

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Hana Gabrielová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení obsahu vitamínu C v jahodách

Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Hana Gabrielová**
Osobní číslo: **C21348**
Studijní program: **B0531A130025 Chemie**
Téma práce: **Stanovení obsahu vitamínu C v jahodách**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na analýzu vitamínu C v jahodách a případně v dalším ovoci či zelenině. Zaměřte se na možnosti extrakce vitamínu C z přírodní matrice a na jeho analýzu s využitím klasických i moderních analytických metod.
2. Diskutujte využití různých typů metod pro zjištění obsahu vitamínu C a vyberte nejvhodnější metodu pro experimentální stanovení jeho obsahu ve vzorcích čerstvých či konzervovaných jahod.
3. Výsledky porovnejte a kriticky zhodnoťte.

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

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **7. února 2024**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2024

PROHLÁŠENÍ:

Práci s názvem Stanovení obsahu vitamínu C v jahodách 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 27. 6. 2024

Hana Gabrielová v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto cestou vyjádřila své poděkování vedoucí mé bakalářské práce, paní doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D., za její neocenitelnou podporu, odborné rady a trpělivost během celého procesu psaní této práce.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením obsahu vitamínu C v čerstvých jahodách a v jahodách různým způsobem konzervovaných (sušených, lyofilizovaných a mražených). Cílem bylo zjistit, jak různé způsoby konzervace ovlivňují množství tohoto důležitého vitamínu. Pro analýzu byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie se spektrofotometrickou detekcí. Výsledky této práce prokázaly nepříznivý vliv vysoké teploty na celkový obsah vitamínu C a tedy, že sušení je nejméně vhodnou konzervační metodou z hlediska zachování tohoto vitamínu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Vitamín C, jahody, HPLC, lyofilizace, sušení, konzervace

TITLE

Determination of vitamin C content in strawberry

ANNOTATION

This bachelor's thesis focuses on determining the content of vitamin C in fresh strawberries and strawberries preserved in various ways (dried, lyophilized, and frozen). The aim was to find out how different preservation methods affect the amount of this important vitamin. High-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection was used for the analysis. The results of this study demonstrated the adverse effect of high temperature on the total vitamin C content, indicating that drying is the least suitable preservation method in terms of retaining this vitamin.

KEYWORDS

Vitamin C, strawberries, HPLC, lyophilization, drying, conservation

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	11
ÚVOD	12
1 Ovoce a zelenina.....	13
1.1 Dělení zeleniny	13
1.2 Dělení ovoce	13
1.3 Jahody	13
1.3.1 Složení jahod.....	14
2 Konzervace potravin	16
2.1 Sušení.....	16
2.2 Lyofilizace	17
2.3 Blanšírování	18
2.4 Sterilace	19
2.5 Zmrazování a chlazení	19
3 Vitamíny	22
3.1 Vitamín C.....	23
3.1.1 Stabilita vitamínu.....	24
3.1.2 Funkce v organismu.....	25
3.1.3 Zdroje.....	25
3.1.4 Využití	26
3.1.5 Doporučený příjem	26
3.1.6 Hypervitaminóza.....	27
3.1.7 Hypovitaminóza.....	27
3.1.8 Avitaminóza.....	27
4 Analytické metody stanovení vitamínu C.....	29
4.1 Extrakce vitamínu C	29
4.2 Chromatografie	29
4.2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	30

4.3 Jodometrie.....	31
4.4 Voltametrie	32
4.5 Polarografie.....	33
4.6 Coulometrie	33
4.7 Fluorimetrie	34
4.8 UV/VIS spektrometrie	35
5 Experimentální část.....	36
5.1 Vzorky	36
5.2 Chemikálie	36
5.3 Pomůcky	36
5.4 Přístroje.....	37
5.5 Úprava vzorků.....	37
5.5.1 Čerstvé jahody	37
5.5.2 Sušené jahody	38
5.5.3 Lyofilizované jahody	38
5.5.4 Mrazené jahody.....	38
5.6 Vlastní stanovení.....	39
5.6.1 Kalibrace	39
5.6.2 Stanovení kyseliny askorbové ve vzorcích jahod	39
5.7 Výsledky stanovení.....	39
Závěr	43
Použitá literatura	44

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Tabulka 1 – Obsah živin obsažených ve 100 g čerstvých jahod, jablek a pomerančů	15
Tabulka 2 – Fyzikální fázové jevy předcházející sublimačnímu sušení	18
Tabulka 3 – Obsah vitamínu C v kompotech a šťávách po sterilaci ve srovnání s čerstvým ovocem	19
Tabulka 4 – Ztráty vitamínu C v ovoci a zelenině po rozmrazení	21
Obrázek 1 – Struktura kyseliny L-askorbové	23
Obrázek 2 – Degradace kyseliny L-askorbové na kyselinu dehydroaskorbovou a kyselinu 2,3-diketogulonovou	23
Tabulka 5 – Obsah vitamínu C v důležitých potravinových zdrojích	26
Obrázek 4 – Redoxní reakce vitamínu C a jodu	32
Obrázek 5 – Kalibrační křivka pro stanovení kyseliny askorbové.	40
Tabulka 6 – Výsledky stanovení vitamínu C ve vzorcích jahod.	41
Tabulka 7 – Výsledky stanovení vitamínu C v lyofilizovaných jahodách.	42

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AA – kyselina askorbová

DHAA – kyselina dehydroaskorbová

EDTA – kyselina ethylendiaminotetraoctová

HLPC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

LC – kapalinová chromatografie

GC – plynová chromatografie

UV – ultrafialové záření

VIS – viditelné záření

DPV – diferenční pulzní voltametrie

CV – cyklická voltametrie

GCE – skleněná uhlíková elektroda

ÚVOD

Konzervace potravin je nedílnou součástí jejich zpracování pro prodloužení doby životnosti. Konzervaci lze provádět rozmanitými způsoby, nejčastější je použití vyšších či nižších teplot, které zamezují množení mikroorganismů, zapříčiňující ztrátu nutričních hodnot potravin a jejich kažení. Při využití konzervace vysokými teplotami můžeme hovořit například o sterilaci či sušení. Jako metody konzervace za nízkých teplot je využíváno chlazení, mrazení či lyofilizace potravin. Konzervace potravin však není dokonalý proces, a tak i při ní dochází k jistému znehodnocování potraviny o určité nutriční složky.

U ovoce a zeleniny nejčastěji dochází ke ztrátě vitamínů. Významným z nich je vitamín C, který v lidském těle podporuje imunitní systém, účastní se procesů vstřebávání železa, tvorby kolagenu a působí také jako antioxidant který snižuje riziko tvorby a šíření volných radikálů. Nejbohatší na obsah tohoto vitamínu jsou zelenina a ovoce, zejména citrusové plody, ale i jahody. Obsah vitamínu C je velmi závislý na teplotě, které je potravina vystavována, jelikož při vysokých teplotách vitamín C degraduje a také rychleji dochází k jeho oxidaci vlivem vzdušného kyslíku, či stykem s ionty kovů. Z tohoto důvodu se tato bakalářská práce zabývá stanovením ztráty obsahu vitamínu C v jahodách, porovnáním hodnoty jeho množství v čerstvých plodech a hodnot v jahodách sušených, lyofilizovaných a mrazených.

Pro tato stanovení byla využita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), jakožto v praxi nejvyužívanější a nejvhodnější metoda pro stanovení vitamínu C.

1 OVOCE A ZELENINA

Ovoce a zelenina představují rostlinnou složku lidské potravy. Udává se, že pro správnou výživu člověka by měla zelenina tvořit ideálně jednu čtvrtinu celkového příjmu potravy [1,2].

V potravě zaujímají ovoce a zelenina významnou a nenahraditelnou roli jako zdroje sacharidů, bílkovin, tuků, organických kyselin, ale hlavně vitamínů a minerálů. Také jsou důležité pro svůj obsah biologicky aktivních látek nápomocných při prevenci ale také léčbě nemocí zažívacích orgánů, nervového systému, kardiovaskulárních onemocnění a dalších [1,2].

1.1 DĚLENÍ ZELENINY

Zelenina je dělena do několika skupin podle částí, pro které je konzumována. Jedná se o košťálovou zeleninu (hlávkové zelí a květák), kořenovou zeleninu (mrkev a celer), zeleninu plodovou (rajče a paprika), cibulovou (cibule a česnek) a luskovou (hrách a fazole). Dále na listovou zeleninu (salát a špenát) a zeleninu kořeninovou (kopr a majoránka), která se používá jako koření pro dochucování pokrmů [1,2].

1.2 DĚLENÍ OVOCE

Ovoce dělíme do čtyřech skupin podle charakteru daného plodu, a to na jádroviny, peckoviny, skořápkoviny, subtropické ovoce a drobné plody. Pro jádroviny je typické umístění více semen v jadřinci uvnitř plodu, který je obrostlý hojně vyvinutou dužinou. Řadí se zde jablko, hruška, jeřabiny a další. Mezi peckoviny se řadí například meruňka, broskev nebo třešeň. Tyto plody mají jedno semeno uvnitř tvrdé pecky pokryté dužinou. Mezi skořápkoviny řadíme ořechy jako mandle, lískové ořechy, pekanové ořechy či kaštiny a jako drobné ovoce označujeme jahody, borůvky, maliny a další [2].

1.3 JAHODY

Jahody jako takové zaujímaly své místo v potravě člověka již v době kamenné, ale zprávy o jejich cíleném pěstování se dochovávají až z dob středověku. Různým křížením planých druhů jahodníků již patrně v roce 1766 vznikla dnešní nejpěstovanější odrůda jahodníku velkoplodého. Pěstování této rostliny však nesloužilo pouze

k získávání potravy, ale plody i listy jahodníku se také dříve využívaly k léčitelským účelům pro přípravu čajů, které měly vliv na léčbu průjmových stavů či onemocnění močových cest [3].

Jahodník je považován za nejvíce pěstovaný druh drobného ovoce u nás a také nejvíce oblíbený, ať už pro vysokou kvalitu sklizených plodů, tak pro rychlost růstu a dozrávání těchto plodů. Jedná se o ovocnou vytrvalou rostlinu mnoha odrůd, jejíž plodem je jahoda, patřící do rodu *Fragaria* z čeledi růžkovitých. Nejčastěji pěstovaným druhem je kříženec jahodník velkoplodý (*Fragaria ananassa*). Jedná se o velmi rozšířený druh pěstovaný takřka všude po světě. Největší celosvětovou produkci však zastávají státy středomořského klimatu jako Kalifornie, Španělsko, jižní Itálie a jižní Francie [2–4].

Jahoda je souplodím nažek, které jsou na povrchu pokryty semeny. Ve zralém stavu má jahoda na povrchu červenou barvu, která se uvnitř ztrácí až do barvy bílé. Velikost a tvar jahod závisí na pěstované odrůdě a podmínkách prostředí ve kterém plod vyrůstá. Obvykle se ale délkově pohybuje kolem 2-5 cm [4].

1.3.1 SLOŽENÍ JAHOD

Jahody mají vysoký obsah vody a nízkou energetickou hodnotu. V porovnání s jiným ovocem neobsahují jahody ani významné množství vlákniny. Jsou však významné jako zdroje vitamínu C, kterého obsahují více než některé citrusové plody. Dále obsahují stopové množství aminokyselin a železa, čímž jahody pozitivně ovlivňují krevtvorbu. V tabulce 1 jsou pro porovnání uvedeny nutriční hodnoty jahod, jablka a pomeranče [3,4].

Tabulka 1 – Obsah živin obsažených ve 100 g čerstvých jahod, jablek a pomerančů [4].

Výživové údaje	Jahoda	Jablko	Pomeranč
Voda (g)	91,57	83,93	86,75
Energie (kcal)	30	59	47
Energie (kJ)	127	245	197
Bílkoviny (N x 6,25; g)	0,61	0,19	0,94
Tuky (g)	0,37	0,36	0,12
Cholesterol (mg)	0	0	0
Sacharidy (g)	7,02	15,25	11,75
Vláknina (g)	0,53	0,77	0,43
Vápník (mg)	14	7	40
Hořčík (mg)	10	5	10
Fosfor (mg)	19	7	14
Draslík (mg)	166	115	181
Kyselina askorbová (mg)	56,7	5,7	53,2
Kyselina listová (μg)	17,7	2,8	30,3
Vitamín A (μg)	8,1	1,5	6,3

2 KONZERVACE POTRAVIN

Potraviny mohou vlivem mikroorganismů, enzymů, nevhodných podmínek a jimi vyvolanými fyzikálně-chemickými procesy ztrácet na svých výživových hodnotách až dochází k jejich zkažení a nepoživatelnosti. Z tohoto důvodu se potraviny začaly upravovat pomocí speciálních procesů nazývaných konzervační procesy. Tyto procesy do jisté míry zabraňují rozkladným procesům a prodlužují tak životnost potravin. Konzervace může probíhat trojím mechanismem: hubením mikroorganismů, zastavením činnosti enzymů anebo jejich úplnou inaktivací. Dle použitých prostředků se dělí na chemickou konzervaci, při které se používá přídavek konzervačních látek, biologickou konzervaci zajištěnou činností bakterií a kvasinek či fyzikální konzervaci prováděnou například změnou teploty [5].

2.1 SUŠENÍ

Sušení potravin (dehydratace) je jeden z nejstarších druhů konzervace potravin využívající většinou vysokých teplot k odpaření těkavé kapaliny. Odstraněním vody dochází v potravine ke změně prostředí, které se stává nevyhovujícím pro přežití mikroorganismů způsobující rozkladné procesy a pro funkci enzymů (oxidás) katalyzující biochemické reakce, které jsou rovněž příčinou znehodnocování potravin. Proces sušení se provádí varem či teplým vzduchem a lze ho rozdělit do třech částí. První část zodpovídá za zahřátí potravin, ve druhé je udržována konstantní rychlost sušení a ve fázi třetí se rychlost sušení snižuje až na nulovou hodnotu. Nejeekonomičtější pro tento proces je krátká doba sušení za co nejvyšší přípustné teploty a nejmenšího přístupu vzduchu, kvůli znehodnocení sušených potravin. V průmyslu se pro ovoce a zeleninu pohybují teploty sušení obvykle v rozmezí 60 až 90 °C [5–7].

Aby nedocházelo k nadměrným ztrátám složek potravin vlivem jejich nestability při vysoké teplotě a také k nadměrnému narušení jejich struktury, je pro ovoce doporučeno sušit na přibližně 15-20 % zbytkové vlhkosti a pro zeleninu na 5-10 % [7].

Proces sušení je prováděn v kontinuálně i diskontinuálně pracujících zařízeních s použitím protiproudu, souproudu nebo křížového proudění sušicího média. V průběhu sušení je sledována hmotnost sušené suroviny, jejíž úbytek v závislosti na čase tvoří

křivku sušení, dle které lze rozeznat jednotlivé fáze sušení zmíněné výše, a také samotnou rychlost sušení [6].

Vysušené potraviny mohou po odpaření vody získat pevnou až tvrdou, polotvrdou nebo práškovitou konzistenci. Mezi základní požadavky při využití sušení je, aby nedošlo k přílišnému poškození či rozdrčení suroviny, která by se totiž po případné rehydrataci měla co nejvíce podobat původní surovině. Stejný nárok je kladen také na složení potraviny, a proto je teplota sušení vhodně volena tak, aby co nejméně poškodila látky náchylné na vysoké teploty. V některých případech jsou potraviny před samotným sušením podrobeny dalším operacím usnadňující jejich konzervaci pomocí sušení, jako třeba proslazování či předvaření. Pro některé druhy zeleniny je krátké předvaření ve slané vodě klíčové pro inaktivaci enzymů způsobujících mimo hnědnutí potraviny také ztrátu vitamínu C [5,6].

2.2 LYOFILIZACE

Jedná se o jeden z finančně nejnákladnějších způsobů sušení potravin, který využívá fázové přeměny vody z pevného na plynné skupenství, která se nazývá sublimace. Proto je lyofilizace často nazývána jako sublimační sušení. Tento proces probíhá za nízkých teplot a tlaků, a tak je vhodný pro konzervaci potravin obsahující tělu prospěšné látky, jako vitamíny, u kterých by při využití vysokých teplot mohlo dojít k jejich poškození, a tedy i znehodnocení konzervované potraviny. Pro tyto vlastnosti se lyofilizace používá také ve zdravotnictví k odstranění vody například z krevní plazmy [8].

Proces je rozdělen do dvou fází. V první fázi je sublimací snížen obsah vody v potravine přibližně na 15 % a ve fázi druhé je pak zbylá voda desorbována na konečný obsah vody v potravine činící zhruba 2 %. Proces lyofilizace začíná u zmrazení potraviny, a tedy i vody obsažené v ní. Snížením tlaku a ochlazením pod hodnoty trojného bodu vody (62,28 Pa, 0,01 °C) je dosaženo vhodných podmínek pro sublimaci ledu na vodní páru. Jelikož je ale skupenské teplo sublimace ledu rovno 2830 kJ/kg je nutné k započetí procesu sublimace dodat teplo. To může být dodáváno dvěma způsoby, a to kontaktně nebo radiací. Vzniklá vodní pára je následně odváděna do výparníku, kde kondenzuje [8].

V důsledku snižování teploty dochází před zahájením sublimačního sušení postupně k několika fyzikálním a fázovým jevům závislých na určitém rozmezí teplot, které jsou uvedeny v tabulce 2 [8].

Tabulka 2 – Fyzikální fázové jevy předcházející sublimačnímu sušení [8].

Teplota (°C)	Fyzikální a fázové jevy
-1 až -1,5	Ochlazování materiálu
-1 až -3	Zmrznutí strukturně volné vody
-2 až -20	Zamrzání immobilizované nebo volné vlhkosti
-20	Eutektická hranice roztoků solí v buňkách resp. Tkáních
-20 až -65	Vymrzání vázané vlhkosti
-65 a nižší teploty	Sublimační sušení

2.3 BLANŠÍROVÁNÍ

Jedná se o tepelnou úpravu, která se provádí u většiny ovoce a zeleniny před jejich konzervací, pomocí procesu mrazení, pasterace nebo tepelné sterilace. Potravina je při tomto procesu na krátkou chvíli zahřáta, většinou na teploty okolo 60 °C, při čemž dochází k inaktivaci enzymů zvaných lipoxygenasa, polyfenoloxidasa, polygalakturonasa a chlorofylasa. Při blanšírování musí dojít k prohrátí a zastavení funkce enzymů v celém objemu potraviny, protože je-li proces blanšírování proveden nesprávně, mohou jeho účinky naopak zvýšit aktivitu enzymů a probíhající rozkladné procesy jsou takto urychleny [6,9].

Blanšírování sebou přináší i další výhody jako likvidaci tkáňových plynů, díky kterým může potravina podléhat oxidačním změnám. Dále snižuje míru zamoření mikroorganismy až o 99 % a zvyšuje míru permeability tkání. Proces blanšírování je však nevýhodný pro látky rozpustné ve vodě, které se při něm z potraviny vyplavují [9].

2.4 STERILACE

Při sterilaci dochází k ošetření potravin za vysokých teplot (nad 100 °C). Při těchto teplotách dochází k inaktivaci enzymů a usmrcení mikroorganismů, čehož však můžeme docílit i při nižší teplotě, většinou nad 55 °C [9].

Teplota při sterilaci je závislá na vlhkosti a hodnotě pH potraviny, míře kontaminace mikroorganismy a času působení této vysoké teploty na potravinu. Například pro ovoce s nízkou hodnotou pH jsou teploty do 100 °C dostačující, zatímco pro zeleninu či maso je nutné sterilační teplotu zvýšit, nebo proces sterilace provést opakovaně [5].

Pro sterilaci jsou využívány tlakové nádoby zvané autoklávy, ve kterých je potravina za zvýšeného tlaku vystavována teplotě okolo 120 °C. Alternativou sterilace v autoklávu je opakovaně prováděná sterilace ve vodní lázni, kde je dosahováno teplot pouze okolo 98 °C. Časový úsek, po který je nutné potravinu sterilovat, se odvíjí od použité sterilační teploty a platí, že čím vyšší teplotě je potravina vystavena, tím kratší dobu je nutné sterilaci provádět [5].

Tabulka 3 – Obsah vitamínu C v kompotech a šťávách po sterilaci ve srovnání s čerstvým ovocem [10].

Ovoce	Retence vitamínu C po sterilaci
broskve	23–25 %
hrušky	50 %
jahody	77 %
maliny	78–98 %
meruňky	60 %
švestky	87 %
višně	67 %
rajčatová šťáva	35–90 %

2.5 ZMRAZOVÁNÍ A CHLAZENÍ

Principem konzervace potravin snižováním teploty je současné snížení aktivity přítomných mikroorganismů a také snížení rychlosti enzymatických a biochemických

reakcí zodpovědných za kažení potravin. K tomuto efektu dochází v momentu, kdy je veškerá volná voda v potravine, ve které tyto reakce probíhají, zmrazená na led a v kapalném skupenství zůstává pouze voda vázaná. Tento druh konzervace bývá často kombinován s procesy konzervace inaktivací enzymů, jelikož v průběhu mrazení může docházet ke koncentrování rozpuštěných složek v nezmrzlé části vody, což může probíhající reakce urychlit natolik, že se vyrovná zpomalení reakcí působením nízké teploty, nebo dojde dokonce k urychlení celého procesu [6].

Udává se, že pro konzervaci mrazením a zastavení rozkladných procesů všech mikroorganismů přítomných v potravinách, včetně plísní, je nutno tyto potraviny zmrazit minimálně na teplotu $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nedochozí však vždy k jejich usmrcení, a proto můžeme u rozmrazených potravin pozorovat daleko rychlejší rozkladný proces vlivem chemických a fyzikálních změn vzniklých při mrazení potraviny. Pro omezení funkčnosti enzymatických systémů se pro zmrazování používají i teploty nižší než $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ [6].

Při mrazení potravin je důležitá rychlost tohoto procesu. Pro co nejmenší poškození potravin a zajištění co nejmenších ztrát živin je nutné co nejrychleji překonat rozmezí teplot 0 až $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$, kdy dochází k tvorbě velkých krystalů ledu náhodného rozmístění, které narušují strukturu buněk. Po rozmrazení takto zmrzlá voda spolu s živinami vytéká i spolu s rozpuštěnými živinami a potravina získává měkkou konzistenci [5].

Chlazení potravin je oproti mrazení velmi neinvazivní proces, při kterém nedochází k fyzikálním ani chemickým změnám. Díky této skutečnosti potraviny, které přestaneme udržovat při nízké teplotě budou mít následně delší trvanlivost než potraviny rozmrazené [5,6].

Tabulka 4 – Ztráty vitamínu C v ovoci a zelenině po rozmrazení [10].

	Doba skladování při -18 °C (měsíce)	Průměrné ztráty vitamínu C v rozmrazené zelenině a ovoci (%)
brokolice	6–12	35–68
květák	6–12	40–60
hrášek	6–12	32–67
špenát	6–12	54–80
jahody	8	39–51
maliny	6–7	27–40
rybíz černý	6–8	32–44
rybíz červený	8	30

3 VITAMÍNY

Jako vitamíny označujeme nízkomolekulární organické látky nezbytné pro správnou funkci metabolismu lidského organismu. Jedná se o sloučeniny, které ve většině případů heterotrofní organismy nedokáží syntetizovat, a proto je nutné zajistit jejich dostatečný příjem v potravě či doplňcích stravy. Často jsou takto však místo vitamínů přijímány spíše látky bez fyziologických účinků, které slouží jako zdroje pro syntézu vitamínů naším organismem. Tyto látky jsou chemicky blízké vitamínům a nazývají se provitamíny [11,12].

Vitamíny bývají nazývány exogenními esenciálními biokatalyzátory, jelikož jsou mimo jiné častou součástí katalyzátorů důležitých biochemických reakcí v našem těle. Mohou zde figurovat jako kofaktory enzymatických systémů, součást těchto systémů, nebo se biochemických procesů účastní přímo. Další jejich významnou vlastností jsou jejich antioxidační účinky a posilování obranyschopnosti vůči nádorovým, kardiovaskulárním a degenerativním onemocněním [11–13].

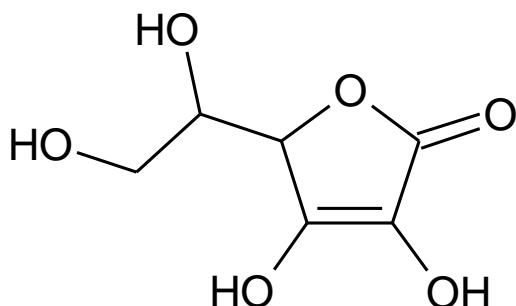
Nejběžnější dělení vitamínů je dle rozpustnosti na vitamíny rozpustné v tucích (lipofilní) a vitamíny rozpustné ve vodě (hydrofilní). Mezi lipofilní vitamíny se řadí vitamín A (retinol), D (karciferol), E (tokoferol) a K (fylochinon). Tyto vitamíny se ukládají v tělesných tkáních a podle potřeby jsou zejména v játrech či ledvinách přeměňovány na své volné formy. Hydrofilní vitamíny zahrnují vitamíny skupiny B (thiamin, riboflavin, niacin, biotin, pyridoxin, folacin, kyselina pantothenová a kobalamin) a vitamín C (kyselina L-askorbová) [11–13].

Doporučený denní příjem vitamínů se liší jak podle země, ve které žijeme, tak podle fyzického stavu člověka. Hodnoty jsou rozdílné pro jednotlivá pohlaví, pro různé věkové skupiny a jsou posuzovány také s ohledem na zdravotní stav a životní styl člověka. Na základě množství přijatých vitamínů rozlišujeme hypervitaminózu, hypovitaminózu a avitaminózu. Hypervitaminóza je způsobená nadměrným příjmem vitamínů rozpustných v tucích, jelikož se ve velkém množství ukládají do tukových tkání a mohou způsobit poškození biochemických procesů. U hydrofilních vitamínů je tato situace nepravděpodobná, protože nadbytek těchto vitamínů je vylučován močí ven z organismu. Naopak hypovitaminóza je způsobena příjmem vitamínu v nedostatečném množství, což se projevuje poškozením funkcí organismu a biochemických procesů.

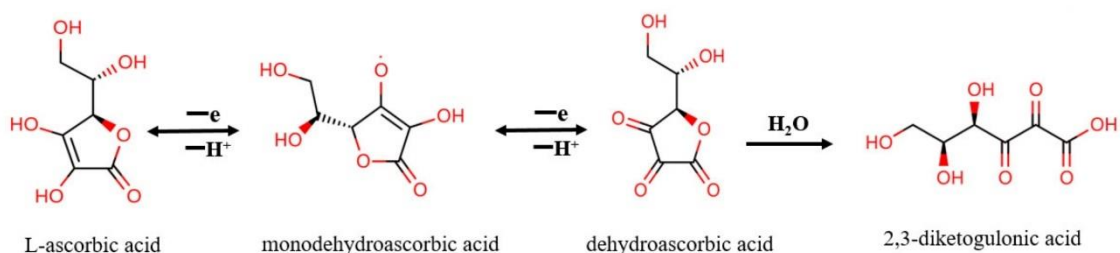
Pokud je příjem některého vitamínu dlouhodobě omezen úplně, mluvíme o avitaminóze, se kterou jsou rovněž spojeny poruchy funkcí organismu, ale také vznik závažných onemocnění jako je beri-beri, pelagra nebo kurděje [11,13,14].

3.1 VITAMÍN C

Vitamín C, známý také jako kyselina L-askorbová (obrázek 1), se řadí k derivátům glukosy. Je rozpustný ve vodě a nezbytný pro biochemické procesy našeho organismu. Tento vitamín je pro lidský organismus esenciální, jelikož jej díky mutaci v genetickém kódu L-glukonolaktonoxidázy není naše tělo schopno samo syntetizovat. Ve vodných roztocích je kyselina askorbová velmi silným redukčním činidlem a tvoří reversibilní oxidačně-redukční systém účastníci se reakcí s přenosem dvou elektronů. Tento systém tvoří kyselina L-askorbová, askorbát (monoanion), kyselina semidehydro-L-askorbová (volný radikál) a kyselina L-dehydroaskorbová (obrázek 2). Tento reversibilní redoxní systém zaniká rozštěpením kruhové struktury kyseliny L-dehydroaskorbové a vitamín C tak ztrácí svoji aktivitu [4,10].



Obrázek 1 – Struktura kyseliny L-askorbové [15].



Obrázek 2 – Degradace kyseliny L-askorbové na kyselinu dehydroaskorbovou a kyselinu 2,3-diketogulonovou [16].

3.1.1 STABILITA VITAMÍNU

L-askorbová kyselina patří k nejméně stabilním vitamínům. K největším ztrátám dochází vlivem skladování a zpracování potravin z nichž nejpodstatnější jsou ztráty výluhem vitamínu C a ztráty jeho oxidací se vzdušným kyslíkem či degradací za katalýzy kyselinami bez přístupu vzduchu. Z fyzikálních činitelů ovlivňují jeho stabilitu zejména teplota a vlhkost [15].

Vitamín C je velmi náchylný k oxidačním reakcím, ke kterým dochází vlivem působení enzymů spadajících do kategorie antivitaminů C. Oxidace kyseliny askorbové může probíhat jednoelektronově, kdy jako meziproduct vzniká její radikál anebo dvouelektronově za přímého vzniku kyseliny dehydroaskorbové (DHAA). Jedním z působících enzymů je askorbát oxidáza, přítomná v rostlinných pletivech, která oxiduje vitamín C jednoelektronovým mechanismem. Pro zamezení jejího působení se ovoce a zelenina podrobuje blanšírování. Vzniklá dehydroaskorbová kyselina je redukována zpět na vitamín C například cysteinem či glutathionem. Nejvýznamnější reakcí však zůstává takzvaná autooxidace, kdy dochází ke ztrátám vitamínu C jeho oxidací vzdušným kyslíkem [15].

Ve vodných roztocích je vitamín C nestabilní a jeho degradace je považována za primární příčinu změn kvality a barvy potravin při jejich skladování. Nestabilita je způsobena neutrálním pH vody, jelikož stabilita tohoto vitamínu významně roste spolu s klesajícím pH prostředí a je méně náchylný k oxidaci. Proto se v potravinách využívá stabilizace kyselou přísadou jako může být například kyselina citronová, jablečná, fosforečná či kyselina vinná. Degradace vitamínu může být způsobena také jeho vysokou koncentrací, kdy začíná docházet k autooxidaci, jejíž průběh je rovněž závislý na pH prostředí [16–18].

Vysokou teplotou jsou urychlovány jak enzymatické reakce v potravinách, tak oxidační reakce zapříčiňující degradaci účinné formy vitamínu C. Pro zamezení ztrát vlivem teploty by měl být vitamín C vystavován teplotám nejlépe od -18 do 4 °C. Při pokojové teplotě je vitamín stabilní po dobu několika dní, poté už ale vlivem vzdušného kyslíku a světla dochází ke ztrátám. Kritická teplota, při které vitamín C začíná významně degradovat je 70 °C, kdy dochází ke ztrátám až 20 % a více v závislosti na době

vystavení této teplotě. Při teplotách nad 100 °C již dochází k téměř úplnému znehodnocení vitamínu [16,19,20].

3.1.2 FUNKCE V ORGANISMU

Vitamín C má v lidském těle enzymatickou i chemickou funkci a je rovněž kofaktorem důležitých enzymatických reakcí jako je například metabolismus některých aminokyselin a také kolagenu. Podílí se zejména na hydroxylačních reakcích a účastní se také biosyntéz mukopolysacharidů a prostaglandinů. Významně ovlivňuje vstřebávání železa v lidském organismu svojí schopností absorpce jeho iontových forem a napomáhá tak i jeho transportu. Urychluje také přenos sodných a chloridových iontů a je potřebný také v metabolismu cholesterolu [4,15].

Nejvíce významnými hydroxylacemi, na kterých se vitamín C podílí je hydroxylace prolinu za vzniku 3-hydroxyprolinu a hydroxylace lysinu, která koreluje s biosyntézou proteinů pojivových tkání a jejíž produktem je 5-hydroxylysin [15].

Je považován rovněž za nejdůležitější antioxidant v extracelulárním i mezibuněčném prostoru díky své schopnosti reagovat s volnými radikály darováním elektronu za vzniku askorbylradikálu, jež není schopen uskutečnit další řetězovou reakci [4,15].

Vitamin C je také známý svými silnými antioxidačními schopnostmi, které mu umožňují efektivně neutralizovat toxické volné radikály a další reaktivní formy kyslíku, jež se tvoří při buněčném metabolismu. Díky těmto vlastnostem chrání tkáň před poškozením a zánětem a zároveň zpomalují proces stárnutí [21].

3.1.3 ZDROJE

Nejspolehlivějším zdrojem vitamínu C je čerstvá zelenina a ovoce, přestože se řadí ke zdrojům s průměrným obsahem. Jedná se totiž o nejkonzumovanější zdroje, které jsou pro člověka celoročně dostupné. Patří mezi ně zejména citrusové plody jako citrony, pomeranče, limetky ale také jahody, brambory, papriky či rajčata. V dnešní době je kyselina askorbová také průmyslově vyráběna složitými chemickými a biotechnologickými postupy z D-glukózy [10,11,16].

Tabulka 5 – Obsah vitamínu C v důležitých potravinových zdrojích [4].

Potravina	Obsah vitamínu C (mg/100 g)	Potravina	Obsah vitamínu C (mg/100 g)
Zelenina			
brokolice	115	brambory, vařené	7
brokolice, mrazená	54	červená paprika	195
brokolice, vařená	37	zelená paprika	86
květák	70	špenát, mrazený	16
květák, mrazený	49	špenát, vařený	12
zelí	45	mrkev	5
zelí, vařené	24	mrkev, mrazená	4
zelené fazole, mrazené	24	mrkev, konzervovaná	3
brambory	24		
Ovoce			
pomeranč	55	jablko	9
pomerančová šťáva	34	broskev	7
citron	49	meruňka	10
bezinka	29	meruňka, sušená	2
banán	11	jahody	56,7
hroznové víno	11		

3.1.4 VYUŽITÍ

Díky svým oxidačním vlastnostem je vitamín C hojně využíván jako přísada v potravinářském průmyslu, zajišťující zlepšení chuti, barvy a také obnovení neaktivní formy vitamínu C vzniklé během zpracování a skladování potravin [4].

3.1.5 DOPORUČENÝ PŘÍJEM

Doporučený denní příjem vitamínu C se pohybuje okolo 60-200 mg. Je známo že již dávky o 10 mg denně jsou dostačující k předejití onemocnění z dlouhodobého

nedostatku vitamínu C zvaném kurděje nebo také skorbut. Doporučené denní dávky se liší podle věku a zdravotního stavu člověka, v současné době je doporučováno pro dospělého ženu příjem 75 mg a dospělého muže 90 mg na den. Uvádí se, že dávka 100 mg je ideální pro udržování maximální zásoby vitamínu C v organismu, činící 3 g. Dávky nad 200 mg jsou již pro lidský organismus za běžných podmínek a zdravotního stavu zbytečné, jelikož při překročení této hranice dochází ke zrychlování vylučování vitamínu C močí [10,15,20].

3.1.6 HYPERVITAMINÓZA

Jelikož je kyselina askorbová vitamínem rozpustným ve vodě, je předávkování, a tedy i hypervitaminóza takřka nemožná. Spíše, než příznaky intoxikace vitamínem C se objevují vedlejší účinky v podobě například snížené hladiny kobalaminu. V ojedinělých případech ale může nadbytek vitamínu C v podobě 2 až 3 g za den způsobit gastrointestinální potíže v podobě průjmů, nevolnosti a křečí. Dlouhodobý nadbytek má za následek zvýšenou tvorbu ledvinových kamenů. Nadbytečný příjem vitamínu C je nepříznivý pro jedince s hemochromatózou, což je metabolická porucha způsobující nadměrné vstřebávání železa, jelikož vitamín C tomuto vstřebávání významně napomáhá [10,20].

3.1.7 HYPOVITAMINÓZA

Hypovitaminóza je častá zejména v jarních měsících, jelikož ovoce a zelenina v tomto období obsahuje nižší množství vitamínu C. Dostává se tehdy, pokud tělo není dostatečně zásobeno z potravy alespoň podle doporučených denních příjmů, nebo je-li vlivem nadměrné fyzické zátěže, stresem, infekčním onemocněním či nadměrným užíváním drog a alkoholu či kouřením významně zvýšena jeho spotřeba. Mezi příznaky nedostatečného příjmu kyseliny askorbové patří únava, krvácení dásní, chudokrevnost, horší odolnost vůči infekčním onemocněním či zvýšená tvorba modřin [13].

3.1.8 AVITAMINÓZA

Avitaminóza je stav dlouhodobého nedostatku vitamínu C v potravě. Takovýto stav je v dnešní době už velmi vzácný, jelikož jeho předcházení stačí už pouhých 10 mg vitamínu C v denním příjmu. Následkem avitaminózy je nemoc zvaná kurděje či

skorbut. Při tomto onemocnění, které v dřívějších dobách postihovalo zejména námořníky, kteří neměli dlouhodobě přístup k čerstvému ovoci či zelenině, dochází k poškozování pojivových tkání. Toto onemocnění doprovází rovněž extrémní únava, kožní léze, svalová atrofie a revmatické bolesti v oblasti dolních končetin. V některých případech byly kurděje pro člověka i smrtelné [15,20].

4 ANALYTICKÉ METODY STANOVENÍ VITAMÍNU C

Díky známé chemické struktuře vitamínu C je možné jej v dnešní době stanovovat hned několika analytickými metodami. Jedná se o metody titrační, elektrochemické, spektrofotometrické či chromatografické. Volba metody závisí na požadované citlivosti, selektivitě a formě vzorku. Nejvyužívanější z těchto metod je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) [4,16,20].

4.1 EXTRAKCE VITAMÍNU C

Extrakce vitamínu C z matrice vzorku je prováděna v závislosti na vybrané analytické metodě stanovení. Během extrakce by se mělo zabránit degradaci vitamínu C vlivem rozpuštěného kyslíku či přítomnosti kovových iontů nebo enzymů. Mezi některá opatření proti degradaci patří přídavky chelatačních činidel jako je EDTA, uchovávání vzorků v ochranné atmosféře dusíku nebo oxidu uhličitého, zabránění kontaktu se světlem či uchovávání vzorku při nízké teplotě. Extrakce se většinou provádí s využitím vodného roztoku kyseliny pro dosažení optimálního prostředí, jehož hodnota pH se pohybuje pod 2. Nejčastěji se jedná o kyselinu metafosforečnou, octovou, trichloroctovou a kyselinu chloristou. Takto extrahovaný vzorek je následně podroben centrifugací a filtrací [4,22].

Pro podpoření účinnosti extrakce je možno využít ultrazvukové vlny. S použitím 8 % kyseliny octové jako extrakčního činidla se tento postup využívá k extrahování vitamínu C z přírodních matric jako je petržel, kopr a celer [22,23].

4.2 CHROMATOGRAFIE

Jedná se o analytickou separační metodu, která se využívá k dělení směsi látek na základě jejich afinity ke dvou vzájemně nemísitelným fázím, z nichž jedna je mobilní (pohyblivá) a druhá je stacionární (nepohyblivá). Je vhodná jak ke kvalitativní, tak kvantitativní analýze [24].

Podle skupenství mobilní fáze dělíme chromatografii na kapalinovou (LC), kdy je mobilní fáze kapalná a na chromatografii plynovou (GC), kde je mobilní fáze v plynném skupenství. Metody dělíme také podle druhu uspořádání stacionární fáze na kolonovou chromatografii, kde je stacionární fáze umístěná v koloně a chromatografii

v plošném uspořádání, kde je stacionární fáze zakotvená na papíru nebo na v tenké vrstvě na hliníkovou nebo skleněnou destičku. Dále můžeme dělit chromatografii dle převažujícího fyzikálně-chemického děje probíhajícího při separaci na rozdělovací, adsorpční, iontově-výměnnou, gelovou a afinitní [24].

4.2.1 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

HPLC se vyznačuje vysokou citlivostí a přesností. Využívá se proto ve farmaceutickém průmyslu, biochemii, chemii životního prostředí, potravinářském průmyslu a dalších průmyslových a vědeckých odvětvích. Její princip spočívá v separaci vzorku mezi mobilní fází v kapalném skupenství, která protéká kolonou naplněnou pevnou stacionární fází, která je zpravidla tvořená částicemi silikagelu, oxidu hlinitého, oxidu zirkoničitého či organických polymerů, jejichž povrch bývá modifikován různými činidly, čímž dochází k úpravě jejich polaritě a chemických vlastností. Podle polaritě mobilní a stacionární fáze rozlišujeme dva základní chromatografické systémy, systém s normálními fázemi, kdy je stacionární fáze více polární než fáze mobilní, a častěji využívaný systém s obrácenými (reverzními) fázemi, kdy je mobilní fáze polárnější než fáze stacionární [25].

Kapalinový chromatograf se skládá ze zásobníku mobilní fáze, čerpadla, dávkovače, chromatografické kolony a detektoru. Jednoduché schéma přístroje je popsáno na obrázku 3. Z detektorů jsou nejvyužívanější spektrofotometrické či fluorimetrické detektory nebo v dnešní době stále rozšířenější hmotnostní spektrometr. Signál z detektoru je zpracováván počítačovým programem a výstupem je závislost zaznamenaného signálu na čase, který se nazývá chromatogram. Z chromatogramu je podle retenčních charakteristik možné jednak identifikovat neznámé látky (kvalitativní analýza) a také je možné určit množství jednotlivých látek ve vzorku obsažených (kvantitativní analýza). Kvalitativní složení je určováno podle retenčních časů, tedy polohy píku na chromatogramu. Pro kvantitativní analýzu se využívá plocha nebo výška píku sledované látky [24,25].

Při stanovení vitamínu C je HPLC hojně využívaná díky vysoké přesnosti a reprodukovatelnosti výsledků. U vitamínu C je důležité zajistit jeho stabilitu přidávkem stabilizačních látek, které snižují pH, zabraňují jeho oxidaci, a tak zajišťují přesné měření jeho koncentrace ve vzorku. Jako stabilizační látky se využívají například

kyselina metafosforečná nebo kyselina trichloroctová. K detekci je nejčastěji využíván spektrofotometrický detektor, přičemž se pracuje v oblasti vlnových délek 245 až 265 nm, kde se vyskytuje absorpční maximum vitamínu C [23,26–30]. Elektrochemická detekce [31–33] a fluorescenční detekce [34] jsou také používány pro jejich vysokou citlivost a specifitu.

Běžně jsou u stanovení AA využívány kolony na bázi oktadecylsilikagelu a mobilní fáze často obsahují fosfátové pufrы kombinované s organickými rozpouštědly, jako je methanol či ethanol. Pro separaci AA byla také účinně použita kombinace pufru amonného formiátu a methanolu, která sebou v porovnání s běžně používanými mobilními fázemi přináší lepší separační účinnost, kompatibilitu s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie a lepší kompatibilitu s gradientovou elucí [23,26–30,32].

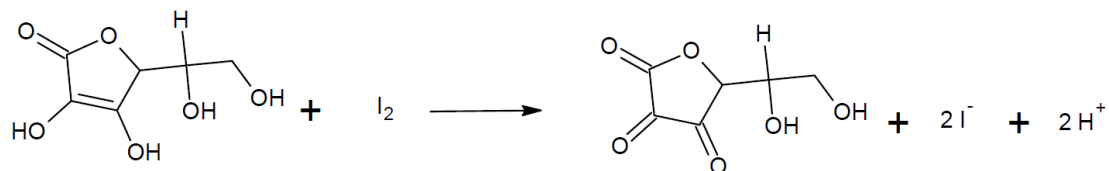
4.3 JODOMETRIE

Jodometrie je jednou z metod odměrné analýzy využívajících oxidačně redukčních vlastností jodu podle reakce v rovnici 1. Jako odměrné roztoky jsou při této analýze využívány roztoky jodu pro oxidimetrická stanovení a thiosíranu sodného pro stanovení reduktometrická. Indikace bodu ekvivalence je zajištěna použitím škrobového mazu, který je v přítomnosti jodu modře zabarven. Oxidimetrická stanovení se provádějí v neutrálním či slabě kyselém prostředí na rozdíl od reduktometrických jež se uskutečňují v prostředí kyselém metodou nepřímé titrace přidáním známého nadbytku jodidu, který je reakcí redukován na jód, jehož přebytek je následně titrován odměrným roztokem thiosíranu sodného [35].



Jedná se o cenově dostupnou a jednoduchou metodu pro stanovení vitamínu C využívající redoxní reakci mezi AA a jodem uvedenou na obrázku 4. Přídavkem jodu se kyselina L-askorbová oxiduje za vzniku jodidu. Přebytečné množství jodu je následně ztitrováno roztokem thiosíranu sodného. Konec titrace je indikován pomocí škrobového mazu, díky kterému se titrovaný roztok vzorku v bodě ekvivalence odbarvuje z modrofialového zabarvení díky redukcí veškerého jodu na jodid. Množství spotřebovaného jodu je úměrné koncentraci kyseliny L-askorbové ve vzorku [36,37].

Stanovení je prováděno taktéž přímou titrací roztokem jodu do vzniku modrého zabarvení vlivem vytvoření komplexu škrobového mazu s jodem [38].



Obrázek 3 – Redoxní reakce vitamínu C a jodu [39].

4.4 VOLTAMETRIE

Voltametrie je elektrochemická metoda, která zkoumá proud generovaný při aplikaci potenciálového rozdílu na pracovní elektrodu. Tato technika využívá potenciostat, který kontroluje potenciál pracovní elektrody vůči referenční elektrodě a měří proud vznikající v důsledku redoxních reakcí na povrchu elektrody. Mezi běžně používané voltametrické metody patří cyklická voltametrie (CV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV) [40,41].

Voltametrické techniky, jako je cyklická voltametrie [42–45] a diferenční pulzní voltametrie [44,46,47], se ukázaly být efektivními nástroji pro kvantitativní analýzu kyseliny askorbové díky jejich schopnosti detekovat elektroaktivní sloučeniny.

Voltametrické stanovení kyseliny askorbové bývá většinou prováděno pomocí DPV a CV technik na pracovní skleněné uhlíkové elektrodě (GCE) nebo elektrodě platinové [43–46].

Podle studie W. Okiei z roku 2009 je pro měření možno využít CV s tříelektrodovou konfigurací. Jako pracovní elektroda byla využita GCE vyleštěná práškem z oxidu hlinitého a jako pomocná byla využita platinová elektroda. Vzorky byly extrahovány v prostředí fosfátového pufru s přidávkem Na₂EDTA a byly probublávány dusíkem po dobu deseti minut. Při měření v rozsahu 200 – 1000 mV byl anodický pík pro oxidaci kyseliny askorbové zaznamenán při 580 mV [43].

4.5 POLAROGRAFIE

Polarografie je jednou z analytických elektrochemických metod fungující na principu měření procházejícího proudu mezi měrnou (polarizovatelnou) a srovnávací (nepolarizovatelnou) elektrodou v roztoku elektrolytu. Od voltametrie se odlišuje použitím odkapávající rtuťové kapkové elektrody. Výsledkem polarografického měření je závislost proudu na vkládaném napětí zvaná polarogram. Na kvalitativní složení vzorku usuzujeme z půlvolných potenciálu v polarogramu a kvantitativní zastoupení látky ve vzorku určujeme dle výšky vlny [35].

Kyselina askorbová je elektrochemicky aktivní látkou, a tak pro její stanovení může být použita také polarografie, využívající její oxidaci na odkapávající rtuťové kapkové elektrodě. Tato metoda stanovení je výhodná pro snadnou přípravu vzorku pro analýzu, svou rychlostí a také pro malé množství vzorku potřebného k analýze [48,49].

AA je silné redukční činidlo, které se velmi snadno oxiduje při vyšších hodnotách pH. Proto se pro přípravu vzorků k polarografickému stanovení kyseliny askorbové používají elektrolyty jako je například pufr z kyseliny octové a oxalové, který udržuje stabilní pH a neinterferuje s anodickou vlnou kyseliny askorbové [48].

Polarografická analýza vitamínu C se provádí pomocí tříelektrodového systému, kde rtuťová kapková elektroda slouží jako pracovní elektroda a platinová jako pomocná elektroda [49].

Pro stanovení nízkých koncentrací AA v různých potravinách je využívána diferenční pulsní polarografie. Tato metoda umožňuje detekovat kyselinu askorbovou při koncentracích až 1 $\mu\text{g/ml}$ s vysokou přesností a reprodukovatelností [49].

4.6 COULOMETRIE

Coulometrická analýza je založena na měření náboje potřebného k úplné přeměně určité látky na jiný oxidační stav. Hlavní předností této metody je možnost použití nestabilních nebo těkavých titračních činidel, které jsou generovány elektrochemickou reakcí na elektrodě, a nikoliv přidávány z byrety jako při klasické volumetrické titraci. Coulometrická titrace může být prováděna dvojím způsobem, a to za konstantního potenciálu, nebo konstantního proudu [24,50,51].

Výzkum ukázal, že nejlepší titrační činidla pro kvantifikaci kyseliny askorbové jsou halogeny, zejména jód a brom, při jejichž použití je dosaženo dobré přesnosti.[50–53].

Pro stanovení kyseliny askorbové se nejčastěji využívá coulometrické titrace založené na oxidaci kyseliny askorbové jódem. Kyselina askorbová je oxidována na dehydroaskorbovou kyselinu při molárním poměru kyseliny askorbové k titračnímu činidlu 1:1. Jód je generován elektrochemickou reakcí na pracovní elektrodě, přičemž celé měření probíhá v ochranné atmosféře dusíku aby nedocházelo k reakci jodu se vzdušným kyslíkem [50–53].

4.7 FLUORIMETRIE

Fluorimetrické stanovení kyseliny askorbové je citlivou analytickou metodou, která umožňuje měřit koncentraci AA na základě fluorescence jejich produktů s různými fluorescenčními činidly. V dostupných studiích jsou popsány různé přístupy využívající různé fluorescenční reagenty a podmínky:

Jednou z metod je fluorimetrická metoda s o-fenylendiaminem, který reaguje s AA za vzniku fluorescenčního produktu. Reakce probíhá bez potřeby oxidantu, což zvyšuje citlivost metody. Excitační a emisní vlnové délky jsou 360 nm a 430 nm. [54,55].

Další metodou je fluorimetrická metoda s beta-cyklodextrinem. Tato metoda využívá snížení fluorescence derivátu β -cyklodextrinu při tvorbě supramolekulárních komplexů s AA. Excitační a emisní vlnové délky jsou 270 nm a 352 nm [56].

Kinetická fluorimetrická metoda s rhodaminem 6G je založena na aktivačním účinku AA na oxidaci rhodaminu 6G bromičnanem draselným za přítomnosti vanadu jako katalyzátoru. Tato metoda je vhodná pro stanovení AA ve farmaceutických výrobcích, ovocných šťávách a zelenině [57].

Poslední metodou je fluorimetrická metoda s 2,3-diaminonaftalenem, kde AA reaguje s 2,3-diaminonaftalenem za vzniku fluorescenčního produktu [58]. Přídavek β -cyklodextrinu výrazně zvyšuje fluorescenci systému. Její hlavní výhody spočívají v jednoduchosti a citlivosti bez potřeby oxidačního činidla a vysoké selektivitě [54,59].

4.8 UV/VIS SPEKTROMETRIE

Jedná se o analytickou optickou metodu pro analýzu kvalitativního i kvantitativního složení zkoumaného vzorku využívající absorpci elektromagnetického záření o vlnové délce v ultrafialové a viditelné oblasti (200–800 nm). Měření je prováděno na přístrojích zvané spektrofotometry skládající se ze zdroje elektromagnetického záření, monochromátoru, kyvety s měřeným vzorkem a detektoru, měřícího intenzitu prošlého záření. Spektrometrie využívá platnosti Lambert-Beerova zákona popisující rovnice 2, který udává vztah mezi absorbcí a koncentrací analytu ve vzorku [60].

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (2)$$

Kde A je naměřená absorbance, ε je molární absorpční koeficient s jednotkou $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, c je koncentrace v molech na litr a l délka absorpční vrstvy v centimetrech.

Vitamín C je pomocí spektrometrie možno stanovovat hned několika způsoby. Ke stanovení lze použít například reakci s 2,6-dichlorindofenolem. Ten má ve své oxidované formě modrou barvu a redukcí AA se mění na bezbarvý, což při měření absorbance při vlnové délce 520 nm způsobuje její pokles, který je úměrný koncentraci AA ve vzorku [61].

S použitím molybdenového činidla dochází k jeho redukcí v prostředí kyseliny sírové vitamínem C na molybdenovou modř, jejíž absorbance je měřena při vlnové délce 760 nm [61].

Stanovení je prováděno také přidavkem roztoku CuSO_4 , neocuproinu a pufracního roztoku ke kyselině askorbové, kdy dochází k redukcí Cu^{2+} , která následně tvoří komplex s neocuproinem, jehož absorbance je měřitelná při použití záření o vlnové délce 460 nm [62,63].

AA lze také oxidovat na DHAA přidavkem bromové vody, jejíž nadbytek je následně odstraněn pomocí thiomocoviny. K takto připravenému roztoku se přidává 2,4-dinitrofenylhydrazin, který s DHAA reaguje za vzniku červeného komplexu jehož absorbance je měřitelná při vlnové délce 521 nm [64].

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 VZORKY

K experimentu byly využity jahody I. jakosti zakoupené v obchodním řetězci Albert v den konání experimentu, které byly v laboratorních podmínkách vysušeny a lyofilizovány. Jahody byly původem ze Španělska a do samotného měření byly uchovávány za nízké teploty v lednici. Dalšími vzorky byly lyofilizované jahody od firmy Emco a čerstvé domácí jahody pěstované na území Pardubic, které byly sklizeny v den měření.

5.2 CHEMIKÁLIE

- Deionizovaná voda připravená pomocí zařízení Milli-Q Reference Shipping Kit (Merck Milipore, Německo)
- Kyselina metafosforečná (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina L-askorbová (Sigma-Aldrich, USA)
- Methanol (čistota HPLC gradient grade, Honeywell, Německo)

5.3 POMŮCKY

- běžné laboratorní sklo (kádinky, hodinová sklíčka, tyčinka, nálevky)
- injekční stříkačky, 1 ml
- stříkačkové PP filtry (0,45 μm , Labicom, ČR)
- skládané filtry
- vialky
- plastové mikrozkuřavky
- mikropipety s nastavitelným objemem (Biohit-Proline, Biohit Finsko)
- váženky
- porcelánová lodička
- plastová lžička

5.4 PŘÍSTROJE

- modulární kapalinový chromatograf složený z čerpadla mobilní fáze LC-20AD, degaseru DGU-3014, spektrofotometrického detektoru SPD-M30A, autosampleru SIL-20AC XR (vše Shimadzu, Kyoto, Japonsko), termostatu kolon LCO 102 single (Ecom, Praha) a kolony Ascentis Express C18 (150 x 3 mm, povrchově porézní částice 2.7 µm) s odpovídající předkolonkou,
- počítačový software LabSolution Lite (Shimadzu)
- homogenizátor ULTRA TURRAX T 18 (Ika, Německo)
- pH metr (Metrohm 827, Švýcarsko)
- ultrazvuková lázeň (Kraintek 12, Slovensko)
- centrifuga 5424 (Eppendorf)
- digitální analytické váhy (Sartorius, Ústí nad Labem)
- lyofilizátor L4-110 PRO (Gregor Instruments)
- laboratorní sušárna UFE 400 (Memmert)

5.5 ÚPRAVA VZORKŮ

Několik vybraných exemplářů jahod bylo nakrájeno na tenké plátky a promícháno, tak aby byly zastoupeny více i méně zralé jahody různé velikosti a barevného odstínu. Tento postup byl proveden u kupovaných i zahradních jahod pro zajištění alespoň nízké reprezentativnosti vzorků. Takto připravené vzorky byly před vlastní analýzou upravené podle níže uvedených postupů.

5.5.1 ČERSTVÉ JAHODY

Navážka přibližně 3 gramů reprezentativního vzorku čerstvých jahod byla po dobu 5 minut homogenizována spolu s 40 ml 3 % roztoku kyseliny metafosforečné. V první minutě dosahovaly otáčky hodnoty až 20 000, na zbylou dobu homogenizace byly sníženy na 4 000. Poté byl takto připravený roztok přefiltrován přes skládaný filtr a přes stříkačkový filtr převeden do vialky. Takovýmto způsobem byly připraveny dva vzorky pro jahody kupované a dva vzorky pro zahradní jahody.

5.5.2 SUŠENÉ JAHODY

Reprezentativní vzorek plátků jahod byl navážen na hodinové sklíčko a vložen do laboratorní sušárny. Poté byl připraven nereprezentativní vzorek rozkrájením a zvážení jedné celé zahradní jahody. Připravené vzorky byly sušeny po dobu 40 hodin při teplotě 40 °C. Sušina připravených vzorků byla v průměru cca 10 %. Z takto vysušených jahod, byly pro každý vzorek připraveny dvě navážky o hmotnosti přibližně 0,5 g, které byly upraveny stejným způsobem, jako vzorky čerstvých jahod.

5.5.3 LYOFILIZOVANÉ JAHODY

K lyofilizaci byly připraveny reprezentativní vzorky plátků kupovaných a zahradních jahod a následně nereprezentativní vzorek celé nakrájené zahradní jahody. Vzorky byly v lyofilizátoru sušeny při teplotě -110 °C po dobu 24 hodin. Sušina vzorků po lyofilizaci byla v průměru 9,6 %. Od každého vzorku byly připraveny dvě navážky s hmotností pohybující se kolem 0,5 g, které byly podrobeny stejné extrakci, jako vzorky čerstvých jahod a převedeny do vialek.

Vzorky lyofilizovaných jahod značky Emco, zakoupených v obchodním řetězci Albert, byly připraveny rozetřením náhodných kusů jahod z celého balení v třecí misce, pro zajištění reprezentativnosti vzorků. Z takto získaného prášku byly naváženy tři navážky o hmotnosti zhruba 0,3 g, ke kterým bylo přidáno 40 ml 3 % kyseliny metafosforečné a byly na 5 minut vloženy do ultrazvukové lázně. Po vyjmutí byly vzorky převedeny do plastových mikrozkušavek a centrifugovány na 20 000 otáček po dobu 2 minut. Z mikrozkušavek pak byly roztoky vzorků převedeny přes stříkačkové filtry do skleněných vialek.

5.5.4 MRAZENÉ JAHODY

Vzorky celých jahod (kupované i zahradní) byly zváženy ve váženice a zamrazeny při teplotě -18 °C. Při této teplotě byly uchovány po dobu 64 hodin a před přípravou vzorků pro měření byly rozmrazeny při pokojové teplotě. Z celých jahod byly připraveny dvě navážky s hmotností cca 3 g pro vzorek zahradní i kupované jahody. Po navážení byly vzorky homogenizovány stejným způsobem s přidavkem kyseliny metafosforečné, jak je popsáno u přípravy vzorků čerstvých jahod.

5.6 VLASTNÍ STANOVENÍ

5.6.1 KALIBRACE

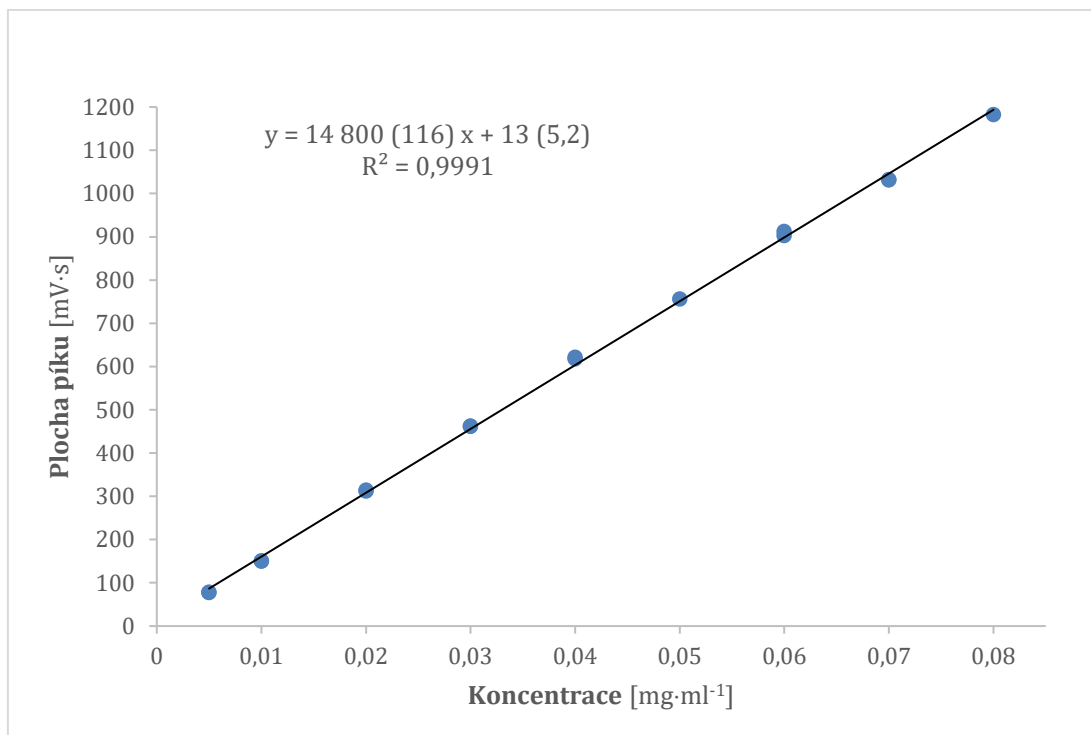
Jako první bylo připraveno 25 ml zásobního roztoku kyseliny L-askorbové o koncentraci $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Jelikož bylo měření prováděno metodou kalibrační křivky, byla ze zásobního roztoku vitamínu C připravena kalibrační řada 11 roztoků o koncentracích 0,005; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09 a $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Takto připravené roztoky byly převedeny do vialek, vloženy do autosampleru a proměřeny kapalinovým chromatografem s UV/VIS detekcí. Separace vzorků probíhala na koloně Ascentis Express C18 o délce 150 mm, průměru 3,0 mm a zrnitosti $2,7 \mu\text{m}$ s využitím isokratické eluce. Jako mobilní fáze byl použit 5 % vodný roztok methanolu s přídavkem roztoku kyseliny metafosforečné o hodnotě pH 2,8. Separace probíhala při stálé teplotě $30 \text{ }^\circ\text{C}$, s rychlostí průtoku mobilní fáze $0,4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a dávkování vzorku o objemu $2 \mu\text{l}$. Detekce kyseliny askorbové byla prováděna při vlnové délce 244 nm odpovídající jejímu absorpčnímu maximu a získaná data byla použita pro sestavení kalibrační křivky závislosti šířky píku na koncentraci roztoku zobrazená v obrázku 5.

5.6.2 STANOVENÍ KYSELINY ASKORBOVÉ VE VZORCÍCH JAHOD

Stanovení vzorků jahod bylo prováděno za totožných podmínek, jako stanovení kalibrační řady roztoků kyseliny askorbové. Pro každý vzorek byly provedeny dvě extrakce a pro každou z nich provedena dvě měření a ze získaných hodnot byla pomocí kalibrační rovnice vypočtena koncentrace kyseliny askorbové ve vzorcích.

5.7 VÝSLEDKY STANOVENÍ

Z naměřených hodnot kalibrační řady byla sestrojena kalibrační křivka pro stanovení kyseliny askorbové. V programu QC Expert 2.9 (TriloByte, ČR) byly vyřazeny odlehle hodnoty pomocí grafických diagnostik a lineární regresí byla zjištěna kalibrační rovnice zobrazená v grafu 1 spolu s koeficientem determinace a směrodatnými odchylkami jednotlivých parametrů uvedených v závorkách.



Obrázek 4 – Kalibrační křivka pro stanovení kyseliny askorbové.

Analýzou vzorků jahod čerstvých, sušených, lyofilizovaných a mražených byly výpočtem z kalibrační rovnice získány koncentrace vitamínu C v jednotlivých extraktech. Pro každý exemplář byly vypočítány čtyři hodnoty, které byly zprůměrovány a jsou uvedené v tabulce 6 spolu s odchylkou mezi výsledky jednotlivých měření.

Tabulka 6 – Výsledky stanovení vitamínu C ve vzorcích jahod.

Vzorek	Obsah vitamínu C (mg/100g)	Relativní odchylka (%)
čerstvá jahoda kupovaná	35,58	5,86
čerstvá jahoda zahradní	46,68	1,80
mrazená jahoda kupovaná	42,31	1,34
mrazená jahoda zahradní	57,04	1,05
sušená jahoda kupovaná	27,69	4,77
sušená jahoda zahradní	15,45	17,96
sušená jahoda zahradní (nereprezentativní vzorek)	33,57	13,18
lyofilizovaná jahoda kupovaná	40,33	0,79
lyofilizovaná jahoda zahradní	44,27	3,28
lyofilizovaná jahoda zahradní (nereprezentativní vzorek)	54,85	1,93

Výsledky ukazují, že nejméně vhodnou metodou konzervace jahod, s ohledem na výsledný obsah vitamínu C, je sušení. Dochází zde oproti čerstvým jahodám k největším ztrátám, a to v průměru o 39 %. K těmto ztrátám došlo zřejmě působením vyšších teplot, které urychlují degradaci vitamínu C. Nejnižší obsah vitamínu C byl stanoven u reprezentativního vzorku zahradní jahody, který byl pravděpodobně způsoben také špatnou konzistencí, ve které byl vzorek předložen k sušení. U mrazených i lyofilizovaných jahod by mělo docházet k minimálním ztrátám vitamínu C, čemuž výsledky z části odpovídají. U těchto jahod je totiž průměrný obsah kyseliny askorbové dokonce vyšší než u čerstvých exemplářů, což může být způsobeno volbou rozdílně zralých plodů a vlivem nedostatečné reprezentativnosti vzorků. Z výsledků je rovněž patrné, že jahody vypěstované na zahradě na území Pardubic, byly výrazně

bohatší na obsah vitamínu C než jahody původem ze Španělska, běžně dostupné v supermarketech.

Odchytky většiny měření se pohybovaly v hodnotách do 3 %, na základě čehož lze říci, že opakovatelnost procesu měření vzorků byla na dobré úrovni. U vzorků sušených jahod dosahovala odchytky až 18 % což mohlo významně ovlivnit výslednou průměrnou hodnotu obsahu vitamínu C.

Pro porovnání vzorků lyofilizovaných jahod v laboratorním prostředí s jahodami průmyslově lyofilizovanými společností Emco dostupnými v obchodních řetězcích, byl obsah vitamínu C přepočítán na množství vitamínu v miligramech na 1 gram sušiny. Hodnoty jsou uvedeny v tabulce 7 spolu s relativními odchylkami mezi jednotlivými výsledky stanovení.

Tabulka 7 – Výsledky stanovení vitamínu C v lyofilizovaných jahodách.

Vzorek	Obsah vitamínu C (mg/1g)	Relativní odchylka (%)
jahoda kupovaná	3,92	1,27
jahoda zahradní	4,71	3,28
jahoda zahradní (nereprezentativní)	5,99	1,87
jahoda lyofilizovaná kupovaná (Emco)	3,03	7,53

Podle naměřených hodnot je patrné, že nejnižší obsah vitamínu C je v kupovaných lyofilizovaných jahodách značky Emco, pro které bylo provedeno nejvíce měření, avšak s největší relativní odchylkou. Tento výsledek však může být do jisté míry ovlivněný rozdílným způsobem přípravy vzorků.

ZÁVĚR

Vitamín C, také známý jako kyselina L-askorbová, je důležitým vitamínem pro lidské tělo, které ho nemůže samo produkovat. Tento vitamín je rozpustný ve vodě a funguje jako silný antioxidant, chrání buňky před poškozením volnými radikály, a posiluje imunitní systém. Jeho stabilita závisí na teplotě, pH a způsobu skladování, přičemž vysoké teploty urychlují jeho oxidaci vzdušným kyslíkem a tím i jeho rozklad. Vitamín C se přirozeně vyskytuje v čerstvém ovoci a zelenině a průmyslově se vyrábí z glukózy. Doporučený denní příjem se pohybuje mezi 60 a 200 mg, přičemž přebytečné množství se vylučuje močí. Nedostatek tohoto vitamínu může vést k problémům, jako je únava, krvácení dásní a v krajních případech k onemocnění zvanému skorbut.

V této bakalářské práci byl zkoumán vliv konzervace na obsah vitamínu C v potravinách. K praktickému měření pro podložení teoretických informací bylo využito exemplářů čerstvých, sušených, lyofilizovaných a mražených jahod zakoupených v obchodním řetězci Albert i zahradních jahod vypěstovaných na území Pardubic.

Koncentraci kyseliny askorbové lze stanovit různými analytickými metodami od jodometrické titrace, přes elektrochemické metody, jako je coulometrie, voltametrie či polarografie až po spektrofotometrické metody využívající k detekci ultrafialové a viditelné záření. Nejvyužívanější a nejpřesnější metodou je však HPLC, která byla využita pro stanovení i v této bakalářské práci s využitím UV/VIS detekce.

Z výsledků stanovení čerstvých jahod bylo patrné, že zahradní jahody byly bohatší na obsah vitamínu C než jahody kupované. Stanovení vzorků jahod s využitím rozdílných metod konzervace prokázalo, že nejšetrnějšími metodami pro zachování vysokého obsahu vitamínu C jsou lyofilizace a konzervace mražením, u kterých nedocházelo ke znatelnému úbytku tohoto vitamínu. Naopak nejméně vhodné je pro vitamín C a jeho stabilitu sušení, jelikož je využíváno vyšších teplot, které způsobují jeho degradaci. Ztráty kyseliny askorbové v sušených jahodách při teplotě 40 °C oproti čerstvým jahodám dosahovaly v průměru hodnoty 39 %.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Kopec, K., Zelenina ve výživě člověka, Grada Publishing a.s., 2010.
- [2] Kopelevič, D., Dolejší, A., Halíč, J., Raab, Č., Dienstbier, J., Ovoce a zelenina ve výživě člověka, 1. vydání, SZN, Praha, 1988.
- [3] Harant, M., Zacha, V., Jahody, 4. doplněné vydání, Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 1986.
- [4] Caballero, B., Trugo, L.C., Finglas, P.M., Encyclopedia of food sciences and nutrition, 2. vydání, Academic Press, Amsterdam Boston Paris, 2003.
- [5] Půhoný, K., Konzervace a ukládání potravin v domácnosti, 5. vydání, Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 1987.
- [6] Drdák, M., Studnický, J., Mόrová, E., Karovičová, J., Základy potravinářských technologií: spracovanie rastlinných a živočíšnych surovín; cereálne a fermentačné technológie; uchovávanie, hygiena a ekológia potravín, Malé centrum, Bratislava, 1996.
- [7] Kadlec, P., Technologie potravin I, 1. vydání, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, 2002.
- [8] Hanika, J., Farmaceutické inženýrství, 1. vydání, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, 2013.
- [9] Kadlec, P., Procesy potravinářských a biochemických výrob, 1. vydání, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, 2003.
- [10] Hlúbik, P., Opltová, L., Vitaminy, 1. vydání, Grada, Praha, 2004.
- [11] Velíšek, J., Hajšlová, J., Chemie potravin, Rozšířené a přepracované 3. vydání, OSSIS, Tábor, 2009.
- [12] Mareček, A., Honza, J., Chemie pro čtyřletá gymnázia, 3. díl, 2. opravené vydání, Proton, Brno, 2014.
- [13] Fajfrová, J., Vitaminy a jejich funkce v organismu, Interní medicína pro praxi, 2011.
- [14] Ball, G., Vitamins, John Wiley & Sons, Oxford, 2008.
- [15] Velíšek, J., Chemie potravin, 2. upravené vydání, OSSIS, Tábor, 2002.
- [16] Yin, X., Chen, K., Cheng, H., Chen, X., Feng, S., Song, Y., Liang, L., Chemical Stability of Ascorbic Acid Integrated into Commercial Products: A Review on Bioactivity and Delivery Technology, Antioxidants 11, 2022, 153. <https://doi.org/10.3390/antiox11010153>.

- [17] Susa, F., Pisano, R., Advances in Ascorbic Acid (Vitamin C) Manufacturing: Green Extraction Techniques from Natural Sources, *Processes* 11, 2023, 3167. <https://doi.org/10.3390/pr11113167>.
- [18] Herbig, A.-L., Renard, C.M.G.C., Factors that impact the stability of vitamin C at intermediate temperatures in a food matrix, *Food Chemistry* 220, 2017, 444–451. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.012>.
- [19] Feszterová, M., Kowalska, M., Mišiaková, M., Stability of Vitamin C Content in Plant and Vegetable Juices under Different Storing Conditions, *Applied Sciences* 13, 2023, 10640. <https://doi.org/10.3390/app131910640>.
- [20] Giannakourou, M.C., Taoukis, P.S., Effect of Alternative Preservation Steps and Storage on Vitamin C Stability in Fruit and Vegetable Products: Critical Review and Kinetic Modelling Approaches, *Foods* 10, 2021, 2630. <https://doi.org/10.3390/foods10112630>.
- [21] Arrigoni, O., De Tullio, M.C., Ascorbic acid: much more than just an antioxidant, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1569, 2002, 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(01\)00235-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(01)00235-5).
- [22] Cvačka, J., *Detekce ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii*, 2010.
- [23] Stan, M., Soran, M.L., Marutoiu, C., Extraction and HPLC determination of the ascorbic acid content of three indigenous spice plants, *J Anal Chem* 69, 2014, 998–1002. <https://doi.org/10.1134/S106193481410013X>.
- [24] Klouda, P., *Moderní analytické metody*, 3. upravené vydání, Pavel Klouda - nakladatelství Pavko, Ostrava, 2016.
- [25] Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Dolan, J.W., *Introduction to modern liquid chromatography*, 3. vydání, Wiley, Hoboken, N.J, 2010.
- [26] Haiying, L., Padilla, L., Yoshimatsu, K., Matsui, T., Kitagawa, M., Yano, H., Determination of plasma vitamin C concentration in fattening cattle, *Animal Science Journal* 74, 2003, 7–10. <https://doi.org/10.1046/j.1344-3941.2003.00079.x>.
- [27] Kand'ár, R., Drábková, P., Hampl, R., The determination of ascorbic acid and uric acid in human seminal plasma using an HPLC with UV detection, *Journal of Chromatography B* 879, 2011, 2834–2839. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.08.007>.
- [28] Rizzolo, A., HPLC assay of ascorbic acid in fresh and processed fruit and vegetables, *Food Chemistry* 14, 1984, 189–199. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(84\)90058-X](https://doi.org/10.1016/0308-8146(84)90058-X).

- [29] Chebrolu, K.K., Jayaprakasha, G.K., Yoo, K.S., Jifon, J.L., Patil, B.S., An improved sample preparation method for quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid by HPLC, *LWT* 47, 2012, 443–449. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.02.004>.
- [30] Mitic, S., Kostic, D., Naskovic-Okic, D., Mitic, M., Rapid and Reliable HPLC Method for the Determination of Vitamin C in Pharmaceutical Samples, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 10, 2011. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v10i1.66549>.
- [31] Inoue, K., Namiki, T., Iwasaki, Y., Yoshimura, Y., Nakazawa, H., Determination of uric acid in human saliva by high-performance liquid chromatography with amperometric electrochemical detection, *Journal of Chromatography B* 785, 2003, 57–63. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00850-4](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00850-4).
- [32] Khan, A., Khan, M.I., Iqbal, Z., Shah, Y., Ahmad, L., Nazir, S., Watson, D.G., Khan, J.A., Nasir, F., Khan, A., Ismail, A new HPLC method for the simultaneous determination of ascorbic acid and aminothiols in human plasma and erythrocytes using electrochemical detection, *Talanta* 84, 2011, 789–801. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.02.019>.
- [33] Gazdik, Z., Zitka, O., Petrlova, J., Adam, V., Zehnalek, J., Horna, A., Reznicek, V., Beklova, M., Kizek, R., Determination of Vitamin C (Ascorbic Acid) Using High Performance Liquid Chromatography Coupled with Electrochemical Detection, *Sensors* 8, 2008, 7097–7112. <https://doi.org/10.3390/s8117097>.
- [34] Lopez-Anaya, A., Mayersohn, M., Ascorbic and dehydroascorbic acids simultaneously quantified in biological fluids by liquid chromatography with fluorescence detection, and comparison with a colorimetric assay, *Clinical Chemistry*, 1987.
- [35] Moravcová, H., *Analytická chemie*, 1. vydání, Pavko, Ostrava, 2011.
- [36] Dioha, I., Olugbemi, O., Onuegbu, T., Shahru, Z., Determination of ascorbic acid content of some tropical fruits by iodometric titration, *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 5, 2012, 2180. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v5i5.37>.
- [37] Ballentine, R., Determination of Ascorbic Acid in Citrus Fruit Juices, *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition* 13, 1941, 89–89. <https://doi.org/10.1021/i560090a011>.
- [38] Ismail, M., Ali, S., Hussain, M., Quantitative Determination of Ascorbic Acid in Commercial Fruit Juices by Redox Titration, 2014.
- [39] Bartoš, M., Šrámková, J., Staněk, V., *Laboratorní cvičení z analytické chemie*, Univerzita Pardubice, Pardubice, 2014.

- [40] Scholz, F., Voltammetric techniques of analysis: the essentials, *ChemTexts* 1, 2015, 17. <https://doi.org/10.1007/s40828-015-0016-y>.
- [41] Chooto, P., Cyclic Voltammetry and Its Applications, in: N. Wendy Maxakato, S. Surprise Gwebu, G. Hlengiwe Mhlongo (Eds.), *Voltammetry*, IntechOpen, 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.83451>.
- [42] Zuo, F., Luo, C., Zheng, Z., Ding, X., Peng, Y., Supramolecular Assembly of β -Cyclodextrin-Capped Gold Nanoparticles on Ferrocene-Functionalized ITO Surface for Enhanced Voltammetric Analysis of Ascorbic Acid, *Electroanalysis* 20, 2008, 894–899. <https://doi.org/10.1002/elan.200704113>.
- [43] Okiei, W., Ogunlesi, M., Azeez, L., Obakachi, V., Osunsanmi, M., Nkenchor, G., The Voltammetric and Titrimetric Determination of Ascorbic Acid Levels in Tropical Fruit Samples, *International Journal of Electrochemical Science* 4, 2009, 276–287. [https://doi.org/10.1016/S1452-3981\(23\)15128-5](https://doi.org/10.1016/S1452-3981(23)15128-5).
- [44] Pisoschi, A.M., Pop, A., Negulescu, G.P., Pisoschi, A., Determination of Ascorbic Acid Content of Some Fruit Juices and Wine by Voltammetry Performed at Pt and Carbon Paste Electrodes, *Molecules* 16, 2011, 1349–1365. <https://doi.org/10.3390/molecules16021349>.
- [45] Pisoschi, A.M., Danet, A.F., Kalinowski, S., Ascorbic Acid Determination in Commercial Fruit Juice Samples by Cyclic Voltammetry, *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry* 2008, 2008, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2008/937651>.
- [46] Yilmaz, S., Sadikoglu, M., Saglikoglu, G., Yagmur, S., Askin, G., Determination of Ascorbic Acid in Tablet Dosage Forms and Some Fruit Juices by DPV, *International Journal of Electrochemical Science* 3, 2008, 1534–1542. [https://doi.org/10.1016/S1452-3981\(23\)15537-4](https://doi.org/10.1016/S1452-3981(23)15537-4).
- [47] Ensafi, A.A., Taei, M., Khayamian, T., A differential pulse voltammetric method for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid using poly (3-(5-chloro-2-hydroxyphenylazo)-4,5-dihydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid) film modified glassy carbon electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 633, 2009, 212–220. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2009.06.001>.
- [48] Sahbaz, F., Determination of ascorbic acid in fruit and vegetables using normal polarography, *Food Chemistry* 44, 1992, 141–146. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(92\)90327-X](https://doi.org/10.1016/0308-8146(92)90327-X).
- [49] Lau, O., Shiu, K., Chang, S., Determination of ascorbic acid in vegetables and fruits by differential pulse polarography, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 36, 1985, 733–739. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740360814>.

- [50] Yaschenko, N.N., Zhitar, S.V., Zinovjeva, E.G., Determination of phenolic compounds in medicinal preparations by galvanostatic coulometry, *Chim.Tech.Acta* 8, 2021, 20218110, 5081. <https://doi.org/10.15826/chimtech.2021.8.1.10>.
- [51] Ziyatdinova, G., Budnikov, H., Analytical Capabilities of Coulometric Sensor Systems in the Antioxidants Analysis, *Chemosensors* 9, 2021, 91. <https://doi.org/10.3390/chemosensors9050091>.
- [52] Karlsson, R., Iodometric determination of ascorbic acid by controlled potential coulometry, *Talanta* 22, 1975, 989–993. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(75\)80113-5](https://doi.org/10.1016/0039-9140(75)80113-5).
- [53] Washko, P.W., Welch, R.W., Dhariwal, K.R., Wang, Y., Levine, M., Ascorbic acid and dehydroascorbic acid analyses in biological samples, *Analytical Biochemistry* 204, 1992, 1–14. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90131-P](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90131-P).
- [54] Wu, X., Fluorimetric determination of ascorbic acid with o-phenylenediamine, *Talanta* 59, 2003, 95–99. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(02\)00475-7](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00475-7).
- [55] Chung, H.K., Ingle, J.D., Fluorimetric kinetic method for the determination of total ascorbic acid with o-phenylenediamine, *Analytica Chimica Acta* 243, 1991, 89–95. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)82544-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)82544-1).
- [56] Wang, L., Zhang, L., She, S., Gao, F., Direct fluorimetric determination of ascorbic acid by the supramolecular system of AA with β -cyclodextrin derivative, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 61, 2005, 2737–2740. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2004.09.028>.
- [57] Feng, S., Chen, X., Fan, J., Zhang, G., Jiang, J., Wei, X., Kinetic Determination of Ultratrace Amounts of Ascorbic Acid with Spectrofluorimetric Detection, *Analytical Letters* 31, 1998, 463–474. <https://doi.org/10.1080/00032719808001852>.
- [58] Yang, J., Tong, C., Jie, N., Zhang, G., Ren, X., Hu, J., Fluorescent reaction between ascorbic acid and DAN and its analytical application, *Talanta* 44, 1997, 855–858. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(96\)02129-7](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(96)02129-7).
- [59] Yang, J., Sun, C., Wu, X., Diao, Y., β -Cyclodextrin Enhanced Fluorimetry for a Determination of Ascorbic Acid, *Analytical Letters* 34, 2001, 1331–1339. <https://doi.org/10.1081/AL-100104157>.
- [60] Opekar, F., *Základní analytická chemie*, 2. vydání, Karolinum, Praha, 2010.
- [61] Bajaj, K.L., Kaur, G., Spectrophotometric determination of L-ascorbic acid in vegetables and fruits, *Analyst* 106, 1981, 117. <https://doi.org/10.1039/an9810600117>.

- [62] Shrivastava, K., Agrawal, K., Patel, D.K., A Spectrophotometric Determination of Ascorbic Acid, *Journal of the Chinese Chemical Society* 52, 2005, 503–506. <https://doi.org/10.1002/jccs.200500072>.
- [63] Özyürek, M., Güçlü, K., Bektaşoğlu, B., Apak, R., Spectrophotometric determination of ascorbic acid by the modified CUPRAC method with extractive separation of flavonoids–La(III) complexes, *Analytica Chimica Acta* 588, 2007, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.01.078>.
- [64] Kapur, A., Hasković, A., Čopra-Janićijević, A., Klepo, L., Topčagić, A., Tahirović, I., Sofić, E., Spectrophotometric analysis of total ascorbic acid content in various fruits and vegetables, *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina*, 2012.