

Stanovení vitamínu C v zelenině po tepelné úpravě

Bc. Zuzana Martinková

Diplomová práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav biochemie a analýzy potravin

akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Zuzana MARTINKOVÁ
Osobní číslo: T08810
Studijní program: N 2901 Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin
Téma práce: Stanovení vitamínu C v zelenině po tepelné úpravě

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika vitamínu C, jeho zdrojů a vlastností.
2. Popis analytických metod využívaných pro stanovení tohoto vitamínu, se zaměřením především na chromatografickou metodu HPLC.
3. Tepelná úprava potravin.

II. Praktická část

1. Optimalizace izolačního a analytického postupu pro stanovení kyseliny askorbové pomocí chromatografické techniky HPLC/UV.
2. Stanovení obsahu kyseliny askorbové ve vybrané zelenině před i po tepelné úpravě (vaření, dušení, mikrovlnný ohřev) technikou HPLC s UV detekcí.



Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] Velišek, J. *Chemie potravin*. 1. vyd. Tábor: Ossis, 1999. 304s.
- [2] Hlúbík, P., Opltová, L. *Vitaminy*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2004. 232 s.
- [3] Churáček, J. a kol. *Analytická separace látek*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1990. 384 s.
- [4] Kubáň, V., Kubáň, P. *Analýza potravin*. 1. vyd. Brno: MZLU, 2007. 202 s.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Soňa Škrovánková, Ph.D.**
Ústav biochemie a analýzy potravin

Datum zadání diplomové práce: **4. ledna 2010**

Termín odevzdání diplomové práce: **19. května 2010**

Ve Zlíně dne 8. dubna 2010

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



Ignác Hoza
prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

V diplomové práci je charakterizován vitamin C a kyselina askorbová, jeho vlastnosti, reaktivita, fyziologické působení, výskyt v potravinách a ztráty během technologického zpracování potravin. Je popsáno i tepelné zpracování potravin a chromatografické metody pro stanovení vitaminu C, se zaměřením na metodu HPLC. Praktická část je zaměřena na stanovení vitaminu C (kys. askorbové) v zelenině (brokolice, květák, paprika bílá, paprika červená, růžičková kapusta, listový špenát) před a po tepelné úpravě (vaření, vaření v páře, dušení, mikrovlnný ohřev) pomocí techniky HPLC/UV.

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

ABSTRACT

The thesis deals with characterization of vitamin C (ascorbic acid) – its properties, reactivity, physiological results, foods sources and losses during thermal processing. The thermal processing of foods and chromatographic methods for vitamin C determination, especially HPLC method, are also described. The practical part is focused on the determination of vitamin C (ascorbic acid) in vegetables (broccoli, cauliflower, white and red peppers, brussels sprouts, spinach) before and after different types of thermal processing (cooking, steaming, stewing, microwave heating) using HPLC/UV technique.

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

Ráda bych poděkovala touto cestou vedoucí práce Ing. Soni Škrovánkové, Ph.D. za odborné vedení při zpracování této práce, za cenné rady a připomínky.

Příjmení a jméno:

Obor:

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně

.....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 VITAMINY	13
1.1 VITAMIN C.....	14
1.1.1 Historie objevu vitamínu C.....	15
1.1.2 Fyziologické účinky vitamínu C.....	15
1.1.2.1 Význam vitamínu C v syntéze kolagenu.....	16
1.1.2.2 Význam vitamínu C jako antioxidantu	17
1.1.2.3 Význam vitamínu C v regulaci metabolismu cholesterolu a patogeneze aterosklerózy	17
1.1.2.4 Význam vitamínu C pro imunitní systém.....	18
1.1.2.5 Význam vitamínu C v boji proti rakovině.....	18
1.1.3 Absorpce a potřeba vitamínu C pro lidský organismus.....	19
1.1.4 Fyziologie vitamínu C v lidském těle	20
1.1.4.1 Antivitaminy vitamínu C.....	21
1.1.5 Vlastnosti a reaktivita vitamínu C.....	21
1.1.5.1 Enzymová oxidace	22
1.1.5.2 Autooxidace	23
1.1.5.3 Redukce iontů kovů.....	23
1.1.5.4 Reakce s volnými radikály.....	23
1.1.5.5 Degradace katalyzovaná kyselinami.....	24
1.1.5.6 Reakce s dalšími složkami potravin	24
1.1.6 Ovlivnění stability vitamínu C.....	25
1.1.6.1 Vliv světla.....	25
1.1.6.2 Vliv teploty.....	25
1.1.6.3 Vliv pH.....	26
1.1.6.4 Vliv koncentrace kyseliny askorbové.....	26
1.1.6.5 Vliv stabilizačních látek.....	26
1.1.6.6 Vliv iontů kovů.....	26
1.1.7 Zdroje vitamínu C	27
1.1.8 Ztráty vitamínu C.....	29
1.1.8.1 Ztráty vitamínu C při technologickém zpracování.....	30
2 TEPELNÉ OPRACOVÁNÍ POTRAVIN.....	32
2.1 VAŘENÍ.....	33
2.1.1 Vaření zeleniny	33
2.2 VAŘENÍ V PÁŘE.....	33
2.3 DUŠENÍ.....	34
2.3.1 Dušení zeleniny.....	34
2.4 PEČENÍ.....	34
2.5 MIKROVLNNÝ OHŘEV.....	35
2.5.1 Rizikové faktory mikrovlnného ohřevu potravin.....	35
3 CHROMATOGRAFICKÉ METODY	36

3.1	ROZDĚLENÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD	36
3.2	KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE	38
3.2.1	Vývoj moderní kolonové kapalinové chromatografie	38
3.2.2	Popis kapalinové chromatografie	38
3.2.3	Kapalinová eluční kolonová chromatografie	39
3.3	HPLC	40
3.3.1	Instrumentace v HPLC	40
3.3.1.1	Čerpadla mobilní fáze	41
3.3.1.2	Zařízení pro dávkování vzorku do chromatografického systému	43
3.3.1.3	Chromatografické kolony	44
3.3.1.4	Detektory	45
3.4	METODY STANOVENÍ VITAMINU C (ASKORBOVÉ KYSELINY)	48
3.4.1	Extrakce vitamínu C	49
3.4.2	Titrační stanovení vitamínu C	49
3.4.3	Spektrofotometrické stanovení vitamínu C	50
3.4.4	Elektrochemické stanovení vitamínu C	51
3.4.5	Fluorimetrické stanovení vitamínu C	52
3.4.6	Enzymatické stanovení vitamínu C	52
3.4.7	Chromatografické metody stanovení vitamínu C	52
II	PRAKTICKÁ ČÁST	57
4	CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	58
5	MATERIÁL A PŘÍSTROJE	59
5.1	VZORKY ZKOUMANÉ ZELENINY	59
5.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	59
5.3	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY	59
6	METODIKA IZOLACE A STANOVENÍ VITAMINU C (Kyseliny ASKORBOVÉ) METODOU HPLC/UV	61
6.1	TEPELNÁ ÚPRAVA VZORKŮ ZELENINY	61
6.2	OPTIMALIZACE IZOLACE VITAMINU C	62
6.2.1	Postup izolace vitamínu C ze vzorků zeleniny	62
6.3	STANOVENÍ VITAMINU C METODOU HPLC/UV	62
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	64
7.1	STANOVENÍ VITAMINU C METODOU HPLC/UV	64
7.1.1	Kalibrační křivka standardu kyseliny askorbové stanovené technikou HPLC/UV	64
7.1.2	Stanovení askorbové kyseliny v jednotlivých druzích zeleniny metodou HPLC/UV	66
7.1.2.1	Stanovení kyseliny askorbové v brokolici	66
7.1.2.2	Stanovení kyseliny askorbové v kvěťáku	69
7.1.2.3	Stanovení kyseliny askorbové v bílé paprice	72
7.1.2.4	Stanovení kyseliny askorbové v červené paprice	75
7.1.2.5	Stanovení kyseliny askorbové v růžičkové kapustě	78

7.1.2.6 Stanovení kyseliny askorbové v listovém špenátu	81
7.1.3 Ztráty vitamínu C (askorbové kyseliny) po různých tepelných úpravách.....	83
7.1.3.1 Ztráty vitamínu C (kyseliny askorbové) po vaření.....	84
7.1.3.2 Ztráty vitamínu C (kyseliny askorbové) po vaření v páře	85
7.1.3.3 Ztráty vitamínu C (kyseliny askorbové) po dušení	86
7.1.3.4 Ztráty vitamínu C (kyseliny askorbové) po mikrovlnném ohřevu.....	87
ZÁVĚR	88
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	90
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	96
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	97
SEZNAM TABULEK	98
SEZNAM PŘÍLOH	100

ÚVOD

Vitamin C patří mezi vitaminy rozpustné ve vodě. Názvem vitamin C se označuje nejen kyselina L-askorbová, ale také celý její reverzibilní redoxní systém, který zahrnuje L-askorbylradikál a kyselinu L-dehydroaskorbovou.

V lidském těle vitamin C plní mnoho fyziologických funkcí a jeho nedostatek se projevuje onemocněním zvaným kurděje. Vitamin C se účastní biosyntézy mukopolysacharidů, prostaglandinů, absorpce iontových forem železa, jeho transportu, uplatňuje se v metabolismu cholesterolu a je základní složka v biosyntéze kolagenu. Mezi důležité funkce vitaminu C patří podpora imunitního systému a podpora plicní funkce. Jedná se o důležitý antioxidant v živých organismech, funguje jako silné redukční činidlo při likvidaci volných radikálů. Přispívá také k rychlejšímu hojení ran, podporuje pochody látkové přeměny.

Lidé přijímají vitamin C výhradně ze stravy, výživových doplňků a vitaminových preparátů. Vitamin C je obsažen v mnoha potravinách rostlinného původu, především v zelenině, ovoci, a v bramborách. Z potravin živočišného původu jsou významným zdrojem játra. Vitamin C neboli askorbová kyselina patří mezi nejméně stabilní vitaminy. K faktorům, které ovlivňují stabilitu kyseliny askorbové, patří působení světla, zvýšená teplota, změna pH, přítomnost kyslíku nebo vliv kovových iontů. Ke ztrátám dochází výluhem také při skladování, kulinárním a průmyslovém zpracování, největší ztráty jsou při tepelném opracování.

Metoda HPLC je fyzikálně-chemická separační metoda, při které se oddělují, separují složky obsažené ve vzorku. Mobilní fází v HPLC je kapalina. K detekci jsou nutné citlivé detektory – např. UV detektor, MS detektor a pod..

Metod na stanovení vitaminu C a jeho forem je mnoho. Nejčastěji používané metody stanovení vitaminu C lze rozdělit do několika skupin: titrační metody, spektrofotometrické metody (UV-VIS spektrometrie, fluorimetrie, flow – injection, chemiluminiscenční metody), enzymatické metody, elektrochemické (amperometrické metody), kinetické a chromatografické metody (hlavně kapalinová chromatografie a také plynová chromatografie), které mají výhodu hlavně ve vysoké citlivosti stanovení.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VITAMINY

Vitaminy jsou exogenní esenciální nízkomolekulární sloučeniny nezbytné pro život. Nejsou zdrojem energie, ani stavebním materiálem, ale obvykle mají funkci jako součást katalyzátorů biochemických reakcí a proto často bývají označovány jako exogenní biokatalyzátory. Vitaminy jsou často součástí koenzymů a prostetických skupin, které nacházíme u enzymů. Heterotrofní organismy je syntetizují jen v omezené míře a většinu je získávají jako exogenní látky především z potravin a některé z nich prostřednictvím střevní mikroflóry. Vitaminy jsou v určitém minimálním množství nezbytné pro látkovou přeměnu a regulaci metabolismu člověka, bezpodmínečně nutné pro růst a zachování životních funkcí [1,2,3].

Vitaminy jsou látky s různou chemickou strukturou mezi nimiž neexistují po chemické stránce žádné strukturální vztahy, podle nichž by mohly být klasifikovány. Nejběžnější hledisko třídění vitaminů je podle rozpustnosti ve vodě a v tucích. Vitaminy rozpustné v tucích se označují jako lipofilní vitamíny a vitaminy rozpustné ve vodě se označují jako vitaminy hydrofilní [1,2].

Mezi vitaminy rozpustné ve vodě patří: vitamin B₁ (thiamin), vitamin B₂ (riboflavin), niacin, vitamin B₅ (kyselina pantothenová), vitamin B₆ (pyridoxin), vitamin B₉ (kyselina listová), vitamin B₁₂ (kyanokobalamin), biotin (dříve nazýván vitamin H), vitamin C (kyselina L-askorbová a L-dehydroaskorbová) [1,2].

Mezi vitaminy rozpustné v tucích patří: vitamin A a jeho provitaminy (karotenoidy), vitaminy D, vitaminy E, vitaminy K [1,2].

Ke značení vitaminu se používají velká písmena abecedy, u látek se stejným fyziologickými účinky se používají u písmen číselné indexy. U řady vitaminů se běžně dává přednost jednoduchým triviálními názvům [1].

Denní potřeba vitaminů je poměrně nízká. Množství potřebné k zajištění normálních fyziologických funkcí člověka je závislé na mnoha faktorech, jako je stáří, pohlaví, zdravotní stav, životní styl, stravovací zvyklosti, pracovní aktivita apod. [1,2].

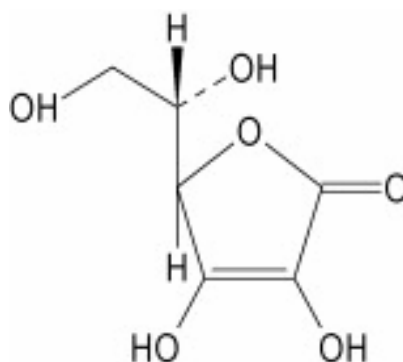
V potravinách se vitaminy vyskytují zpravidla v množství od $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ po stovky až tisíce $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ podle druhu vitaminu, ročního období, druhu potravin a způsobu jejího zpracování. Vyskytují se v potravinách volné nebo vázané na jednotlivé složky potravy, nejčastěji na

sacharidy a proteiny. Vitaminy patří mezi labilní složky potravin, proto slouží zároveň jako indikátory četných technologických a kulinárních úprav. U vitaminů rozpustných ve vodě dochází během technologického a kulinárního zpracování ve většině případů k největším ztrátám výluhem, u vitaminů rozpustných v tucích jsou největší ztráty způsobeny oxidací [1,2,3].

Při nedostatku některého vitamínu dochází k hypovitaminóze – je-li vitamín nedostatečně dodáván nebo až k avitaminóze – přechodný úplný nedostatek vitaminů projevující se poruchou některých biochemických procesů. Většina příznaků avitaminózy po dodání nedostatečného vitamínu zmizí, dlouhotrvající avitaminóza může vést k nenávratným změnám organismu nebo až ke smrti. Příčinou nedostatečné resorpce vitaminů bývá většinou onemocnění zažívací soustavy. Deficience vitamínu byla dříve jednou z hlavních příčin mnoha chorob a úmrtí. Nadbytek jednotlivých vitaminů se označuje jako hypervitaminóza. Hypervitaminóza se projevuje nadměrným příjmem především lipofilních vitaminů A, D a vyvolává poruchy některých biochemických procesů a může vést až k těžkým onemocněním [1,2,4].

1.1 Vitamin C

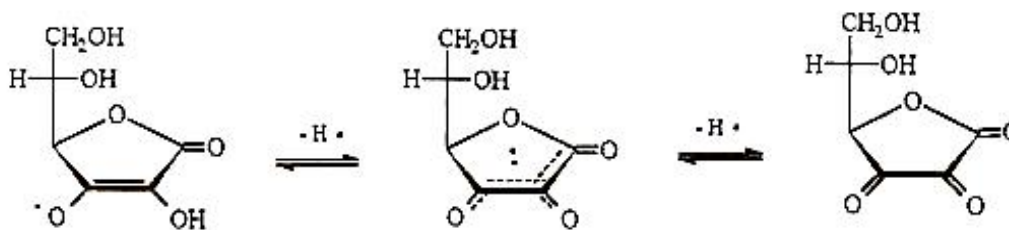
Vitamin C patří mezi vitaminy rozpustné ve vodě. Základní biologicky aktivní sloučeninou je L-askorbová kyselina, jedná se γ -laktón kyseliny 2-oxo-L-gulonové [1,5].



Obr. 1. Struktura askorbové kyseliny.

Názvem vitamin C se označuje nejen kyselina L-askorbová, ale také celý její reverzibilní redoxní systém, který zahrnuje navíc její L-askorbylradikál (L-monodehydroaskorbovou kyselinu) a kyselinu L-dehydroaskorbovou. Ten zahrnuje L-askorbovou kyselinu, produkt její jedneelektronové oxidace, který se nazývá L-askorbylradikálem nebo také L-monodehydroaskorbovou kyselinou a produkt dvouelektronové oxidace, tj. L-

dehydroaskorbovou kyselinu. Askorbová kyselina a askorbylradikál se v roztocích se o fyziologickém pH vyskytují jako anionty [1,5].



L-askorbová kys.

L-monodehydroaskorbová kys.

L-dehydroaskorbová kys.

Obr. 2. Biologicky aktivní formy vitamínu C [5].

1.1.1 Historie objevu vitamínu C

Již v roce 1750 bylo známo, že zelenina a citrusové plody mohou ochránit námořníky na dlouhé cestě po moři před nemocí skorbut neboli kurděje. Skorbut postihoval často staré mořeplavce a způsoboval krvácivost kůže, dásní a občas končil smrtí. Kapitán James Cook prokázal, že konzumací zeleniny lze ochránit námořníky na dlouhé cestě po moři před tímto onemocněním [4].

Chemická struktura vitamínu byla objevena v roce 1933. Za výzkum vitamínu C získali roku 1937 W.N.Haworth a A.Szent-Gyorgyri von Nagyrápolt Nobelovu cenu. O několik let později A.Szent-Gyorgyri popsal aktivitu vitamínu C při onemocnění zvaném kurděje (skorbut) a dal této sloučenině triviální název kyselina askorbová. Chemická struktura kyseliny askorbové byla stanovena v několika laboratořích světa a je hojně vyráběna [3,4].

1.1.2 Fyziologické účinky vitamínu C

Vitamin C je velmi důležitý pro mnoho fyziologických pochodů v lidském těle.

Vitamin C se účastní biosyntézy mukopolysacharidů, postaglandinů, absorpce iontových forem železa, jeho transportu, uplatňuje se v metabolismu cholesterolu a je základní složka v biosyntéze kolagenu. Mezi důležité funkce vitamínu C patří podpora imunitního systému, podpora plicní funkce. Jedná se o důležitý antioxidant v živých organismech, funguje jako silné redukční činidlo při likvidaci volných radikálů. Přispívá také k rychlejšímu hojení ran, podporuje pochody látkové přeměny [1,6,7,8].

Vitamin C je základní složka v biosyntéze kolagenu, je potřebný pro tvorbu a správnou funkci pojivové tkáně, kostí a chrupavek. Vitamin C se uplatňuje při hydroxylaci p-hydroxy-fenylpyruvátu na kyselinu homogentisinovou, na tvorbě noradrenalinu z dopaminu, při hydroxylaci tryptofanu a tím i na vzniku serotoninu. Prokázáno je i zapojení kyseliny askorbové do metabolismu aminokyselin a kyseliny listové. Biosyntéza karnitinu rovněž vyžaduje vitamin C jako kofaktor pro dioxygenázy, nedostatečný příjem způsobuje únavnost a letargii, které jsou považovány za počáteční příznaky kurdějů. Vitamin C zasahuje i do biosyntézy katecholaminů a jeho nedostatek je v této oblasti spojován s výskytem depresí, hypochondrií a změnami nálad, které byly povněž pozorovány u nemocných kurdějemi. Extracelulární funkce vitamínu C spočívají v ochraně LDL cholesterolu proti oxidaci, v regeneraci tokoferolů (vitamin E) a tokoferoxylového radikálu a v regeneraci glutathionu z jeho oxidované formy [2,9,10,11].

Kyselina askorbová jakožto donor elektronů je účinným redukčním činidlem v mnoha intra- i extracelulárních reakcích. Je kofaktorem nebo kosubstrátem osmi enzymů. Kromě biosyntézy kolagenu, karnitinu a katecholaminu ve spojení s kurdějemi existují i další funkce vitamínu C na jeho příjmu a koncentraci v séru jsou dále závislé aktivity enzymů mono- a dioxygenázy při amidaci peptidů a metabolismu tyroxinu, cholesterol 7 α -monooxygenáza v metabolismu cholesterolu a steroidů. Role vitamínu C v těchto případech spočívá v redukci centrálních kovových iontů uvedených mono- i dioxygenáz, když díky svému redoxnímu potenciálu udržuje tyto ionty v redukováném stavu. Další aktivity vitamínu C zahrnují udržování thiolů v redukováném stavu a ochranný a šetřící efekt pro glutation (důležitý intracelulární antioxidant a kofaktor enzymů) a tetrahydrofolát [10].

1.1.2.1 Význam vitamínu C v syntéze kolagenu

Vitamin C je esenciální pro syntézu kolagenu, má specifickou úlohu, kdy působí jako kofaktor hydroxylace při konverzi prolinu na hydroxyprolin. Vitamin C je esenciálním kofaktorem pro dva enzymy potřebné pro syntézu kolagenu a to prolylhydroxylázu (stabilizuje molekulu kolagenu) a lysylhydroxylázu (upevňuje příčné vazby v molekule kolagenu). Při této hydroxylační reakci dochází k hydroxylaci prolinu na 3-hydroxyprolin a lysinu na 5-hydroxyprolin v prokolagenu, která souvisí s biosyntézou pojivových tkání [1,2,6].

1.1.2.2 Význam vitamínu C jako antioxidantu

Vitamin C je důležitý a efektivní antioxidant. Může působit přímo v reakci s peroxylovými radikály a nebo nepřímo tím, že obnoví antioxidantní vlastnosti tokoferolů. Vitamin C vystupuje jako ve vodě rozpustný „lapač“ volných radikálů v živočišných i rostlinných tkáních, kde snadno vychytává reaktivní kyslíkové a dusíkaté radikály a tím efektivně chrání ostatní substráty před oxidativním poškozením [4,10].

Askorbová kyselina má nižší redukční potenciál než peroxylové radikály a tak tyto peroxylové radikály může zničit. Navíc, redukční potenciál askorbové kyseliny je nižší než redukční potenciál tokoferolů a to znamená, že askorbová kyselina může dodatečně regenerovat oxidovanou formu tokoferolů. Interakce mezi askorbovou kyselinou a volnými radikály má za následek vytváření četných formací oxidačních produktů. Celkový důsledek těchto antioxidantních vlastností může být dán v ochraně buněčných membrán a membránových organel proti peroxidaci tuků [4,12].

Další výhodou vitamínu C jako antioxidantu spočívá ve stabilitě a nízké reaktivitě askorbylového radikálu, který vzniká při vychytávání kyslíkových a dusíkatých radikálů [10].

Dvouelektrový oxidační produkt askorbátu, kyselina dehydroaskorbová, může být glutathionem redukována zpět na askorbát a jeho enzymy nebo je hned hydrolyzována na kyselinu 2,3-diketogulonovou [10].

Vitamin C je také součástí antioxidantního systému. Tento propracovaný antioxidantní systém je tvořen vitaminem C, vitaminem E, ubichinony, deriváty selenu a proteiny obsahující síru. Tento antioxidantní systém chrání organismus proti nepříznivým vlivům kyslíkových radikálů jako jsou peroxidy, superoxidy a hydroxylové radikály. Tento systém je dost komplikovaný a není podrobně znám princip účinku. Avšak kyselina askorbová je považována za nejvýznamnější složku tohoto systému [4].

Antioxidantní vlastnosti vitamínu C také spočívají v tom, že vitamin C je významnou antioxidantní složkou plazmy a stejně tak i extracelulární tekutiny obklopující plíce, čočku oka a oční sítnici [12].

1.1.2.3 Význam vitamínu C v regulaci metabolismu cholesterolu a patogeneze aterosklerózy

Vitamin C do jisté míry příznivě působí na snižování sérové hladiny celkového cholesterolu

a zvyšuje koncentraci HDL cholesterolu u začínající hypercholesterolemie [2].

Vědecké i experimentální výzkumy zjistili, že chronický nedostatek vitamínu C vede k hypercholesterolemii a k hromadění cholesterolu v určitých tkáních. Vitamin C se podílí na hydroxylaci cholesterolu, který se po té snadněji odstraňuje z lidského těla. Doplněním vitamínu C do stravy lidí a zvířat, kteří trpí hypercholesterolemií, má za následek významné snížení koncentrace cholesterolu v plazmě. Jako modelové organismy při těchto studiích byly použity králíci a guinejské vepřičky [8,9].

Chronický nedostatek vitamínu C může mít za následek patogenezí aterosklerózy, dále vliv na koncentraci cholesterolu a triacylglycerolu v plazmě i integritu cévních stěn. Vitamin C je do metabolismu cholesterolu zapojen mnoha způsoby. Nedostatečný příjem vitamínu C ve stravě je nepřímo spojený se snižující se absorpcí cholesterolu, tento účinek vyplývá ze snížené dostupnosti žlučových kyselin, monoglycerolů a mastných kyselin. Vylučování cholesterolu, jako neutrálního steroidu, nelze ovlivnit vitamínem C. Ačkoliv mnoho důkazů o zahrnutí kyseliny askorbové do syntézy cholesterolu je nejistých, zdá se, že syntéza cholesterolu je snižena při nedostatku kyseliny askorbové [8,9].

1.1.2.4 Význam vitamínu C pro imunitní systém

Lidský imunitní systém je silně ovlivněn příjmem živin, vitaminů a minerálních látek ze stravy. Již dlouho se vedou diskuze, zda vitamin C může přispět k prevenci a léčbě běžného nachlazení. Některé buňky imunitního systému si můžou nahromadit vitamin C, který potřebují pro výkon jejich funkce, zejména fagocyty a t-buňky. Nedostatek vitamínu C má za následek sníženou rezistenci buněk proti napadení některými patogeny, zatímco vyšší záso-
ba vitamínu C může být zodpovědná za vyšší odolnost imunitního systému. Zvýšené množství vitamínu C může mírně snížit dobu trvání nemoci u zdravých jedinců, ale nemůže ovlivnit výskyt a dopad nemoci [14].

1.1.2.5 Význam vitamínu C v boji proti rakovině

Epidemiologické studie o ochranném účinku vitamínu C proti rakovině v souvislosti s konzumací zeleniny jsou významné. Bylo zjištěno, že pravidelná konzumace vyšších dávek ovoce a zeleniny je spojená se sníženým rizikem vzniku rakoviny, zvláště pak s epitelárními druhy rakoviny dýchacích a zažívacích cest. Podle některých studií vitamin C snižuje výskyt karcinomu žaludku a možný je také antikarcinogenní účinek u karcinomu jazyka, faryngu

(hltnu), jícnu, plic, pankreatu a děložního hrdla. Mechanismus, kterým ovoce a zelenina snižuje riziko rakoviny, může být vysvětlen na základě obsahu vysokého množství potenciálně proti karcinogenních činitelů v ovoci a zelenině. Mezi tyto činitele jsou zařazeny karotenoidy, lykopen, vitamin C a vitamin E, kyselina listová, selen, vláknina, glukosinuláty a indoly, dithiolthioly, isokyanáty, flavonoidy, fenoly, inhibitory proteáz a rostlinné steroly. Všeobecně tyto činitele mohou působit při inhibici nitrosaminových formací, brání přeměně dusitanů a dusičnanů na karcinogenní nitrosaminy, zásobování substrátem pro formování antineoplastických činitelů, ředění a navázání karcinogenních látek v zaživacím traktu, antioxidační působení a další [10,15,16].

1.1.3 Absorpce a potřeba vitaminu C pro lidský organismus

Požadavky organismu na vitamin C jsou poměrně vysoké a zásoby minimální. Vitamin C je rozpustný ve vodě a jeho nadměrný příjem je odváděn močí z těla ven. Vitamin C je absorbován střevní sliznicí. Zvýšené dávky vitaminu C (1,2 -12 g) jsou spojeny s jeho sníženou absorpcí [7,13,17].

Denní dávka 10 mg vitaminu C bývá postačující k prevenci skorbutu. Dnes doporučené množství vitaminu C je 65-120 mg na osobu a den. Denní příjem 100 mg vitaminu C je spojen s udržení maximální zásoby vitaminu C v lidském těle, která činí 3 g. Při uvedeném příjmu vitaminu C činí poločas obratu přibližně 14 dní. Vhodná denní dávka vitaminu C se liší podle věku, pohlaví a fyzické aktivity u různých jedinců. Zvýšené požadavky organismu jsou pak během těhotenství, u kojících žen, u kuřáku, u dětí v období růstu, u sportovců, při těžké práci, při práci s těžkými kovy (Pb, Hg), v chladném prostředí, při horečnatých onemocněních a po operacích [1,7,10,18].

U kuřáku je zvýšena potřeba vitaminu C až na čtyřnásobek doporučené denní dávky. Je prokázáno, že vykouřením jedné cigarety je z těla odebráno 35 mg vitaminu C [19].

Zvýšené denní dávky vitaminu C snižují riziko srdečních a cévních onemocnění, aterosklerózy, hypertenze, šedého zákalu a AIDS [8].

Deficience vitaminu C či hypovitaminóza se projevuje řadou nespecifických příznaků, nejčastěji tzv. jarní únavou. Nejznámějším syndromem akutní avitaminózy jsou kurděje (skorbut) u dospělých lidí, u dětí dlouhodobý nedostatečný příjem vitaminu C vyvolává Moellerovou-Barlowovu nemoc. Příznaky kurdějí se objeví až po 3 měsících nedostatku vitaminu

C [2,20].

Nemoc kurděje se projevuje především krvácením z dásní, do nehtových lůžek, do vnitřních orgánů, sníženou odolností proti nemocem, zvýšenou krvácivostí a sníženou krvetvorbou. Dalšími příznaky jsou uvolňování zubů, snadná lomivost kostí, špatné hojení ran, nechutenství, bolesti kloubů. To vše souvisí se selháním biosyntézy kolagenu. Vitamin C také zasahuje do biosyntézy katecholaminů a jeho nedostatek je v této oblasti spojován s výskytem depresí a hypochondrií [2].

Dnes je onemocnění kurděje poměrně vzácné, vyskytuje se jen občas v chudých oblastech tzv. třetího světa [20].

Při dávkách vitamínu C 1-3 g za den byly zjištěny projímavé účinky. Vyšší dávka vitamínu C může způsobit gastrointestinální potíže. Zvýšená kyselost ze žaludku po pasáži do tenkého střeva může způsobit zánět, plynatost, průjem a omezení absorpce tohoto vitamínu spolu se zvýšením jeho ztrát stolicí. Po podání super dávek (10-20g denně) byl u pacientů pozorován neklid, nespavost a tvorba ledvinových oxalátových kamenů. Intoxikace kyselinou askorbovou je extrémně vzácná, spíše se objevují vedlejší účinky, například snížení hladiny vitamínu B₁₂ nebo známky megaloblastické anémie [10].

1.1.4 Fyziologie vitamínu C v lidském těle

Vitamin C se vstřebává v proximální části tenkého střeva aktivně, kdy absorpce kyseliny askorbové ve střevní sliznici probíhá prostřednictvím sodíko-dependentního aktivního transportního přenosu. Druhý mechanismus pro akumulaci vitamínu C ve tkáních spočívá v transportu kyseliny dehydroaskorbové, která je ihned po dosažení cíle redukována, v mnoha tkáních primárně tioltransferázou. Tento transport je 10x rychlejší než transport kyseliny askorbové, ale je kvantitativně limitován. Po absorpci je vitamin C distribuován do všech buněk lidského těla, kde metabolizuje. Nejvyšší hladina vitamínu C v lidském těle se nachází v nadledvinkách, bílých krvinkách, kosterním svalstvu, v mozku a zvláště pak v podvěsku mozkovém [7,10,11,12].

Odbourávání vitamínu C se odehrává v játrech řadou meziproductů, které jsou eliminovány močí. Část vitamínu C, který se nezapojí do metabolismu, se spolu s metabolity vylučuje močí. Produkty metabolismu, které se vylučují močí jsou: oxalát, dehydroaskorbát, kyselina 2,3-diketogulonová, askorbát-2-sulfát, 3-O-methylaskorbát, sacharoaskorbát atd. Močí se

vyklučuje denně z celkového množství přijaté askorbové kyseliny jako volná kyselina asi 20-25%, 20% jako kyselina 2,3- diketogulonová a 40-50% jako oxalát [10,11].

1.1.4.1 Antivitaminy vitamínu C

Antivitaminy nebo také antagonisty vitamínu jsou přirozené nebo syntetické látky, které inhibují určitým mechanismem funkci daného vitamínu nebo jeho absorpci, což může vést až k projevům deficiencie [19].

Za antivitaminy vitamínu C se považuje řada oxidoreduktáz uplatňujících se v metabolismu vitamínu C živočichů a rostlin. Náleží sem askorbát oxidasa, dále také askorbát peroxidasa, monodehydroaskorbát reduktasa, superoxid dismutasa a askorbát: cytochrom-*b*-reduktasa. Nepřímo způsobují ztráty askorbové kyseliny další oxidoreduktasy jako jsou enzymy triviálně nazývané polyfenolazy. Antagonistou kyseliny L-askorbové je kyselina glukaskorbová [1,11].

Jako antivitaminy mohou být považovány některé farmaceutické preparáty. Například kortizonové léky a aspirin zabraňují vstřebávání vitamínu C, antibiotika a uspávací prostředky (barbituráty) metabolismus vitamínu C narušují.

Všechny polutanty životního prostředí se považují za antagonisty vitamínu C. Např. ve vzduchu, především ve městech, působí jako antivitaminy: oxid uhelnatý, olovo, ozón, oxid siřičitý a oxid dusičitý [19].

1.1.5 Vlastnosti a reaktivita vitamínu C

Vitamin C je velmi dobře rozpustný ve vodě. V neutrálním, kyselém a alkalickém prostředí za katalytických účinků těžkých kovů (Cu, Fe) podléhá snadno oxidaci za vzniku již zmíněné kyseliny L-dehydroaskorbové a vytváří v mnoha organismech důležitý, reversibilní biologický oxidoredukční systém. Přenos elektronů je reverzibilní dokud není porušena kruhová struktura kyseliny L-dehydroaskorbové. Pokud dojde k jejímu hydrolytickému rozštěpení, vzniká kyselina 2,3 dioxo-L-gulonová a aktivita vitamínu C zaniká [2,11].

Vitamin C neboli kyselina askorbová je nestabilní a snadno podléhá oxidaci. K oxidaci askorbové kyseliny na dehydroaskorbovou dochází působením enzymů, které se řadí do kategorie antivitaminů C. Dále je oxidována vzdušným kyslíkem a různými chemickými oxidačními činidly. Oxidace na dehydroaskorbovou kyselinu je vratná reakce a může probíhat

různými mechanismy. V případech, kdy přenosem jednoho elektronu vzniká jako meziproduct radikál askorbové kyseliny se oxidace označuje jako jednoelektronová. Vzniká-li dehydroaskorbová kyselina přímo, hovoří se o dvouelektronové oxidaci [1,21].

Obě enolové hydroxylové skupiny askorbové kyseliny mohou disociovat a askorbovou kyselinu lze proto považovat za dvojsytnou kyselinu ($pK_1 = 4,25$ a $pK_2 = 11,8$). V roztocích o fyziologických hodnotách pH se převážně vyskytuje jako anion. Např. v roztocích o pH 7,4 je v této formě přítomno 99,93 % askorbové kyseliny, zbytek tvoří nedisociovaná kyselina (0,06 %) a dianion (0,01 %). Jsou známy pouze soli monovalentního aniontu, např. askorbát sodný [21].

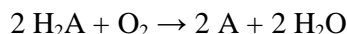
Askorbyl radikál je kyselina ($pK = -0,96$), která v roztocích existuje jako anion stabilizovaný rezonancí (jako bicyklická sloučenina, zřejmě s dvojnou vazbou mezi uhlíky C-2 a C-3), nepárový elektron je lokalizován v oblasti C-4 [21].

Dehydroxyaskorbová kyselina je ve vodných roztocích přítomna jako hydratovaný bicyklický monomer [21].

1.1.5.1 Enzymová oxidace

V enzymově aktivních a zvláště v mechanicky poškozených rostlinných pletivech (loupáním, krájením) je oxidace kyseliny askorbové na kyselinu dehydroaskorbovou katalyzována především enzymem askorbát oxidázou (L-askorbát:O₂ oxidoreduktázou). Tento enzym oxiduje askorbovou kyselinu za přítomnosti vzdušného kyslíku. V některých rostlinných pletivech souvisí ztráty vitamínu s aktivitou peroxidas a jiných enzymů [1,21].

Obecné schéma reakce enzymové oxidace (H₂A askorbová kyselina, A dehydroaskorbová kyselina):



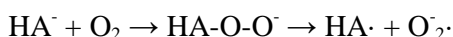
Detailní mechanismus reakce je ve skutečnosti složitější, kdy je primárním produktem oxidace askorbové kyseliny její askorbylradikál. Reakce je vratná a dehydroaskorbová kyselina může být redukována zpět na askorbovou kyselinu (glutathionem, cysteinem, jinými trioly, hydrochinony a dalšími látkami) [1].

Ztráty vitamínu C enzymovou oxidací v ovoci a zelenině při zpracování lze omezit účinným blanšírováním, které inaktivuje enzymy oxidující kyselinu askorbovou [1].

1.1.5.2 Autooxidace

Nejvýznamnější reakcí kyseliny askorbové je oxidace vzdušným kyslíkem (autooxidace), která způsobuje většinu ztrát v potravinách při jejich zpracování. Probíhá v přítomnosti i v nepřítomnosti iontů přechodných (transitních) kovů. Aktivní jsou hlavně ionty trojmocného železa a dvojmocné mědi. Reakce závisí na hodnotě pH prostředí. V kyselém prostředí je pomalá, rychlejší je v neutrálním a nejrychlejší je v alkalickém prostředí [21].

Autooxidace probíhá bez katalýzy ionty kovů následujícím mechanismem:



Reakcí iontů askorbové kyseliny s tripletovým kyslíkem vzniká jako přechodný produkt C-2 hydroperoxid anionu L-askorbové kyseliny (HA-O-O⁻), který se spontánně rozkládá na askorbylradikál (HA[·]) a superoxidový radikál. Z askorbylradikálu vzniká následnou reakcí anion [1].

Katalytická účinnost kovů spočívá v tom, že askorbová kyselina tvoří s iontem kovu o vyšší valenci a s kyslíkem velmi stabilní komplex, ve kterém je askorbová kyselina přítomna jako anion HA⁻. Rychlost reakce roste s hodnotou pH prostředí [1].

1.1.5.3 Redukce iontů kovů

Askorbová kyselina reaguje s ionty kovů za vzniku komplexů, ale za určitých podmínek (především při nízkých hodnotách pH prostředí a je-li přítomna v nízkých koncentracích) může ionty kovů také redukovat [21].

Reakce s ionty Fe³⁺ a analogicky s Cu²⁺ probíhá následujícím způsobem:



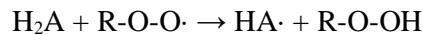
Redukční působení askorbové kyseliny v konečném efektu urychluje oxidační reakce související s nežádoucími změnami chuti, vůně a barvy potravin [21].

1.1.5.4 Reakce s volnými radikály

Askorbová kyselina i její isomery a deriváty mohou reagovat s volnými radikály, které způsobují oxidaci lipidů a dalších oxylabilních složek potravin. Brzdí tak řetězovou autooxidační reakci a účinně působí jako antioxianty [21].

Reakci askorbové kyseliny s peroxylovým radikálem mastné kyseliny (R-O-O[·]), případně s

alkoxylovým radikálem (RO·), lze schematicky popsat rovnicí:



Vzniklý askorbylradikál není schopen vyvolat řetězovou reakci a disproportionuje na askorbovou a dehydroaskorbovou kyselinu [21].

Askorbová kyselina je obecně účinnějším antioxidantem použije-li se v kombinaci s tokoferoly. Ty potom přednostně reagují s volnými radikály lipidů, vzniklé radikály tokoferolů jsou na fázové rozhraní tuk-voda redukovány zpět na tokoferoly askorbovou kyselinou [1].

Askorbová kyselina reaguje podobně také s toxickými formami kyslíku jako je hydroxylový radikál (HO·) nebo anion superoxidového radikálu ($\text{O}_2\cdot^-$) a singletový kyslík ($^1\text{O}_2$). Všechny tyto reakce tak současně zpomalují oxidaci lipidů [1].

1.1.5.5 Degradace katalyzovaná kyselinami

V silně kyselém prostředí askorbová kyselina dekarboxyluje a stejně jako jiné cukry dehydratuje. V modelových pokusech vzniká téměř kvantitativně oxid uhličitý a 2-furankarbaldehyd. Významným produktem reakce je tzv. 3-deoxy-L-xyloson, systematickým názvem 3-deoxy-L-glycero-pentulosa, který hraje významnou roli při reakcích neenzymového hnědnutí pentos [1].

Kysele katalyzovaná degradace askorbové kyseliny se považuje za hlavní příčinu ztrát vitamínu C v konzervářských výrobcích v nepřítomnosti vzdušného kyslíku. Dochází k ní i v kyselých potravinách jako jsou ovocné komploty a džusy (pH kolem hodnoty 3,5), zvláště při skladování za vyšších teplot nebo při termických operacích jako je sušení. Při teplotě 50°C ztrácejí ovocné džusy 70–95 % askorbové kyseliny během 12 týdnů skladování. Rychlost reakce je 10x nižší než je rychlost autooxidace katalyzované kovovými ionty [1,21].

1.1.5.6 Reakce s dalšími složkami potravin

Ke ztrátám vitamínu může docházet také reakcí askorbové kyseliny s některými reaktivními složkami potravin. Technologicky jsou významné především reakce s chinony vznikajícími reakcemi enzymového hnědnutí, reakce s dusitany a hemovými barvivy v mase a v masných výrobcích [1].

1.1.6 Ovlivnění stability vitamínu C

Stabilita askorbové kyseliny je klíčový problém, jelikož kyselina askorbová je velmi nestabilní ve vodných roztocích. Je mnoho známých faktorů, které ovlivňují stabilitu kyseliny askorbové, mezi něž patří působení světla, zvýšená teplota, zvýšené pH, přítomnost kyslíku nebo vliv kovových iontů. Je proto nutné, aby působení těchto vlivů bylo omezeno na minimum. Kyselina askorbová se při extrakci stabilizuje zajištěním nízkého pH, přítomností komplexotvorných látek a redukujících látek [22,23].

1.1.6.1 Vliv světla

Askorbová kyselina i dehydroaskorbová kyselina jsou náchylné na působení světla. Účinek přirozeného světla a UV záření (265 nm) na stabilitu askorbové kyseliny v roztocích byl zkoumán v závislosti na výběru vhodného laboratorního skla – hnědého a normálního průsvitného skla. Experiment byl proveden ve dvou druhích baněk – hnědá (nepropustná pro přirozené světlo) a bílá transparentní (propouští přirozené světlo), které byly vystaveny UV záření a ponechány při pokojové teplotě [22].

Výsledky experimentu ukázaly, že degradace askorbové kyseliny byla významná při působení přirozeného světla a UV záření. Po jedné hodině experimentu, počáteční koncentrace askorbové kyseliny snížila na 79,9% při působení UV záření. Při působení přirozeného světla se koncentrace snížila na 84,2% v transparentní baňce a na 95,6% v hnědé baňce [22].

Výsledky experimentu prokázaly, že askorbová kyselina je mnohem stabilnější, když je skladována v hnědé objemové lahvi, která zabrání degradaci askorbové kyseliny působením přirozeného světla. Je tedy nezbytně nutné chránit kyselinu askorbovou před působením přirozeného světla a UV záření [22].

1.1.6.2 Vliv teploty

Teplota je jedním z hlavních klíčových faktorů, které ovlivňují stabilitu kyseliny askorbové a dehydroaskorbové v roztocích. Bylo provedeno mnoho experimentů, které zkoumali vliv teploty na stabilitu kyseliny askorbové. Při experimentálních pokusech, které byly provedeny při 60°C a 80°C, bylo zjištěno, že koncentrace kyseliny askorbové během jedné hodiny klesla více než o 20% z původní koncentrace. Při působení těchto teplot je kyselina askorbová velmi nestabilní a dochází k jejímu značnému úbytku. Při zkoumání stability kyseliny askor-

bové při laboratorní teplotě, bylo zjištěno, že počáteční koncentrace zůstává stejná po dobu jedné hodiny. Je nutné při práci s kyselinou askorbovou pracovat za laboratorních teplot [22].

1.1.6.3 Vliv pH

Askorbová kyselina je stabilnější v kyselém prostředí. V kyselém prostředí není možný vznik askorbátu jako hlavního degradačního produktu. Bylo provedeno mnoho pokusů na srovnání extrakce v podmínkách různého pH a jejich dopad na stabilitu kyseliny askorbové. Obecně, pH kolem 2,1 bylo nejvhodnější pro přípravu vzorku a zajišťuje dostatečnou stabilitu a obnovu kyseliny askorbové. Meta-fosforečná kyselina je nejčastěji používána jako extrakční činidlo, občas se používá v kombinaci s EDTA nebo s organickými kyselinami, metanolem nebo acetonitrilem [22].

1.1.6.4 Vliv koncentrace kyseliny askorbové

Koncentrace kyseliny askorbové a dehydroaskorbové v roztocích může ovlivňovat jejich stabilitu. Rumelin, Iwase a Novaková prováděli výzkum stability askorbové kyseliny v roztocích při různé koncentraci. Výsledkem studie bylo zjištění, že kyselina askorbová je stabilnější při vyšší koncentraci v roztoku. Stabilita vitamínu C se v roztoku významně snižovala v koncentracích pod 0,1 mg/l [22].

1.1.6.5 Vliv stabilizačních látek

Stabilizující látky jsou často používány k zajištění stability kyseliny askorbové a dehydroaskorbové v roztocích. Jako typický stabilizátor je používána kyselina meta-fosforečná, která je schopna splnit úlohu extrakčního činidla a stabilizátoru. Mezi další stabilizátory můžou být zařazeny tyto sloučeniny: trichloroctová kyselina, o-fosforečná kyselina, homocystein, oxalová kyselina, EDTA, trifluoroctová kyselina, směs: citronová kyselina a pyrogallol [22].

1.1.6.6 Vliv iontů kovů

Přítomnost kovových iontů způsobuje sníženou stabilitu kyseliny askorbové a dehydroaskorbové v roztocích. K omezení vlivu přítomných těžkých kovů se používá EDTA nebo se extrahuje kyselina askorbová do organických rozpouštědel. Byl zkoumán vliv Cu^{2+} , Fe^{2+} ,

Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} iontů kovů, kde dané množství jednotlivých prvků odpovídalo množství, které bylo přidáno. Pouze Cu^{2+} ovlivňoval významně množství askorbové kyseliny [22,23].

1.1.7 Zdroje vitamínu C

Vitamin C je obsažen v mnoha potravinách rostlinného původu, především v zelenině, citrusovém ovoci, drobném bobulovitém ovoci a v bramborách [4].

Nejvyšší obsah vitamínu má čerstvé ovoce a čerstvá zelenina. Na obsah vitamínu C v zelenině má vliv mnoho faktorů. Mezi tyto faktory může být zařazen typ kultivaru, vegetační podmínky během růstu, stupeň zralosti, způsob posklizňového uskladnění, působení světla a další. V potravinách rostlinného původu je zpravidla 90-95% vitamínu přítomno ve formě askorbové kyseliny, zbytek tvoří dehydroaskorbová kyselina [1,4,10,17].

Z potravin živočišného původu jsou nejvýznamnějším zdrojem vitamínu C pouze játra. Další potraviny (maso, vejce a mléko) mají jako zdroj vitamínu téměř zanedbatelný význam. Významným zdrojem askorbové kyseliny mohou být šunky, kde se kyselina askorbová přidává jako aditivní látka. Přídavek askorbové kyseliny (resp. askorbátu sodného nebo askorbyl-palmitátu) k masu a masným výrobkům (v množství 60-180 mg/kg) spolu s dusitany např. při výrobě šunky, má funkční i ekonomický význam [1].

Lidé přijímají vitamin C výhradně ze stravy, výživových doplňků a vitaminových preparátů. Při konzumaci zeleniny či ovoce, jako významného zdroje vitamínu C, musí být brán zřetel na to, kolik mg vitamínu C potravina obsahuje, zda ji konzumujeme syrovou či tepelně upravenou, jaké množství jí můžeme sníst a zda je dostupným a běžným zdrojem či jen výjimečným. Bohaté zdroje vitamínu C však zpravidla nebývají příliš významné pro krytí potřeby vitamínu (např. šípky, černý rybíz, kadeřavá petrželka), neboť se konzumují jen příležitostně a v malém množství. Mnohem větší význam mají zdroje s průměrným obsahem vitamínu C, které se konzumují pravidelně a v relativně značném množství (např. brambory) [1,10,13].

Tab. 1. Obsah vitamínu C v zelenině v jedlém podílu [1,10].

Zelenina	Obsah vit.C (mg/100g)	Zelenina	Obsah vit.C (mg/100g)
Paprika (různé druhy)	62-300	Chřest	15-40
Petržel kadeřavá	150-270	Rajčata	8-38
Květák	4,7-161	Pór	15-30
Kapusta hlávková	70-140	Fazolové lusky	9-30
Křen	45-120	Salát hlávkový	6-30
Brokolice	110-113	Petržel kořenová	23
Kapusta růžičková	100-103	Česnek	15-16
Špenát	35-84	Okurka	6,5-11
Kedluben	28-70	Mrkev	5-10
Zelí	170-700	Cibule	90-100
Pažitka	430	Mrkev	50-100
Hrášek	80-410	Lilek	80

Úroveň příjmu vitamínu C je ovlivňována nejen způsobem úpravy potravin – typem tepelného opracování, ale i dobou skladování potravin. Výše ztrát vitamínu během zpracování je značná a při některých nešetrných technologických postupech může dosáhnout až 100% [4,17].

Tab. 2. Obsah vitamínu C v zelenině a v bramborách v syrovém stavu a po tepelném zpracování (tepelné opracování vařením v neslané vodě) [17].

Potravina	Obsah vitamínu C (mg/100g)	
	Syrový stav	Tepelně zpracovaná
Nové brambory	16	9
Staré brambory	11	6
Zelené fazole	12	7
Hrášek	24	16
Brokolice	87	44
Růžičková kapusta	115	60
Květák	43	27

1.1.8 Ztráty vitamínu C

Vitamin C patří mezi nejméně stabilní vitaminy. Ke ztrátám dochází při skladování, kulinárním a průmyslovém zpracování, největší ztráty jsou při tepelném opracování [17].

Ztráty vitamínu C u květáku, bílého zelí, růžičkové kapusty a fazolek při klasickém varu, varu v tlakovém hrnci a při ohřevu v mikrovlnné troubě (750 W) zjišťovali polští vědci. Nejnižší ztráty byly u uvedených potravin zjištěny po mikrovlnném ohřevu (13,9%), vařením v tlakovém hrnci poklesl obsah vitamínu C v průměru o 32,5%. Při klasickém způsobu vaření činily průměrné ztráty vitamínu C 53,8%, když byla zelenina vkládána do studené vody a 37,8%, když byla vkládána do vody vařící. Bylo zjištěno, že při různých konvenčních způsobech tepelné úpravy potravin dochází ke ztrátám vitamínu C v rozsahu od 14,4% do 94,6%, přitom největší ztráty jsou při běžném vaření. Vařením se snižuje obsah vitamínu C v rozsahu 23,9 – 94%, kvůli jeho nestabilitě při vysokých teplotách a kvůli tomu, že je ve vodě rozpustný [10,55].

Vysoké ztráty vitamínu C jsou způsobeny výluhem, dále je citlivý na pH prostředí, kdy dochází ke ztrátám při kulinární a průmyslové úpravě v alkalickém či neutrálním prostředí.

Významné jsou i ztráty enzymatickou oxidací. V nepřítomnosti vzdušného kyslíku jsou ztráty způsobeny hlavně kyselinami katalyzovanou degradací. Celkové ztráty se pohybují zpravidla mezi 20 až 80% [1,17].

Ztráty kyseliny askorbové jsou obvyklé při mytí, blanširování (předvaření), vaření a dalších tepelných úpravách a konzervování potravin. Povaha a rozsah ztrát závisí na pH, teplotě, množství vody, době působení, velikosti povrchu materiálu, lokalizaci vitamínu C v zelenině, celkovém obsahu vitamínu, obsahu intracelulárního kyslíku, aktivitě oxidačních enzymů, zralosti, rozsahu kontaminace těžkými kovy a přívodu kyslíku. Ztráty vitamínu C výluhem jsou vyšší u listové zeleniny s velkým povrchem než u kořenové zeleniny. U listové zeleniny jsou ztráty vitamínu v rozmezí 20-70% původního obsahu a u kořenové zeleniny je rozmezí ztrát vitamínu 25-50%. K značnému úbytku vitamínu dochází rovněž při loupání plodů, kdy se odstraňují povrchové vrstvy bohaté na vitamin [1,17].

Destrukci vitamínu C je možno předcházet inaktivací enzymů přítomných v ovoci a zelenině (blanširováním). Prevence ztrát vitamínu C při přípravě pokrmů spočívá především ve vyloučení přítomnosti kyslíku a kovových iontů, zejména mědi a železa a v udržení nízké teploty a pH [10].

1.1.8.1 Ztráty vitamínu C při technologickém zpracování

Porovnáním ztrát v různých fázích technologického postupu zpracování potravin od sklizně po konzumaci hotového pokrmu bylo zjištěno, že k největším ztrátám vitamínu C dochází během vaření [10].

Vedle tepelného zpracování potravin se jejich údržnost může významně prodloužit sušením, které je spojeno s významnými ztrátami u kyseliny askorbové, kdy ztráty dosahují až 80%. Nové metody dehydratace, např. lyofilizace a extruze, představují, pokud jde o údržnost vitamínů, mnohem šetrnější postupy než klasické sušení [1,10].

Zmrazování je další způsob konzervace potravin. Vysoké ztráty vitamínů v zelenině nastávají při blanširování zeleniny před mražením, při dlouhodobém skladování potravin ve zmraženém stavu a rovněž ve vyteklé šťávě při rozmrazování. Ztráty při rozmrazování také záleží na přítomnosti přírodních antioxidantů nebo na přítomnosti kyslíku v surovinách a potravinách. Je-li potravina skladována méně než 12 měsíců a při teplotě okolo - 20°C, pak ztráty vitamínu C nepřesahují 15%. Hlavním faktorem ovlivňujícím ztráty vitamínu C ve

zmražené potraviny při uvedených nízkých teplotách je prostupnost obalu pro kyslík a světlo. K nejvyšším ztrátám vitamínu C dochází při nesprávném rozmrazování potraviny [1,10].

Tab. 3. Ztráty vitamínu C v zelenině po rozmrazení (doba skladování 6-12 měsíců při teplotě -18°C) [10]

	Průměrné ztráty obsahu vitamínu C v rozmražené zelenině
	[%]
Brokolice	35-68
Květák	40-60
Špenát	54-80
Hrášek	32-67

2 TEPELNÉ OPRACOVÁNÍ POTRAVIN

Tepelná úprava potravin patří mezi základní zvyklosti při přípravě pokrmů. Tepelnou úpravou potravin je dosaženo [25]:

- lepší stravitelnosti potravin (mění se struktura a uvolňuje se tuhá konzistence surových potravin, čímž je usnadněno jejich trávení).
- zlepšení organoleptických vlastností pokrmů tj. vzhledu, chuti a vůně (účinkem tepla nebo biochemických vlivů vznikají nové chuťové a vonné látky).
- ničí se zdravotně závadné látky v potravinách (patogenní mikroorganismy).

Tepelné zpracování potravin je jedním z neefektivnějších procesů pro ochranu potravin před mikrobiologickým rozkladem a pro inaktivaci nežádoucích enzymů, ale má negativní vliv na retenci vitamínů v potravine [25,26].

Základní formy tepelné úpravy potravin můžeme rozdělit podle toho, jak vysoká teplota a jak dlouho teplo na potraviny působí a podle prostředí, ve kterém působí [26].

Vaření – teplo je dodáváno vodou, v níž je potravina ponořena.

Vaření v páře – teplo je dodáváno párou.

Dušení ve vodě – teplo je dodáváno vodou a párou.

Mikrovlnný ohřev – působení vysokofrekvenční mikrovlnné energie.

Pečení – teplo je dodáváno teplým vzduchem.

Mezi nevýhody tepelného opracování potravin patří ztráta výživových látek, které se vodou vyluhují. Působením tepla dochází k uvolňování plynů, mění se barviva, srážejí se bílkoviny, bobtnají škroby a pektiny, mění se energetická a nutriční hodnota pokrmů [26].

Při tepelném opracování dochází ke značným ztrátám u vitamínů. Možným nepříznivým změnám termolabilních složek potravin lze předejít účelnou volbou kombinací zahřívacích teplot a dob: poměrně velmi krátké a vysoké záhřevy denaturují enzymy, vysokomolekulární bílkoviny mikroorganismů, kdežto nízkomolekulární, cenné sloučeniny mohou zůstat beze změny. K nejméně odolným vitamínům patří vitamin C. Ztráty vitamínu C během tepelného zpracování potravin činí 55-65%. Poměrně odolné proti teplu jsou vitaminy A, B₂ a D. Vi-

tamin A je však citlivý na vliv vzdušného kyslíku [26].

2.1 Vaření

Vaření je technologická úprava pokrmů, při které je působeno na zvolenou potravinu horkou vodou o teplotě 100°C. Při vaření jsou potraviny zpravidla ponořeny ve vodě a tepelná úprava probíhá rovnoměrně ze všech stran. Zelenina se vaří v malém množství vody [25,26].

Na průběh vaření má vliv kvalita vody. Měkká voda způsobuje větší vyluhování ve vodě rozpustných látek a tvrdá voda způsobuje usazování minerálních látek na potravinách a prodlužuje dobu vaření. Na vaření je vhodná středně tvrdá voda [25].

Dlouhodobým vařením se mění nejen vzhled potravin, ale i konzistence, barvu a vůni, ale dochází i ke značným ztrátám živin. Doba vaření se nepočítá od doby vložení pokrmu do vody, ale od doby, kdy voda začala znovu vřít [26].

2.1.1 Vaření zeleniny

Zelenina se vkládá do horké osolené vody, aby během varu nedocházelo k intenzivnímu vyluhování výživných i chuťových látek do vody a aby byla zachována konzistence a barva. Přidáním soli se zpomaluje vyluhování. Zelenina se vaří podle možnosti vcelku, aby byly zachovány biologicky cenné látky a doba varu se zbytečně neprodlužuje. Některé druhy zeleniny (obsahující čpavé látky) se vaří bez pokličky. Tyto látky během varu bez pokličky z potraviny vyprchají. Při vaření zeleniny dochází ke ztrátám vitamínu C dvojího druhu: část vitamínu se rozloží varem s vodou a část je vyluhována do vývaru [25,26].

Při vaření zeleniny přidáním cukru se zelenina zpevňuje a udržuje si původní tvar. Přidáním oleje nebo másla se vyluhují vitamíny rozpustné v tucích.

Vývar ze zeleniny se používá k dalšímu kulinárnímu zpracování [25].

2.2 Vaření v páře

Při vaření v páře dochází k tepelnému opracování působením horké páry. Při vaření v páře jsou potraviny položeny na pařákovou vložku (síto) do nádoby s menším množstvím vroucí vody nebo jsou použity přímo varné skříně v nichž se tvoří pára. Potravina se v krátké době tepelně zpracovává [26].

Vaření v páře patří k nejšetrnějšímu způsobu tepelné úpravy potravin, protože nedochází k vyluhování živin, chuťových látek a dalších cenných látek do vody. Tento působ úpravy se používá nejčastěji u zeleniny, kdy se účinně zabraňuje ztrátám ve vodě rozpustných vitamínů [26].

2.3 Dušení

Dušení je tepelná úprava v uzavřené nádobě, při které je teplo potravině dodáváno prostřednictvím malého množství vody, tuku, vlastní šťávy a horké páry. Dušení je šetrný způsob tepelné úpravy. Dušení se musí provádět v dobře uzavřených nádobách, aby nedocházelo k úniku aromatických látek. Během dušení je přidávána tekutina - voda nebo vývar, pouze v menším množství, nesmí dojít k úplnému zalití potravin, a tekutina musí být teplá. Během tepelného procesu se při zahřívání vytváří pára s teplotou vyšší než je 100°C. Působením páry se snižuje doba tepelné úpravy [25,26].

2.3.1 Dušení zeleniny

Zelenina se dusí co nejkratší dobu, aby se v zelenině zachovalo co nejvíce vitamínů. Zelenina se zpočátku dusí pouze na tuku, poté, když zelenina uvolní šťávu, se dle potřeby podlévá. U zeleniny, která obsahuje čpavé látky (kapusta, zelí) se před vlastním dušením provádí spaření horkou vodou [26].

2.4 Pečení

Pečení je technologický postup, při kterém je potravina upravována suchým teplem, dále na potravinu může působit částečně i tuk a vypečená šťáva. Na upravované potraviny působí hlavně suché teplo. Teplota při pečení dosahuje rozmezí od 120 – 250 °C. Během pečení se z upravované potraviny uvolňují aromatické látky. Při pečení při vysokých teplotách se na potravinách (zejména u masa) vytváří kůrka, v níž vznikají aromatické a chuťové látky a také chrání potravinu před vysycháním [26].

Jedním ze způsobů pečení je gratinování – zapékání. Jedná se spíše pro označení dokončující fáze pečení. Zapékání – gratinování je rychlá, až prudká tepelná úprava předem upravených potravin nebo potravin, kterým stačí jen velmi krátká doba tepelné úpravy pro jejich změknutí a následné zapečení [26].

2.5 Mikrovlnný ohřev

Mikrovlnný ohřev je způsob tepelné úpravy potravin, kdy působením vysokofrekvenční mikrovlnné energie na potraviny dochází k jejich rychlému ohřátí [26].

Mikrovlnný ohřev se principiálně liší od klasického ohřevu. Při mikrovlnném ohřevu dochází k přímé absorpci mikrovlnného záření polárními složkami (voda, soli, tuky apod.), čímž se zvyšuje jejich vibrační energie a zahřívají se zevnitř. Gradient nárůstu teploty bývá 0,25-4 °C za sekundu. Mikrovlnný ohřev je 3-4krát rychlejší a o 20% levnější než konvenční způsob ohřevu [27].

2.5.1 Rizikové faktory mikrovlnného ohřevu potravin

Navzdory výhodám mikrovlnného ohřevu se čím dál častěji objevují námitky proti mikrovlnnému ohřevu díky rizikům, které tento ohřev způsobuje. Jsou to:

Chemická rizika – produkce nebezpečných látek působením vysoké teploty (heterocyklické aminy, polyaromatické uhlovodíky a nitrosaminy).

Mikrobiální rizika – nerovnoměrný ohřev za krátkou dobu není schopen zničit všechny přítomné mikroorganismy.

Degradace nutričně významných látek – dochází k degradaci proteinů, oxidaci lipidů, rozkladu vitamínů (C, E, B).

Transport kontaminantů z obalů – některé plasty obsahují aditiva (plastifikátory, stabilizátory, syntetické antioxidanty a pigmenty), které mohou přecházet do ohřívané potraviny. Z plastů mohou přecházet i monomery (vinylchlorid, akryláty, akrylonitril) [27].

Jako největší riziko při používání mikrovlnného ohřevu se považuje oxidační degradace tuků. U tuků a olejů, přestože mají malou absorpční schopnost tak dochází k rychlému vzrůstu teploty (běžně 200 °C a více) díky jejich relativně malé měrné tepelné kapacitě. Vysoké teploty, kterým jsou tuky a oleje při mikrovlnném ohřevu vystavovány urychlují řadu reakcí, při kterých dochází k tvorbě mnoha degradačních produktů, což v konečném důsledku přispívá ke zhoršení sensorické a hygienické jakosti takto zpracovaných potravin. Jako produkt oxidace tuků jsou hydroperoxydy, které se při mikrovlnném ohřevu tvoří 3-4krát rychleji než při běžném konvenčním ohřevu [24,27].

3 CHROMATOGRAFICKÉ METODY

Chromatografické metody jsou fyzikálně-chemické separační metody, při kterých se oddělují, separují složky obsažené ve vzorku. Chromatografie patří mezi metody kvalitativní a kvantitativní analýzy vzorku [28].

V chromatografii se vzorek vnáší mezi dvě navzájem nemísitelné fáze, z nichž jedna je stacionární – nepohyblivá a druhá mobilní – pohyblivá. Aby docházelo k separaci látek, musí existovat fázové rozhraní mezi stacionární a mobilní fází, která unáší složky vzorku tak, aby obtékala stacionární fázi. Vzorek je umístěn na začátek stacionární fáze. Pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku mohou být stacionární fází zachycovány, a proto se při pohybu zdržují. Více se zdrží složky, které jsou stacionární fází poutány silněji. Tím se postupně složky od sebe separují a na konec stacionární fáze se dostávají dříve složky méně zadržované. Rozdělování jednotlivých složek je založeno na afinitě složek směsi k mobilní a stacionární fázi [28,30].

3.1 Rozdělení chromatografických metod

Chromatografických metod je velké množství. Vzhledem ke značné různorodosti se chromatografické metody dělí podle několika hledisek.

- **Podle skupenství mobilní fáze:**

- Ø Plynová chromatografie (*Gas Chromatography – GC*) – mobilní fáze je plyn.
- Ø Kapalinová chromatografie (*Liquid Chromatography – LC*) – mobilní fáze je kapalina.
- Ø Fluidní chromatografie – mobilní fáze je látka v nadkritickém stavu.
- Ø Plazmová chromatografie – mobilní fáze je proud iontů.

- **Podle uspořádání stacionární fáze:**

- Ø Kolonová chromatografie – stacionární fáze je umístěna v trubici (koloně).
- Ø Plošné techniky - Papírová chromatografie (*Paper Chromatography – PC*) – stacionární fáze je součástí chromatografického papíru nebo upravené celulózy.

- Tenkovrstvá chromatografie (*Thin Layer Chromatography – TLC*) stacionární fáze je umístěna na skleněné desce, hliníkové fólii nebo plochem podkladu z jiného materiálu.

- **Podle povahy děje, který převládá při separaci:**

Obvykle se při separaci uplatňuje několik fyzikálně-chemických dějů, ale jeden z nich převládá.

- Ø Rozdělovací chromatografie – o separaci rozhoduje odlišná rozpustnost složek vzorku ve stacionární fázi (kapalina) a mobilní fáze (kapalina nebo plyn).
- Ø Adsorpční chromatografie – o separaci rozhoduje různá schopnost složek poutat se (adsorbovat se) na povrch stacionární fáze (tuhá látka). Stacionární fází je adsorbent.
- Ø Iontově – výměnná chromatografie – o separaci rozhodují různě veliké elektrostatické přitažlivé síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze (iontoměnič) a ionty vzorku. Stacionární fází je ionex.
- Ø Gelová chromatografie – složky se separují podle velikosti na pórovité stacionární fázi (gelu) – menší molekuly vzorku se v pórech gelu zdržují déle (molekulově síťový efekt). Stacionární fáze je neionizovaný přírodní nebo syntetický gel.
- Ø Afinitní chromatografie – stacionární fáze je schopna vázat ve vzorku právě určité složky, ke kterým má úzce selektivní vztah – afinitu. Stacionární fáze obsahuje zakotvené ligandy, na které se rozdělovaná látka váže.

- **Podle podmínek při separaci:**

- Ø Izokratická chromatografie – během separace se podmínky metody nemění a zůstávají konstantní.
- Ø Gradientová chromatografie – během separace se podmínky metody mění, např. teplota nebo složení mobilní fáze [29,30].

3.2 Kapalinová chromatografie

3.2.1 Vývoj moderní kolonové kapalinové chromatografie

Kolonová kapalinová chromatografie (liquid column chromatography, LLC) je metoda již dlouho známa. V klasickém provedení (kolony délky až 0,5 m, vnitřní průměr kolem 10 mm, průměr částic stacionární fáze 0,05 až 1 mm) se používala až do poloviny šedesátých let. Mobilní fáze se pohybovala gravitací, průtok činil řádově jednotky mililitrů za minutu. Separace byly málo účinné (desítky teoretických pater) a doba analýzy dlouhá (až několik hodin) [33].

Prvními kapalinovými chromatografy, i když se zcela speciálním určením, byly automatické analyzátory aminokyselin, vyvinuté začátkem padesátých let na základě prací Moora a Steina. Koncem šedesátých let a začátkem let sedmdesátých dochází k prudkému rozvoji teorie a instrumentace moderní kapalinové chromatografie. Na trh byly uvedeny přístroje umožňující práci při zvýšených tlacích zpočátku do 4 MPa, později až do 40-60 MPa. Tím bylo umožněno značné zvýšení rychlosti analýzy. Současně dochází i k vývoji účinných chromatografických kolon, resp. jejich náplní. Od počátku sedmdesátých let bylo dosaženo pozoruhodných úspěchů i ve vývoji nových typů stacionárních fází určených speciálně pro kapalinovou chromatografii. V posledních letech se začíná rozvíjet i výzkum v oblasti vzájemných interakcí mezi dělenými látkami a stacionární a mobilní fází. Na základě tohoto výzkumu dochází k lepšímu pochopení vlivu kapalné mobilní fáze na chromatografický proces a k využívání řady selektivních interakcí v mobilní fázi pro praktická dělení látek [34].

3.2.2 Popis kapalinové chromatografie

Kapalinová chromatografie se využívá především k separaci směsí látek, které jsou netěkavé nebo špatně těkavé a termicky labilní (až 85% všech sloučenin). V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. Na rozdíl od plynové chromatografie rozhodují o separaci vzorku nejen jejich interakce se stacionární fází, ale velmi výrazně i použitá mobilní fáze. Během separace se analyt rozděluje mezi mobilní a stacionární fází. Čas, jaký stráví v jedné nebo druhé fázi, závisí na afinitě vzorku ke každé z nich [29,30,35].

V kapalinové chromatografii se využívají čtyři systémy podle převažujícího mechanismu separace :

- Kapalinová adsorpční chromatografie (liquid-solid chromatography, LSC)
- Kapalinová rozdělovací chromatografie (liquid-liquid chromatography, LLC)
- Gelová permeační chromatografie (GPC), nebo také SEC (size exclusion chromatography)
- Iontově výměnná chromatografie (ion exchange chromatography, IEC) [29,35].

Podle uspořádání stacionární fáze rozlišujeme kolonovou a tenkovrstvou či papírovou kapalinovou chromatografii [30].

3.2.3 Kapalinová eluční kolonová chromatografie

V případě kolonové chromatografie je k dělení látek používána chromatografická kolona. Chromatografická kolona je zpravidla skleněná, ocelová či plastová trubice naplněná drobnými částicemi vhodného materiálu – sorbentu. Určitá část sorbentu je přístupná pro molekuly vzorku a tvoří tzv. stacionární fázi. Mezi částicemi sorbentu protéká kolonou kapalina – mobilní fáze. Při běžné eluční metodě je roztok vzorku nastříknut v úzké koloně na začátek kolony. V kontaktu se sorbentem každá složka vzorku přechází zčásti do stacionární fáze ve snaze dosáhnout termodynamické rovnováhy. Velikost zadržení – retence složky na stacionární fázi je charakterizována retenčním faktorem k :

$$k = \frac{n_s}{n_m}$$

kde n_s a n_m jsou rovnovážná látková množství složky ve fázi stacionární a mobilní [31].

Na rozdíl od retence (zadržování látek) se jejich vymývání z kolony nazývá eluce. Mobilní fáze je také proto nazývána též eluční činidlo či eluent a má schopnost vymývat látky z kolony eluční silou. Čím rychleji jsou vymývány látky z kolony, tím má mobilní fáze vyšší eluční sílu. Rozpouštědla seřazena podle eluční síly tvoří eluotropickou řadu. Látky lze eluovat:

- a) izokratická eluce – mobilní fázi o konstantním složení (konstantní eluční síle),
- b) eluční sílu lze změnit skokem,
- c) gradientová eluce – eluční sílu lze měnit kontinuálně podle určitého programu (lineárního či nelineárního) [33].

3.3 HPLC

Metoda HPLC se vyvinula z plynové chromatografie v počátcích 70. let. Mezi metodami kapalinové chromatografie zaujímá významné místo metoda HPLC. Zkratka je odvozena od dvou přípustných názvů této techniky a to „high performance liquid chromatography“ (vysokoučinná kapalinová chromatografie) nebo „high pressure liquid chromatography“ (vysokotlaká kapalinová chromatografie). Mobilní fáze je v tomto případě kapalina, průtok mobilní fáze je zajištěn vysokým tlakem. V moderní kolonové chromatografii prochází mobilní fáze kolonou předem volitelnou rychlostí a pod příslušným tlakem, který odpovídá jak zvolené rychlosti, tak vlastnostem sorbentu. Vysokých účinností se dosahuje použitím stacionárních fází, které obsahují malé částice pravidelného tvaru a jednotné velikosti, které homogenně vyplňují kolonu. Tím se dosahuje účinnosti řádově desítek tisíc pater na metr délky kolony. Dávkuje se malá množství vzorku (řádově mikrolitry). K detekci jsou nutné citlivé detektory, které umožňují kontinuální monitorování látek na výstupu z kolony. Signál detektoru se zpracovává počítačem. Přístroj, na kterém se provádí HPLC analýzy se nazývá kapalinový chromatograf [32,33,34].

Mezi výhody HPLC patří zejména široká oblast použitelnosti: lze analyzovat ionty, látky polární a nepolární, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární (cca 80% veškerých známých látek je možné analyzovat metodou HPLC). Další výhodou je možnost ovlivňovat separaci složením mobilní fáze, která na rozdíl od plynové chromatografie není inertní, ale významně se podílí na separaci. Kromě analytických aplikací se často používá k preparacím. Nevýhodou je náročnější instrumentace a složitější mechanismus separace [33].

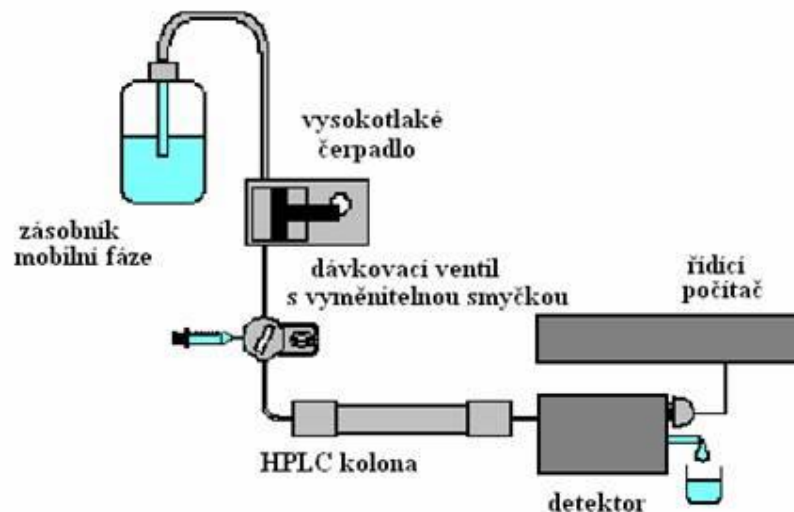
3.3.1 Instrumentace v HPLC

Přístroje pro HPLC jsou mnohem složitější než pro klasickou sloupcovou LC, kde se mobilní fáze pohybuje gravitační silou [33].

Kapalinový chromatograf se skládá z těchto částí:

- zařízení pro uchování (zásobník) a transport mobilní fáze (vysokotlaká čerpadla)
- zařízení pro dávkování vzorku (dávkovač)
- zařízení pro separaci látek (chromatografická kolona)
- zařízení pro detekci látek (detektory)

- zařízení pro zpracování signálu detektoru (PC s vyhodnocovacím programem) [35,36].



Obr. 3. Blokové schéma kapalinového chromatografu [36].

Zásobníky mobilní fáze

Zásobníky mobilní fáze v HPLC jsou nejčastěji skleněné nebo i nerezové nádoby objemu 0,1 – 2,5 l umístěné v samostatném prostoru. Zásobníky jsou opatřené ryskami a uzávěrem z inertního plastu s převratnými otvory pro teflonové hadičky. Mobilní fáze se čerpá přes filtry odstraňující mechanické nečistoty [34,37].

Odplyňovací zařízení

Odplynění je důležité proto, aby se detektoru v důsledku velkého tlakového spádu v systému netvořily bubliny. K odplynění se používají následující zařízení:

Membránové odplyňovače – mobilní fáze protéká semipermeabilní hadičkou umístěnou ve vakuu.

Héliové odplyňovače – mobilní fáze se probublává héliem, které vytěsňuje rozpouštědlo. Rozpustnost hélia v rozpouštědlech je minimální.

Odplyňování za vakua nebo ultrazvukem [33,37].

3.3.1.1 Čerpadla mobilní fáze

Základním požadavkem na čerpadla kapalných mobilních fází je dlouhodobá konstantnost prů-

toku s přesností menší než 2 %, chemická inertnost částí čerpadla přecházející do kontaktu s kapalinou, možnost regulace průtoku v dostatečně velkém rozsahu (0,1 – 10 ml/min), pracovní tlak minimálně 10 MPa (lépe 20 - 40 MPa). Průtok musí být konstantní, reprodukovatelný a bezpulsní [33,35].

Principiálně můžou být vysokotlaká čerpadla rozdělena do dvou hlavních skupin v nichž hlavní rozlišovací prvky jsou konstantní tlak anebo konstantní objemový průtok. Oba dva typy pracují zpravidla tak, že ze zásobníku vytlačují pístem či membránou mobilní fázi [34].

Z praktického hlediska bývají čerpadla rozdělována na pulsni a bezpulsni. Pulsni čerpadla mají objem pracovní komory poměrně malý, zatímco bezpulsni čerpadla pracují s objemem pracovní komory daleko větším, 100 – 500 ml, což umožní provést bez znovuplnění čerpadla celou řadu analýz. Bepulsni čerpadla ve srovnání s čerpadly pulsniými zpravidla poskytují hladší průtok mobilní fáze, nevyžadují speciálního přídavného zařízení pro tlumení tlakových pulsů, ale jsou dražší a vyznačují se horší reprodukovatelností při tvorbě gradientu mobilní fáze [34].

Podle technického řešení se rozlišují tři skupiny čerpadel: pneumatická čerpadla, bezpulsni čerpadla tzv. lineární dávkovače, pulsni neboli reciproká čerpadla [35].

Pneumatická čerpadla

V pneumatických čerpadlech je zdrojem energie stlačený plyn. Čerpadla jsou obvykle bezpulsni, velmi jednoduchá a levná. Výhodou těchto čerpadel je velmi dobrá stabilita průtoku. Nevýhodou je jejich obtížné zapojení do regulačního systému celého chromatografu [34,35,36].

Lineární dávkovače

Nebo také velkoobjemová pístová čerpadla. Jsou to vysokotlaké válce o objemu až 500 ml, pracovní objem čerpadel je 100 – 500 ml, do nichž je definovanou rychlostí zasouván píst. Lineární dávkovače poskytují bezpulsni konstantní tok mobilní fáze. Cena čerpadel je velmi vysoká. Stabilní průtok se ustavuje velmi pomale cca až za 15 – 60 minut a použitá mobilní fáze musí být odvzdušněná. Lineární (pístové) dávkovače jsou vhodné pro práci s vysokými tlaky [34,35,36].

Reciproční čerpadla

Jsou tvořena válcem o objemu několika desetin mililitru. Hlava čerpadla je opatřena dvěma

ventily – sacím a výtlačným, které se při pravidelně se opakujícím pohybu pístu ve válci uzavírají nebo otevírají. Reciproční čerpadla jsou konstruována jako pístová a membránová. Nevýhodou reciprokých čerpadel je pulsní chod [33,35,36].

Reciproční čerpadla se s výhodou používají pro programovou změnu složení mobilní fáze během analýzy, tzv. gradientovou eluci [35].

3.3.1.2 *Zařízení pro dávkování vzorku do chromatografického systému*

Z čerpadla se mobilní fáze vede do dávkovacího zařízení. Dávkovací zařízení slouží k vnesení vzorku do toku mobilní fáze ve formě úzkého koncentračního pulsu, tak aby bylo zabezpečeno minimální rozmytí vzorku v dávkovači a ve spojích mezi dávkovačem a chromatografickým ložem. Při dávkování vzorku je nutno překonat velký pracovní tlak uvnitř kolony. Účinnost celého chromatografického systému je do značné míry závislá i na dokonalém dávkování vzorku. Do chromatografického systému je možno dávkovat ručně (manuální dávkovací ventil) anebo pomocí automatického dávkovacího ventilu (autosampleru) [34,35,36,37].

Septové dávkovače – jsou obdobou dávkovačů používaných v plynové chromatografii, umožňují vnášení vzorku pomocí injekční stříkačky do bezprostřední blízkosti začátku chromatografického lože. Nároky na septum jsou vysoké – septum po vytažení jehly se musí znovu uzavřít a odolávat tlakům cca 10 – 20 MPa, podobně jako dávkovací vysokotlaké stříkačky. Výhodou septových dávkovačů je variabilita objemu vnešeného vzorku, nevýhodou potřeba časté výměny používaného septa a menší přesnost dávkovaného objemu v porovnání s dávkovacími kohouty [34,35].

Dávkovací ventily (kohouty) se smyčkou – umožňují přesné a reprodukovatelné odměření objemu vzorku vnitřní nebo vnější dávkovací smyčkou. Vnější dávkovací smyčku tvoří nerezová kovová kapilára, jejíž objem se pohybuje od desítek nanolitřů po mililitry. Kohouty se konstruují jako čtyřcestné a šesticestné, často jsou ovládány elektricky. Nejčastěji se jedná o šesticestné ventily s vyměnitelnou smyčkou, která se plní injekční stříkačkou. Dávkování je reprodukovatelné (opakovatelnost nástřiku se pohybuje kolem 0,2 %) a lze je snadno automatizovat. V případě kapilárních kolon, které vyžadují velmi malé nástřiky (v nanolitrech) se používají dávkovače s regulovanou dobou vyplachování smyčky do kolony nebo dávkovače s děličem (obdoba plynové chromatografie) [33,35,37].

Automatické dávkovače v HPLC – jedná se o přístroje pro automatické dávkování vzorků. Vzorky určené na analýzu jsou ve vialkách umístěny v chlazeném prostoru. Robotický systém vybere požadovanou vialku a provede nástřik pomocí smyčkového ventilu [37].

Vialky jsou vzorkovnice o objemu 1,5 ml na jedno použití se šroubovacím nebo zamačkávacím víčkem. Ve víčku je septum, které se při nástřiku propíchne [37].

3.3.1.3 Chromatografické kolony

Předkolony jsou krátké kolony zařazované těsně před analytickou kolonou. Chrání kolonu tím, že zachytávají mechanické nečistoty a látky, které se ireverzibilně vážou na kolonu. Předkolony se často používají k ochraně kolony při analýzách biologických vzorků. Předkolony obsahují stejnou stacionární fázi jako analytická kolona [36,37].

Ve vysokotlaké vysokoúčinné kapalinové chromatografii má volba a výběr kolony a jejich příslušenství rozhodující význam. O účinnosti kolon rozhoduje nejen kvalita použitého sorbentu (stacionární fáze), ale i její délka, tvar, materiál z něhož jsou zhotoveny, spojovací součásti, jejich vnitřní povrch a další faktory, jako je způsob plnění kolon atd. [34].

Kolony jsou obvykle vyrobeny z nerezové oceli, avšak mohou být i skleněné či plastové. Jednoduše lze říct, že kolona je trubice obsahující stacionární fázi. Jejich vnitřní průměr se pohybuje řádově od desítek mikrometrů do cca 1 cm pro analytické kolony až po několik centimetrů pro preparativní kolony. Nejvýhodnější jsou kovové kolony, jejichž vnitřní povrch je potažen vrstvou skla. V současnosti se používají kolony o délce 10 – 30 cm. Kolony lze plnit přímo v laboratořích pomocí komerčně dodávaných plniček, nebo je možné je koupit naplněné již od výrobce. V současnosti je nejvhodnější použití kapilárních kolon, jejichž průměr je srovnatelný s velikostí náplně částic [33,36,37].

Podle typu kapalinové chromatografie lze kolony na základě rozměrů rozdělit do následujících skupin:

Tab. 4. Typy kolon v HPLC [35].

Skupina	Vnitřní průměr [mm]	Délka [mm]
---------	---------------------	------------

Preparativní (technologické)	>50	500 - 2000
Semipreparativní	10 – 50	250 - 1000
Klasické (GPC,IEC)	6 – 10	150 – 1000
Analytické	2 – 6	30 – 300
Mikrokolony	0,5 – 2	50 – 1000
Kapilární	0,0005 – 0,06	1000 – 10000

3.3.1.4 Detektory

Detektory slouží k indikaci látek vycházejících z chromatografické kolony. Detektory v HPLC jsou obecně složitější než v plynové chromatografii [34,37].

Požadovanými vlastnostmi pro detektory jsou:

- okamžitá, lineární koncentrační odezva
- vysoká citlivost
- nízký šum
- minimální vliv změny tlaku, průtoku mobilní fáze, teploty
- minimální příspěvek k rozšiřování zóny
- možnost použití gradientové eluce [34,35].

K detekci se využívá analytická vlastnost systému, která je ve známém a reprodukovatelném vztahu ke koncentraci analytu. Podle toho rozlišujeme detektory buď univerzální (měří vlastnost systému jako celku, tj. index lomu, tepelnou vodivost, relativní permitivitu) nebo selektivní (měří absorbanci při určité vlnové délce, elektrolytický proud při určitém potenciálu atd.). Selektivní detekce je obvykle citlivější a vhodnější zejména při analýze složek přítomných v komplikovaných maticích [34].

Rozdělení detektorů do skupin podle měřených veličin uvádí následující tabulka [34].

Tab. 5. Typy detektorů v kapalinové chromatografii.

Měřená veličina	Název detektoru
Absorpce záření	Fotometrický (spektrofotometrický) v UV, viditelné a IČ oblasti spektra
Index lomu	Refraktometrický
Fluorescence	Fluorescenční
Elektrolytický proud	Polarografický
Elektrická vodivost	Vodivostní
Permitivita	Kapacitní, permitivitní
Elektrodotový potenciál	Potenciometrický
Ionizační proud	Transportní s plamenoionizační detekcí
Sorbční teplo (teplota)	Mikroadsorpční
Radioaktivita	Radiometrický

Mezi běžné detektory používané v HPLC patří spektrofotometrické, fluorimetrické, elektrochemické, hmotnostní a refraktometrické [33].

Spektrofotometrické detektory – patří k nejpoužívanějším v HPLC, neboť jsou poměrně jednoduché, provozně spolehlivé, citlivé a univerzální - lze jimi detekovat velký počet látek a jsou kompatibilní s gradientovou elucí. Základním požadavkem je nízká absorbance mobilní fáze při použité vlnové délce detekce. Spektrofotometrické detektory jsou založeny na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek od 190 – 800 nm, v ultrafialové a viditelné části spektra. Nejčastěji jsou používány dvoupaprskové spektrofotometry s průtokovou detekční celou [33,38].

Podle konstrukčního typu se mohou detektory rozdělit na čtyři typy:

- Detektory s fixní vlnovou délkou – nejčastěji 253,7 nm.
- Detektory s měřitelnou vlnovou délkou – a to pouze předem danými vlnovými délkami.
- Detektory s programovatelnou vlnovou délkou – vlnovou délku lze nastavovat

v určitém rozmezí, nejčastěji od 190 – 700 nm. Vlnová délka je měnitelná během analýzy, některé typy detektorů dokáží snímat pak spektra látek (scan) v měrné cele při zastaveném průtoku mobilní fáze (stop flow). Některé detektory umožňují měření při dvou až čtyřech vlnových délkách současně, jejich nevýhodou je však poněkud nižší citlivost ve srovnání s detektory s fixní vlnovou délkou.

- Detektory diodového pole (DAD) – snímají celé spektrum v reálném čase bez přerušování chromatografické separace. Tyto detektory umožňují ve spolupráci s řídicí jednotkou (počítačem) detekci látky při jakékoliv zvolené vlnové délce, umožňují porovnávat snímaná spektra s knihovnou spekter a vypočítají čistotu píku – identifikace látky [38].

Fluorimetrické detektory – jsou to detektory vysoce selektivní, nezávislé na kolísání teploty a s dobrou lineární odezvou. Používají se pro detekci látek vykazujících fluorescenci nebo látek, jejichž deriváty fluoreskují. Fluorimetrické detektory jsou o zhruba tři řády citlivější než UV spektrofotometrické detektory. Při fluorimetrické detekci prochází eluovaná látka průtokovou celou detektorem, absorbuje UV záření z intenzivního zdroje (např. rtuťové výbojky, deuteriové, wolframové či xenonové lampy či laseru) a přitom vydává fluoreskující záření o větší vlnové délce než záření excitační. Excitační záření dopadá na fotonásobič, který je přeměněn na elektrický signál, jehož velikost je úměrná intenzitě fluorescenčního záření [33,34,38].

Refraktometrické detektory – patří mezi univerzální detektory. Pracují jako diferenciální měřiče změny indexu lomu mobilní fáze, tím, že měří rozdíl indexu lomu mobilní fáze uzavřené v referenční cele a eluentem vycházejícím z kolony. Detektor je tím citlivější, čím větší je rozdíl mezi indexem lomu analytu a rozpouštědla. Protože tyto rozdíly jsou malé, je refraktometrický detektor málo citlivý. Podmínkou přesné detekce refraktometrickým detektorem je nutnost přesného temperování, neboť index lomu je závislý na teplotě. Další nevýhodou je nemožnost použít gradientovou eluci. Refraktometrické detektory se využívají zejména tehdy, pokud ostatní detektory neposkytují pro analyzované látky odezvu (např. při analýze cukrů). Používá se v gelové chromatografii [33,35,36,37].

Elektrochemické detektory – patří mezi selektivní detektory. Výhodou těchto detektorů je vysoká citlivost a rychlost odezvy. Měří proud, který vzniká při průchodu oxidovatelné ne-

bo redukovatelné látky měrnou celou. Většinou se používá tříelektrodového zapojení s pracovní, pomocnou a referentní elektrodou. Pracovní elektroda může být ze skelného uhlíku, uhlíkových vláken, grafitové pasty, diamantu, Pt, Au, Cu, rtuti nebo amalgámů [33,37].

Detektory pracují buď amperometricky (měří se proud při konstantním elektrodovém potenciálu, který se volí v oblasti limitního proudu – koncentrační detektor) nebo coulometricky (dochází k úplné elektrolyze – hmotnostní detektor) [37].

Amperometrické detektory - jsou založeny na měření elektrického proudu odpovídajícího oxidaci či redukci (redoxní reakci) - měří se proud mezi polarizovatelnou pracovní elektrodou a pomocnou elektrodou v závislosti na vloženém napětí nebo při konstantním napětí. Patří mezi nejobvyklejší druh elektrochemického detektoru v HPLC [33,34,36].

Coulometrický detektor – v coulometrickém detektoru dochází k úplné elektrolyze analytu. Elektrody jsou velkoplošné, např. porézní uhlík. Využívají se k elektrochemické derivatizaci před další detekcí (amperometrickou, fluorescenční, MS) [37].

Vodivostní detektory – měří vodivost mobilní fáze mezi dvěma elektrodami (nerez, platina, zlato) v průtokové cele obvykle válcovitého tvaru. Na elektrody se vkládá střídavé napětí, aby se zabránilo polarizaci. Mobilní fáze musí být nevodivá, tj. bez přídavku pufru. Využívají se v iontové výměnné chromatografii. Tyto detektory patří mezi univerzální a s nízkou citlivostí [37].

Hmotnostní detektory – mají v kapalinové i plynové chromatografii specifické postavení jako detektor umožňující nejen detekci separovaných látek s vysokou citlivostí, ale především jako dominantní způsob identifikace jednotlivých složek. Detekují ionty, které vznikají ionizací analytů. Prvním krokem je převod analytů rozpuštěných v mobilní fázi na ionty plyné fázi. V další fázi se ionty analyzují, tj. určuje se poměr hmotnosti ku náboji m/z . Iontové zdroje pracují za atmosferického tlaku, analyzátoři za vakua [35,37].

3.4 Metody stanovení vitamínu C (askorbové kyseliny)

Metod na stanovení vitamínu C a jeho forem je mnoho. V potravinách se vitamín C vysky-

tuje až v 95% jako kyselina askorbová a zbytek tvoří kyselina dehydroaskorbová.

Vitamin C má nízký redox potenciál a snadno podléhá oxidaci na kyselinu dehydroaskorbovou. Při stanovení vitamínu C musí být brán zřetel na to, jestli se stanovuje kyselina askorbová zároveň s kyselinou dehydroaskorbovou anebo jde o stanovení kyseliny askorbové a dehydroaskorbové zvlášť vedle sebe z rozdílu stanovení před a po oxidaci/redukci jedné z komponent [39,40].

Nejčastěji používané metody stanovení vitamínu C lze rozdělit do několika skupin: titrační metody, spektrofotometrické metody (UV-VIS spektrofotometre, fluorimetrie, flow-injection, chemiluminiscenční metody), enzymatické metody, elektrochemické (amperometrické metody), kinetické a chromatografické metody (hlavně kapalinová chromatografie HPLC a také plynová chromatografie GC), které mají výhodu hlavně ve vysoké citlivosti stanovení [40,42,43].

3.4.1 Extrakce vitamínu C

Před vlastním stanovením vitamínu C ve vzorku musí být provedena jeho efektivní extrakce. Jako extrakční činidlo se používá kyselina metafosforečná, trichloroctová a šťavelová často v kombinaci s nízkomolekulárními alkoholy jako je methanol či ethanol [40].

Vitamin C je velmi nestabilní a snadno podléhá oxidaci či hydrolýze, proto je nutné při jeho extrakci postupovat opatrně a zabránit jeho ztrátám. Bylo vypracováno několik doporučení pro extrakci vitamínu C ze vzorku, např. okyselení vzorku ihned po extrakci, přidavek antioxidantů či chelatačních činidel, odstranění plynu – probublávání tekutých vzorků inertním plynem, přidavek redukujících sloučenin např. homocystein a uchovávat vzorek v tmavých lahvích za nepřístupu denního světla [40].

3.4.2 Titrační stanovení vitamínu C

Mezi titrační metody stanovení vitamínu C patří oxidoredukční stanovení s 2,6 – dichlorfenolindofenolem, s tetrachlorbenzochinonem, bromátometrické stanovení, jodometrické stanovení, s N – bromsukcinimidem, stanovení s modrou skalicí, s chloridem rtuťnatým a další [37,39,45].

Titrační stanovení s 2,6 – dichlorfenolindofenolem (DCIP) – tato metoda slouží k přímému stanovení kyseliny askorbové v nápojích, v ovoci, v zelenině, ve výrobcích z nich a

z vitaminových preparátů. Tato metoda je založena na redukci DCIP s askorbovou kyselinou v kyselých roztocích. Jako indikátor je zde použito vlastní titrační činidlo DCIP. Tato metoda je nevhodná pro stanovení biologických materiálů přirozeně obsahujících tanin, betaniny a sulfylhydrolytové sloučeniny, jelikož tyto sloučeniny jsou oxidovány barvivem DCIP a zkreslují výsledky stanovení. Tuto metodu lze použít pouze v nepřítomnosti interferujících látek. Pro analýzu barevných vzorků je nutno provést potenciometrickou indikaci bodu ekvivalence [40,48].

Z analyzovaného vzorku se extrahuje kyselina askorbová roztokem kyseliny metafosforečné. Obsah kyseliny askorbové se stanovuje titračně s 2,6 – dichlorfenolindofenolem jako oxidačním činidlem do lososově růžové barvy. Pro stanovení dehydroaskorbové kyseliny je nutno udělat redukci (např. homocystein, cystein, H_2S) [40,48].

Bromátometrické stanovení – tímto způsobem lze stanovit askorbovou kyselinu v léčivých přípravcích. Při bromátometrickém stanovení v kyselém prostředí uvolňuje bromičnan s reakcí s bromidem elementární brom. Askorbová kyselina reaguje s elementárním bromem a podléhá oxidaci na dehydroaskorbovou kyselinu [37].

Analyzovaný vzorek (tableta) se rozpustí ve vodě a k ní se přidá dané množství pevného bromidu draselného, pro okyselení roztoku se používá kyselina chlorovodíková. K titrovanému roztoku se přidává jako indikátor methylová oranž nebo methylová červeň, které nadbytečný brom rozrušují a roztok se odbarví. Titrace se provádí roztokem bromičnanu draselného, až se roztok odbarví [37].

Jodometrické stanovení – kyselinu askorbovou lze v kyselém prostředí stechiometricky oxidovat jódem na kyselinu dehydroaskorbovou, přičemž jedna molekula kyseliny askorbové reaguje s jednou molekulou jódu [41].

Analyzovaný vzorek se rozpustí ve vodě, přidá se kyselina sírová na okyselení a jako indikátor se použije roztok škrobu. Jako titrační roztok se použije jód o známé koncentraci a titruje se do modrého zbarvení [41].

3.4.3 Spektrofotometrické stanovení vitamínu C

Mezi nejběžnější spektrofotometrické metody stanovení vitamínu C patří reakce vitamínu C s 2,4-dinitrofenylhydrazinem. Stanovení je založeno na oxidaci kyseliny askorbové na kyselinu dehydroaskorbovou a ta následně kondenzuje s 2,4-dinitrofenylhydrazinem za vzniku

oranžovočervených osazonů. Intenzita zbarvení roztoku se porovnává se standardem, měření absorbance se provádí ve viditelné oblasti světla (510 – 540 nm) [39,40,50].

3.4.4 Elektrochemické stanovení vitamínu C

Mezi elektrochemické analytické metody patří polarografie. Polarografie slouží k určování přítomnosti a koncentrace redukovatelných nebo oxidovatelných látek v roztoku [48].

Polarografická analýza umožňuje elektrochemickou oxidaci kyseliny askorbové na rtuťové kapkové elektrodě. Tato metoda byla použita pro stanovení kyseliny askorbové v koření, potravinách, v ovoci a zelenině a v lécích. Jako pomocné elektrolyty v této analýze byly použity acetát a citrát (pH 4,5-4,6) fosfát a univerzální pufr (pH 2,2-7). Tato metoda vyžaduje předběžnou úpravu vzorku za použití formaldehydu, aby bylo zabráněno interferenci s reduktory [48].

Voltmetrická analýza - využívá různé elektrody (tradiční elektrody, mikrodiskové elektrody, mikrobandové a vícenásobné mikrobandové elektrody) pro stanovení vitamínu C jsou to uhlíkové elektrody. Spolehlivost těchto elektrod se snižuje s opětovným použitím, jelikož se elektroda znečišťuje oxidačními produkty. Tuto metodu použil Pournaghi-Azar k elektrokatalytické oxidaci askorbové kyseliny ve farmaceutických přípravcích a v čerstvých ovocných šťávách pomocí fericiniumkarboxylové kyseliny jako prostředníka. Tímto způsobem může být stanovena kyselina askorbová u barevných, viskózních a zakalených vzorků ovocné šťávy [48].

Amperometrické stanovení – Strohl a Curran poprvé použili mřížkovanou skleněnou uhlíkovou elektrodu jako amperometrický průtokový detektor ve flow-injection stanovení vitamínu C. Amperometrické flow-injection stanovení využívají nepohyblivých enzymů reaktorů nebo fotochemickou redukci methylenovou modří pro vzorek kyseliny askorbové. Použitím metody s methylenovou modří lze dosáhnout stanovení vitamínu C v rozsahu 5-90 $\mu\text{g/ml}$ [48].

Coulometrie – při coulometrii se ke stanovení množství látky používá měření prošlého náboje, potřebného k úplnému průběhu příslušné reakce. Coulometrie, ačkoliv nenachází tak široké uplatnění jako ostatní metody, má mnoho možností stanovení vitamínu C. Coulometrické metody jsou založeny na kvantitativní oxidaci kyseliny askorbové na platinové anodě, ale pouze pro čisté roztoky [48,49].

3.4.5 Fluorimetrické stanovení vitamínu C

Fluorimetrické metody analýzy může být využito ke stanovení vitamínu C v ovoci, v zelenině a v lidském séru. Mezi nejběžnější metody fluorimetrické analýzy lze zařadit metodu stanovení s *o*-fenylendiaminem (OPDA). Při fluorimetrickém stanovení je potřeba kontrolovat pH roztoku, jelikož intenzita fluorescence je závislá na pH roztoku [48].

Fluorimetrické stanovení s OPDA – Tato metoda je jednoduchá a rychlá, použitelná pro stanovení celkového obsahu kyseliny askorbové (kyseliny askorbové a dehydroaskorbové). Je založena na kondenzační reakci mezi askorbovou kyselinou a *o*-fenylendiaminu (OPDA) za vzniku fluorescenčního chinoxalinu. Jako redukční činidlo pro dehydroaskorbovou kyselinu se používá 2,6 – dichlorindofenol, N – bromsukcinimid a jód. Dehydroaskorbová kyselina se musí převést na askorbovou, která vstupuje do reakce s OPDA. Intenzita fluorescence se měří v excitaci a emisních vlnových délkách 360 nm a 430 nm navzájem. Za optimálních podmínek je lineární vztah mezi získanou intenzitou fluorescence a koncentrací askorbové kyseliny v rozmezí 0,05-40 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Detekční limit je 0,006 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Kvůli přidavku oxidačního činidla je citlivost metody nízká [42,54,46].

3.4.6 Enzymatické stanovení vitamínu C

Vitamin C může být stanoven v potravinách pomocí enzymatického stanovení. Enzymatické stanovení kyseliny askorbové je založeno na její akci jako druhého substrátu s peroxidázami v reakcích *o*-dianisidinu a 3,3',5,5' – tetramethylbenzidinu (TMB) oxidaci s peroxidem vodíku. Rozsah reakce je měřen spektrofotometricky měřením délky indukční doby na kinetických křivkách zapsaných v souřadnicích absorpce – čas. Navrhované postupy jsou citlivé, rychlé a jednoduché. Postup používající HRP peroxidázu a reakce oxidace TMB je použitelná pro stanovení kyseliny askorbové v ovocné šťávě, v mléku, v zakysaných mléčných výrobcích a v dětské výživě [47].

3.4.7 Chromatografické metody stanovení vitamínu C

Mezi nejběžnější metodu stanovení vitamínu C (kyselina askorbové a dehydroaskorbové) patří metoda HPLC. K dalším chromatografickým metodám stanovení vitamínu C patří i plynová chromatografie [48].

Kapalinová chromatografie je běžně používána pro separaci a stanovení vitamínu C, využí-

vající mnoho modifikací této metody. Metoda HPLC má mnoho výhod oproti běžným metodám stanovení (např. titrační, enzymatické). U metody HPLC se stále pracuje na vylepšení a to hlavně v oblasti zvýšení citlivosti detekce, u běžně používaných elektrochemických, fluorescenčních a UV – VIS detektorů. Citlivost metody HPLC závisí na použitém typu detektoru. UV – detektory a ECD – detektory patří mezi nejběžnější, ale používají si i MS (hmotnostně spektrometrický) detektor a fluorescenční detektory. MS detektory poskytují nejvyšší citlivost a selektivitu měření. MS detektory jsou ale drahé a náklady na jejich provoz jsou vysoké, proto si je mnoho laboratoří nemůže dovolit [22,52].

Problém u HPLC metody při stanovení vitamínu C spočívá ve stanovení dehydroaskorbové kyseliny. Kyselina dehydroaskorbová musí být stanovena nepřímo pomocí redukujících prostředků na kyselinu askorbovou. Jako redukující prostředky se používají homocystein, cystein a dithiothreitol. Celkový obsah kyseliny dehydroaskorbové se vypočítá jako rozdíl mezi stanovením ve vzorku po redukci a před redukcí [48,52].

Stanovení vitamínu C metodou HPLC s elektrochemickou detekcí – jde o citlivé stanovení kyseliny askorbové a dehydroaskorbové v biologických tekutinách, tkáních a v potravinách. Škrovánková a kol. stanovovali vitamín C (kyselinu askorbovou) v jarním ovoci a zelenině s použitím metody HPLC s elektrochemickou detekcí (ECD). Vzorek byl extrahován v mobilní fázi ($\text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_3\text{PO}_4 : \text{H}_2\text{O} - 99 : 0,5 : 0,5$) po dobu 15 minut. Chromatografické podmínky byly následující: kolona SUPELCOSIL – LC8, izokratická eluce. K detekci byl použit ECD detektor (Coulchem III) s nastavenými potenciály $K_1 = 600 \text{ mV}$ a $K_2 = 650 \text{ mV}$. Při analýze byl zjištěn nevyšší obsah vitamínu C v oranžové paprice (107,32 mg/100 g) a dále v žluté, červené a zelené paprice a nejnižší obsah v mandarince (15,48 mg/100 g) [53].

Stanovení vitamínu C metodou HPLC s UV-VIS detekcí – tato metoda se používá pro stanovení celkového obsahu vitamínu C (askorbové a dehydroaskorbové kyseliny) např. v ovoci a zelenině.

Gokmen a kol. použili ke stanovení vitamínu C (askorbová a dehydroaskorbová kyselina) v ovoci a zelenině metodu HPLC s UV-VIS detekcí. Analýza byla provedena na kapalinovém chromatografu Varian 9010, s diodovým detektorem nastaveným na vlnové délky 210 nm pro detekci dehydroaskorbové kyseliny DHA a 254 nm pro detekci askorbové kyseliny AA. Separace askorbové kyseliny a dehydroaskorbové kyseliny byla provedena na koloně

C18, mobilní fáze byla upravená deionizovaná voda (pH=2,4) a průtok 0,5 ml/min. Kyselina dehydroaskorbová byla stanovena po redukcii s dithiothreitem DTT jako kyselina askorbová. Kyselina dehydroaskorbová poskytovala nízkou UV odezvu detektoru a nedovolila přesné stanovení ani při vysokých koncentracích dehydroaskorbové kyseliny. Výsledky analýzy byly následující: v ovoci (pH < 4) převládala kyselina askorbová (nejvíce zjistili v citronu - 53,8 mg/100 g AA a 0,9 mg/100 g DHA) a v zelenině (pH > 5) dehydroaskorbová (nejvíce zjistili v zelené paprice - 1,6 mg/100 g AA a 22,5 mg/100 g DHA), v závislosti na pH [52].

Rodríguez-Bernaldo de Quirós a kol. představili jednoduchou a rychlou HPLC metodu pro stanovení vitamínu C v nápojích. Metoda je založena na použití nové stacionární fázi Teknokroma, Tr-010065 Mediterranea sea18. Chromatografické podmínky měření byly: mobilní fáze 0,1%-ní roztok kyseliny mravenčí ve vodě, průtok mobilní fáze byl 0,8 ml/min, detekce byla prováděna při vlnové délce 245 nm. Při této metodě byly vzorky nápojů vstříkovány přímo bez předchozí úpravy. Celkový čas analýzy nepřesahoval 6 minut. Metoda má dobrou opakovatelnost a vysokou citlivost s limitem detekce 0,01 mg/l. Rozsah koncentrace kyseliny askorbové, ve kterém bylo měřeno byl 6,6 – 840 mg/l. Obsah vitamínu C (kyselina askorbová a dehydroaskorbová) v pomerančových nápojích se pohyboval v rozmezí: 6,6 mg/l - 739 mg/l [56].

Planchon a kol. použili metodu HPLC pro stanovení obsahu vitamínu C (kyseliny askorbové) v jablkách. Vzorky jablek byly nastrohány a pak probublávány v kapalném dusíku k odstranění kyslíku. Kyselina askorbová byla extrahována v 0,01 M kyselině metafosforečné, vzorky byly dány na odstředivku (10 min při 150 ot./min) a poté byly odstředěny i extrakty (5 min při 6000 ot./min). Chromatografická separace byla provedena na koloně Nucleosil 100 C18, mobilní fáze byla 0,01 M octan amonný (pH= 3,5) a průtok mobilní fáze byl 0,7 ml/min. Detekce byla prováděna při vlnové délce 248 nm. Výsledky ukázaly, že obsah kyseliny askorbové v jablkách je velice proměnlivý a závisí na mnoha faktorech jako je zralost, pozice jablka na stromu, barva jablka, atd. Rozdíly mezi jednotlivými jablky jednoho druhu činily až 20%. U šesti druhů bylo stanoveno obsah vyšší než 20 mg/100 g, u komerčních druhů: Jonagold - 11,9 mg/100 g, u Golden Delicious - 11,4 mg/100 g, Elstar - 6,4 mg/100 g a Gala - 2,9 mg/100 g [57].

Fontannaz a kol. stanovovali askorbovou kyselinu ve fortifikovaných potravinářských produktech pomocí metody HPLC/UV. Metoda byla založena na kyselé extrakci kyseliny

askorbové ze vzorku pomocí redukčního prostředku TCEP (tris-karboxyethyl-fosfát). Analýza byla provedena na koloně LiChrospher RP-C18, mobilní fáze byla složena z 1,6 mg decylaminu, 80 ml acetonitrilu, 100 ml octanu sodného a 820 ml destilované vody, pH 5,4. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min a detekce při vlnové délce 265 nm. Limit detekce byl stanoven na 0,1 mg/100 g. Tato metoda byla označena jako spolehlivá metoda s dobrou opakovatelností a vysokou citlivostí. Bylo zkoumáno 25 vzorků fortifikovaných potravin. Obsah askorbové kyseliny byl v rozmezí 6,2 - 98,4 mg/100 g [58].

Stanovení vitamínu C metodou HPLC s fluorimetrickou detekcí – tato metoda slouží ke stanovení vitamínu C v potravinách, je časově méně náročná než běžné metody, má dobrou opakovatelnost, citlivost a přesnost.

Burini stanovoval kyselinu askorbovou ve potravinách pomocí metody HPLC s fluorimetrickou detekcí. Vzorky (grepový džus, pomerančový džus, kiwi, rajče, jablka, salát, hrášek, pasterované mléko a UHT mléko) byly extrahovány pomocí metafosforečné kyseliny. Metoda spočívala v tom, že kyselina askorbová byla oxidována na kyselinu dehydroaskorbovou pomocí peroxylových radikálů. Kyselina dehydroaskorbová následně kondenzovala s benzenem-1,2-diaminem (či *o*-fenyldiaminem OPDA) a vytvořila fluorescenční quinoxalinové deriváty, které byly následně odděleny na koloně C18, promývané mobilní fází o složení 80 mM fosfátového pufru a methanolu při pH = 7,8 a s fluorimetrickou detekcí při vlnové délce 355 nm a 425 nm. Odezva detekčního systému byla lineární v rozsahu 0,5-8 µg/ml. Limit detekce byl 0,27 µg/ml. Nejvyšší obsah vitamínu C (kyseliny askorbové a dehydroaskorbové) byl zjištěn u kiwi – 86,8 – 89,6 mg/100 g a nejmenší obsah byl mléka UHT 1,11 – 1,19 mg/100 g [54].

Stanovení vitamínu C metodou HPLC/MS – tato metoda slouží ke stanovení vitamínu C v potravinách a vitaminových preparátech. Je velmi citlivá a dává velmi přesné výsledky stanovení.

Zhi a kol. použili metodu HPLC/ESI-MS pro stanovení 10 ve vodě rozpustných vitamínů, mezi nimiž byl i vitamin C (kyselina askorbová), v multivitaminových preparátech. Extrakce vzorku byla provedena pomocí 50 ml vody a 1,25 ml amoniaku s úpravou pH. Při separaci byla použita kolona Johnson Spherigel C18 s reverzní fází, mobilní fáze byla složena z 5 mM vodný roztok kyseliny heptafluorobutyrové a druhá fáze byla methanol. Byla použita gradientová eluce. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min a teplota kolony byla 30 °C. Detekce

cílových sloučenin byla pomocí ESI-MS kontinuálního přepínání z pozitivního iontu módu k zápornému iontu módu. Retenční čas kyseliny askorbové byl $3,61 \pm 0,13$ min. Bylo zkoumáno 11 vzorků multivitaminových preparátů. Obsah kyseliny askorbové byl u 2 vzorků vyšší než bylo uvedeno na etiketě, u 6 vzorků mírně nižší (rozdíl 1 – 5 mg na tabletu), u 2 vzorků značně nižší (o polovinu) a u jednoho vzorku nebyl obsah AA stanoven [59].

Stanovení vitamínu C pomocí plynové chromatografie – vitamin C může být stanoven pomocí plynové chromatografie.

Při stanovení celkového obsahu vitamínu C v pomerančové šťávě použil Silva metodu plynové chromatografie s plameno-ionizačním detektorem. Vzorky byly po lyofilizaci derivatizovány s trimethylsilylem. Byla použita kolona Chrompack (CP-Sil-5), počáteční teplota byla 150 °C a konečná teplota činila 320°C po dobu 3 min. Limit detekce byl 4 mg/100 ml, odezva byla lineární ještě při koncentraci 200 mg/100 ml. Plynová chromatografie je velmi přesná metoda za podmínek zamezení oxidace askorbové kyseliny vzduchem, kdy dochází k velkým ztrátám a zkreslení výsledků. Jediná nevýhoda této metody spočívá v dlouhé době (1-2 hod) lyofilizace [60].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce je optimalizace izolace vitamínu C (kyseliny askorbové) a stanovení obsahu vitamínu C (kyseliny askorbové) v zelenině před a po tepelné úpravě pomocí chromatografické techniky HPLC/UV.

1. Formou literární rešerše popsat vitamín C – charakterizovat jeho vlastnosti, reaktivitu, zdroje vitamínu, fyziologické působení na lidské tělo a ztráty vitamínu C během technologického zpracování. Dále popsat druhy tepelného ohřevu. Stručně popsat chromatografické metody se zaměřením na metodu HPLC/UV.
2. Pro stanovení vitamínu C optimalizovat izolační a analytický postup pro chromatografickou metodu HPLC/UV a stanovit vitamín C (kyselinu askorbovou) a zjistit jeho ztráty v zelenině (brokolice, květák, paprika bílá, paprika červená, růžičková kapusta, špenát) před a po různých druzích teplených úprav (vaření, vaření v páře, dušení, mikrovlnný ohřev).

5 MATERIÁL A PŘÍSTROJE

5.1 Vzorčky zkoumané zeleniny

V diplomové práci bylo analyzováno 6 druhů zeleniny.

- **Brokolice** – zakoupeno v Albertu v Boskovicích, země původu Itálie.
- **Špenát** - zakoupeno v Kauflandu ve Zlíně, krajina původu Itálie.
- **Květák** – zakoupeno v Kauflandu ve Zlíně, země původu Francie.
- **Paprika bílá** – zakoupeno v Bile ve Zlíně, země původu Řecko.
- **Paprika červená** – zakoupeno v Bile ve Zlíně, země původu Nizozemsko.
- **Růžičková kapusta** – zakoupeno v Kauflandu ve Zlíně, krajina původu Holandsko.

5.2 Použité chemikálie

- redestilovaná voda
- standard askorbové kyseliny (Fluka – Chemika, Switzerland)
- methanol pro HPLC (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)
- mořský písek

5.3 Použité přístroje a pomůcky

- analytické váhy (AFA 210 LC)
- laboratorní sklo a pomůcky
- filtrační papíry (Filtrak 390)
- mikrofiltry 0,45 μm (Cronus Syringe Filter, United Kingdom)
- dávkovací stříkačka (Hamilton, USA)
- kuchyňské nádobí (hrnce, teflonová pánev, nerezové síto)
- mikrovlnná trouba (Whirlpool, VIP 20, Švédsko)

Aparatura pro HPLC/UV/VIS (Hewlett Packard 1100, USA)

- dávkovací ventil analytický smyčkový (dávkovací smyčka o objemu 20 μ l)
- kolona SUPELCOSIL – LC8 (15 cm x 4,6 mm; 5 μ m, Supelco, USA)
- vakuový odplyňovací modul G1322A
- binární pumpy G1312A
- termostat kolon G1316A
- detektor UV/VIS DAD G1315A
- PC s vyhodnocovacím programem ChemStation – Instrument Online 1 (Agilent, USA)

6 METODIKA IZOLACE A STANOVENÍ VITAMINU C (KYSELINY ASKORBOVÉ) METODOU HPLC/UV

Kvůli přesnému stanovení vitamínu C (kyselina askorbová) je nutné optimalizovat postup a podmínky pro extrakci vitamínu C ze vzorků a také zjistit optimální podmínky stanovení daného vitamínu pomocí metody HPLC/UV.

6.1 Tepelná úprava vzorků zeleniny

Byly použity 4 metody tepelné úpravy zeleniny: vaření, vaření v páře, dušení a mikrovlnný ohřev.

Vaření – vzorek zeleniny o dané hmotnosti (5-7,5 g) byl vložen do malého množství (cca 2 dcl) vroucí neosolené vody do hrnce s pokličkou. Od vložení vzorku zeleniny do vroucí vody byl počítán čas (3-10 min). Poté byl vzorek zeleniny vyjmut a po zchladnutí byl použit k analýze.

Vaření v páře – vzorek zeleniny o dané hmotnosti (5-7,5 g) byl vložen do hrnce s vložkou pro parní ohřev, kde docházelo k prosycení horkou vodní párou. Od vložení vzorku zeleniny do parního hrnce byl počítán čas (3-10 min). Poté byl vzorek zeleniny vyjmut a po zchladnutí byl použit k analýze.

Dušení – vzorek zeleniny o dané hmotnosti (5-7,5 g) byl dušen za působení vroucí vody (cca 0,5 dcl) a páry na teflonové pánvi. Teflonová pánev byla přikryta pokličkou, aby se zabránilo unikání vodní páry. Od vložení vzorku zeleniny na pánev byl počítán čas (3-10 min). Poté byl vzorek zeleniny vyjmut a po zchladnutí byl použit k analýze.

Mikrovlnný ohřev – vzorek zeleniny byl položen na porcelánový talíř s vodou (cca 0,5 dcl), který byl přikryt plastovým víkem. Doba ohřevu byla 1 minutu a výkon mikrovlnné trouby byl zvolen na 750W. Poté byl vzorek zeleniny vyjmut z mikrovlnné trouby a po zchladnutí byl použit k analýze.

Všechny vzorky byly před tepelnou úpravou a po ní zváženy na analytických váhách. Vzorky jednotlivých druhů zeleniny byly podrobeny tepelné úpravě různou dobu (3-10 min) podle obvyklých zvyklostí vzhledem k jejich textuře.

6.2 Optimalizace izolace vitamínu C

Při izolaci vitamínu C (kyseliny askorbové) byla použita metoda extrakce v třecí misce s přidavkem mořského písku (pro lepší izolaci) za použití vhodného rozpouštědla.

Při zjišťování optimálního rozpouštědla byly vzorky rozpuštěny v redestilované vodě a v mobilní fázi – methanolu a následně u nich byla provedena analýza. Na základě výsledků stanovení bylo zjištěno, že vhodnější rozpouštědlo pro stanovení kys. askorbové v tepelně upravené zelenině je methanol. Při použití redestilované vody jako rozpouštědla docházelo k štěpení píků a tím nebylo možné vyhodnotit takto získané výsledky.

Vzhledem k tomu, že k měření bylo použito více druhů zeleniny o různém obsahu vitamínu C, bylo u každého vzorku zvoleno jiné analyzované množství (hmotnost vzorku).

6.2.1 Postup izolace vitamínu C ze vzorků zeleniny

U jednotlivých druhů zeleniny dle obsahu vitamínu C bylo naváženo dané množství vzorku (5-7,5 g) na analytických vahách před tepelnou úpravou a po ní. Vzorek byl rozmělněn v třecí misce s mořským pískem a homogenizován s daným množstvím methanolu (25 ml, 50 ml) tak aby byl dodržen poměr hmotnost vzorku : objem rozpouštědla (1:10 nebo 1:3) podle předpokládaného obsahu vitamínu C (kys. askorbové) v konkrétní zelenině. Následně byla provedena extrakce (cca 5 min) vitamínu C ze vzorku pomocí rozpouštědla methanolu bez přístupu denního světla, aby se zabránilo možným ztrátám vitamínu C. Po extrakci byl vzorek přefiltrován přes papírový filtr a před analýzou byly vzorky ještě zfiltrány přes mikrofiltr o velikosti pórů 0,45 μm , které jsou určeny pro HPLC analýzu. Takto získaný a upravený vzorek byl použit k analýze HPLC.

Standard kyseliny askorbové byl také rozpuštěn v methanolu.

6.3 Stanovení vitamínu C metodou HPLC/UV

Ke stanovení vitamínu C (kys. askorbové) ze vzorků zeleniny byl zvolen postup pro měření metodou HPLC/UV:

- dávkování alikvotního podílu: 20 μl (objem smyčky)
- složení mobilní fáze: 100% methanol
- průtok mobilní fáze: 0,8 ml/min

- kolona SUPELCO SIL – LC8 (15cm x 4,6mm; 5 μ m, Supelco, USA)
- doba analýzy: 10 min (retenční čas kys. askorbové \pm 1,8 min)
- detektor UV/VIS DAD G1315A – λ = 254 nm.

Pro vyhodnocení výsledků analýz byl použit chromatografický software pro PC – Chem-Station-Instrument 1.

Všechny koncentrace standardů pro kalibrační křivky, i jednotlivé vzorky byly proměřeny pětkrát, aby byla zaručena dostatečná přesnost stanovení.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Stanovení vitamínu C metodou HPLC/UV

Pro stanovení obsahu askorbové kyseliny v různých druzích zeleniny (brokolice, květák, paprika bílá, paprika červená, růžičková kapusta, špenát) byl použit postup izolace a stanovení pomocí optimalizované metody HPLC UV/VIS uvedené v předchozí kapitole 6.2 a 6.3.

7.1.1 Kalibrační křivka standardu kyseliny askorbové stanovené technikou HPLC/UV

Pro naměření kalibrační křivky byl použit standard kyseliny askorbové.

S přesností na 0,0001 g byly naváženy a připraveny zásobní roztoky o koncentraci kyseliny askorbové 5 mg/100 ml, 6 mg/100 ml, 7 mg/100 ml a 8 mg/100 ml methanolu. Následným ředěním se připravily roztoky o koncentraci 4 mg/100 ml, 3 mg/100 ml a 2 mg/100 ml.

Chromatogramy pro jednotlivé koncentrace standardu kyseliny askorbové stanovených metodou HPLC/UV jsou uvedeny v příloze (P I-VII).

Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost plochy píku (mA.V.s) na koncentraci kyseliny askorbové (mg/100 ml).

Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 6 a v grafu kalibrační přímky (Obr. 4).

Byla sestavena kalibrační přímka, která má regresní rovnici:

$$y = 481,36x - 71,63$$

kde: y – velikost plochy píku na chromatogramu [mA.V.s]

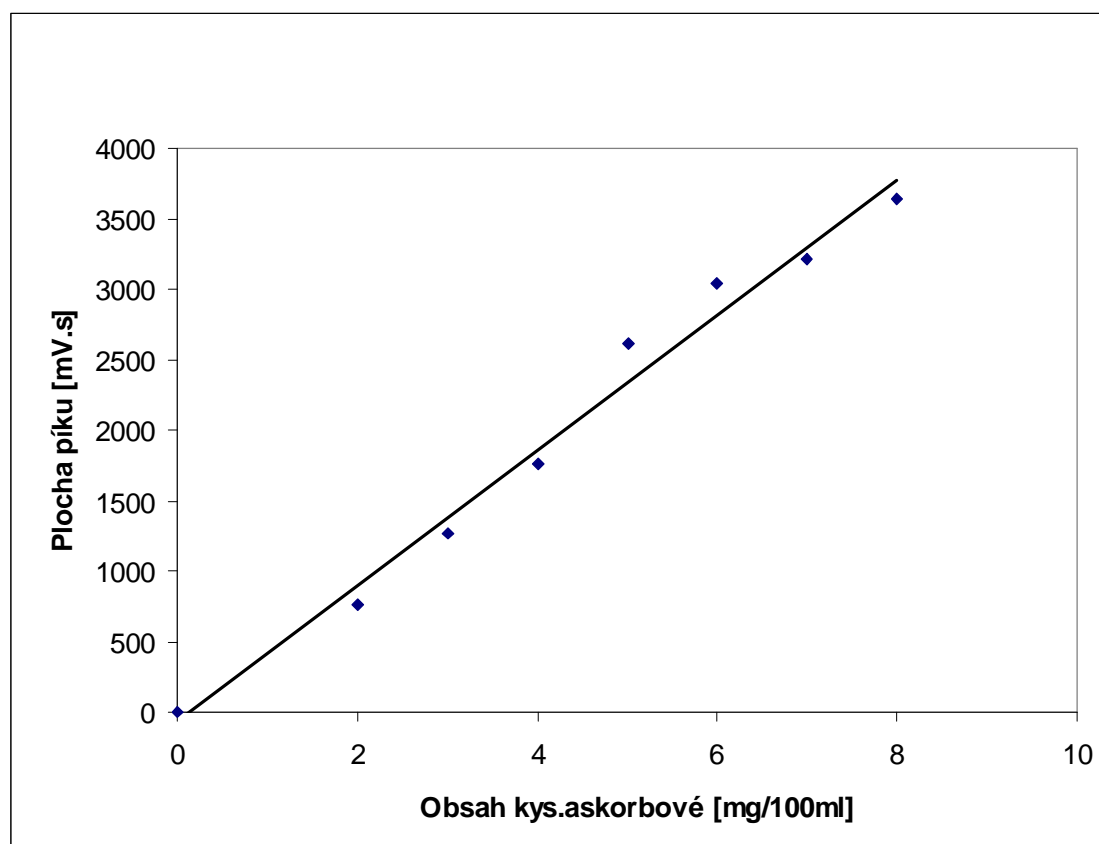
x – obsah askorbové kyseliny [mg/100 ml].

Korelační koeficient pro závislost plochy píku na obsahu askorbové kyseliny:

$$R = 0,9833$$

Tab. 6 Průměrné plochy píků standardu kyseliny askorbové.

Koncentrace askorbové kyseliny [mg/100ml]	Průměrná plocha píku [mV.s]	Směrodatná odchylka - s
2	756,12	9,1
3	1260,36	3,5
4	1756,44	2,3
5	2608,55	2,8
6	3040,21	5,4
7	3213,22	8,1
8	3638,94	2,7



Obr. 4 Kalibrační přímka pro stanovení askorbové kyseliny metodou HPLC.

7.1.2 Stanovení askorbové kyseliny v jednotlivých druzích zeleniny metodou HPLC/UV

V šesti druzích čerstvé zeleniny bylo provedeno stanovení obsahu kyseliny askorbové: brokolice, květák, paprika bílá, paprika červená, růžičková kapusta, špenát.

U každého druhu zeleniny byla provedena tepelná úprava: vaření, vaření v páře, dušení, mikrovlnný ohřev a následně stanoven obsah kyseliny askorbové po tepelné úpravě pomocí metody HPLC/UV.

Vzorky zeleniny byly tepelně zpracovány na základě postupu uvedeného v kapitole 6.1, izolace vitamínu C byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole v 6.2.1 a stanovení kyseliny askorbové bylo uskutečněno podle postupu v kapitole 6.3.

7.1.2.1 Stanovení kyseliny askorbové v brokolici

Pro stanovení kyseliny askorbové v brokolici byla zvolena hmotnost vzorku brokolice 5 g a po homogenizaci byl vzorek extrahován v 50 ml methanolu.

V tabulce 7 jsou uvedeny navážky vzorků brokolice před a po tepelné úpravě a změny hmotnosti po tepelném zpracování (zvýšení hmotnosti +, snížení –).

Tab. 7 Hmotnost vzorků brokolice před a po tepelné úpravě.

Vzorek	Hmotnost před tepelným zpracováním [g]	Hmotnost po tepelném zpracování [g]	Ztráty/nárůst hmotnosti proti čerstvé zelenině [g]
Čerstvá	5,0467		
Vařená	5,3152	6,6145	+ 1,2993
Vařená v páře	5,2182	5,3213	+ 0,1031
Dušená	5,3378	6,9304	+ 1,5926
Mikrovlnný ohřev	5,2844	3,5829	- 1,7015

V tabulce 8 jsou uvedeny průměrné plochy píků a použité ředění vzorku a doby působení jednotlivých druhů tepelného zpracování.

Tab. 8 Průměrné plochy píků vzorků brokolice před a po tepelné úpravě.

Vzorek	Doba působení [min]	Průměrná plocha píku [mA.V.s]	Směrodatná odchylka	Ředění vzorku
Čerstvý	-	1075,2	3,58	1:3
Vařený	10 min	952,63	7,60	1:1
Vařený v páře	10 min	1156,45	4,15	1:2
Dušený	5 min	1062,44	7,33	1:2
Mikrovlnný ohřev	1 min	1064,70	1,23	1:3

V tabulce 9 jsou uvedeny zjištěná množství kyseliny askorbové v brokolici před a po tepelném opracování a vypočítané ztráty obsahu kyseliny askorbové po tepelného zpracování.

Chromatogramy stanovení kyseliny askorbové v čerstvém vzorku brokolice a v vzorcích po různých druzích tepelné úpravě jsou uvedeny v příloze (P VIII-XII).

Tab. 9 Obsah kyseliny askorbové ve vzorku brokolice před a po tepelné úpravě.

Vzorek	Obsah vit.C v čerstvé zelenině [mg/100g]	Obsah vit.C v tepelně zpracované zelenině * [mg/100g]	Obsah vit.C v tepelně zpracované zelenině ** [mg/100g]	Ztráty vitamínu C po tepelném zpracování [%]
Čerstvý	94,42	-	-	-
Vařený	-	40,03	32,17	59,75
Vařený v páře	-	73,34	71,92	24,88
Dušený	-	66,20	50,99	33,71
Mikrovlnný ohřev	-	89,35	131,78	9,63

* počítáno z hmotnosti před tepelným zpracováním

** počítáno z hmotnosti po tepelném zpracování

Obsah kyseliny askorbové v čerstvé brokolici dle literárních zdrojů je 110-113 mg/100 g [1]. Měřením bylo zjištěno, že v čerstvém vzorku brokolice byl průměrný obsah kyseliny askorbové 94,42 mg/100 g.

Nejmenší ztráty vitamínu C (kyseliny askorbové) u brokolice byly u mikrovlnného ohřevu, který byl prováděn nejkratší dobu (1 min). Druhé nejnižší ztráty byly zaznamenány u brokolice vařené v páře (10 min), kdy byly ztráty okolo 25%. Vaření v páře je mnohem šetrnější způsob tepelné úpravy k vitamínu C (kyselině askorbové) než dušení a vaření. Dušení vzorku brokolice probíhalo pouze 5 minut, ale ztráty jsou větší než u vaření v páře (10 min). Vysoké ztráty okolo 60% byly stanoveny u brokolice vařené ve vodě. Takto vysoké ztráty byly pravděpodobně způsobeny dlouhou dobou tepelné úpravy (10 min) a ztrátami výluhem ve vodě.

7.1.2.2 Stanovení kyseliny askorbové v kvěťáku

Pro stanovení kyseliny askorbové v kvěťáku byla zvolena hmotnost vzorku kvěťáku 7,5 g a po homogenizaci byl vzorek extrahován v 25 ml methanolu.

V tabulce 10 jsou uvedeny navážky vzorků kvěťáku před a po tepelné úpravě a změny hmotnosti po tepelném zpracování (zvýšení hmotnosti +, snížení –).

Tab. 10 Hmotnost vzorků kvěťáku před a po tepelné úpravě.

Vzorek	Hmotnost před tepelným zpracováním [g]	Hmotnost po tepelném zpracování [g]	Ztráty/nárůst hmotnosti proti čerstvé zelenině [g]
Čerstvý	7,5505		
Vařený	7,5023	7,5632	+ 0,0609
Vařený v páře	7,4289	7,2747	- 0,1542
Dušený	7,6340	8,3701	+ 0,7361
Mikrovlnný ohřev	7,5424	4,7330	- 2,8094

V tabulce 11 jsou uvedeny průměrné plochy píků, použité ředění vzorku, působení jednotlivých druhů tepelného zpracování.

Tab. 11 Průměrné plochy píků vzorků květáku před a po tepelné úpravě.

Vzorek	Doba působení [min]	Průměrná plocha píku [mA.V.s]	Směrodatná odchylka	Ředění vzorku
Čerstvý	-	1923,51	4,93	1:4
Vařený	10 min	1654,40	7,50	1:2
Vařený v páře	10 min	1834,12	3,05	1:3
Dušený	5 min	1116,01	9,71	1:5
Mikrovlnný ohřev	1 min	1262,70	4,44	1:5

V tabulce 12 jsou uvedeny zjištěná množství kyseliny askorbové před a po tepelném opracování ve vzorku květáku a vypočítané ztráty obsahu kyseliny askorbové po tepelném zpracování.

Chromatogramy stanovení kyseliny askorbové v čerstvém vzorku květáku a ve vzorcích po různých druzích tepelné úpravě jsou uvedeny v příloze (P XIII-XVII).

Tab. 12 Obsah kyseliny askorbové ve vzorku kvěťáku před a po tepelné úpravě.

Vzorek	Obsah vit.C v čerstvé zelenině [mg/100g]	Obsah vit.C v tepelně zpracované zelenině * [mg/100g]	Obsah vit.C v tepelně zpracované zelenině ** [mg/100g]	Ztráty vitamínu C po tepelném zpracování [%]
Čerstvý	68,72	-	-	-
Vařený	-	35,85	35,56	47,42
Vařený v páře	-	53,29	68,03	21,08
Dušený	-	48,48	44,21	30,12
Mikrovlnný ohřev	-	55,13	87,85	19,58

* počítáno z hmotnosti před tepelným zpracováním

** počítáno z hmotnosti po tepelném zpracování

Obsah kyseliny askorbové v čerstvém kvěťáku dle literárních zdrojů je 4,7-161 mg/100 g [1]. Měřením bylo zjištěno, že v čerstvém vzorku kvěťáku byl průměrný obsah kyseliny askorbové 68,72 mg/100 g.

Nejnižší ztráty vitamínu C (kyseliny askorbové) u kvěťáku byly stanoveny při mikrovlnném ohřevu, který působil nejkratší dobu (1 min). Ztráty vitamínu C (kyseliny askorbové) při vaření v páře (10 min) byly 21%, lze tedy konstatovat, že vaření v páře je velmi šetrný způsob tepelného zpracování kvěťáku vzhledem k tomu, že ztráty u mikrovlnného ohřevu činily 20% (1 min) a u vaření v páře byly ztráty 21% (10 min). Dušením (5 min) kvěťáku se snížil obsah kyseliny askorbové o 30%. Největší ztráty vitamínu C (kyseliny askorbové) byly způsobeny vařením (10 min), ztráty činily 48%, což je skoro poloviční ztráta původního obsahu vitamínu C (kyseliny askorbové). Ztráty u vaření jsou způsobené výluhem a působením vysokých teplot.

7.1.2.3 Stanovení kyseliny askorbové v bílé paprice

Pro stanovení kyseliny askorbové v bílé paprice byla zvolena hmotnost vzorku papriky 7,5 g a po homogenizaci byl vzorek extrahován v 25 ml methanolu.

V tabulce 13 jsou uvedeny navážky vzorků bílé papriky před a po tepelné úpravě a změny hmotnosti po tepelném zpracování (zvýšení hmotnosti +, snížení –).

Tab. 13 Hmotnost vzorků bílé papriky před a po tepelné úpravě.

Vzorek	Hmotnost před tepelným zpracováním [g]	Hmotnost po tepelném zpracování [g]	Ztráty/nárůst hmotnosti proti čerstvé zelenině [g]
Čerstvý	7,5125		
Vařený	7,4824	6,9640	- 0,5184
Vařený v páře	7,4947	6,4026	- 1,0921
Dušený	7,4864	6,1770	- 1,3094
Mikrovlnný ohřev	7,5853	4,5148	- 3,0705

V tabulce 14 jsou uvedeny průměrné plochy píků, použité ředění vzorku, doby působení jednotlivých druhů tepelného zpracování.

Tab. 14 Průměrné plochy píků vzorků bílé papriky před a po tepelné úpravě.

Vzorek	Doba působení [min]	Průměrná plocha píku [mA.V.s]	Směrodatná odchylka	Ředění vzorku
Čerstvý	-	1508,17	6,67	1:10
Vařený	3 min	1685,93	1,39	1:5
Vařený v páře	3 min	1297,61	7,58	1:10
Dušený	3 min	1829,13	5,27	1:5
Mikrovlnný ohřev	1 min	2259,03	9,77	1:5

V tabulce 15 jsou uvedeny zjištěná množství kyseliny askorbové před a po tepelném opracování ve vzorku bílé papriky a vypočítané ztráty obsahu kyseliny askorbové po tepelném zpracování.

Chromatogramy stanovení kyseliny askorbové v čerstvém vzorku bílé papriky a ve vzorcích po různých druzích tepelné úpravě jsou uvedeny v příloze (P XVIII-XXII).

Tab. 15 Obsah kyseliny askorbové ve vzorku bílé papriky před a po tepelné úpravě.

Vzorek	Obsah vit.C v čerstvé zelenině [mg/100g]	Obsah vit.C v tepelně zpracované zelenině * [mg/100g]	Obsah vit.C v tepelně zpracované zelenině ** [mg/100g]	Ztráty vitamínu C po tepelném zpracování [%]
Čerstvý	120,14	-	-	-
Vařený	-	73,19	78,64	38,84
Vařený v páře	-	104,37	122,18	12,92
Dušený	-	79,12	95,89	33,91
Mikrovlnný ohřev	-	95,74	160,85	21,07

* počítáno z hmotnosti před tepelným zpracováním

** počítáno z hmotnosti po tepelném zpracování

Obsah kyseliny askorbové v čerstvé bílé paprice dle literárních zdrojů je 62-300 mg/100 g [1]. Měřením bylo zjištěno, že v čerstvém stanovovaném vzorku bílé papriky byl obsah kyseliny askorbové je 120,14 mg/100 g.

Nejnižší ztráty vitamínu C (kyseliny askorbové) byly stanoveny ve vzorku bílé papriky po vařením v páře, kdy ztráty činily 13% (3 min). Druhé nejnižší ztráty byly po mikrovlnném ohřevu - ztráty obsahu kyseliny askorbové činily 21% (1 min). U vzorku, který byl zpracován dušením (3 min) byly ztráty kyseliny askorbové 34%. U vařeného vzorku (3 min) byly ztráty okolo 39%. Ztráty byly způsobeny výluhem a působením vysoké teploty. Lze tedy konstatovat, že vaření v páře je nejšetrnější způsob tepelného zpracování bílé papriky.

7.1.2.4 Stanovení kyseliny askorbové v červené paprice

Pro stanovení kyseliny askorbové v červené paprice byla zvolena hmotnost vzorku papriky 5 g a po homogenizaci byl vzorek extrahován v 50 ml methanolu.

V tabulce 16 jsou uvedeny navážky vzorků červené papriky před a po tepelné úpravě a změny hmotnosti po tepelném zpracování (zvýšení hmotnosti +, snížení –).

Tab. 16 Hmotnost vzorků červené papriky před a po tepelné úpravě.

Vzorek	Hmotnost před tepelným zpracováním [g]	Hmotnost po tepelném zpracování [g]	Ztráty/nárůst hmotnosti proti čerstvé zelenině [g]
Čerstvý	5,0982		
Vařený	5,0580	4,6785	- 0,3795
Vařený v páře	5,1623	4,5322	- 0,6301
Dušený	4,9981 (3 min) / 5,0804 (10 min)	4,6152/ 4,2704	- 0,3829/ -0,7277
Mikrovlnný ohřev	4,8391	3,0293	- 1,8098

V tabulce 17 jsou uvedeny průměrné plochy píků, použité ředění vzorku a doby působení jednotlivých druhů tepelného zpracování.

Tab. 17 Průměrné plochy píků vzorků červené papriky před a po tepelné úpravě.

Vzorek	Doba působení [min]	Průměrná plocha píku [mA.V.s]	Směrodatná odchylka	Ředění vzorku
Čerstvý	-	1715,29	8,71	1:5
Vařený	3 min	1350,15	1,76	1:5
Vařený v páře	3 min	1490,70	9,13	1:5
Dušený	3 min /	1311,35/	11,34/	1:5/
	10 min	1018,90	6,03	1:5
Mikrovlnný ohřev	1 min	1437,22	5,74	1:5

V tabulce 18 jsou uvedeny zjištěné množství kyseliny askorbové před a po tepelném opracování ve vzorku červené papriky a vypočítané ztráty obsahu kyseliny askorbové po tepelném zpracování.

Chromatogramy stanovení kyseliny askorbové v čerstvém vzorku červené papriky a ve vzorcích po různých druzích tepelné úpravě jsou uvedeny v příloze (P XXIII-XXVIII).

Tab. 18 Obsah kyseliny askorbové ve vzorku papriky červené před a po tepelné úpravě.

Vzorek	Obsah vit.C v čerstvé zelenině [mg/100g]	Obsah vit.C v tepelně zpracované zelenině * [mg/100g]	Obsah vit.C v tepelně zpracované zelenině ** [mg/100g]	Ztráty vitamínu C po tepelném zpracování [%]
Čerstvý	218,43	-	-	-
Vařený	-	175,19	189,40	19,16
Vařený v páře	-	188,62	214,84	14,72
Dušený	-	172,45(3 min) / 133,78(10 min)	186,76/ 133,78	19,74/ 38,54
Mikrovlnný ohřev	-	194,33	310,42	6,27

* počítáno z hmotnosti před tepelným zpracováním

** počítáno z hmotnosti po tepelném zpracování

Obsah kyseliny askorbové v čerstvé červené paprice dle literárních zdrojů je 62-300 mg/100 g [1]. Měřením bylo zjištěno, že v čerstvém vzorku červené papriky byl průměrný obsah kyseliny askorbové 218,43 mg/100 g.

Nejnižší ztráty (6%) vitamínu C (kyseliny askorbové) byly stanoveny u mikrovlnného ohřevu. Takto nízké ztráty vitamínu C (kyseliny askorbové) mohou být vysvětleny krátkou dobou (1 min) působení. Nízké ztráty vitamínu C (kyseliny askorbové) byly stanoveny u tepelné úpravy vařením v páře (3 min) a ztráty činily necelých 15%. Dušením vzorku (3 min) byly ztráty kyseliny askorbové 20% a u vaření vzorku ve vodě byly ztráty necelých 20%. Při dušení vzorku po dobu 10 minut byly ztráty značně větší a to 38%, což je dvojnásobek hodnoty proti dušení po dobu 3 minut. Opět lze tedy konstatovat, že vaření v páře je nejšetřnější způsob tepelného zpracování vzhledem ke ztrátám vitamínu C (kyseliny askorbové).

7.1.2.5 Stanovení kyseliny askorbové v růžičkové kapustě

Pro stanovení kyseliny askorbové v růžičkové kapustě byla zvolena hmotnost vzorku kapusty 5 g a po homogenizaci byl vzorek extrahován v 50 ml methanolu.

V tabulce 19 jsou uvedeny navážky vzorků růžičkové kapusty před a po tepelné úpravě a změny hmotnosti po tepelném zpracování (zvýšení hmotnosti +, snížení –).

Tab. 19 Hmotnost vzorků růžičkové kapusty před a po tepelné úpravě.

Vzorek	Hmotnost před tepelným zpracováním [g]	Hmotnost po tepelném zpracování [g]	Ztráty/nárůst hmotnosti proti čerstvé zelenině [g]
Čerstvý	5,3752		
Vařený	5,2104	6,2513	+ 1,0409
Vařený v páře	5,1757 (5 min) / 5,0883 (10 min)	5,5158/ 5,5461	+ 0,3401/ +0,4578
Dušený	5,1845 (5 min) / 5,2925 (10 min)	6,3172/ 6,2702	+ 1,1327/ +0,9777
Mikrovlnný ohřev	5,0772	2,8821	- 2,1951

V tabulce 20 jsou uvedeny průměrné plochy píků, použité ředění vzorku, doby působení jednotlivých druhů tepelného zpracování.

Tab. 20 Průměrné plochy píků vzorků růžičkové kapusty před a po tepelné úpravě.

Vzorek	Doba působení [min]	Průměrná plocha píku [mA.V.s]	Směrodatná odchylka	Ředění vzorku
Čerstvá	-	1173,02	8,71	1:4
Vařená	5 min	1286,00	9,93	1:2
Vařená v páře	5 min /	1644,03/	1,67/	1:2/
	10 min	1371,61	9,94	1:2
Dušená	5 min /	1350,81/	7,28/	1:2/
	10 min	904,43	4,08	1:2
Mikrovlnný ohřev	1 min	1209,40	2,42	1:2

V tabulce 21 jsou uvedeny zjištěná množství kyseliny askorbové před a po tepelném opracování ve vzorku růžičkové kapusty a vypočítané ztráty obsahu kyseliny askorbové po tepelném zpracování.

Chromatogramy stanovení kyseliny askorbové v čerstvém vzorku růžičkové kapusty a ve vzorcích po různých druzích tepelné úpravě jsou uvedeny v příloze (P XXIX-XXXV).

Tab. 21 Obsah kyseliny askorbové ve vzorku růžičkové kapustě před a po tepelné úpravě.

Vzorek	Obsah vit.C v čerstvé zelenině [mg/100g]	Obsah vit.C v tepelně zpracované zelenině * [mg/100g]	Obsah vit.C v tepelně zpracované zelenině ** [mg/100g]	Ztráty vitamínu C po tepelném zpracování [%]
Čerstvý	120,26	-	-	-
Vařený	-	81,19	67,68	30,35
Vařený v páře	-	103,29(5 min)/ 88,39 (10 min)	96,93/ 88,39	10,79/ 25,35
Dušený	-	85,49 (5 min)/ 57,47 (10 min)	70,17/ 48,51	26,29/ 51,47
Mikrovlnný ohřev	-	78,59	138,44	30,81

* počítáno z hmotnosti před tepelným zpracováním

** počítáno z hmotnosti po tepelném zpracování

Obsah kyseliny askorbové v čerstvé růžičkové kapustě dle literárních zdrojů je 100-103 mg/100 g [1]. Měřením bylo zjištěno, že v čerstvém vzorku růžičkové kapusty byl průměrný obsah kyseliny askorbové 120,26 mg/100 g.

Nejnižší ztráty vitamínu C (kyseliny askorbové) u růžičkové kapusty byly zjištěny při tepelném zpracování vařením v páře. Ztráty činily 10% (5 min), u vzorku vařeného v páře po dobu 10 minut byly ztráty vitamínu C 25%, což bylo způsobeno delší dobou tepelného ohřevu. Po dušení vzorku růžičkové kapusty byly ztráty 26% (5 min) a 51% (10 min). Při vaření vzorku (5 min) ve vodě byly zjištěny ztráty 30%, tyto ztráty jsou z různých druhů tepelných úprav nejvyšší za stejnou dobu působení (5 min). Vysoké ztráty vitamínu C byly

stanoveny ve vzorku po mikrovlnném ohřevu - ztráty byly skoro 31% za 1 minutu. Tyto ztráty jsou značně vysoké vzhledem k době působení tohoto ohřevu. Jako nejideálnější způsob tepelného zpracování u růžičkové kapusty je vaření v páře, kdy dochází k nejmenším kyselině askorbové.

7.1.2.6 Stanovení kyseliny askorbové v listovém špenátu

Pro stanovení kyseliny askorbové v listovém špenátu byla zvolena hmotnost vzorku špenátu 5 g a po homogenizaci byl vzorek extrahován v 50 ml methanolu.

V tabulce 22 jsou uvedeny navážky vzorků listového špenátu před a po tepelné úpravě a změny hmotnosti po tepelném zpracování (zvýšení hmotnosti +, snížení -).

Tab. 22 Hmotnost vzorků listového špenátu před a po tepelné úpravě.

Vzorek	Hmotnost před tepelným zpracováním [g]	Hmotnost po tepelném zpracování [g]	Ztráty/nárůst hmotnosti proti čerstvé zelenině [g]
Čerstvý	5,3492		
Vařený	5,1401	9,1138	+ 3,9737
Vařený v páře	4,9218	4,8248	- 0,097
Dušený	5,0965	6,0731	+ 0,9766
Mikrovlnný ohřev	4,9701	3,9943	- 0,9758

V tabulce 23 jsou uvedeny průměrné plochy píků, použité ředění vzorku, doby působení jednotlivých druhů tepelného zpracování.

Tab. 23 Průměrné plochy píků vzorků listového špenátu před a po tepelné úpravě.

Vzorek	Doba působení [min]	Průměrná plocha píku [mV.s]	Směrodatná odchylka	Ředění vzorku
Čerstvý	-	1724,68	8,27	1:2
Vařený	3 min	1462,07	4,50	1:1
Vařený v páře	3 min	Ns	-	-
Dušený	3 min	1175,07	10,08	1:2
Mikrovlnný ohřev	1 min	Ns	-	-

Ns – nestanoveno z důvodu štěpení píku kyseliny askorbové.

V tabulce 24 jsou uvedeny zjištěná množství kyseliny askorbové před a po tepelném opracování ve vzorku listového špenátu a vypočítané ztráty obsahu kyseliny askorbové po tepelném zpracování.

Chromatogramy stanovení kyseliny askorbové v čerstvém vzorku listového špenátu a ve vzorcích po různých druzích tepelné úpravě jsou uvedeny v příloze (PXXXVI-XXXX).

Tab. 24 Obsah kyseliny askorbové ve vzorku listového špenátu před a po tepelné úpravě.

Vzorek	Obsah vit.C v čerstvé zelenině [mg/100g]	Obsah vit.C v tepelně zpracované zelenině * [mg/100g]	Obsah vit.C v tepelně zpracované zelenině ** [mg/100g]	Ztráty vitamínu C po tepelném zpracování [%]
Čerstvý	104,59	-	-	-
Vařený	-	61,98	34,96	38,33
Vařený v páře	-	-	-	-
Dušený	-	76,23	63,97	23,55
Mikrovlnný ohřev	-	-	-	-

* počítáno z hmotnosti před tepelným zpracováním

** počítáno z hmotnosti po tepelném zpracování

Obsah kyseliny askorbové v listovém špenátu dle literárních zdrojů je 35-84 mg/100 g [1]. Měřením bylo zjištěno, že v čerstvém vzorku listového špenátu byl průměrný obsah kyseliny askorbové 104,59 mg/100 g.

U tepelného zpracování vařením v páře a u mikrovlnného ohřevu ve vzorku listového špenátu nebylo možné stanovit obsah kyseliny askorbové, jelikož došlo k štěpení píků. U zbývajících 2 tepelných úprav byly nejnižší ztráty vitamínu C (kyseliny askorbové) zjištěny u dušeného vzorku. Ztráty činily 24% za dobu 3 minut. Vařením byly ztráty vitamínu C 38% za 3 minuty. Ztráty vitamínu C (kyseliny askorbové) u listového špenátu byly vysoké i po krátké době tepelné úpravy ve srovnání s ostatními druhy zeleniny. Jde o listovou zeleninu, u které dochází k větším ztrátám vitamínu C po tepelném zpracování.

7.1.3 Ztráty vitamínu C (askorbové kyseliny) po různých tepelných úpravách

Byly provedeny 4 druhy tepelných úprav (vaření, vaření v páře, dušení, mikrovlnný ohřev)

na šesti druzích zeleniny (brokolice, květák, paprika bílá, paprika červená, růžičková kapusta, špenát listový) a vyhodnocením ztrát vitamínu C (askorbové kyseliny).

7.1.3.1 Ztráty vitamínu C (kyseliny askorbové) po vaření

Při tepelném zpracování vařením byly zjištěny tyto ztráty u jednotlivých vzorků zeleniny (tab 25).

Tab. 25 Ztráty vitamínu C (kys. askorbové) po vaření

Zelenina	Doba působení [min]	Ztráty [%]
Brokolice	10	59,75
Květák	10	47,42
Paprika bílá	3	38,88
Paprika červená	3	19,16
Růžičková kapusta	5	30,35
Špenát	3	38,33

K nejmenším ztrátám (19%) askorbové kyseliny vařením došlo u červené papriky, která byla vařena, vzhledem k její textuře, pouze 3 minuty. Červená paprika má silnou slupku, která patrně zabránila ztrátám askorbové kyseliny výluhem proti zeleninám tenkostěnným (např. u bílé papriky činily ztráty 39%). Největší ztráty (téměř 60%) byly u brokolice, která byla vařena 10 minut. Velké ztráty (47%) byly také u kvěťáku, zelenině velmi podobné brokolici, opět vařené stejně dlouhou dobu. Značné ztráty (38%) askorbové kyseliny byly zaznamenány také u špenátu, který byl vařen pouze 3 minuty (listová zelenina, která nevyžaduje, tak dlouhou dobu tepelné úpravy). Značné ztráty u špenátu mohou být vysvětleny tím, že se jedná o listovou zeleninu.

Ztráty vařením byly zjištěny nejvyšší ztráty vitamínu C (askorbové kyseliny), které mohou být vysvětleny dlouhou dobou působení teploty a také značným ztrátám vitamínu C výluhem do vody.

7.1.3.2 Ztráty vitamínu C (kyseliny askorbové) po vaření v páře

Při tepelném zpracování vařením v páře byly zjištěny tyto ztráty u jednotlivých druhů zeleniny (tab 26).

Tab. 26 Ztráty vitamínu C (kys. askorbové) po vaření v páře

Zelenina	Doba působení [min]	Ztráty [%]
Brokolice	10	24,88
Květák	10	21,08
Paprika bílá	3	12,92
Paprika červená	3	14,72
Růžičková kapusta	5 / 10	10,79 / 25,35
Špenát	3	Ns

Ns- nestanoveno z důvodu štěpení píku.

K nejmenším ztrátám (11%) askorbové kyseliny u vaření v páře došlo u vzorku růžičkové kapusty (5 min). Ztráty vitamínu C vařením v páře po dobu 10 minut byly okolo 25 % u brokolice i růžičkové kapusty a 21% u květáku. Při vaření v páře po dobu 3 minut byly ztráty nižší, jelikož vzorky zeleniny bílé a červené papriky byly vystaveny tepelnému působení kratší dobu. U špenátu nebylo možné zjistit ztráty.

Ztráty vitamínu C (askorbové kyseliny) při tepelné úpravě vařením v páře jsou nejmenší ze zkoumaných způsobů tepelného zpracování. Při vaření v páře nedochází ke ztrátám vitamínu C výluhem, ztráty jsou způsobeny pouze tepelnou destrukcí vitamínu C. Lze tedy konstatovat, že vaření v páře je nejšetrnější způsob tepelné úpravy zeleniny, kdy dochází k nejmenším ztrátám askorbové kyseliny.

7.1.3.3 Ztráty vitamínu C (kyseliny askorbové) po dušení

Při tepelném zpracování dušením byly zjištěny tyto ztráty u jednotlivých vzorků zeleniny (tab 27).

Tab. 27 Ztráty vitamínu C (kys. askorbové) po dušení

Zelenina	Doba působení [min]	Ztráty [%]
Brokolice	5	33,71
Květák	5	30,12
Paprika bílá	3	33,91
Paprika červená	3 / 10	19,74 / 38,54
Růžičková kapusta	5 / 10	26,29 / 51,47
Špenát	3	23,55

K nejmenším ztrátám (19%) askorbové kyseliny při tepelném zpracování dušením byly u červené papriky. Doba dušení byla zvolena 3 minuty, vzhledem k její textuře. Nejnížší ztráty askorbové kyseliny mohou být vysvětleny opět ochrannou funkcí slupky před jeho ztrátami výluhem, jelikož vzorky byly dušeny na vodě. Při dušení červené papriky po dobu 10 minut byly ztráty (39%) mnohem větší a to skoro dvojnásobné, jelikož při tak dlouhém dušení došlo k porušení textury, která byla již velmi měkká a docházelo k rozpadání struktury papriky. Ztráty při tepelném zpracování dušením byly ve vzorcích zeleniny kolem 30%. Největší ztráty (50%) byly zaznamenány u růžičkové kapusty, která byla dušena po dobu 10 minut. Důvodem takto vysokých ztrát je dlouhá doba působení vysoké teploty a porušení struktury růžičkové kapusty a tím pádem docházelo k pronikání vody a páry do celé struktury a ztrátám vitamínu C (askorbové kyseliny).

Ztráty vitamínu C (askorbové kyseliny) při tepelné úpravě dušením byly nižší než při klasickém vaření ve vodě, ale vyšší než ve vaření zeleniny v páře. To lze zdůvodnit tím, že zelenina byla dušena pouze v malém množství vody a docházelo k malým ztrátám askorbové kyseliny výluhem a také tím, že dušením bylo dosaženo požadované textury dříve než při klasickém vaření.

7.1.3.4 Ztráty vitamínu C (kyseliny askorbové) po mikrovlnném ohřevu

Při tepelném zpracování mikrovlnným ohřevem byly zjištěny tyto ztráty u jednotlivých druhů zeleniny (tab 28).

Tab. 28 Ztráty vitamínu C (kys. askorbové) po mikrovlnném ohřevu

Zelenina	Doba působení [min]	Ztráty [%]
Brokolice	1	9,63
Květák	1	19,58
Paprika bílá	1	21,07
Paprika červená	1	6,27
Růžičková kapusta	1	30,81
Špenát	1	Ns

Ns- nestanoveno z důvodu štěpení píku.

Při tepelné úpravě mikrovlnným ohřevem byly vzorky zeleniny upravovány pouze 1 minutu. Při delší době docházelo k spálení vzorku zeleniny na jednotlivých místech, jelikož mikrovlnný ohřev není rovnoměrný. Při mikrovlnném ohřevu docházelo k velkým ztrátám na hmotnosti jednotlivých vzorků. Nejmenší ztráty vitamínu C (askorbové kyseliny) byly u červené papriky (6%), což může být opět vysvětleno ochrannou funkcí slupky, nízké ztráty (10%) byly také u brokolice. Vysoké ztráty přes 20% byly zjištěny u květáku, bílé papriky a nejvyšší ztráty 30% byly u růžičkové kapusty. U vzorku špenátu nebylo možné stanovit výši ztrát, jelikož došlo ke štěpení píků.

Při mikrovlnném ohřevu docházelo k různě velkým ztrátám vitamínu C (askorbové kyseliny) v jednotlivých vzorcích zeleniny. Ztráty askorbové kyseliny během mikrovlnného ohřevu mohou být vysvětleny tím, že při mikrovlnném ohřevu dochází k přímé absorpci mikrovlnného záření polárními složkami, čímž se zvyšuje jejich vibrační energie a zahřívají se rychle zevnitř. Rychlý vzrůst teploty může mít degradační účinek na vitamin C (askorbovou kyselinu), který je velmi citlivý na zvýšení teploty.

ZÁVĚR

Vitamin C neboli kyselina askorbová patří mezi vitaminy rozpustné ve vodě. Vitamin C je základní složka v biosyntéze kolagenu, je potřebný pro tvorbu a správnou funkci pojivové tkáně, kostí a chrupavek. Vitamin C patří mezi nejméně stabilní vitaminy. Ke ztrátám dochází při skladování, kulinárním a průmyslovém zpracování, největší ztráty jsou při tepelném opracování. Vysoké ztráty vitamínu C jsou způsobeny výluhem, dále je citlivý na pH prostředí, kdy dochází ke ztrátám při kulinární a průmyslové úpravě v alkalickém či neutrálním prostředí. Významné jsou i ztráty enzymatickou oxidací. Celkové ztráty se pohybují zpravidla mezi 20 až 80%.

Cílem diplomové práce bylo stanovení vitamínu C (kyseliny askorbové) v různých druzích zeleniny před a po tepelné úpravě pomocí techniky HPLC/UV.

Byly provedeny analýzy šesti druhů zeleniny (brokolice, květák, paprika bílá, paprika červená, růžičková kapusta, listový špenát) před a po různých druzích tepelné úpravy (vaření, vaření v páře, dušení, mikrovlnný ohřev).

Extrakce kyseliny askorbové byla provedena pomocí methanolu jako rozpouštědlem a s přidávkem mořského písku. Obsah vitamínu C (kyseliny askorbové) v zelenině byl stanoven pomocí metody HPLC/UV s těmito podmínkami: mobilní fáze – methanol, průtok mobilní fáze byl 0,8 ml/min a doba analýzy byla 10 minut. Měření probíhalo na koloně SUPELCOSIL LC8 a k detekci byl použit detektor UV/VIS DAD G1315A a zvolená vlnová délka byla 254 nm.

Při tepelném zpracování vařením ve vodě (3 min) byly zjištěny nejmenší ztráty (20%) vitamínu C (askorbové kyseliny) u červené papriky a největší ztráty (téměř 60%) byly u brokolice (10 min). Při vaření v páře došlo k nejmenším ztrátám (11%) vitamínu C (askorbové kyseliny) u vzorku růžičkové kapusty vařené v páře po dobu 5 minut a nejvyšší ztráty (25%) byly zjištěny u růžičkové kapusty vařené v páře po dobu 10 minut. Při tepelném zpracování dušením (3 min) byly nejmenší ztráty (19%) vitamínu C (askorbové kyseliny) u červené papriky a největší ztráty (50%) byly zaznamenány u růžičkové kapusty, která byla dušena po dobu 10 minut. Při mikrovlnném ohřevu docházelo k různě velkým ztrátám vitamínu C (askorbové kyseliny) v jednotlivých vzorcích zeleniny. Nejmenší ztráty askorbové

kyseliny byly u červené papriky (6%) a nejvyšší ztráty (30%) byly u růžičkové kapusty.

Nejmenší ztráty vitamínu C (askorbové kyseliny) byly zjištěny při tepelné úpravě vařením v páře. Nejšetrnější a nejvhodnější tepelný způsob úpravy zeleniny je vaření v páře, méně vhodným způsobem tepelné úpravy zeleniny je dušení a nejméně vhodným je vaření ve vodě, kdy docházelo jednoznačně k největším ztrátám kyseliny askorbové. U mikrovlnného ohřevu byly zjištěny rozdílná množství ztrát vitamínu C.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2*. 1 vyd. Tábor: OSSIS, 1999. 304s. ISBN 80-902391-4-5.
- [2] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D. *Potravinářská biochemie II*. 1. vyd. Zlín: FT UTB, 2006. 168 s. ISBN 80-7318-395-1.
- [3] Vitamin C [online]. [cit. 2009-25-9]. Dostupný z WWW: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es002/ebook.html?p=kyselina_askorbova
- [4] MEYERS, A. R. *Encyklopedia of Physical Science and Technology*. 3.vyd. California, 2001. 528 s. ISBN 978-0-12-22-7410-7.
- [5] Vitamin C: askorbová kyselina [online]. [cit. 2009-25-9]. Dostupný z WWW: <http://www.ped.muni.cz/WCHEM/comenius2000/vitaminC/struktura.htm>
- [6] BURKE, K. E. *Prevention and treatment of aging skin with topical antioxidants*. 1. vyd. New York, William Andrew Publishing, 2008. 517s. ISBN 978-0-8155-1584-5.
- [7] ČERMÁK, B. *Výživa člověka*. 1.vyd. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2002. 224s. ISBN 80-7040-576-7.
- [8] ZUMREOGLU-KARAN, B. The coordination chemistry of Vitamin C. *Coordination Chemistry Reviews*. 2006, roč. 250, vyd. 17-18, s. 2295-2307.
- [9] TURLEY, S. D., WEST, C. E., HORTON, B. J. The role of ascorbic acid in the regulation of cholesterol metabolism and in the pathogenesis of atherosclerosis. 1976, roč. 24, vyd. 1-2, s. 1-18.
- [10] HLÚBIK, P., OPLTOVÁ, L. *Vitaminy*. 1. vyd.. Praha: Grada Publishing, 2004. 232s. ISBN 80-247-0373-4.
- [11] JANIČEK, G., HALAČKA, K. *Základy výživy*. vyd. 1. Praha: nakladatelství VŠCHT, 1985. 174s
- [12] BENDICH, A., MACHLIN, L.J., SCANDURRA, O., BURTON, G.W., WAYNER, D.D.M. The antioxidant role of vitamin C. *Advances in free radical biology a medicine*. 1986, roč. 2, vyd. 2, s. 419-444.

- [13] VERRAX, J., CALDERON, P.BUC. The controversial place of vitamin C in cancer treatment. 2008, roč. 76, vyd. 12, s. 1644-1652.
- [14] STROHLE, A., HAHN, A. Vitamin C and immune function. *PubMed*. 2009, roč. 32, vyd. 2, s. 49-54.
- [15] KRISTI, A., STEINMETZ, POTTER, J.D. Vegetables, fruit and cancer. *Springer Netherlands*. 2004, roč. 2, vyd. 6, s. 427-442.
- [16] BLOCK, G. Vitamin C and cancer prevention: the epidemiologic evidence. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1991, roč. 53, s.270-282.
- [17] SELMAN, J.D. Vitamin retention during blanching of vegetables. *Food chemistry*. 1994, roč. 49, vyd. 2, s.137-147
- [18] NOVÁK, V., BUŇKA, F. *Základy ekonomiky výživy*. vyd.1. Zlín: FT UTB, 2005. 200s. ISBN- 80-7318-262-9.
- [19] Antivitaminy: funkce [online]. [cit. 2009-5-11]. Dostupný z WWW:
<<http://www.agronavigator.cz>>
- [20] MAROUNEK, M., BŘEZINA, P., ŠIMŮNEK, J. *Fyziologie a hygiena výživy*. vyd.1. Vyškov: VVŠ PV Vyškov, 2000. 68s. ISBN 80-7231-057-7.
- [21] Reakce: askorbová kyselina [online]. [cit. 2010-2-25]. Dostupný z WWW:
<<http://www.ped.muni.cz/WCHEM/comenius2000/vitaminC/reakce.htm>>
- [22] NOVÁKOVÁ, L., SOLICH, P., SOLICHOVÁ, D. HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *Trends in analytical chemistry*. 2008, roč. 27, vyd. 10, s. 942-958.
- [23] Vitamin C : stabilita [online]. [cit. 2010-2-19]. Dostupný z WWW:
<http://hplc1.sweb.cz/Vitamin/methods_water.htm#_Kyselina_askorbov%C3%A1>
- [24] Mikrovlnný ohřev [online]. [cit. 2010-3-3]. Dostupný z WWW:
<www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/p/P_45C.doc> 5>
- [25] VODOCHODSKÁ, L., ŠTĚPÁNEK, K. *Technologie v kostce*. vyd. 1. Úvaly:

Ratio, 2000. 141s.

- [26] ČIPERKA, P., KREUZIGER, J. *Základy technologie přípravy stravy*. vyd.1. Vyškov: VVŠ PV Vyškov, 2001. 49s.
- [27] SEKRETÁR, S., SCHMIDT, Š., ŠAJBIDOR, J., STARUCH, L. Riziká mikrovlnného ohřevu potravin. *Laboralim 2009*. 2009, vyd.1., 344s. ISBN 978-80-227-3071-6.
- [28] HPLC : charakteristika [online]. [cit. 2010-2-24]. Dostupný z WWW:
<<http://www.hplc.cz/>>
- [29] Chromatografické metody [online]. [cit. 2010-3-3]. Dostupný z WWW:
<http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/ana/chm.html>
- [30] KLOUDA, P.: *Moderní analytické metody*. vyd. 2. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 2003. 132s. ISBN 80-86369-07-2.
- [31] Kapalinová chromatografie [online]. [cit. 2010-3-3]. Dostupný z WWW:
<www.vscht.cz/anl/lach1/6_LC.pdf>
- [32] Chromatografie [online]. [cit. 2010-3-3]. Dostupný z WWW:
<http://www.old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc>
- [33] ŠTULÍK, K. A KOL. *Analytické separační metody*. vyd. 1. Praha: Karolinum, 2004. 264s. ISBN 80-246-0852-9.
- [34] CHURÁČEK, J., JANDERA, P. *Separace látek – Kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie*. vyd. 2. Praha: Nakladatelství technické literatury n. p., 1986. 140s.
- [35] SOMMER, L. *Základy analytické chemie II*. vyd.1. Brno: VUT Brno, 2000. 347s. ISBN 80-214-1742-0.
- [36] HPLC: schéma [online]. [cit. 2010-3-12]. Dostupný z WWW:
<http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separa.htm>
- [37] HPLC: odplyňovací zařízení [online]. [cit. 2010-3-12]. Dostupný z WWW:
<<http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc5.pdf>>

- <<http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc6.pdf>>
- <http://web.natur.cuni.cz/analchem/nesmerak/0708_pka_scriptum_04.pdf>
- [38] HPLC: detektory [online]. [cit. 2010-3-15]. Dostupný z WWW:
<http://www.hplc.cz/Teorie/UV_VIS_detector.html>
<http://www.hplc.cz/Teorie/FL_detector.html>
- [39] VALÁŠEK, P., ROP. O. *Analýza potravin – přírodní látky*. 1.vyd. Zlín: UTB ve Zlíně, FT. 2007, ISBN 978-80-7314-585-5.
- [40] Vitamin C: stanovení [online]. [cit. 2010-3-20]. Dostupný z WWW:
<http://www.vscht.cz/zkp/ustav/skripta/AP/02/AP_8.pdf>
<<http://web.vscht.cz/kohoutkj/navodVitC%20HPLC%202006.pdf>>
<http://web.natur.cuni.cz/analchem/nesmerak/0708_pka_scriptum_04.pdf>
- [41] ASKORBOVÁ KYSELINA: jodometrické stanovení [online]. [cit. 2010-3-20]. Dostupný z WWW:
<<http://analytika.upol.cz/electromigrace/docs/navody/ACHSB/pdf/04.pdf>>
- [42] WU, X., DIAO, Y., SUN, CH., YANG, J. Fluorimetric determination of ascorbic acid with *o*-phenylenediamine. *Talanta*. 2003, roč. 59, vyd. 1, s. 95-99.
- [43] ZÁDĚROVÁ, L., LUBAL, P. Kinetické stanovení L-askorbové kyseliny s využitím oscilujícího chemického systému. *Chemické listy*. 2006, roč. 100, s. 277-281.
- [44] WANG, L., ZHANG, L., SHE, S., GAO, F. Direct fluorimetric determination of ascorbic acid by the supramolecular system of AA with beta-cyclodextrin derivative. *Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2005, roč. 61, vyd. 11-12, s. 2737-2740.
- [45] JASELSKIS, B., NELAPATY, J. Spectrophotometric determination of microamounts of ascorbic acid in citrus fruits. *Analytical chemistry*. 1976, roč. 44, vyd. 2, s. 379-381.
- [46] CHUNG, H.K., INGLE JR, J.D. Fluorimetric kinetic method for the determination of total ascorbic acid with *o*-phenylenediamine. *Analytica Chimica Acta*. 1991, roč. 243, s. 89-95.

- [47] SHEKHOVTSOVA, T.N., MUGLINOVA, S.V., LUCHININA, J.A., GALIMOVA, A.Z. Enzymatic methods in food analysis: determination of ascorbic acid. *Analytica Chimica Acta*. 2006, roč. 573-574, s. 125-132.
- [48] ARYA, J.P., MAHAJAN, M., JAIN, P. Non – spectrophotometric methods for the determination of vitamin C. *Analytica Chimica Acta*. 2000, roč. 417, vyd. 1, s. 1-14.
- [49] VŠCHT: coulometrie [online]. [cit. 2010-3-24]. Dostupný z WWW: <http://www.vscht.cz/anl/lach1/4_Coulo.pdf>
- [50] RAGHU, V., PLATEL, K., SRINIVAJAN, K. Comparasion of ascorbic acid content of *Emblica officinalis* fruits determined by different analytical methods. *Journal of Food composition and analysis*. 2007, roč. 20, vyd. 6, s. 529-533.
- [51] BEHRENS, W.A., MADERE, R. A highly sensitive high-performance liquid chromatography method for the estimation of ascorbic and dehydroascorbic acid in tissues biological fluids and foods. *Analytical Biochemistry*. 2004, roč. 165, vyd. 1, s. 102-107.
- [52] GOKMEN, V., KAHRAMAN, N., DEMIN, N., ACAR, J. Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acid in fruits and vegetables. *Journal of chromatography A*. 2000, roč. 881, vyd. 1-2, s. 309-316.
- [53] ŠKROVÁNKOVÁ, S., KRAMÁŘOVÁ, D., ŠIMÁNKOVÁ, K., HOZA, I. Chromatografické stanovení kyseliny askorbové (vitamin C) v ovoci a zelenině. *Laboralim 2007*. 2007, vyd.1., s. 499. ISBN 978-80-227-2628-3.
- [54] BURINI, G. Development of a quantitative method for the analysis of total L-ascorbic acid in foods by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A*. 2007, roč. 1154, vyd. 1-2, s. 97-102.
- [55] SOMSUB, W., KONGKACHUICHA, R., SUNGPUAG, P., CHAROENSIRI, R. Effects of three conventional cooking methods on vitamin C, tannin, myoinositol, phosphates contents in selected Thai vegetables. *Journal of Food composition and Analysis*. 2008, roč. 21, vyd. 2, s. 187-197.

- [56] QUIROS, A.R.B., ARIAS, M.F., HENANDEZ, J.L., A screening method for the determination of ascorbic acid in fruit juices and soft drinks. *Food Chemistry*. 2009, roč. 116, vyd. 2, s. 509-512.
- [57] PLANCHON, V., LATEUR, M., DUPONT, P., LOGNAY, G., Ascorbic acid level of Belgian apple genetic resources. *Scientia Horticulturae*. 2004, roč. 100, vyd. 1-4, s. 51-61.
- [58] FONTANNAZ, P., KILINC, T., HEUDI, O., HPLC-UV determination of total vitamin C in a wide range of fortified food products. *Food Chemistry*. 2006, roč. 94, vyd. 4, s. 626-631.
- [59] ZHI, CH., BO, CH., SHOUZHUO, Y., High performance liquid chromatography / electrospray ionization mass spectrometry for simultaneous determination of taurin and 10 water-soluble vitamins in multivitamin tablets. *Analytica Chimica Acta*. 2006, roč. 569, vyd. 1-2, s. 169-175.
- [60] SILVA, O.F. Total ascorbic acid determination in fresh squeezed orange juice by gas chromatography. *Food control*. 2005, roč. 16, vyd. 1, s. 55-58.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HPLC	High performance liquid chromatography – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC	Liquid chromatography – kapalinová chromatografie
AA	Ascorbic acid – askorbová kyselina.
DHA	Dehydroascorbic acid – dehydroaskorbová kyselina.
MPA	Kyselina meta-fosforečná.
DCIP	2,6 – dichlorfenolindofenol
OPDA	<i>o</i> – fenylendiamin
DTT	dithiothreitol

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Struktura askorbové kyseliny	14
Obrázek 2. Biologicky aktivní formy vitamínu C	15
Obrázek 3. Blokové schéma kapalinového chromatografu	41
Obrázek 4. Kalibrační přímka pro stanovení askorbové kyseliny metodou HPLC	65

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Obsah vitamínu C v zelenině v jedlém podílu	28
Tabulka 2. Obsah vitamínu C v zelenině a v bramborách v syrovém stavu a po tepelném opracování (tepelně opracováno vařením v neslané vodě).....	29
Tabulka 3. Ztráty vitamínu C v zelenině po rozmrazení (doba skladování 6-12 měsíců při t - 18°C).....	31
Tabulka 4. Typy kolon v HPLC	45
Tabulka 5. Typy detektorů v kapalinové chromatografii	46
Tabulka 6. Průměrné plochy píků standardu kyseliny askorbové	65
Tabulka 7. Hmotnost vzorků brokolice před a po tepelné úpravě	66
Tabulka 8. Průměrné plochy píků brokolice před a po tepelné úpravě	67
Tabulka 9. Obsah kyseliny askorbové ve vzorku brokolice před a po tepelné úpravě	68
Tabulka 10. Hmotnost vzorků květáku před a po tepelné úpravě	69
Tabulka 11. Průměrné plochy píků květáku před a po tepelné úpravě.....	70
Tabulka 12. Obsah kyseliny askorbové ve vzorku květáku před a po tepelné úpravě	71
Tabulka 13. Hmotnost vzorků papriky bílé před a po tepelné úpravě	72
Tabulka 14. Průměrné plochy píků papriky bílé před a po tepelné úpravě	73
Tabulka 15. Obsah kyseliny askorbové ve vzorku papriky bílé před a po tepelné úpravě ..	74
Tabulka 16. Hmotnost vzorků papriky červené před a po tepelné úpravě	75
Tabulka 17. Průměrné plochy píků papriky červené před a po tepelné úpravě	76
Tabulka 18. Obsah kyseliny askorbové ve vzorku papriky červené před a po tepelné úpravě.....	77
Tabulka 19. Hmotnost vzorků růžičkové kapusty před a po tepelné úpravě	78
Tabulka 20. Průměrné plochy píků růžičkové kapusty před a po tepelné úpravě	79
Tabulka 21. Obsah kyseliny askorbové ve vzorku růžičkové kapusty před a po tepelné úpravě	80

Tabulka 22. Hmotnost vzorků listového špenátu před a po tepelné úpravě	81
Tabulka 23. Průměrné plochy píků listového špenátu před a po tepelné úpravě	82
Tabulka 24. Obsah kyseliny askorbové ve vzorku listového špenátu před a po tepelné úpravě	83
Tabulka 25. Ztráty vitamínu C (kys. askorbové) po uvaření	84
Tabulka 26. Ztráty vitamínu C (kys. askorbové) po vaření v páře	85
Tabulka 27. Ztráty vitamínu C (kys. askorbové) po dušení	86
Tabulka 28. Ztráty vitamínu C (kys. askorbové) po mikrovlnném ohřevu	87

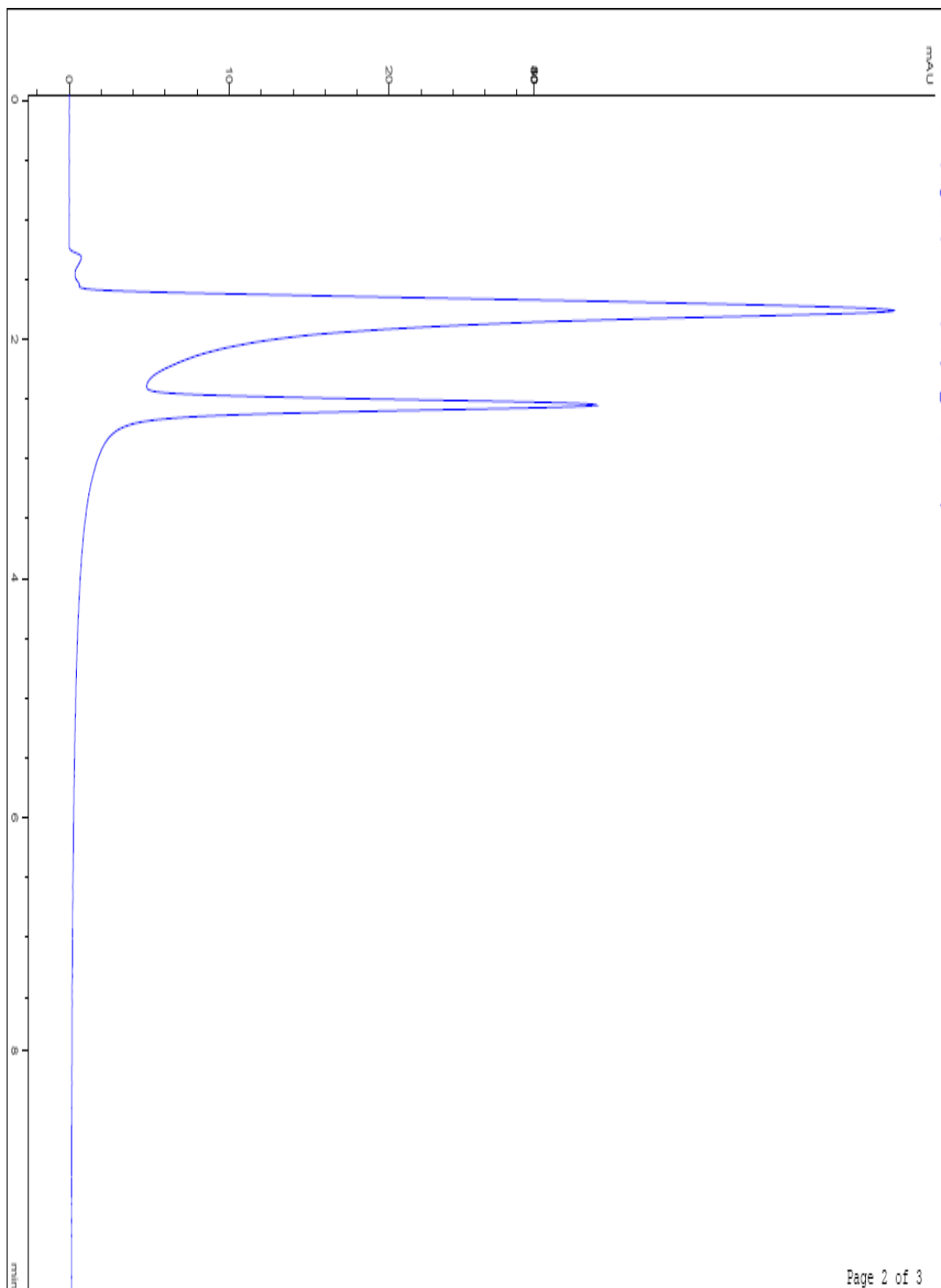
SEZNAM PŘÍLOH

- P I Chromatogram standardu kyseliny askorbové o koncentraci 2 mg/100 ml
- P II Chromatogram standardu kyseliny askorbové o koncentraci 3 mg/100 ml
- P III Chromatogram standardu kyseliny askorbové o koncentraci 4 mg/100 ml
- P IV Chromatogram standardu kyseliny askorbové o koncentraci 5 mg/100 ml
- P V Chromatogram standardu kyseliny askorbové o koncentraci 6 mg/100 ml
- P VI Chromatogram standardu kyseliny askorbové o koncentraci 7 mg/100 ml
- P VII Chromatogram standardu kyseliny askorbové o koncentraci 8 mg/100 ml
- P VIII Chromatogram vzorku čerstvé brokolice
- P IX Chromatogram vzorku brokolice tepelně zpracované vařením
- P X Chromatogram vzorku brokolice tepelně zpracované vařením v páře
- P XI Chromatogram vzorku brokolice tepelně zpracované dušením
- P XII Chromatogram vzorku brokolice tepelně zpracované mikrovlnným ohřevem
- P XIII Chromatogram vzorku čerstvého květáku
- P XIV Chromatogram vzorku květáku tepelně zpracovaného vařením
- P XV Chromatogram vzorku květáku tepelně zpracovaného vařením v páře
- P XVI Chromatogram vzorku květáku tepelně zpracovaného dušením
- P XVII Chromatogram vzorku květáku tepelně zpracovaného mikrovlnným ohřevem
- P XVIII Chromatogram vzorku čerstvé papriky bílé
- P XIX Chromatogram vzorku papriky bílé tepelně zpracované vařením
- P XX Chromatogram vzorku papriky bílé tepelně zpracované vařením v páře
- P XXI Chromatogram vzorku papriky bílé tepelně zpracované dušením
- P XXII Chromatogram vzorku papriky bílé tepelně zpracované mikrovlnným ohřevem
- P XXIII Chromatogram vzorku čerstvé papriky červené
- P XXIV Chromatogram vzorku papriky červené tepelně zpracované vařením

- P XXV Chromatogram vzorku papriky červené tepelně zpracované vařením v páře
- P XXVI Chromatogram vzorku papriky červené tepelně zpracované dušením (3 min)
- P XXVII Chromatogram vzorku papriky červené tepelně zpracované dušením (10 min)
- P XXVIII Chromatogram vzorku papriky červené tepelně zpracované mikrovlnným ohřevem
- P XXIX Chromatogram vzorku čerstvé růžičkové kapusty
- P XXX Chromatogram vzorku růžičkové kapusty tepelně zpracované vařením
- P XXXI Chromatogram vzorku růžičkové kapusty tepelně zpracované vařením v páře (5 min)
- P XXXII Chromatogram vzorku růžičkové kapusty tepelně zpracované vařením v páře (10 min)
- P XXXIII Chromatogram vzorku růžičkové kapusty tepelně zpracované dušením (5 min)
- P XXXIV Chromatogram vzorku růžičkové kapusty tepelně zpracované dušením (10 min)
- P XXXV Chromatogram vzorku růžičkové kapusty tepelně zpracované mikrovlnným ohřevem
- P XXXVI Chromatogram vzorku čerstvého listového špenátu
- P XXXVII Chromatogram vzorku listového špenátu tepelně zpracovaného vařením
- P XXXVIII Chromatogram vzorku listového špenátu tepelně zpracovaného vařením v páře
- P XXXIX Chromatogram vzorku listového špenátu tepelně zpracovaného dušením
- P XXXX Chromatogram vzorku listového špenátu tepelně zpracovaného mikrovlnným ohřevem

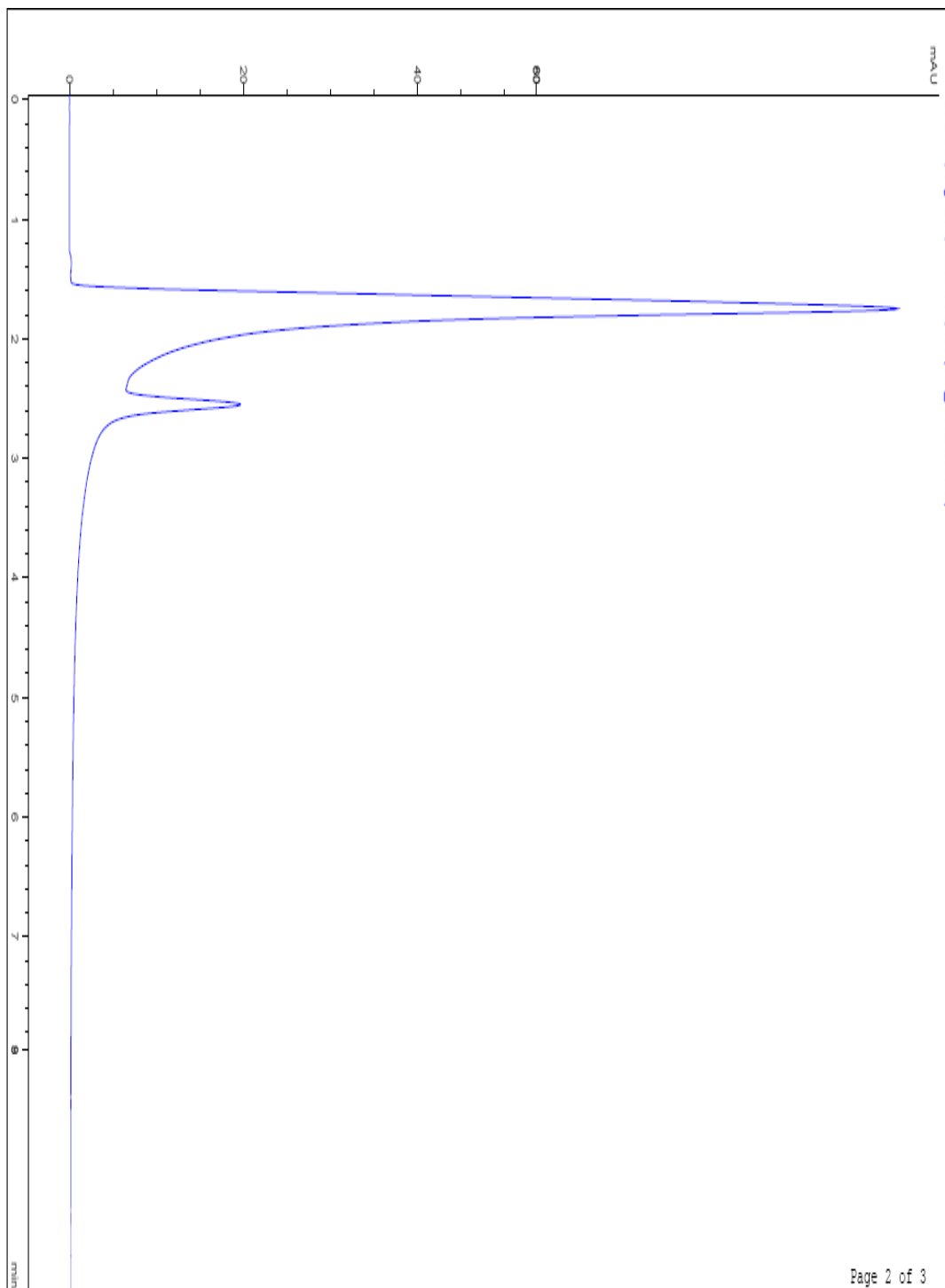
PŘÍLOHA P I: CHROMATOGRAM STANDARDU KYSELINY ASKORBOVÉ

(HPLC/UV), 2 mg/100 ml



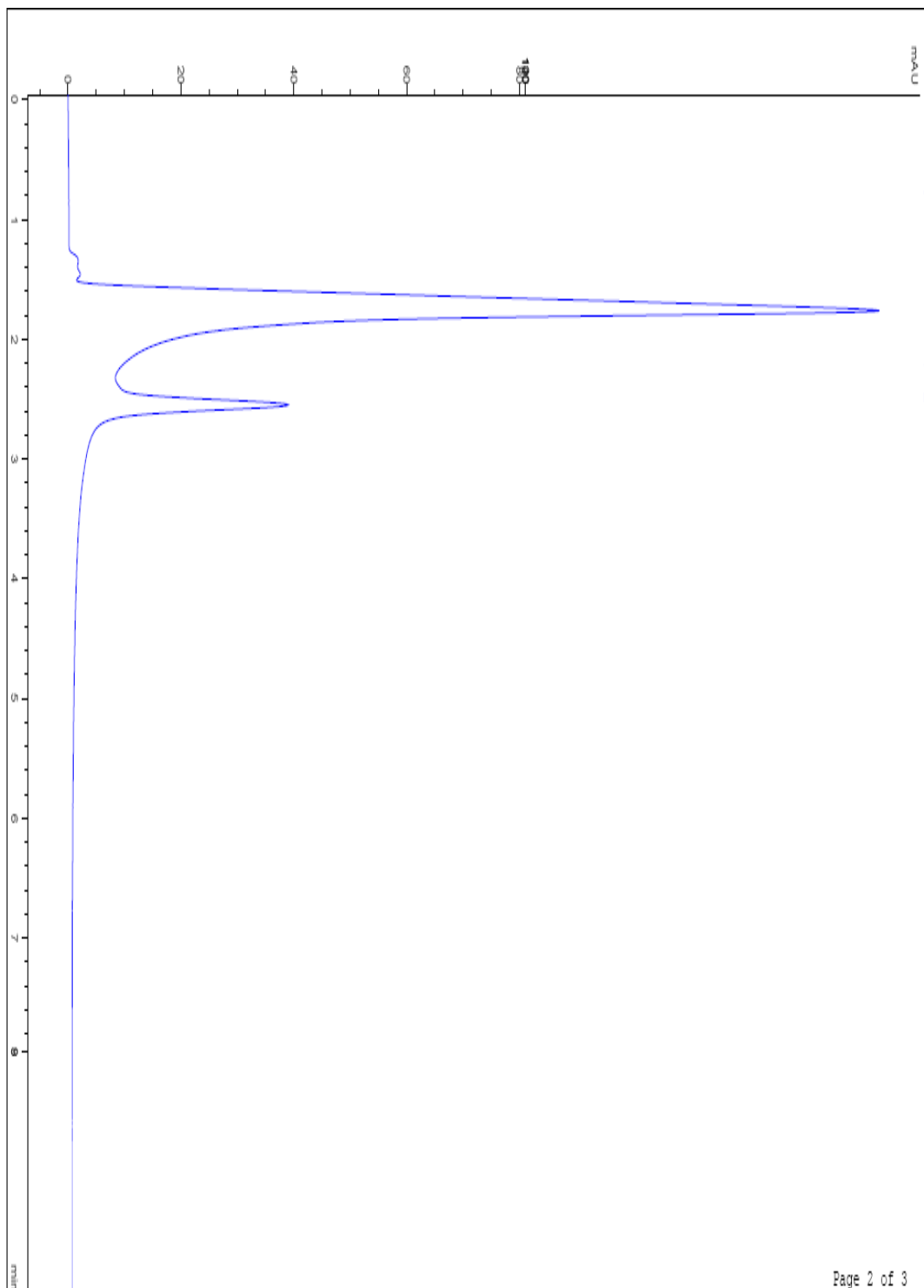
PŘÍLOHA P II: CHROMATOGRAM STANDARDU KYSELINY ASKORBOVÉ

(HPLC/UV), 3 mg/100 ml



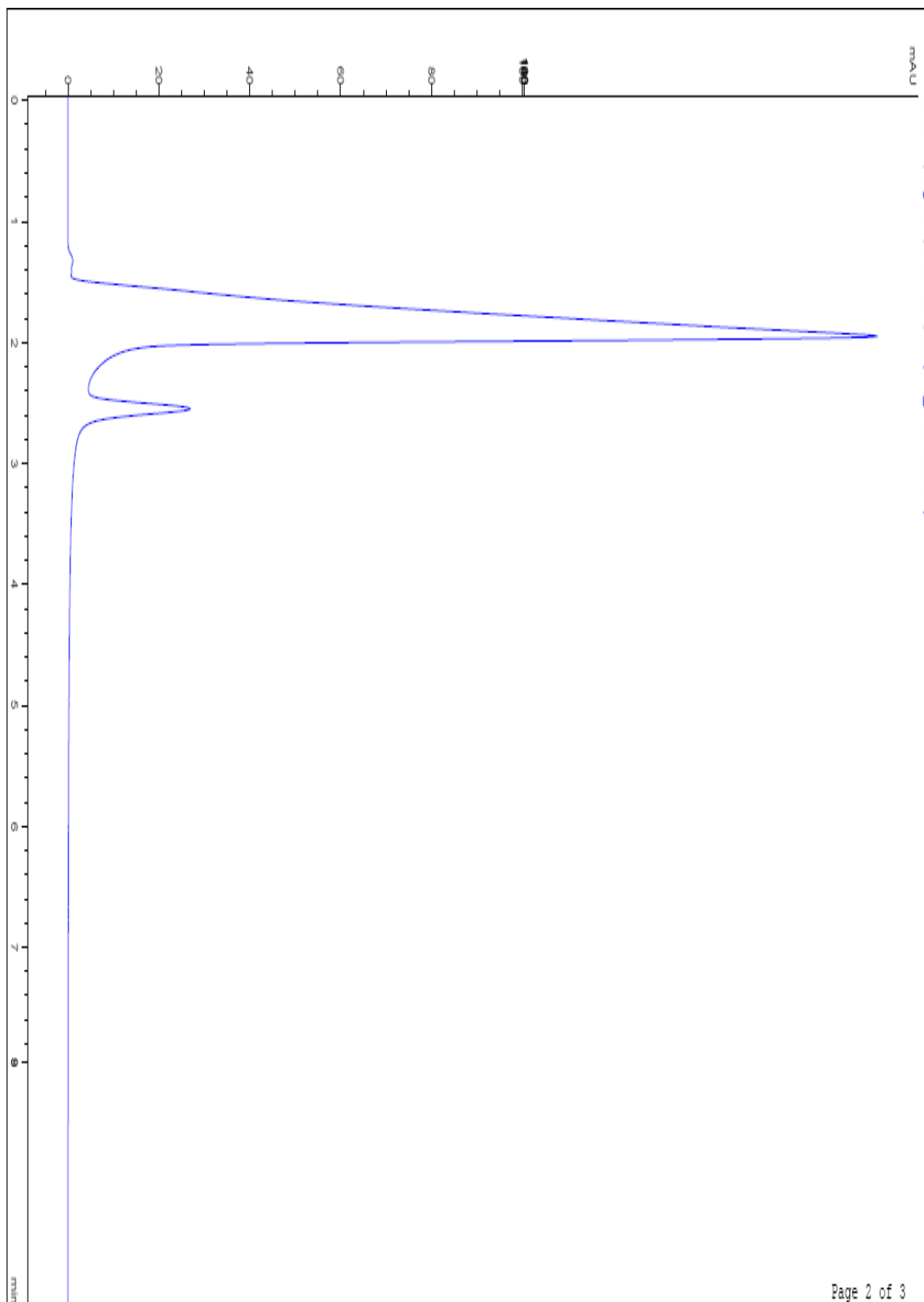
PŘÍLOHA P III: CHROMATOGRAM STANDARDU KYSELINY ASKORBOVÉ

(HPLC/UV), 4 mg/100 ml



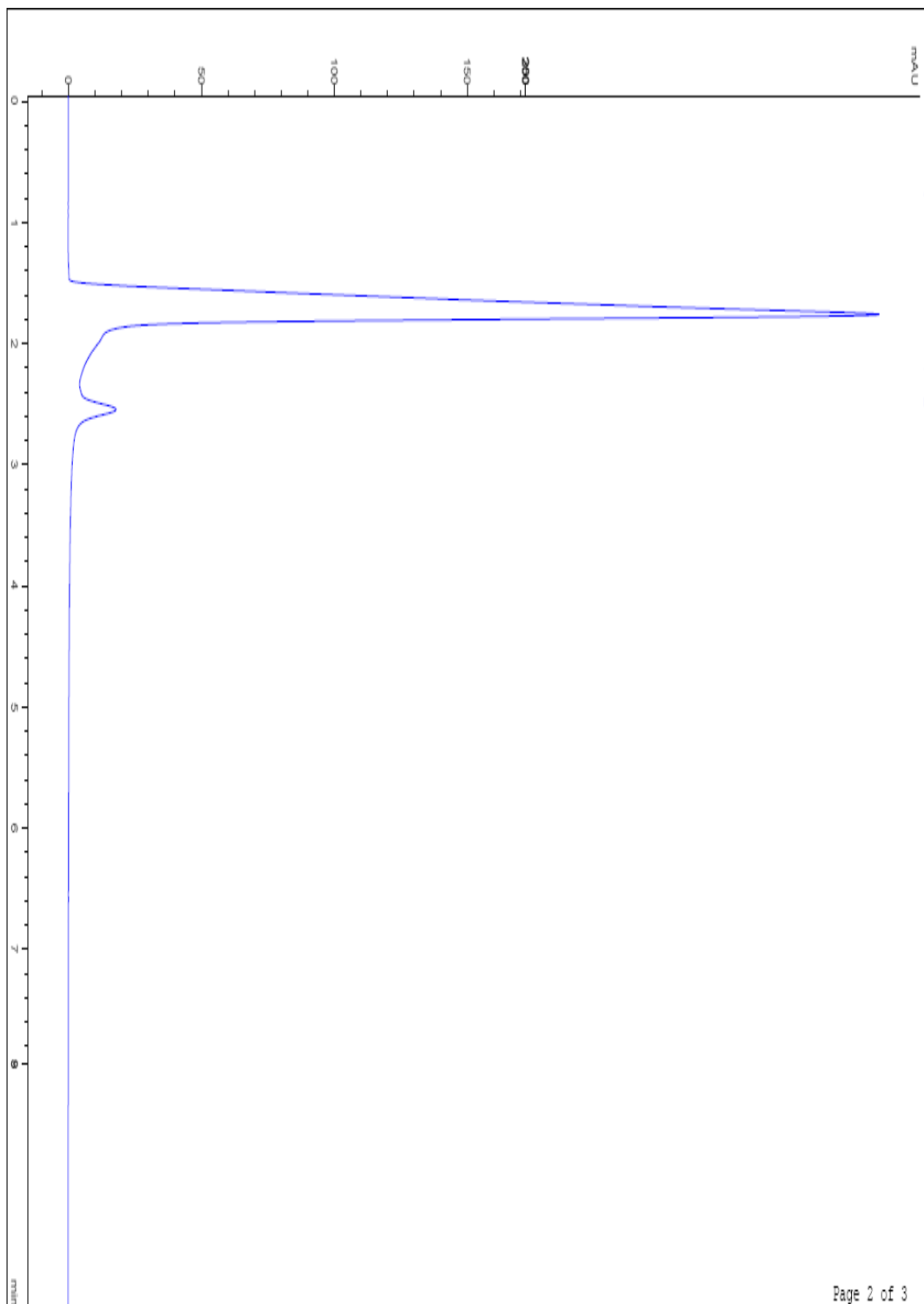
PŘÍLOHA P IV: CHROMATOGRAM STANDARDU KYSELINY ASKORBOVÉ

(HPLC/UV), 5 mg/100 ml



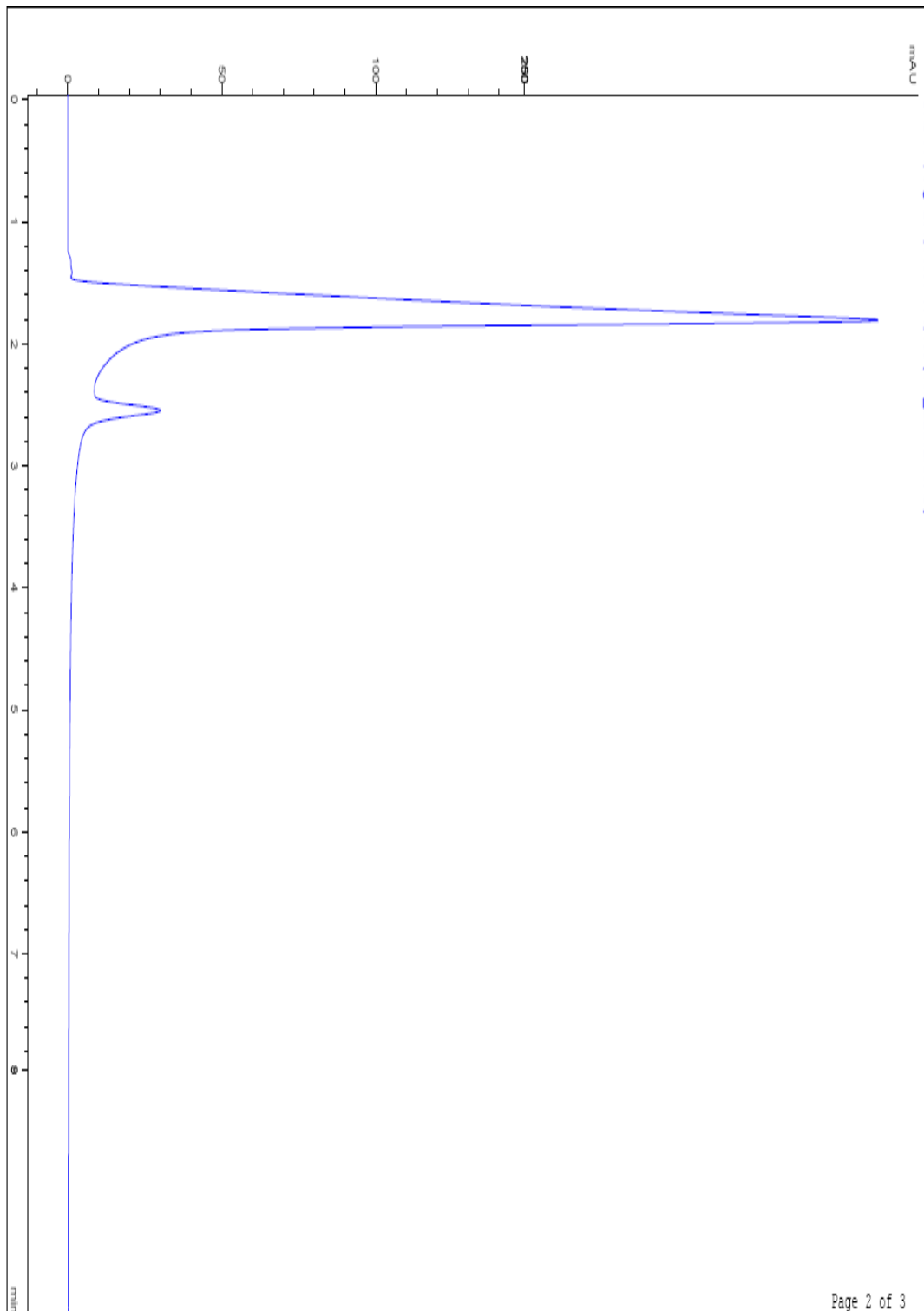
PŘÍLOHA P V: CHROMATOGRAM STANDARDU KYSELINY ASKORBOVÉ

(HPLC/UV), 6 mg/100 ml



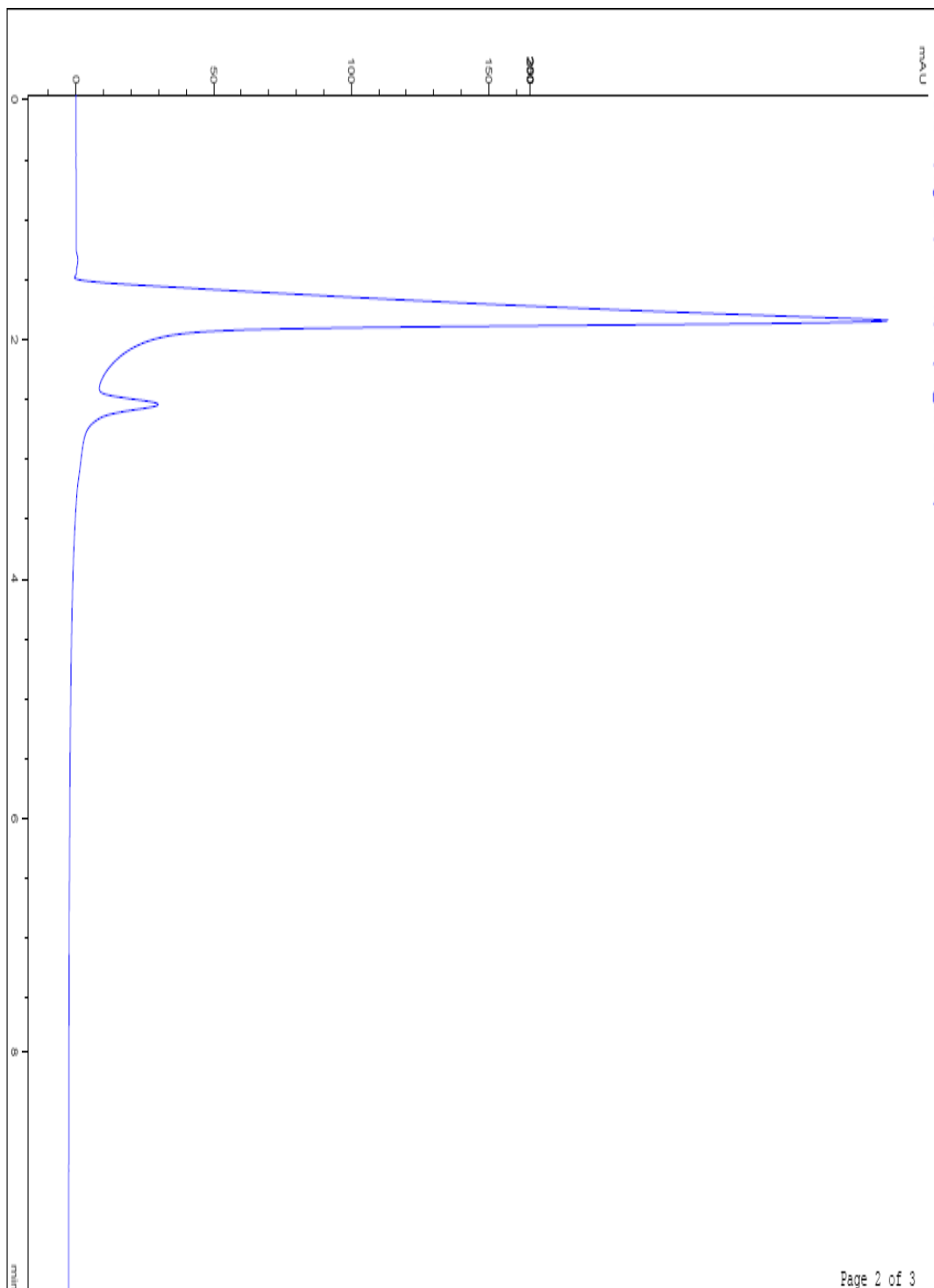
PŘÍLOHA P VI: CHROMATOGRAM STANDARDU KYSELINY ASKORBOVÉ

(HPLC/UV), 7 mg/100 ml



PŘÍLOHA P VII: CHROMATOGRAM STANDARDU KYSELINY ASKORBOVÉ

(HPLC/UV), 8 mg/100 ml



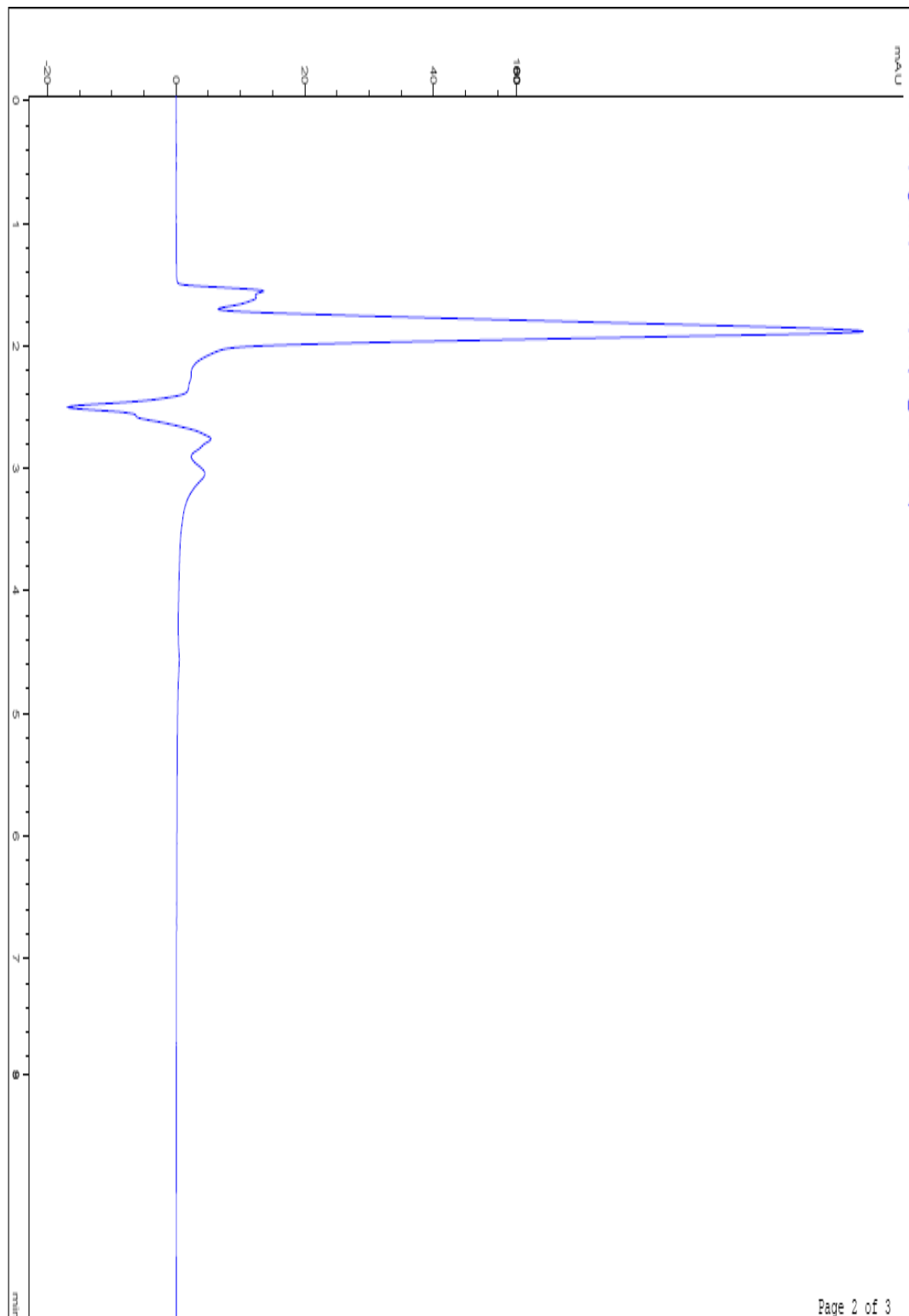
PŘÍLOHA P VIII: CHROMATOGRAM ČERSTVÉ BROKOLICE

(HPLC/UV), 5 g/50 ml methanolu



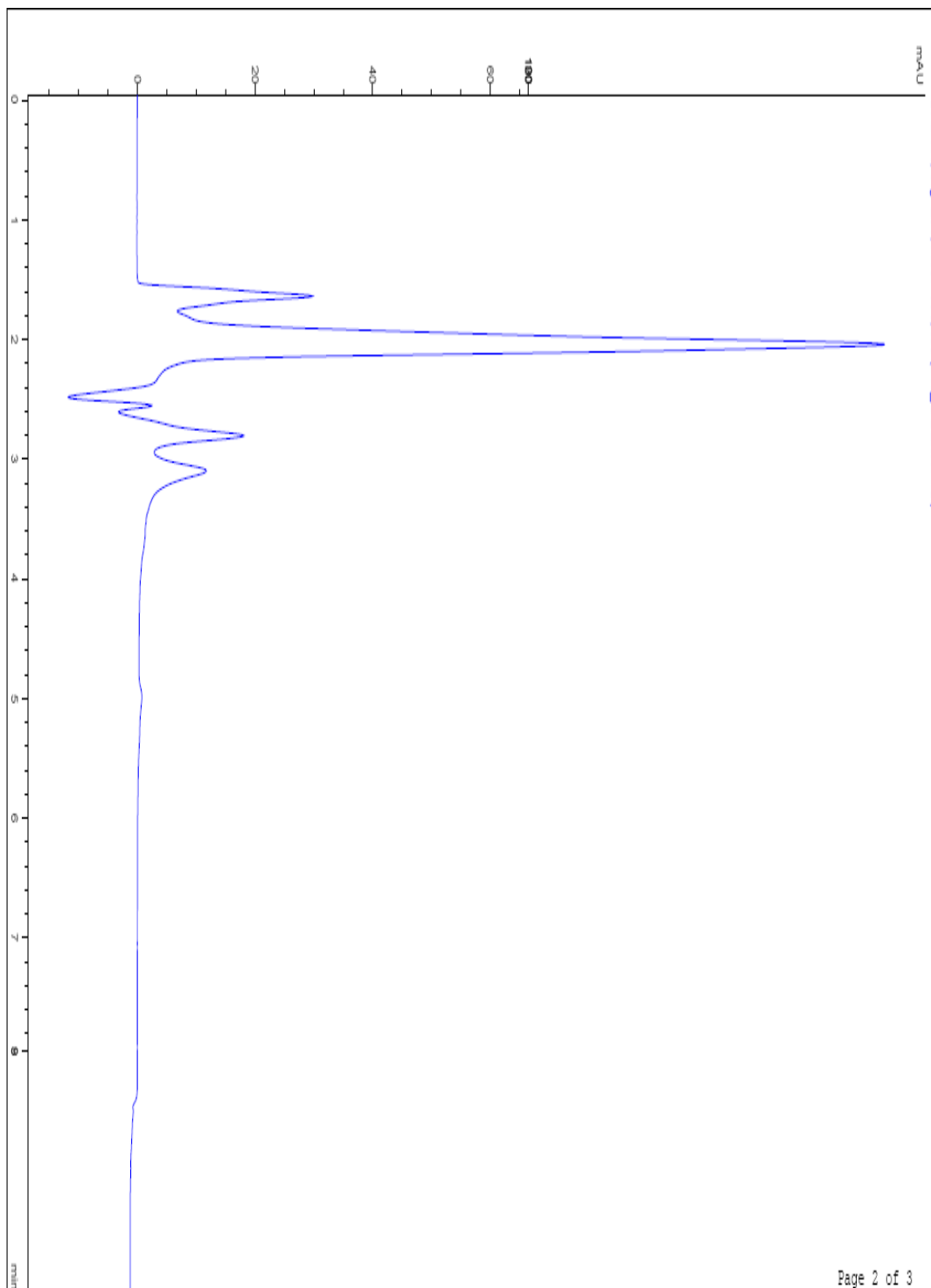
PŘÍLOHA P IX: CHROMATOGRAM BROKOLICE - VAŘENÁ

(HPLC/UV), 5 g/50 ml methanolu



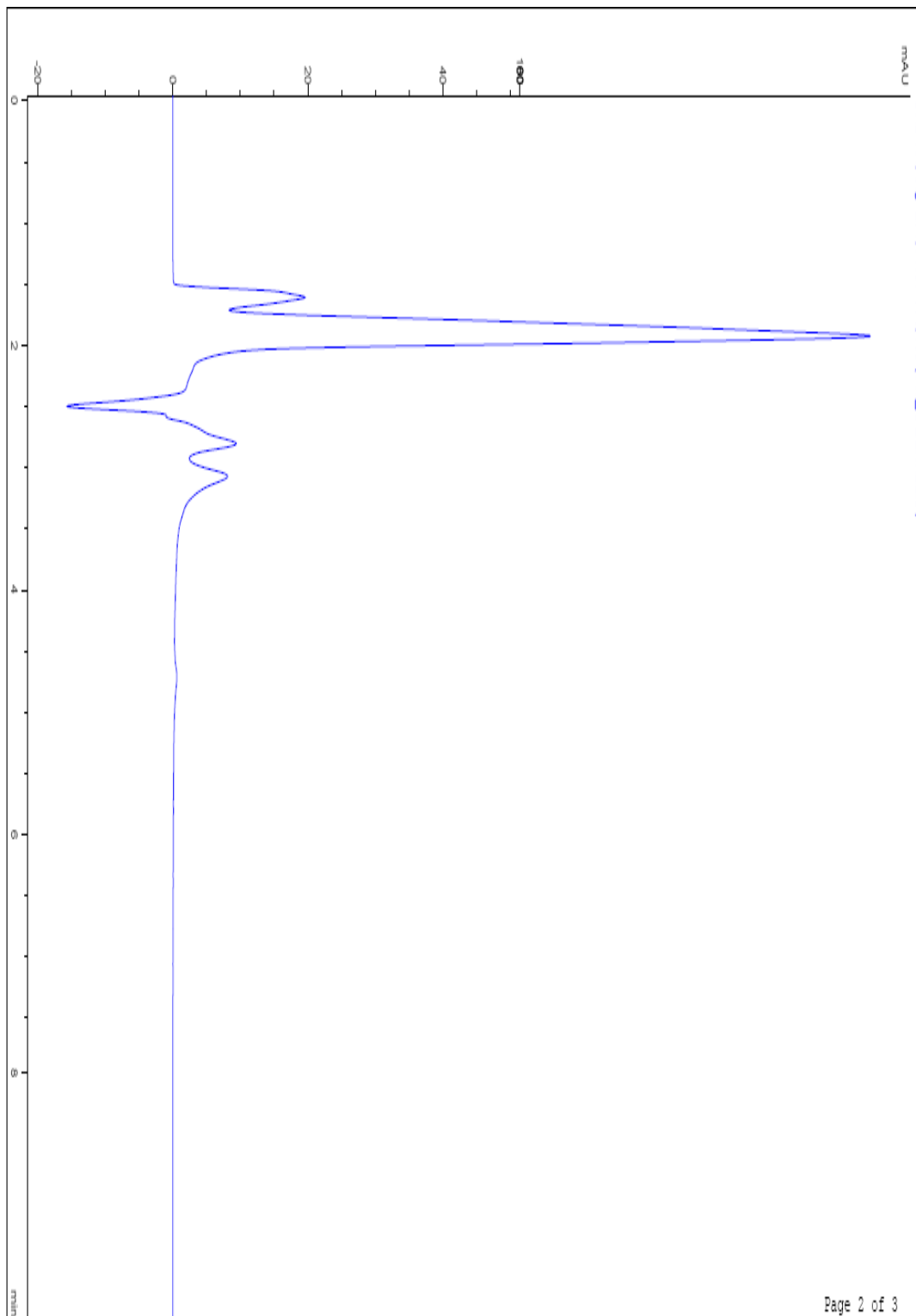
PŘÍLOHA P X: CHROMATOGRAM BROKOLICE – VAŘENÁ V PÁŘE

(HPLC/UV), 5 g/50 ml methanolu



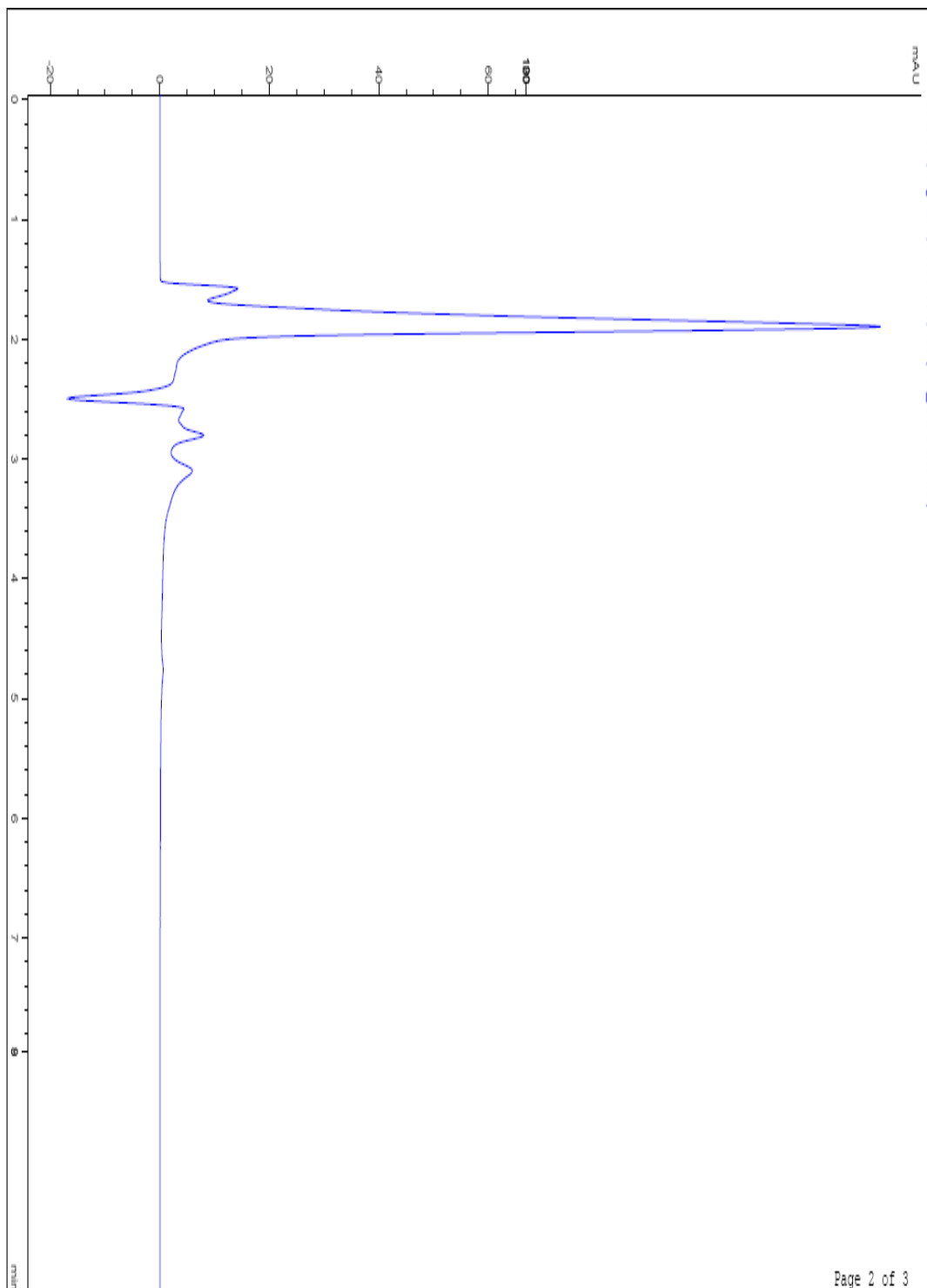
PŘÍLOHA P XI: CHROMATOGRAM BROKOLICE - DUŠENÁ

(HPLC/UV), 5 g/50 ml methanolu



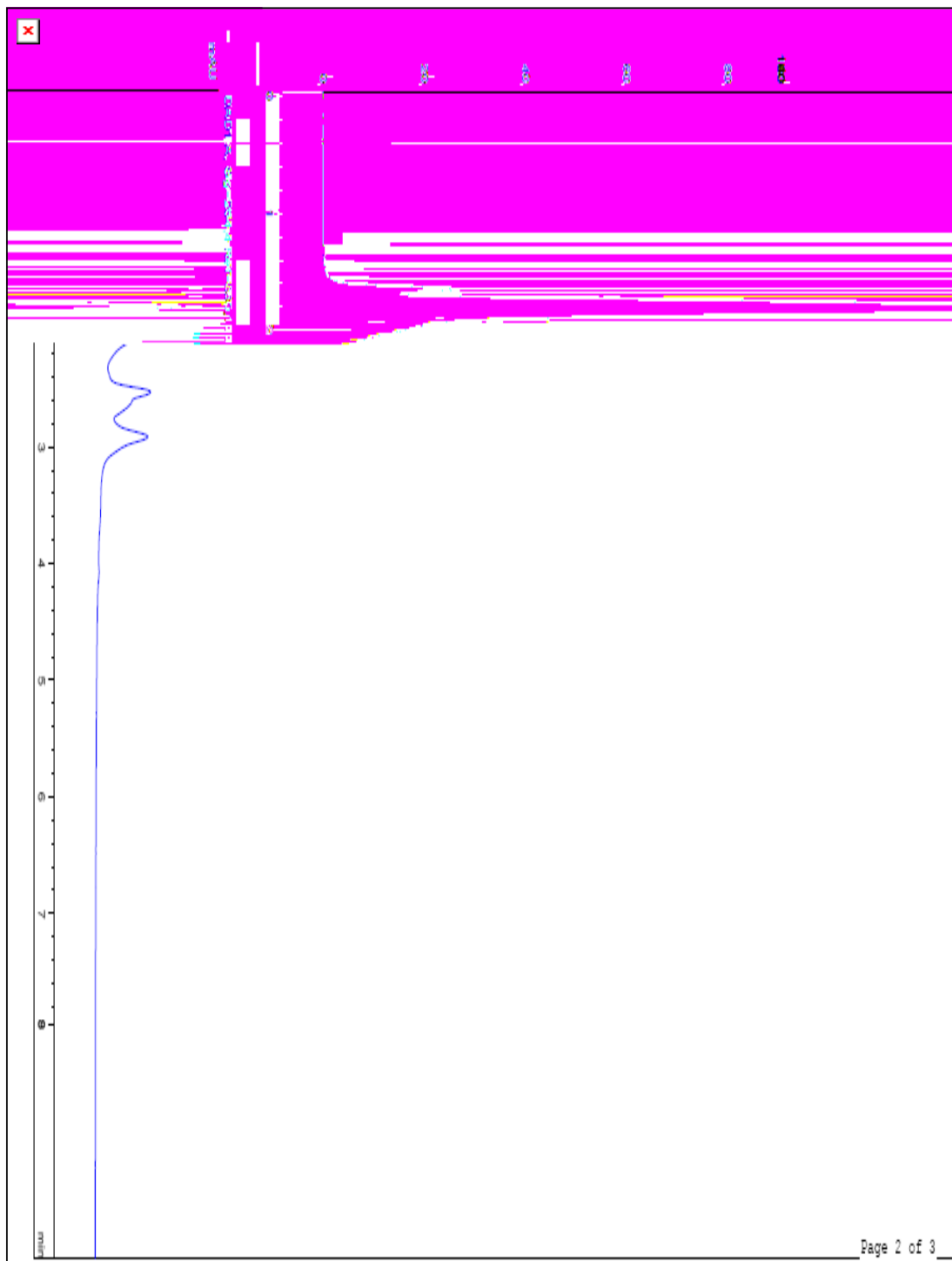
PŘÍLOHA P XII: CHROMATOGRAM BROKOLICE – MIKROVLNNÝ OHŘEV

(HPLC/UV), 5 g/50 ml methanolu



PŘÍLOHA P XIII: CHROMATOGRAM ČERSTVÉHO KVĚTÁKU

(HPLC/UV), 7,5 g/25 ml methanolu



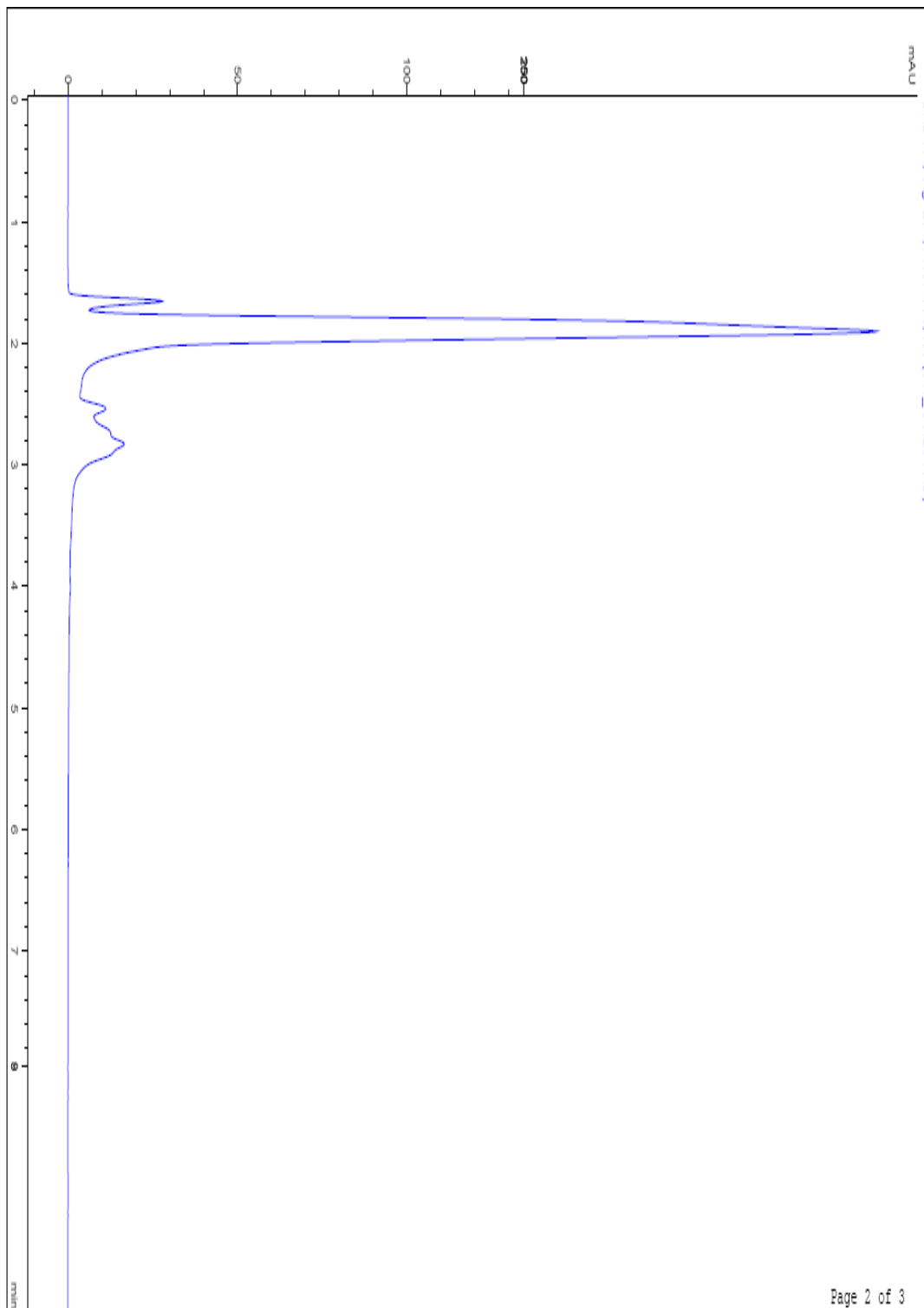
PŘÍLOHA P XIV: CHROMATOGRAM KVĚTÁKU - VAŘENÝ

(HPLC/UV), 7,5 g/25 ml methanolu



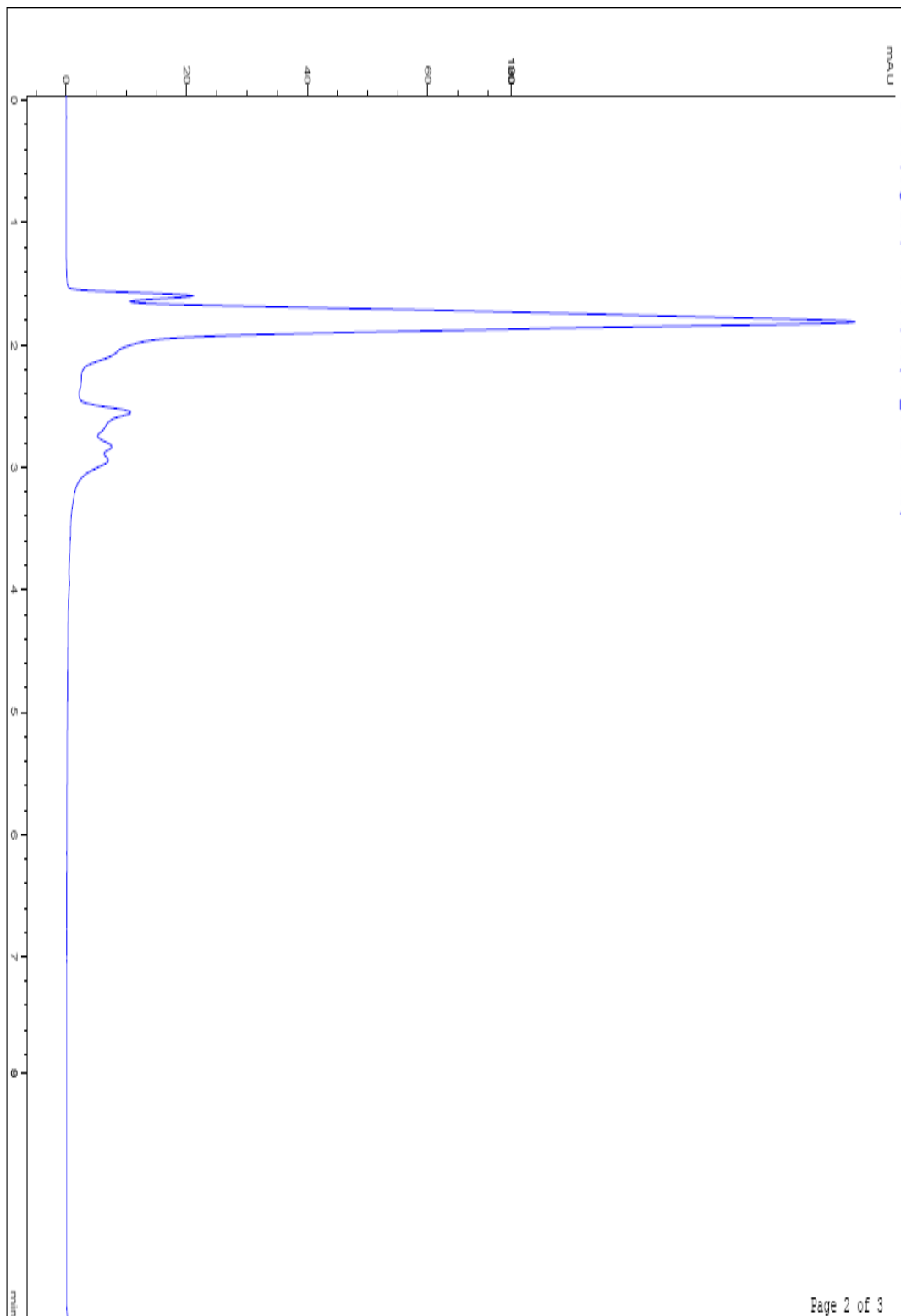
PŘÍLOHA P XV: CHROMATOGRAM KVĚTÁKU – VAŘENÝ V PÁŘE

(HPLC/UV), 7,5 g/25 ml methanolu



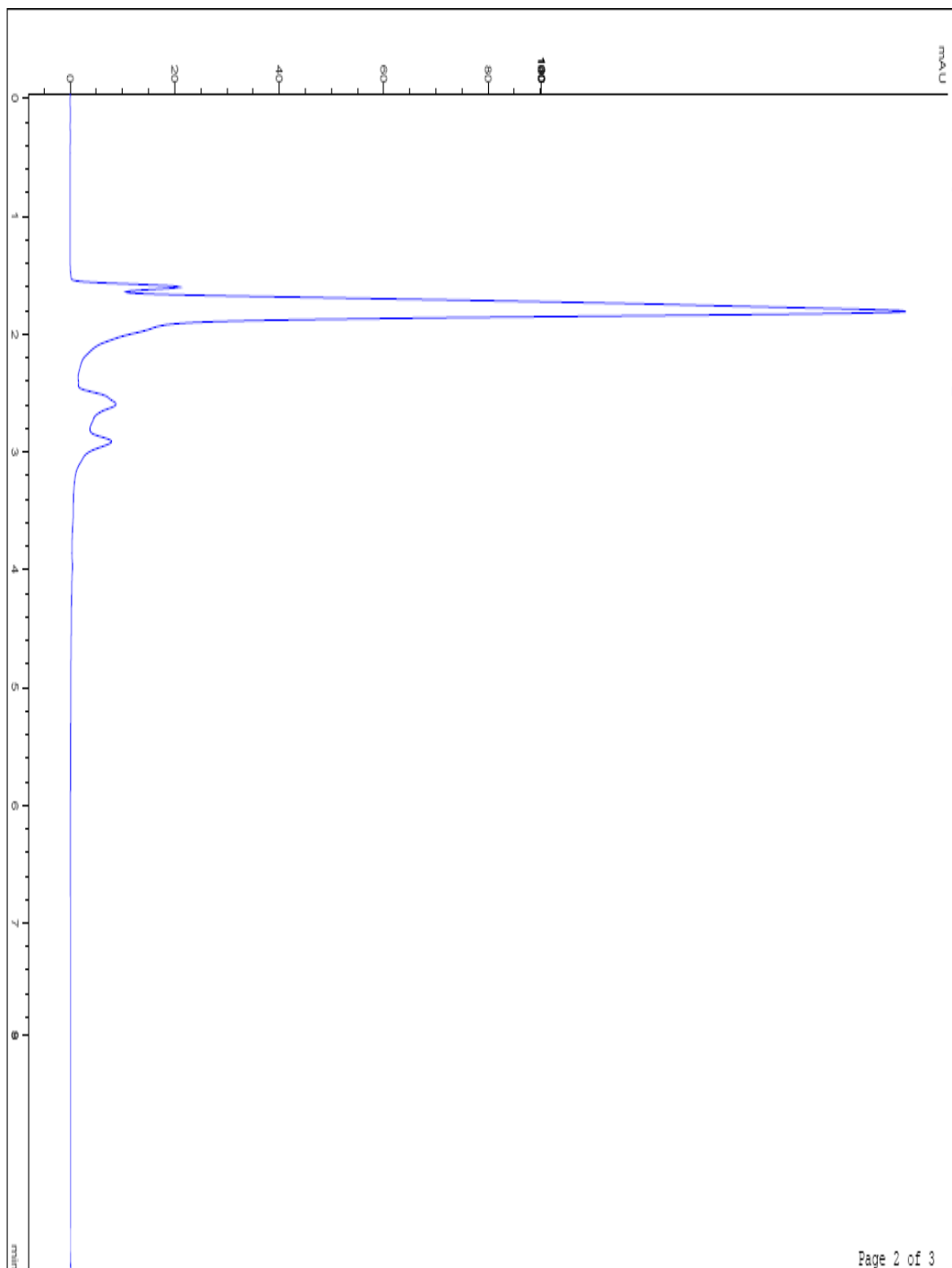
PŘÍLOHA P XVI: CHROMATOGRAM KVĚTÁKU - DUŠENÝ

(HPLC/UV), 7,5 g/25 ml methanolu



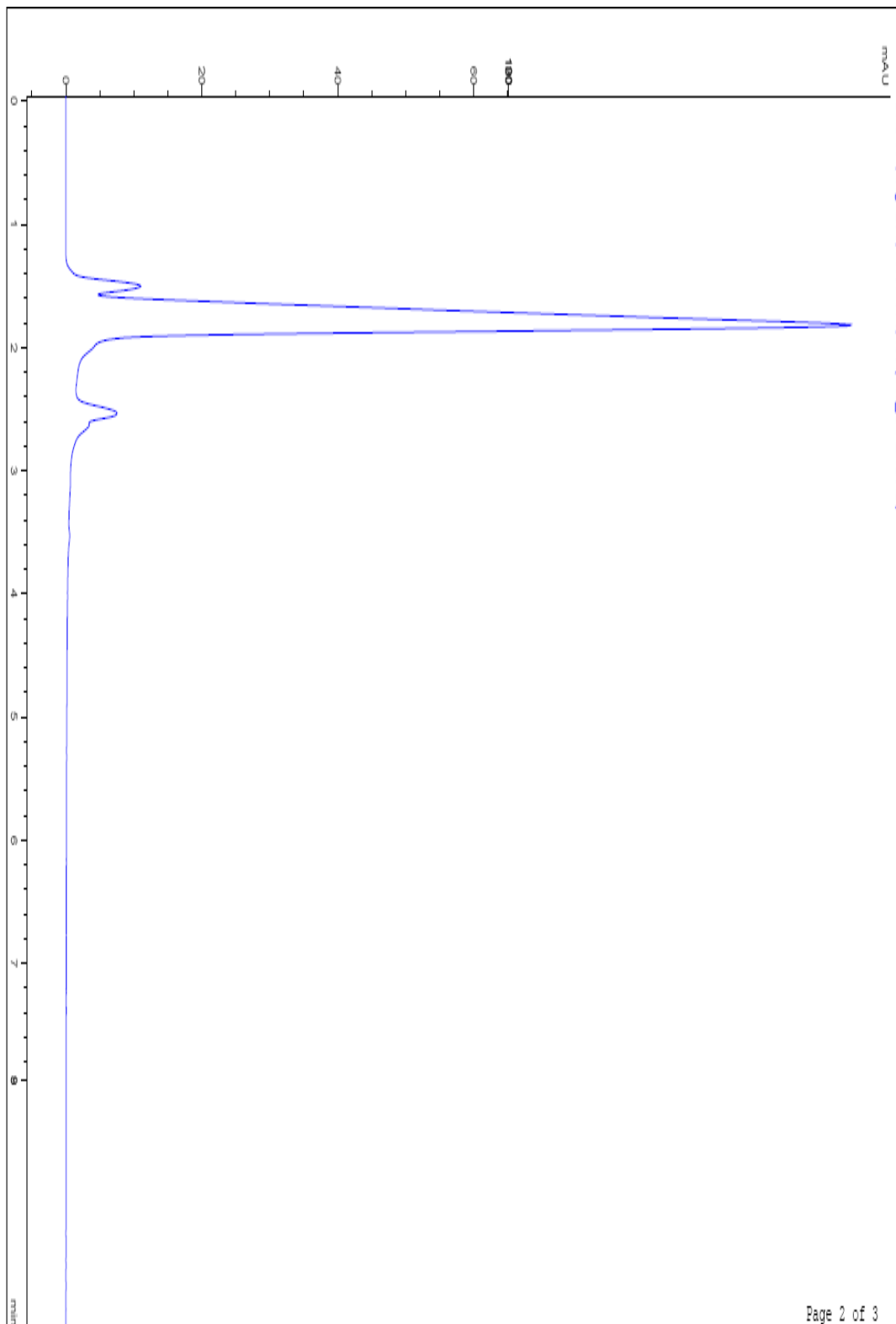
PŘÍLOHA P XVII: CHROMATOGRAM KVĚTÁKU – MIKROVLNNÝ OHŘEV

(HPLC/UV), 7,5 g/25 ml methanolu



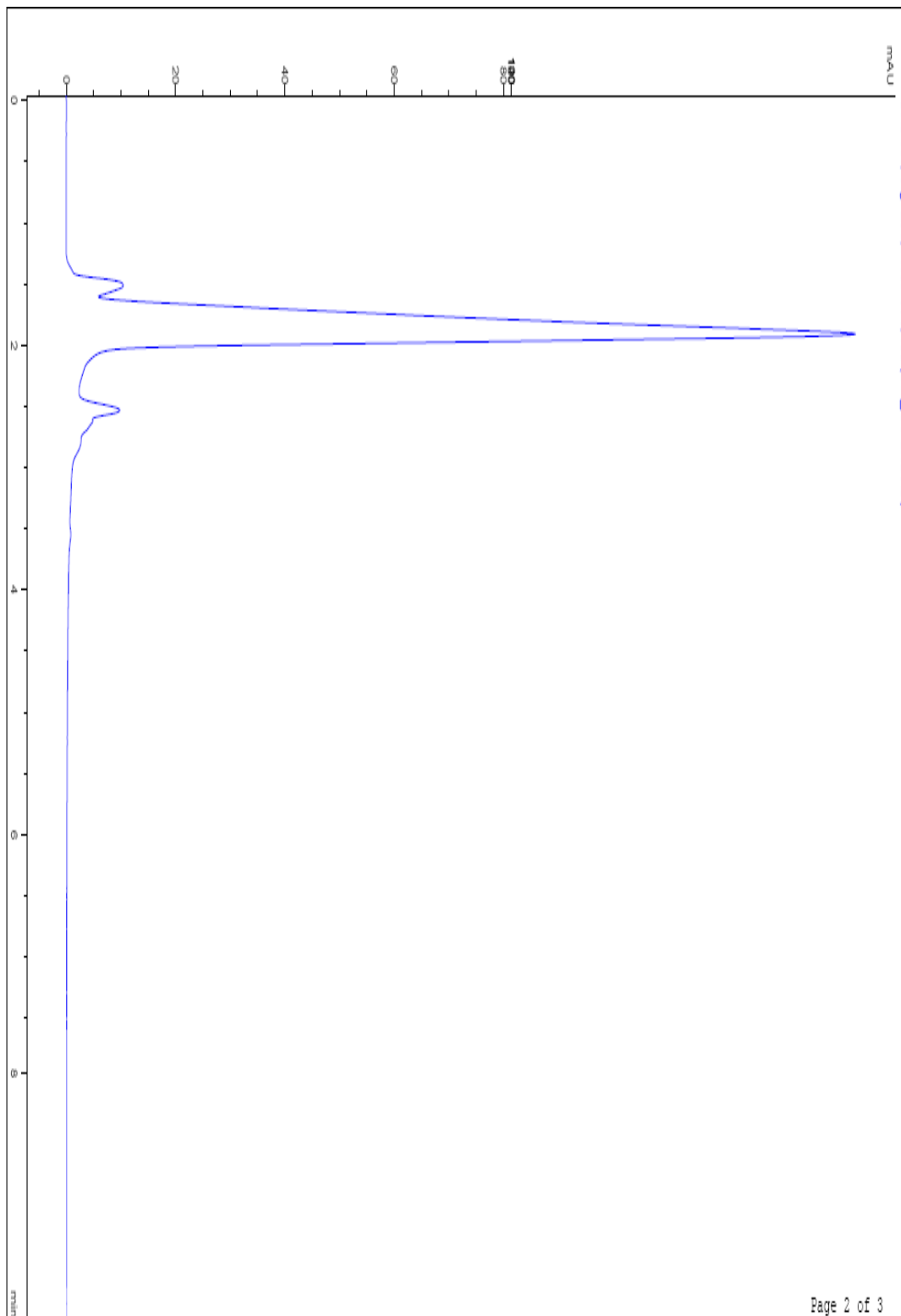
PŘÍLOHA P XVIII: CHROMATOGRAM ČERSTVÉ PAPRIKY BÍLÉ

(HPLC/UV), 7,5 g/25 ml methanolu



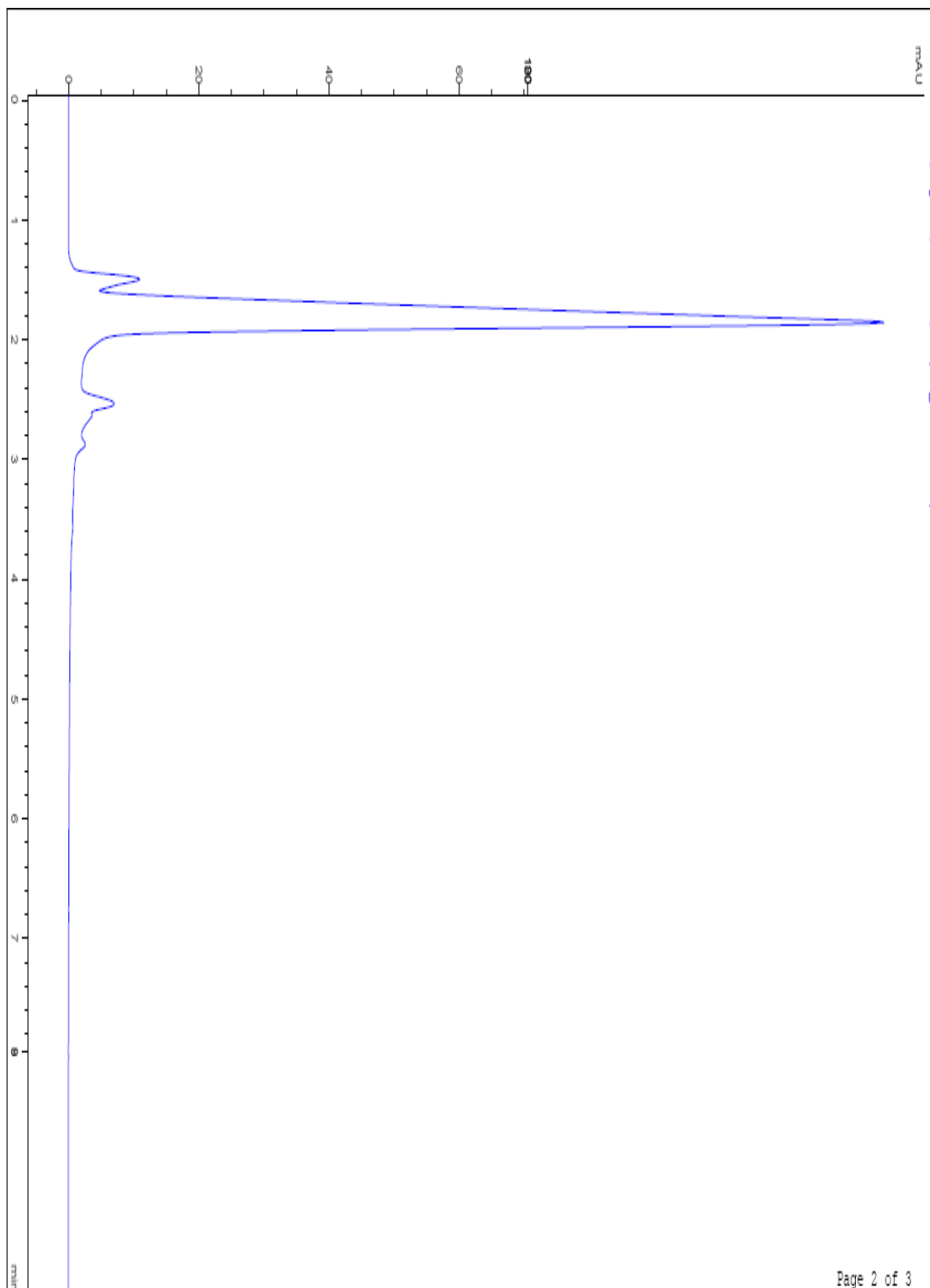
PŘÍLOHA P XIX: CHROMATOGRAM PAPRIKY BÍLÉ - VAŘENÉ

(HPLC/UV), 7,5 g/25 ml methanolu



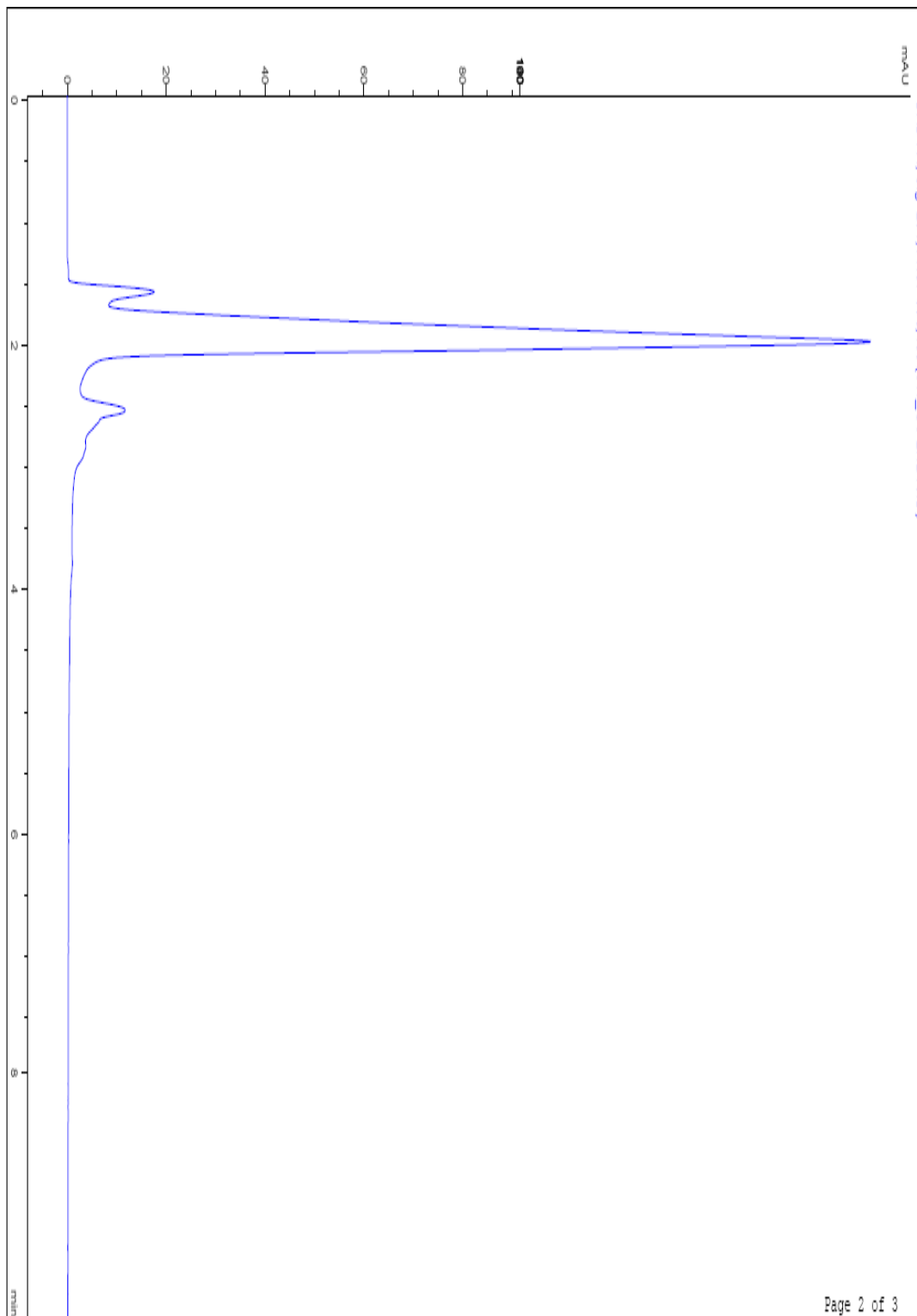
PŘÍLOHA P XX: CHROMATOGRAM PAPRIKY BÍLÉ – VAŘENÉ V PÁŘE

(HPLC/UV), 7,5 g/25 ml methanolu



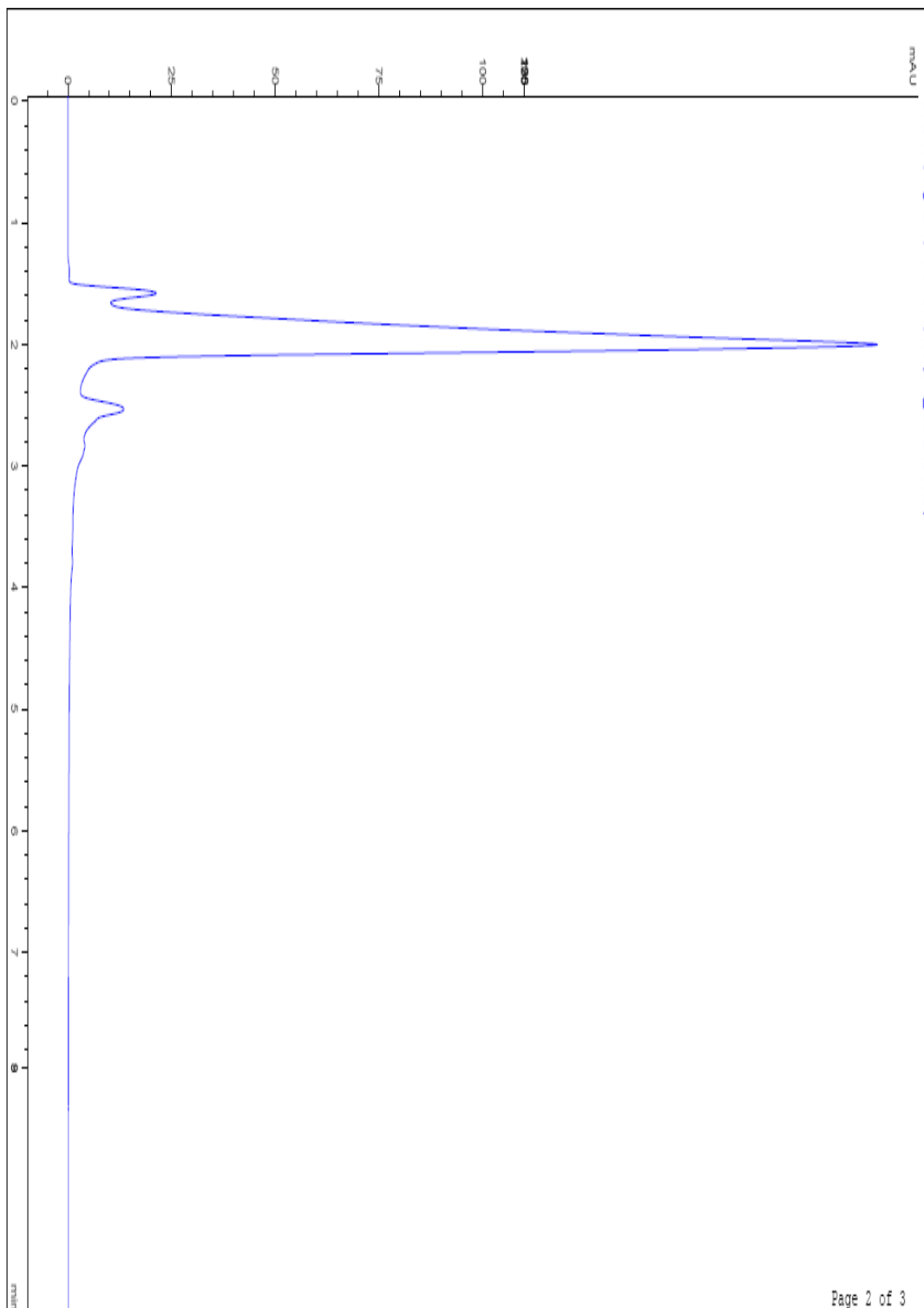
PŘÍLOHA P XXI: CHROMATOGRAM PAPRIKY BÍLÉ - DUŠENÉ

(HPLC/UV), 7,5 g/25 ml methanolu



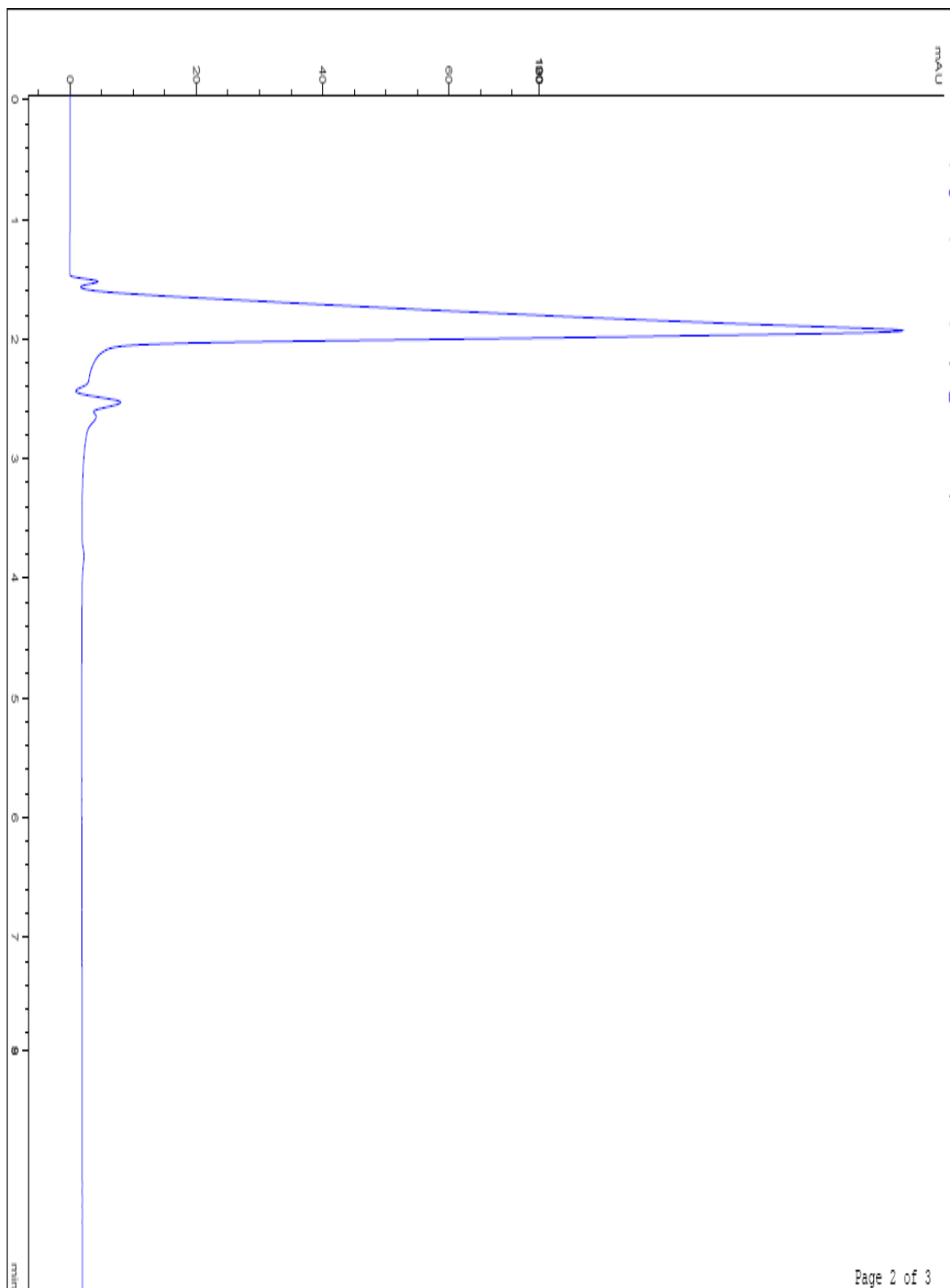
PŘÍLOHA P XXII: CHROMATOGRAM PAPRIKY BÍLÉ – MIKROVLNNÝ OHŘEV

(HPLC/UV), 7,5 g/25 ml methanolu



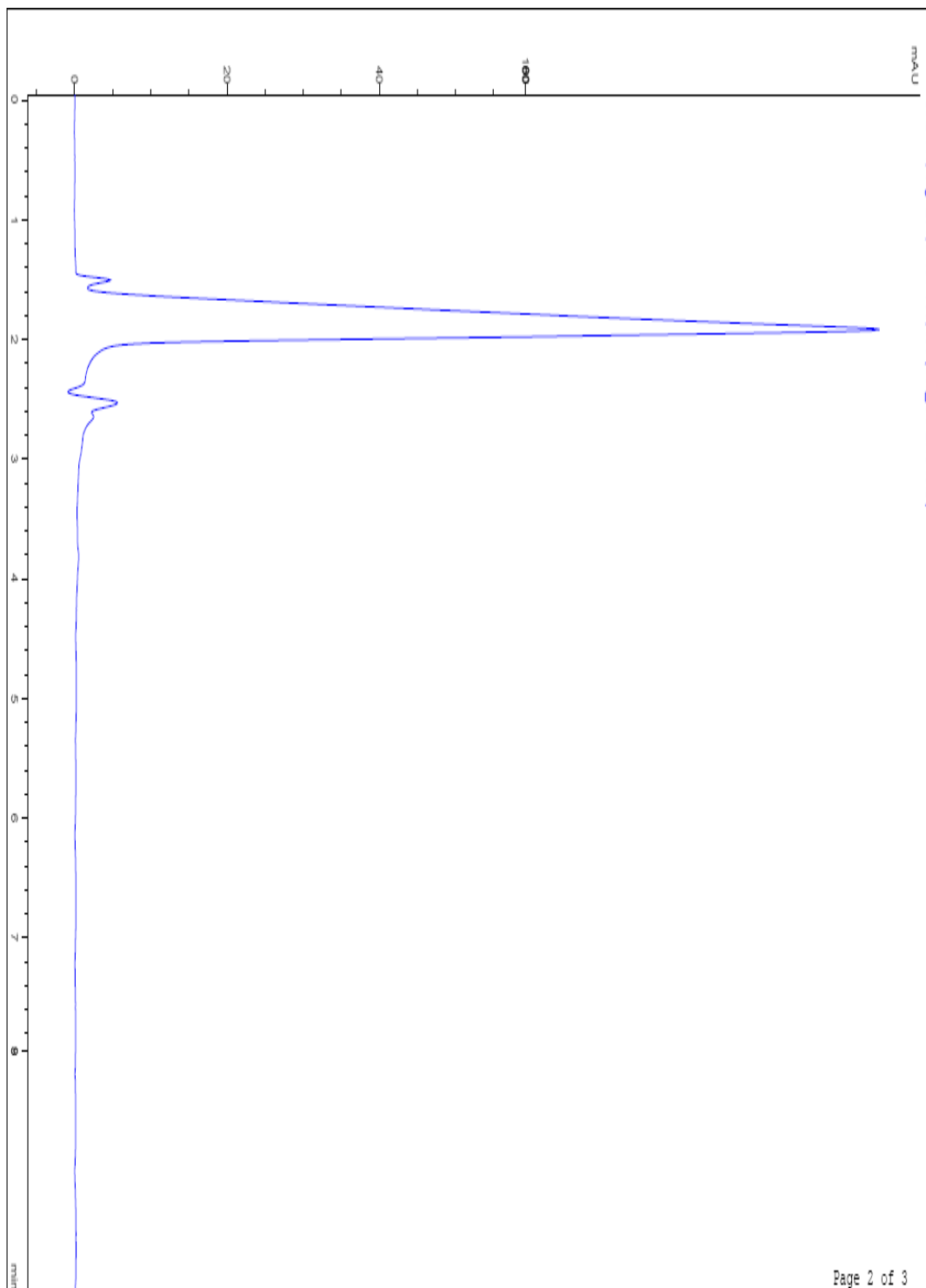
PŘÍLOHA P XXIII: CHROMATOGRAM ČERSTVÉ PAPRIKY ČERVENÉ

(HPLC/UV), 5 g/50 ml methanolu



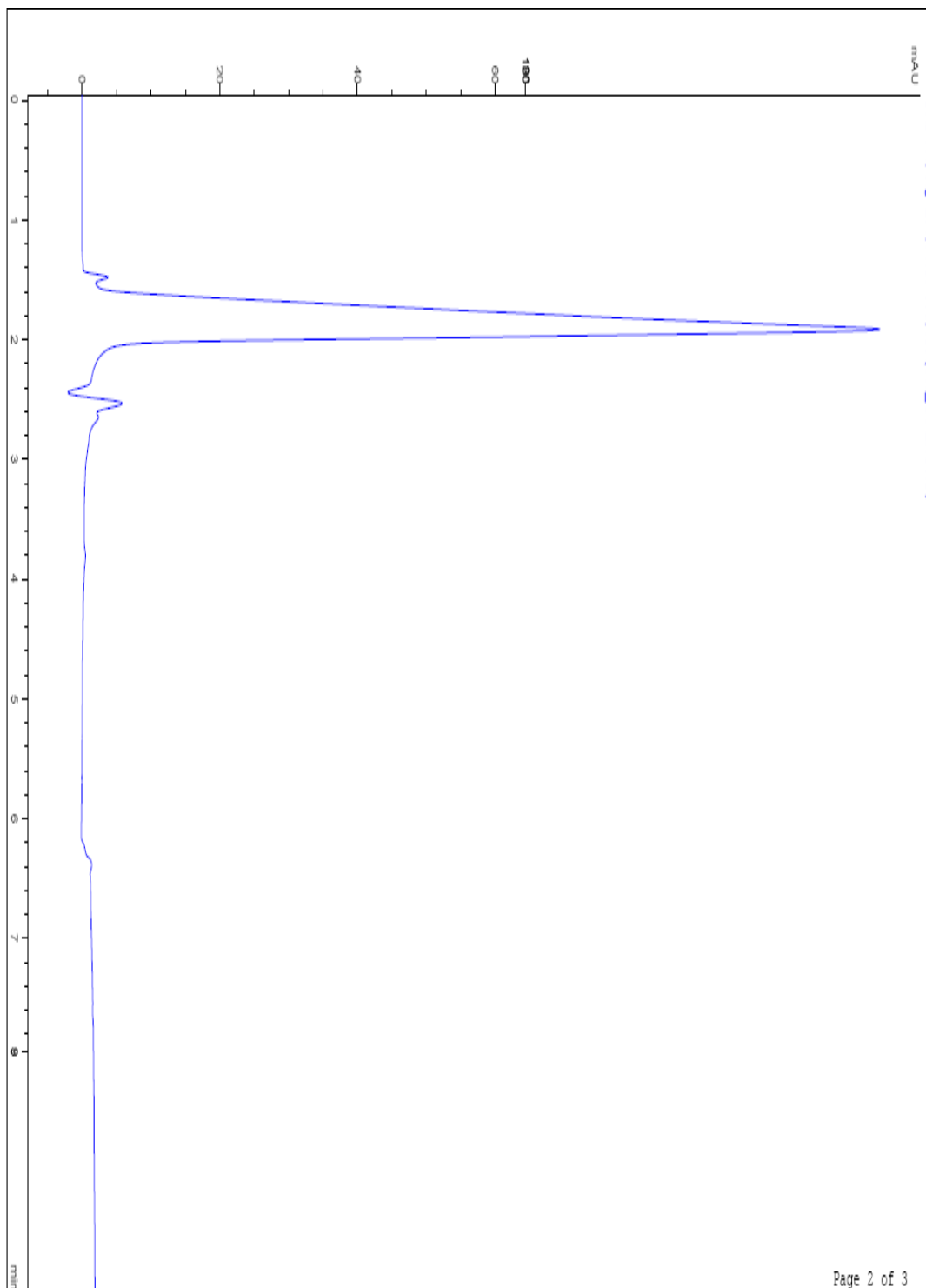
PŘÍLOHA P XXIV: CHROMATOGRAM PAPRIKY ČERVENÉ - VAŘENÉ

(HPLC/UV), 5 g/50 ml methanolu



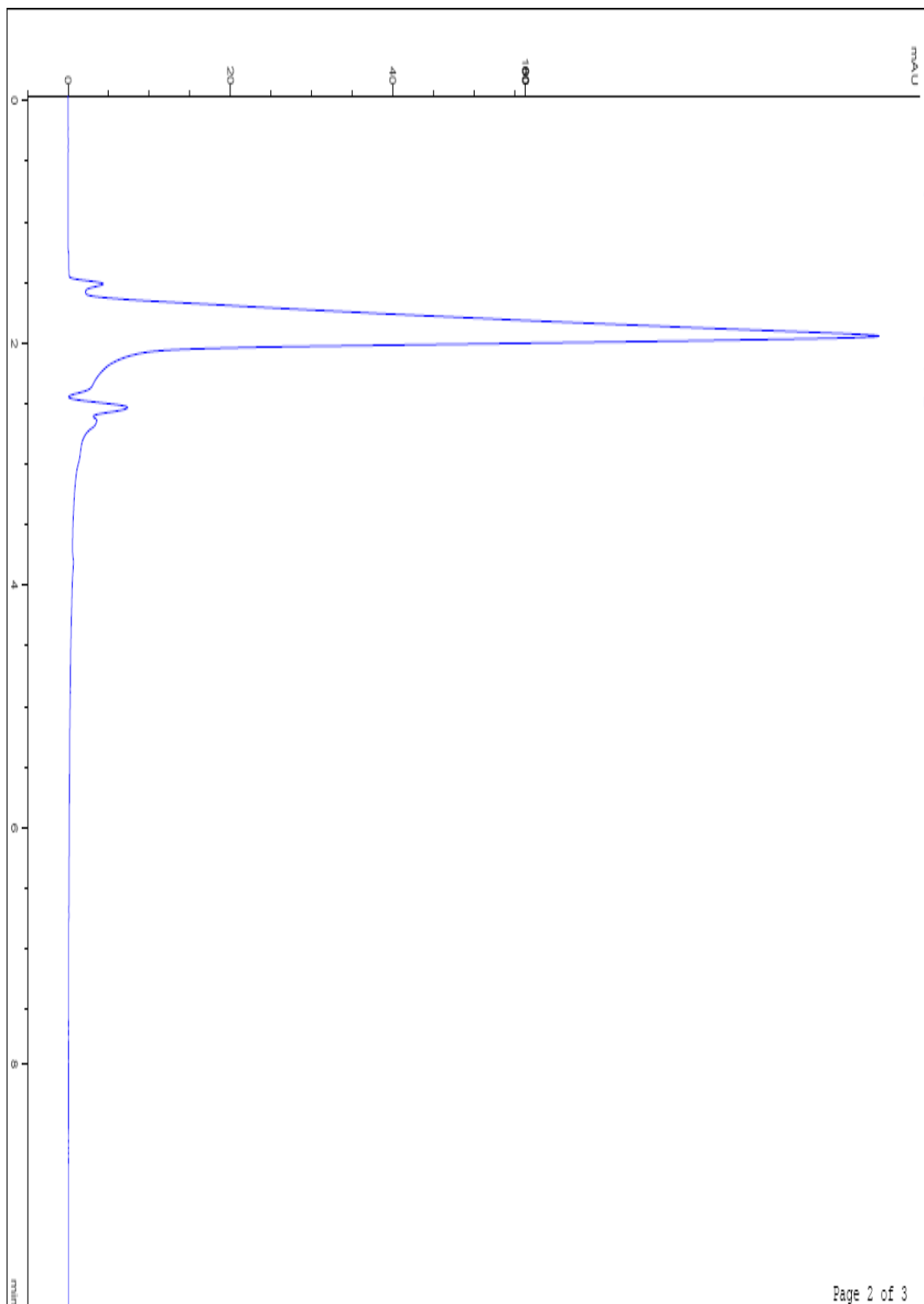
PŘÍLOHA P XXV: CHROMATOGRAM PAPRIKY ČERVENÉ – VAŘENÉ V PÁŘĚ

(HPLC/UV), 5 g/50 ml methanolu



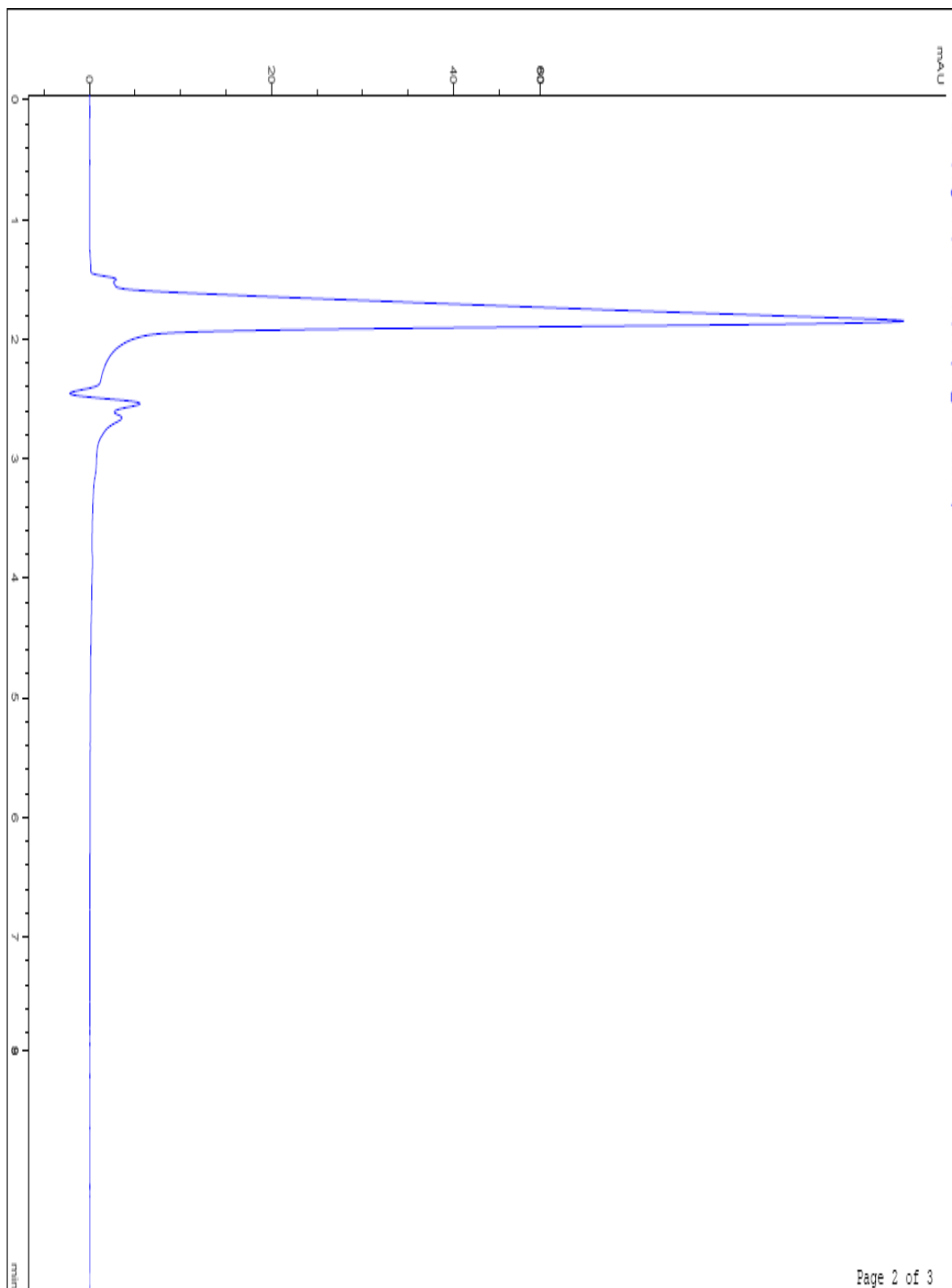
PŘÍLOHA P XXVI: CHROMATOGRAM PAPRIKY ČERVENÉ – DUŠENÉ (3 MIN)

(HPLC/UV), 5 g/50 ml methanolu



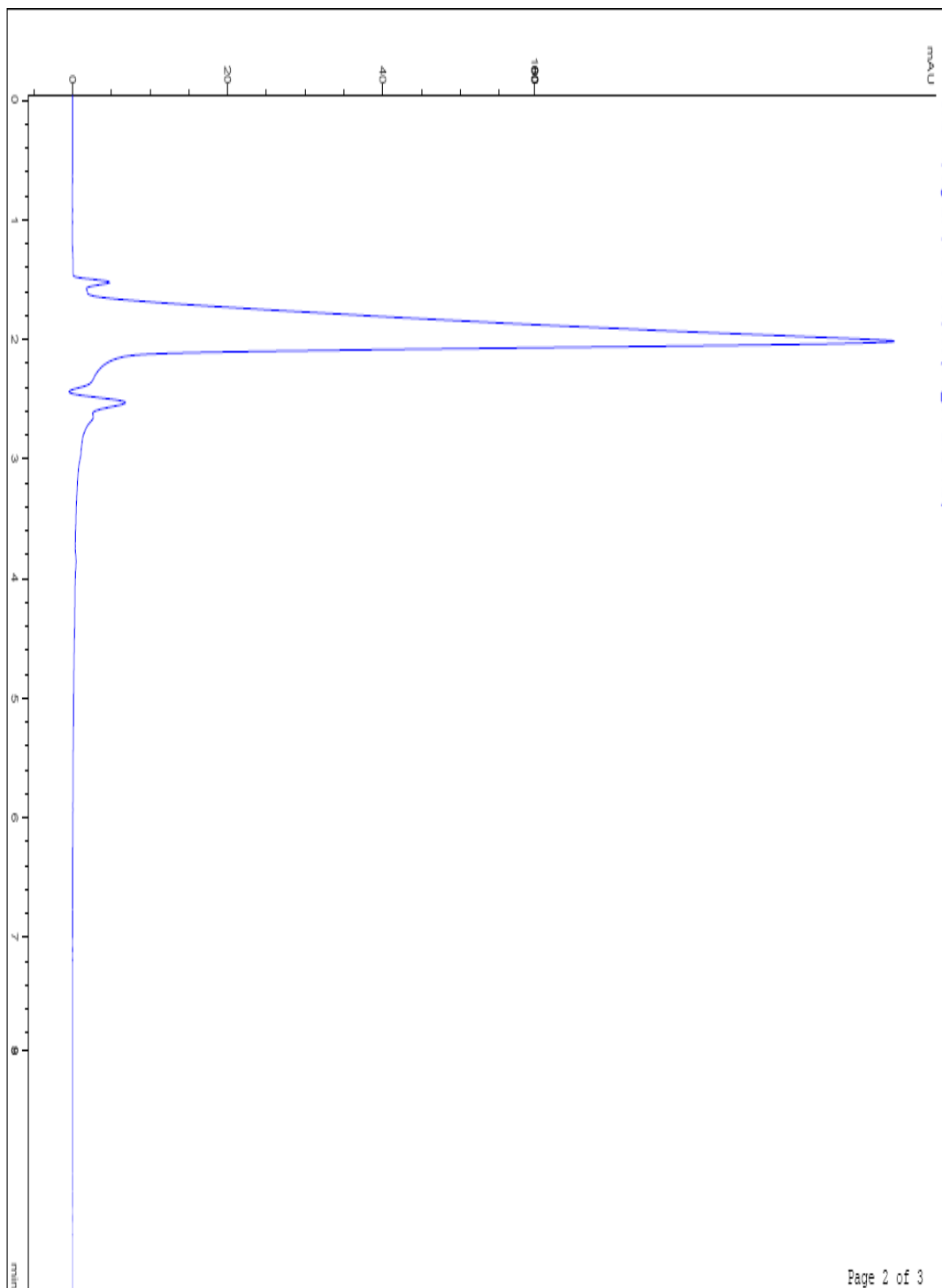
PŘÍLOHA P XXVII: CHROMATOGRAM PAPRIKY ČERVENÉ – DUŠENÉ (10 MIN)

(HPLC/UV), 5 g/50 ml methanolu



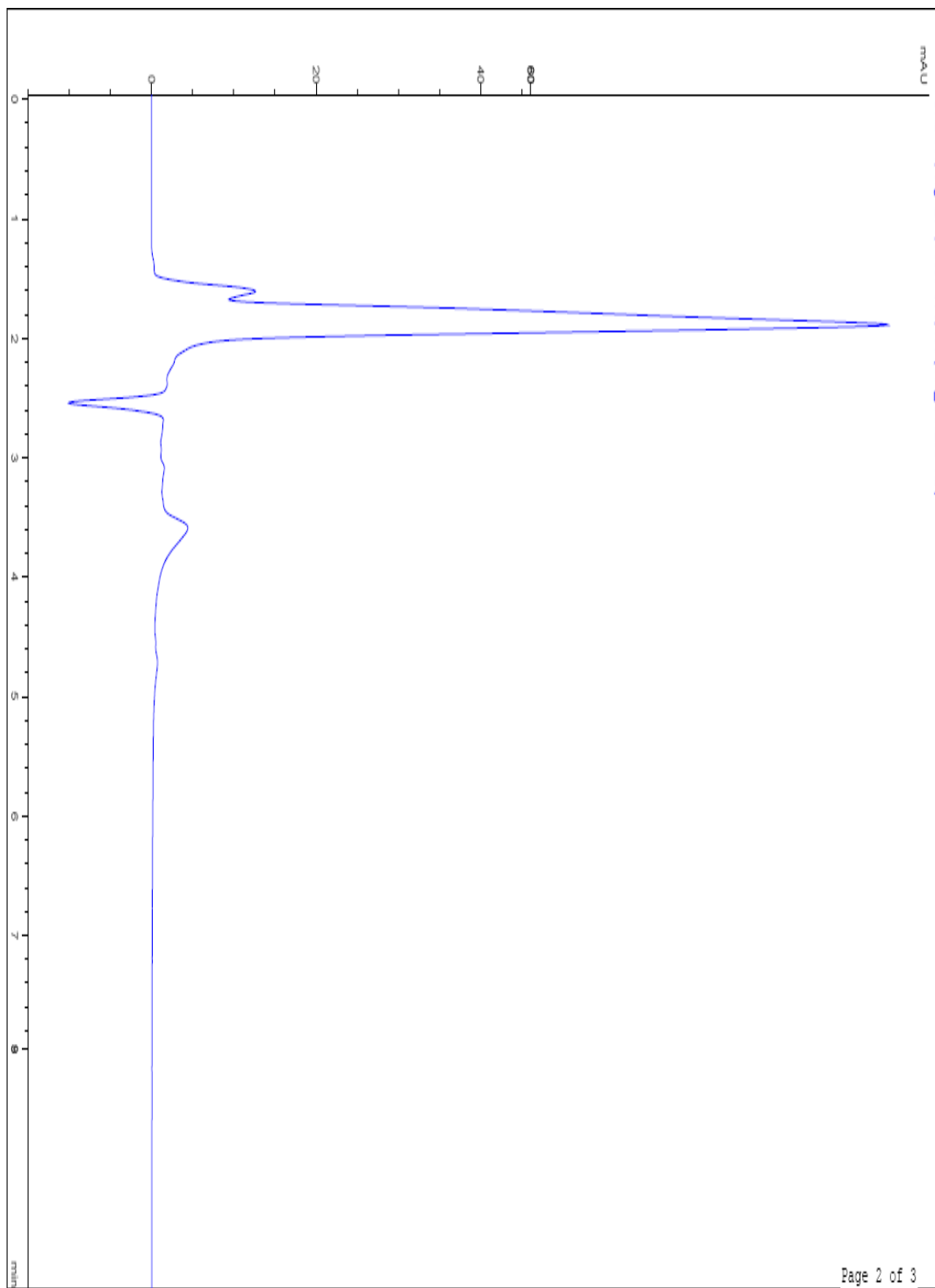
PŘÍLOHA P XXVIII: CHROMATOGRAM PAPRIKY ČERVENÉ – MIKROVLNNÝ OHŘEV

(HPLC/UV), 5 g/50 ml methanolu



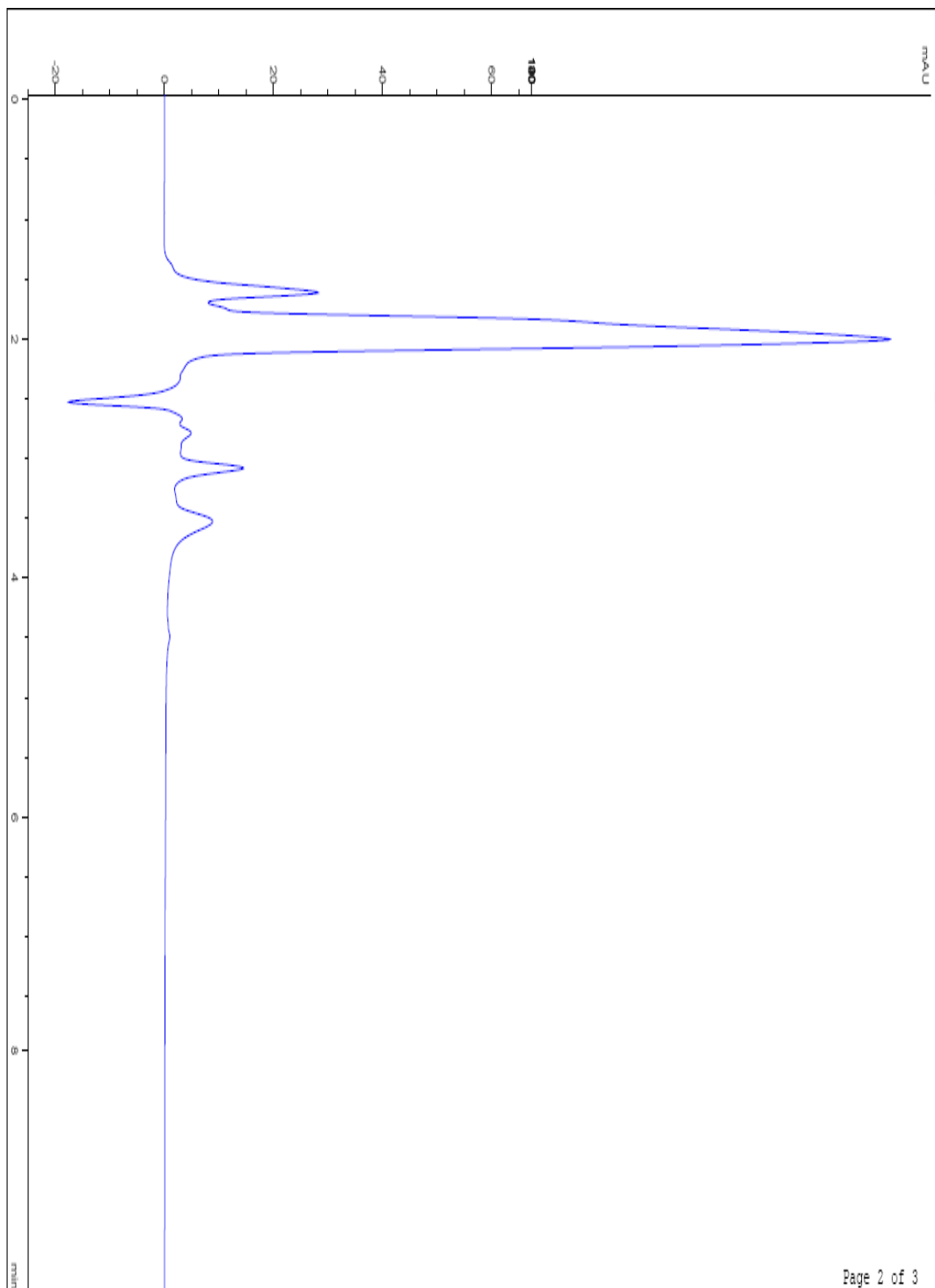
PŘÍLOHA P XXIX: CHROMATOGRAM ČERSTVÉ RŮŽIČKOVÉ KAPUSTY

(HPLC/UV), 5 g/50 ml methanolu



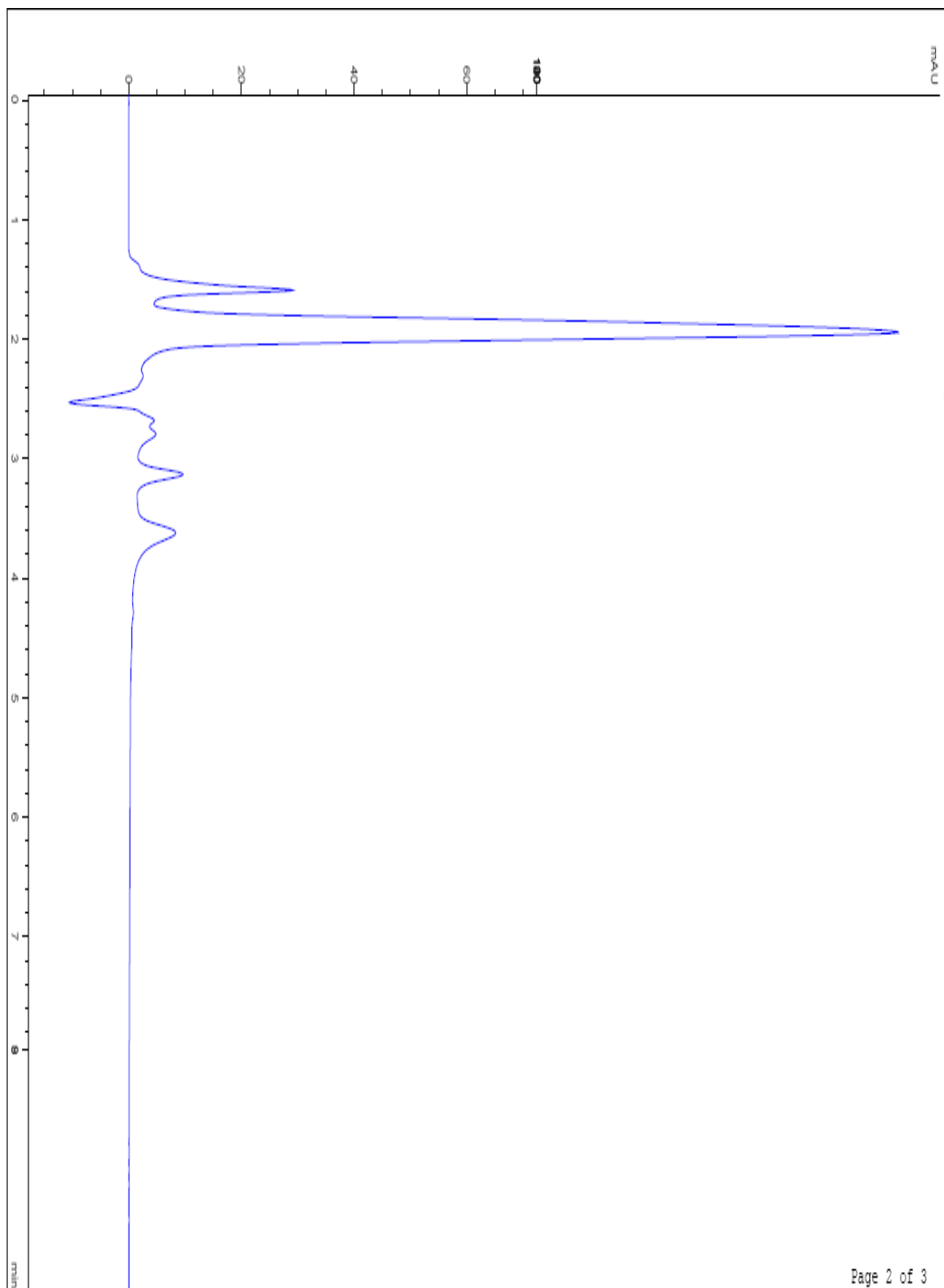
PŘÍLOHA P XXXI: CHROMATOGRAM RŮŽIČKOVÉ KAPUSTY - VAŘENÉ V PÁŘE (5 MIN)

(HPLC/UV), 5 g/50 ml methanolu



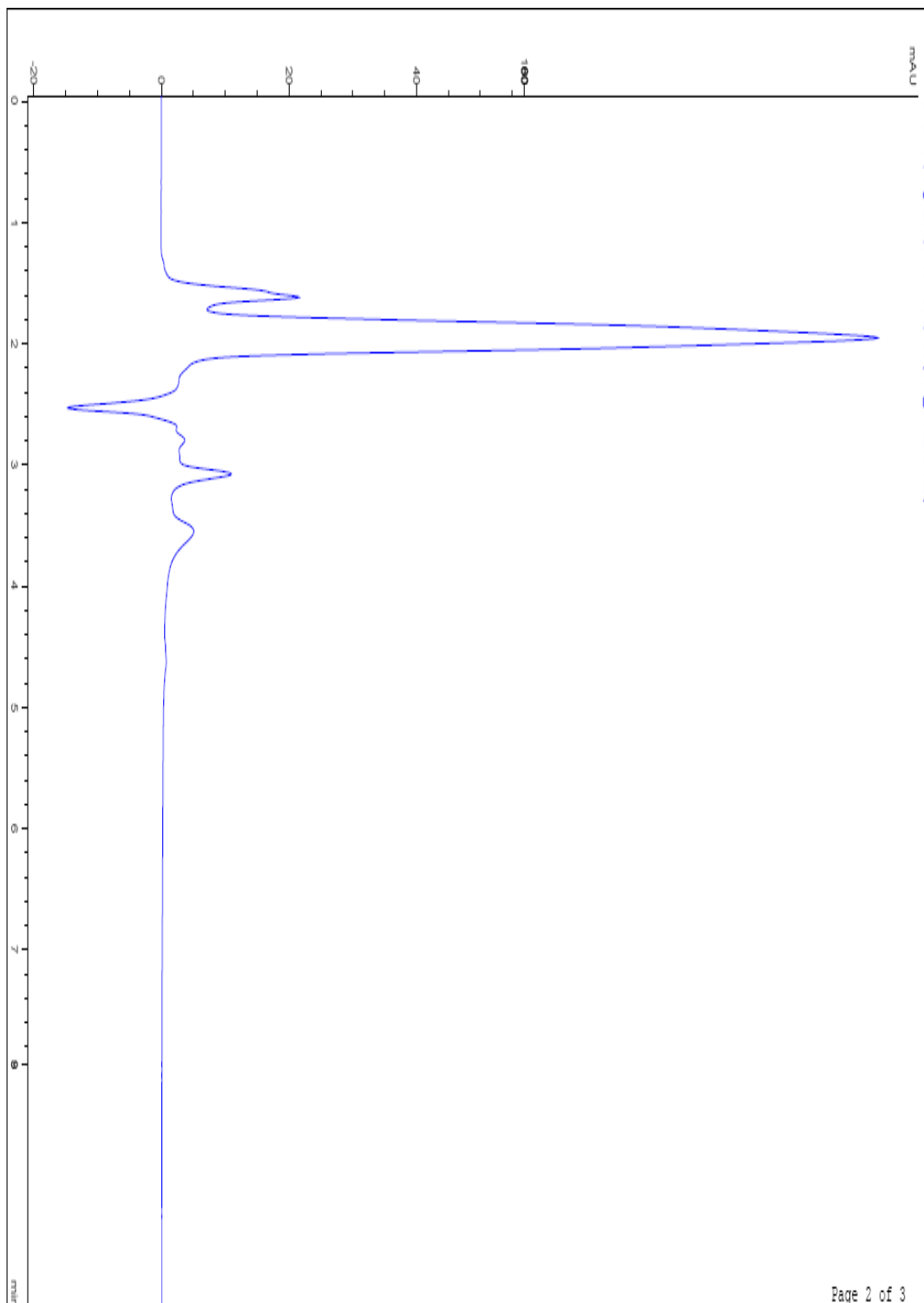
PŘÍLOHA P XXXII: CHROMATOGRAM RŮŽIČKOVÉ KAPUSTY - VAŘENÉ V PÁŘE (10 MIN)

(HPLC/UV), 5 g/50 ml methanolu



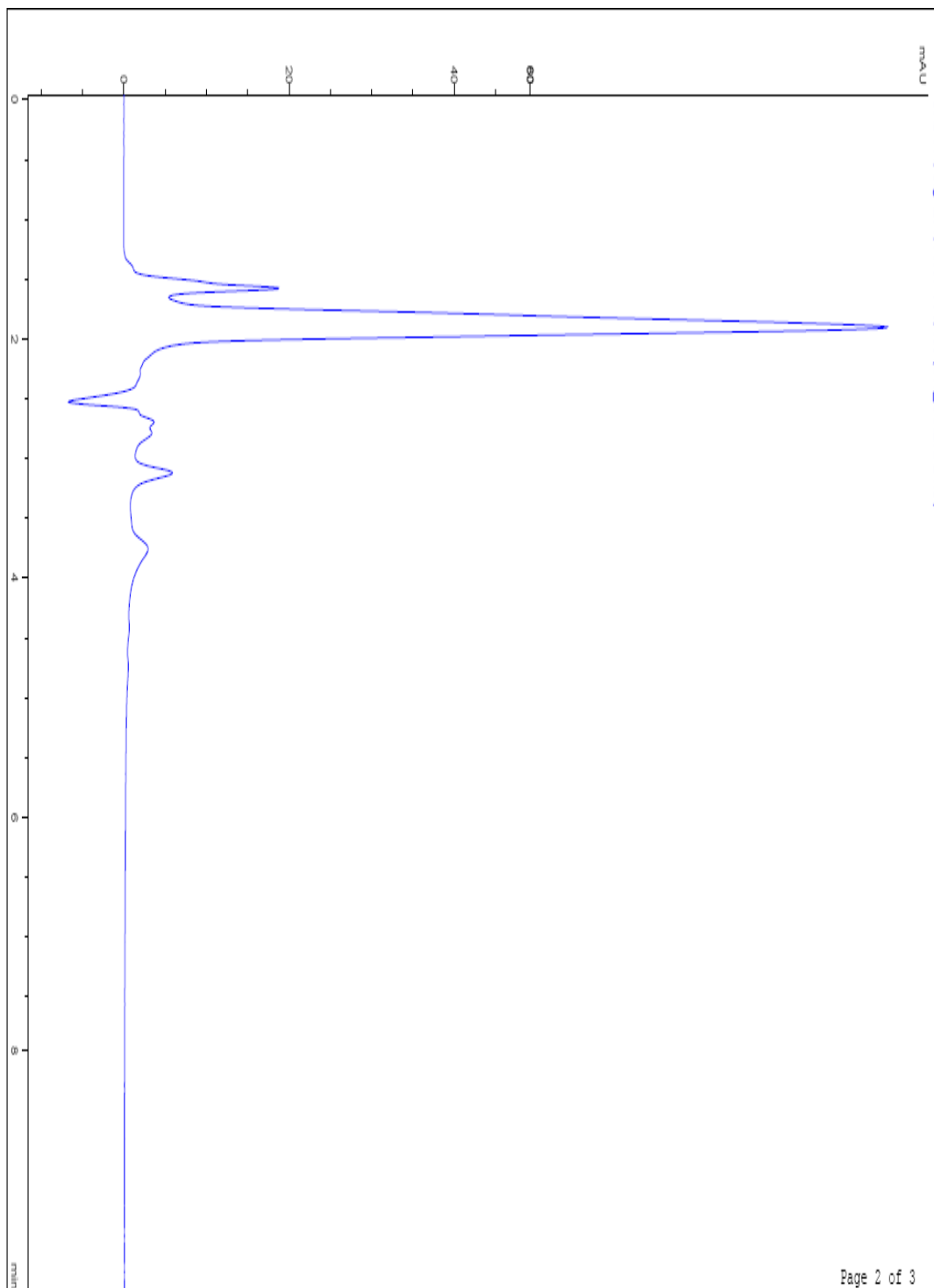
PŘÍLOHA P XXXIII: CHROMATOGRAM RŮŽIČKOVÉ KAPUSTY - DUŠENÁ (5 MIN)

(HPLC/UV), 5 g/50 ml methanolu



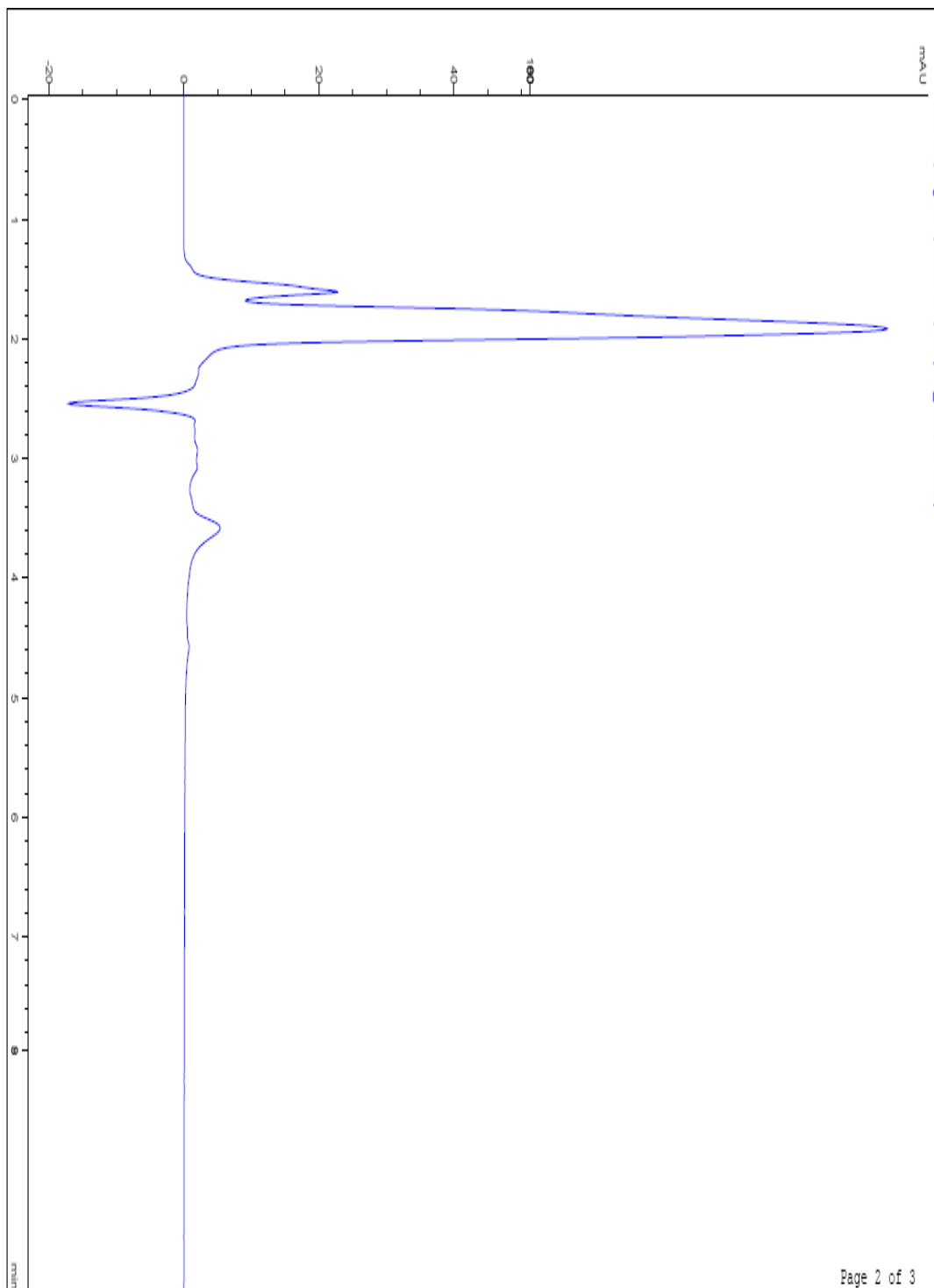
PŘÍLOHA P XXXIV: CHROMATOGRAM RŮŽIČKOVÉ KAPUSTY - DUŠENÁ (10 MIN)

(HPLC/UV), 5 g/50 ml methanolu



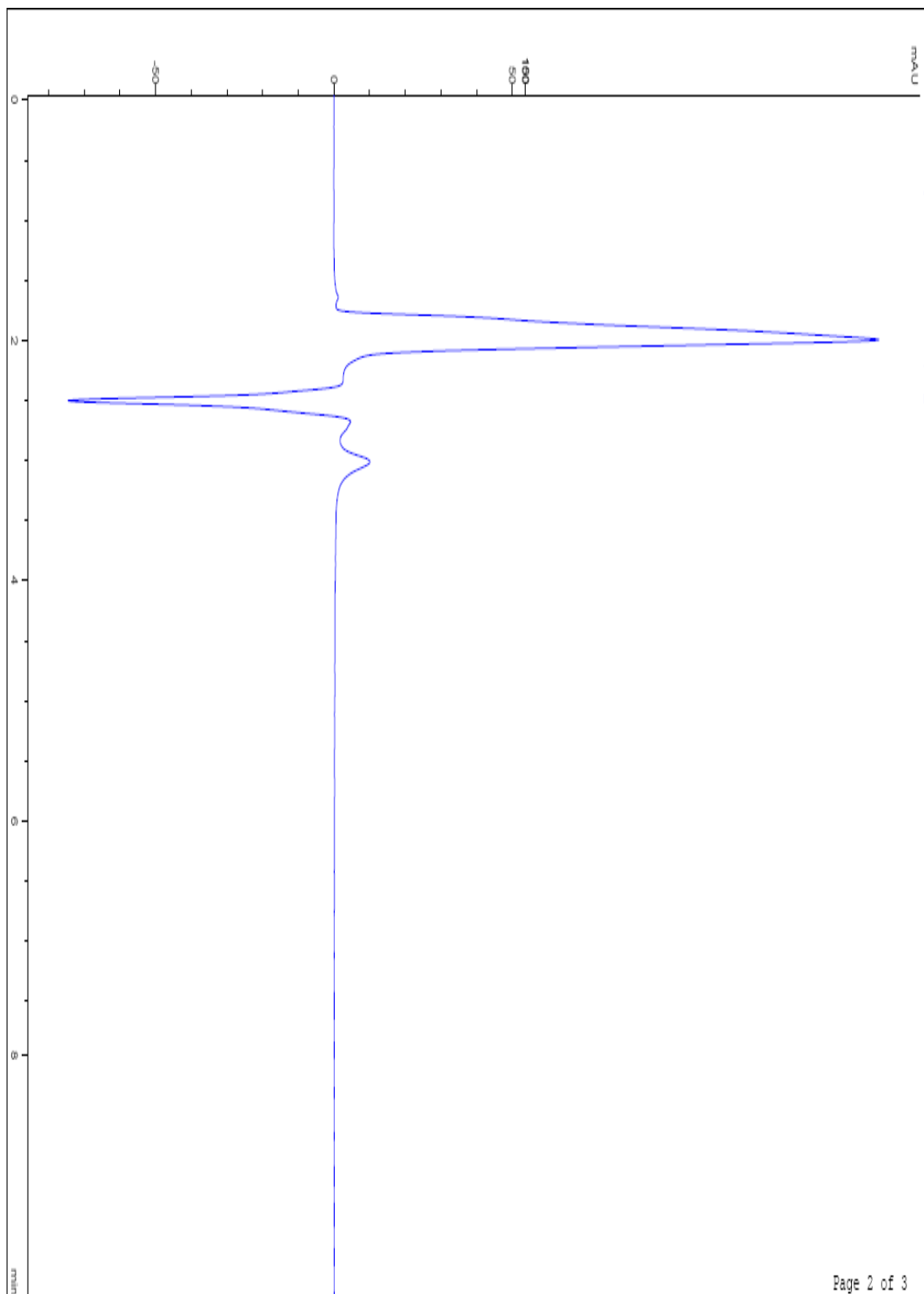
PŘÍLOHA P XXXV: CHROMATOGRAM RŮŽIČKOVÉ KAPUSTY – MIKROVLNNÝ OHŘEV

(HPLC/UV), 5 g/50 ml methanolu



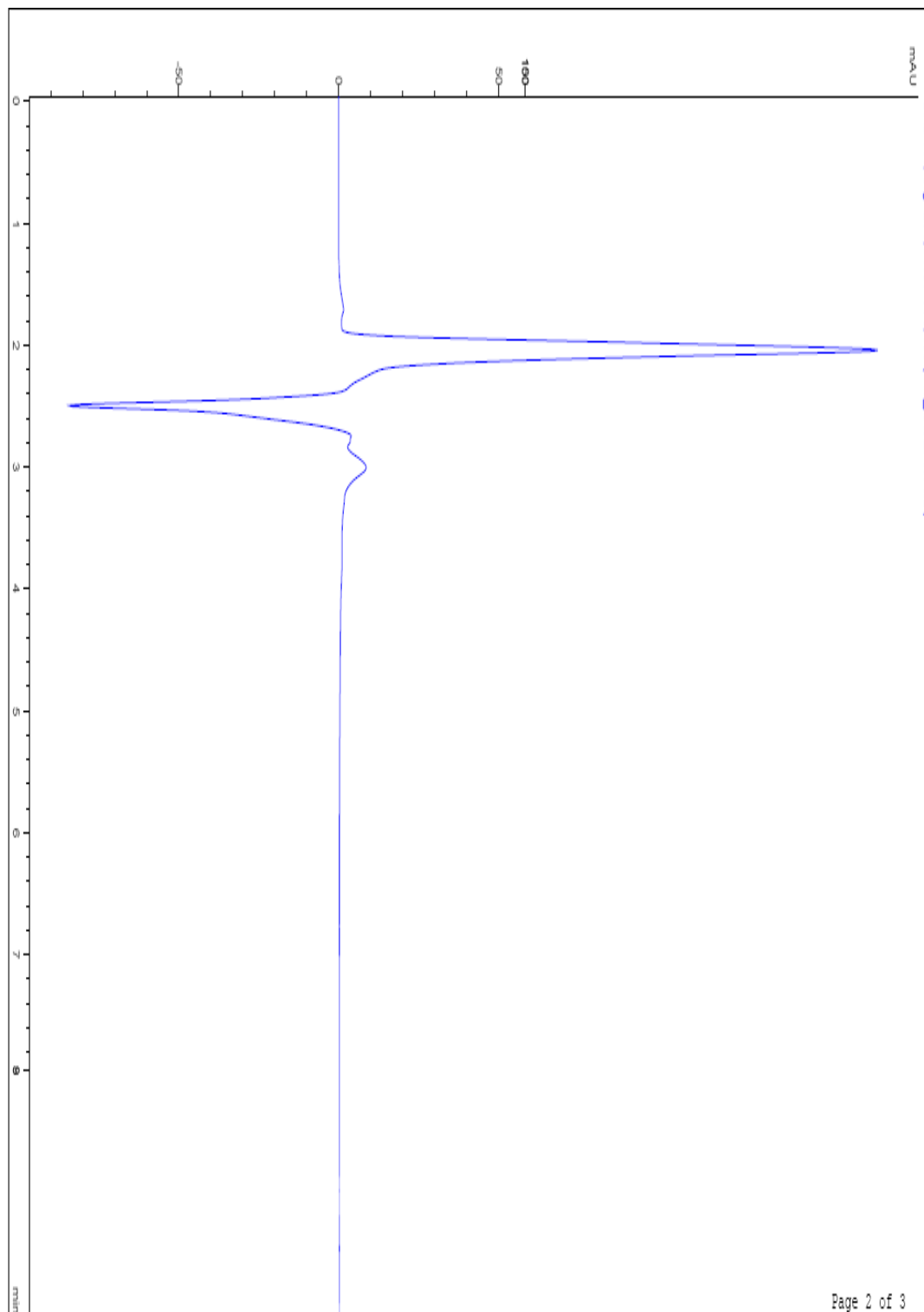
PŘÍLOHA P XXXVI: CHROMATOGRAM ČERSTVÉHO LISTOVÉHO ŠPENÁTU

(HPLC/UV), 5 g/50 ml methanolu



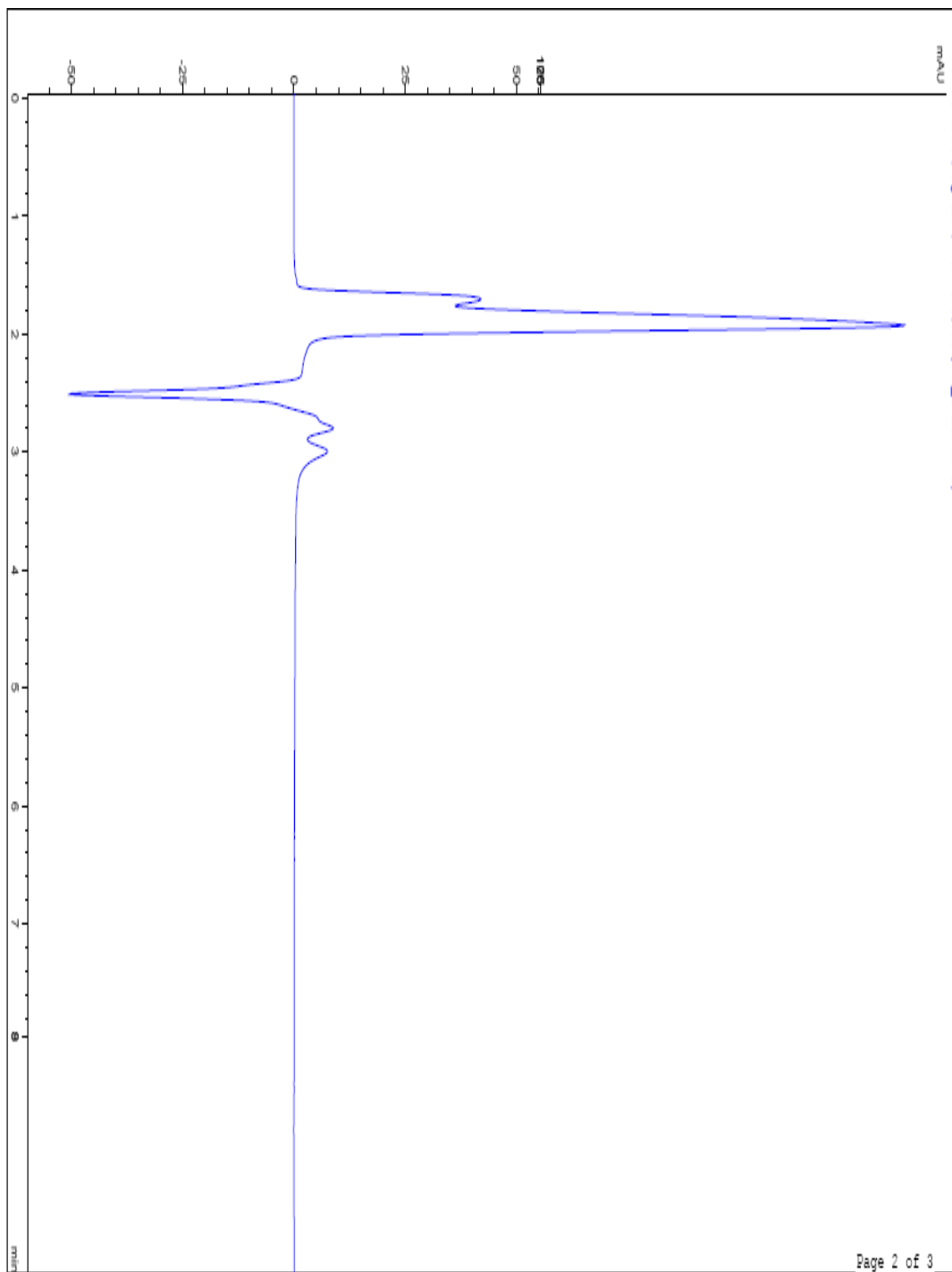
PŘÍLOHA P XXXVII: CHROMATOGRAM LISTOVÉHO ŠPENÁTU - VAŘENÝ

(HPLC/UV), 5 g/50 ml methanolu



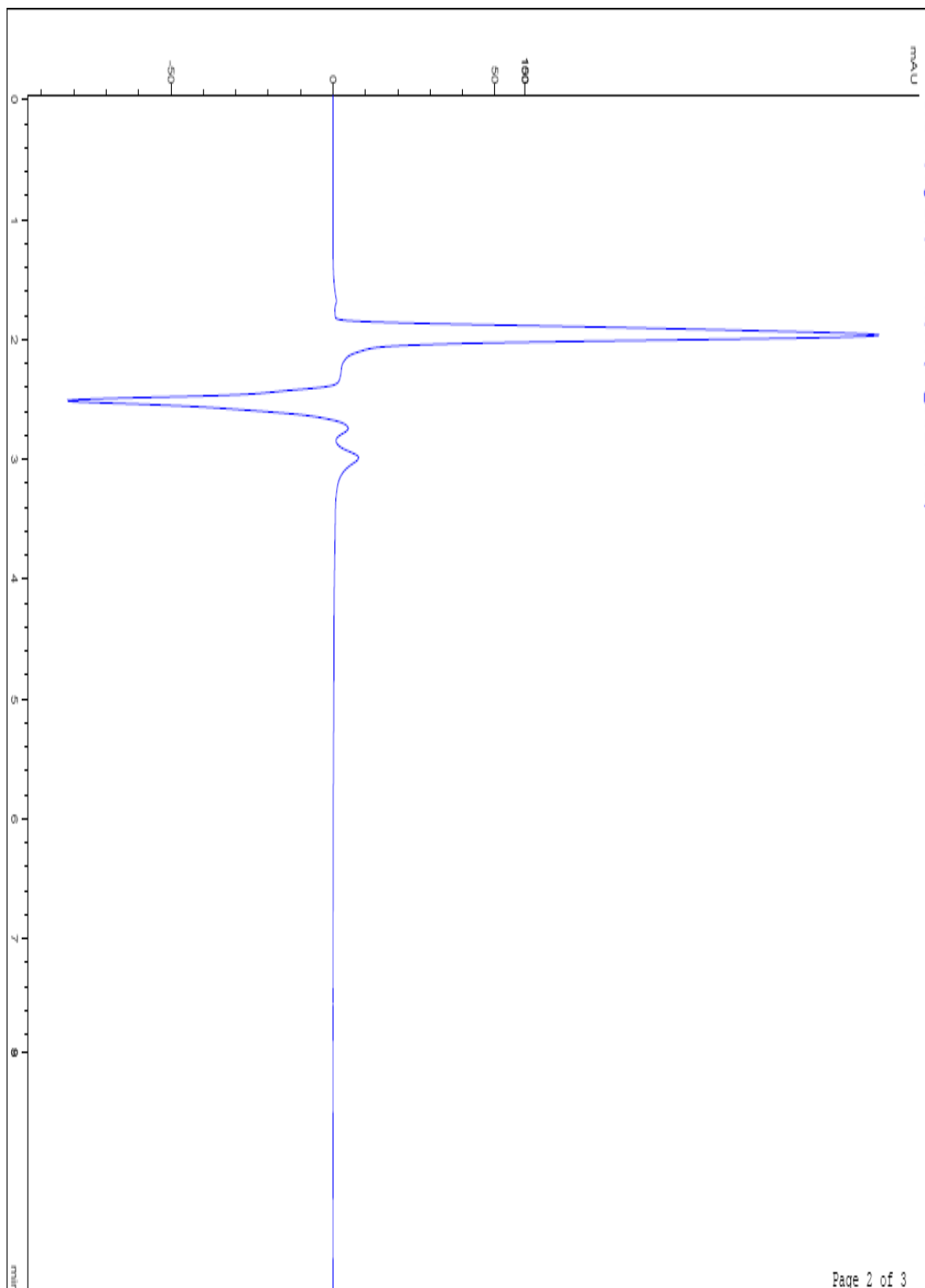
PŘÍLOHA P XXXVIII: CHROMATOGRAM LISTOVÉHO ŠPENÁTU – VAŘENÝ V PÁŘE

(HPLC/UV), 5 g/50 ml methanolu



PŘÍLOHA P XXXIX: CHROMATOGRAM LISTOVÉHO ŠPENÁTU - DUŠENÝ

(HPLC/UV), 5 g/50 ml methanolu



PŘÍLOHA P XXXX: CHROMATOGRAM LISTOVÉHO ŠPENÁTU – MIKROVLNNÝ OHŘEV

(HPLC/UV), 5 g/50 ml methanolu

