

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

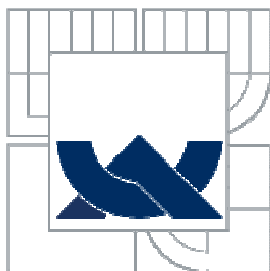
SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ KYSELINY ASKORBOVÉ VE
ZBARVENÝCH VZORCÍCH

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

GABRIELA MORAVCOVÁ

BRNO 2013



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ KYSELINY ASKORBOVÉ VE ZBARVENÝCH VZORCÍCH

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF ASCORBIC ACID IN COLOURED
SAMPLES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

GABRIELA MORAVCOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

PhDr. MIROSLAV HRSTKA, Ph.D.

BRNO 2013



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0735/2012** Akademický rok: **2012/2013**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Gabriela Moravcová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)
Studijní obor: Potravinářská chemie (2901R021)
Vedoucí práce **PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.**
Konzultanti:

Název bakalářské práce:

Spektrofotometrické stanovení kyseliny askorbové ve zbarvených vzorcích

Zadání bakalářské práce:

V teoretické části pojednat o biochemii, fyziologii a metodách stanovení kyseliny askorbové.

V experimentální části ověřit vybranou metodu na standardech, stanovit obsah kyseliny askorbové v reálných vzorcích a optimalizovat podmínky metody.

Termín odevzdání bakalářské práce: 10.5.2013

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Gabriela Moravcová
Student(ka)

PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2013

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením vitamínu C v barevných vzorcích spektrofotometrickou metodou po extrakci xylemem.

Teoretická část se zabývá reakcemi, biochemií a výskytem kyseliny askorbové v potravinách. Rovněž je zde pojednáno o různých metodách stanovení vitamínu C, ať už jde o HPLC metody, elektrochemické metody, titrační stanovení, spektrofotometrické metody nebo metodu polarografickou.

V experimentální části byly touto metodou nejprve stanoveny koncentrace kyseliny askorbové ve standardech, a potom v reálných vzorcích (vitaminové tablety, pomerančová šťáva a šťáva šlechtěných odrůd černého bezu). Dále byly stanoveny některé validační parametry metody. Citlivost metody byla určena na $-1,6772$, linearita na $0,9990$, mez detekce byla stanovena na $0,0466$ mg/ml a mez stanovitelnosti na $0,1552$ mg/ml. Přesnost metody byla vyjádřena relativní směrodatnou odchylkou, která nabývala hodnot do $3,00$ %.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kyselina askorbová, spektrofotometrické stanovení, validace metody, barevné vzorky.

ABSTRACT

This bachelor's thesis deals with spectrophotometric determination of ascorbic acid after the xylene extraction in coloured samples.

The theoretical part deals with reactions, biochemistry and occurrence of ascorbic acid in foodstuffs. Also, it is dealt with various methods of determination of ascorbic acid, such as HPLC methods, electrochemical methods, titrimetric determinations, spectrophotometric determinations or polarographic method.

In the experimental part of this method were first determined the concentration of ascorbic acid in the standards, then in real samples (vitamin tablets, orange juice and the juice of cultivated varieties of elderberry). Some validation parameters of the method were also determined. Sensitivity of the method was determined to $-1,6772$, linearity to $0,9990$, limit of detection was set at $0,0466$ mg/ml and the detection limit at $0,1552$ mg/ml. Accuracy of the method was expressed as relative standard deviation, which gained $3,00\%$ in value.

KEY WORDS

Ascorbic acid, spectrophotometric determination, method validation, coloured samples.

MORAVCOVÁ, G. *Spektrofotometrické stanovení kyseliny askorbové ve zbarvených vzorcích*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 31 s. Vedoucí bakalářské práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a, že všechny použité literární zdroje byly správně a úplně citovány. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Nejprve bych touto formou chtěla poděkovat vedoucímu bakalářské práce panu PhDr. Miroslavu Hrstkovi, Ph.D. za trpělivost, pomoc a odborné vedení.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Vitamin C	9
2.1.1	Struktura a názvosloví	9
2.1.2	Reakce vitamínu C.....	10
2.1.2.1	<i>Enzymová oxidace</i>	10
2.1.2.2	<i>Autooxidace</i>	10
2.1.2.3	<i>Redukce iontů kovu</i>	10
2.1.2.4	<i>Reakce s volnými radikály</i>	11
2.1.2.5	<i>Degradace katalyzovaná kyselinami</i>	11
2.1.2.6	<i>Reakce s dalšími složkami potravin</i>	11
2.1.3	Stabilita	12
2.1.4	Fyziologie, výživa a biochemie	13
2.1.5	Vitamin C v potravinách.....	14
2.1.6	Vitamin C v potravinářství.....	15
2.2	Metody stanovení vitamínu C	15
2.2.1	HPLC metody	15
2.2.1.1	<i>UV detekce</i>	16
2.2.1.2	<i>Fluorescenční detekce</i>	16
2.2.1.3	<i>Elektrochemická detekce</i>	16
2.2.1.4	<i>Hmotnostní detekce</i>	17
2.2.2	Elektrochemické metody	17
2.2.3	Titrační stanovení 2,6-dichlorfenolindofenolem.....	18
2.2.4	Spektrofotometrické metody.....	18
2.2.4.1	<i>Stanovení 2,6-dichlorfenolindofenolem po extrakci xylemem</i>	19
2.2.5	Polarografická metoda.....	19
2.3	Validace metody	19
2.3.1	Validační parametry.....	19
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
3.1	Materiál	21
3.2	Metoda.....	21
3.2.1	Validační parametry.....	23
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	24
4.1	Kalibrační křivka	24
4.2	Validační parametry.....	24
4.3	Stanovení kyseliny askorbové v reálných vzorcích.....	25
4.3.1	Stanovení vitamínu C ve vitaminových tabletách	25

4.3.2	Stanovení vitamínu C u pomerančové šťávy.....	25
4.3.3	Stanovení vitamínu C ve šťávě ze šlechtěných odrůd černého bezu	25
5	ZÁVĚR.....	27
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	28

1 ÚVOD

Kyselina askorbová neboli vitamin C je reverzibilním oxidačně-redukčním systémem, jenž se podílí na mnoha pochodech a reakcích v organismu, jako jsou třeba hydroxylace prolinu a lysinu v kolagenu nebo metabolismus cholesterolu. Snad nejcennější jsou jeho antioxidační vlastnosti, což jsou reakce s volnými radikály.

Vitamin C je jedním z nejméně stálých vitaminů. Nejvíce se ztrácí výluhem, oxidací nebo degradací kyselinami, přičemž rozsah ztrát je ovlivněn mnoha faktory.

Většina živočichů je schopna syntézy vitaminu C, ovšem člověk díky chybějícímu enzymu L-gulonolaktonoxidáze toho schopen není. Jeho doporučená dávka se udává na rozmezí 60 - 200 mg, v závislosti od aktuálního stavu organismu. Zdravou a vyváženou stravou je jeho potřeba kryta.

Nejdůležitějšími zdroji vitaminu C je bezpochyby čerstvé ovoce a zelenina. Absolutně nejvyšší obsah vitaminu má druh západoindické třešně *Malpighia puniceifolia*. Mezi nejvýznamnější zdroje pro člověka patří brambory a citrusy, ze surovin živočišného původu játra.

Ke stanovení obsahu vitaminu C v materiálu je k dispozici velký výběr metod, od jejichž volby závisí správnost výsledků. Nejčastěji se využívá stanovení HPLC s různými detektory, a to z důvodu vysoké přesnosti a citlivosti. Dále se používají metody jako titrační stanovení 2,6-dichlorfenolindofenolem, polarografická metoda nebo spektrofotometrické stanovení 2,6-dichlorfenolindofenolem po extrakci xylenem.

Cílem této bakalářské práce bylo zavést a validovat spektrofotometrickou metodu stanovení kyseliny askorbové 2,6-dichlorfenolindofenolem po extrakci xylenem ve zbarvených vzorcích.

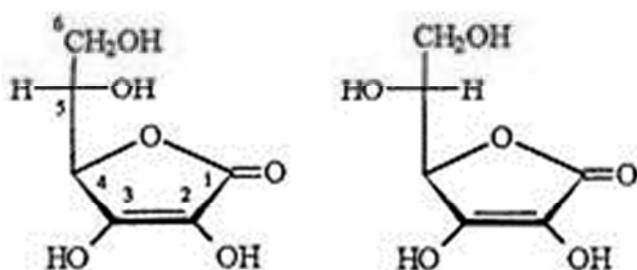
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Vitamin C

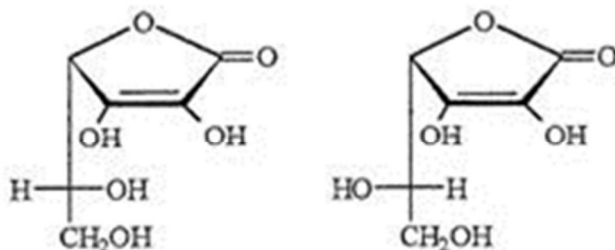
2.1.1 Struktura a názvosloví

Vitamin C neboli kyselina askorbová ($C_6H_8O_6$) je bílý krystalický prášek s relativní molekulovou hmotností 176,13 g/mol a bodem tání 192 °C. Strukturou se řadí mezi deriváty sacharidů, konkrétně kyseliny [1].

Vyskytuje se ve čtyřech stereoizomerech (obr. 1 a 2), přičemž aktivitu vitaminu C vykazuje pouze kyselina L-askorbová (γ -lakton-L-threo-2-hexenonové kyseliny). Na C2 a C3 atomu má endiolové uspořádání, které jí dává silné redukční vlastnosti. L-isoaskorbová kyselina, C5 optický izomer a D-askorbová kyselina (C4 optický izomer) se po chemické stránce chovají stejně jako kyselina askorbová, ale tyto sloučeniny nevykazují aktivitu vitaminu C [2].

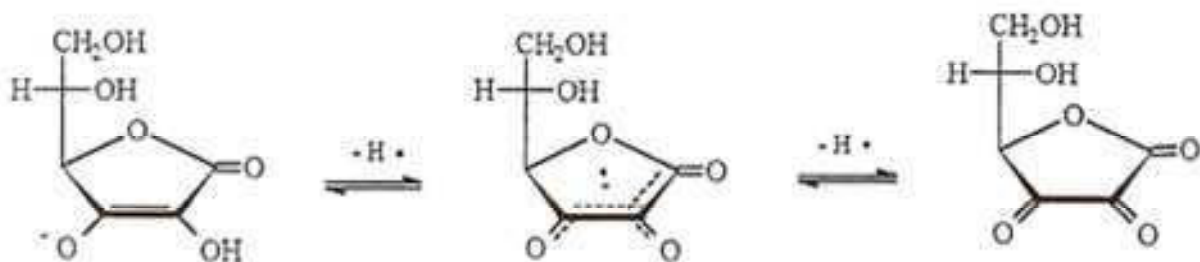


Obr. 1: Kyselina L-askorbová a D-isoaskorbová [3]



Obr. 2: Kyselina D-askorbová a L-isoaskorbová [3]

Pojem vitamin C neoznačuje jen L-askorbovou kyselinu, ale celý reverzibilní oxidačně-redukční systém (obr. 3), kam kromě kyseliny L-askorbové patří i produkty jedno nebo dvouelektronové oxidace. Tyto sloučeniny se ve fyziologickém pH vyskytují jako anionty [2].



Obr. 3: Oxidace kyseliny L-askorbové. Produktem jednoelektronové oxidace je L-askorbylradikál, produktem dvouelektronové L-dehydroaskorbová kyselina [3]

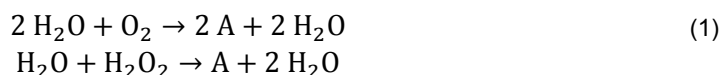
2.1.2 Reakce vitamínu C

Obě enolové hydroxylové skupiny kyseliny askorbové jsou schopny disociace, tudíž se jedná o dvojsytnou kyselinu. V roztoku o fyziologickém pH se tato kyselina vyskytuje ve formě aniontu. Askorbylradikál je kyselina, která se vyskytuje jako anion stabilizovaný rezonancí, nepárový elektron je lokalizován v oblasti C4. Kyselina dehydroaskorbová se ve vodných roztocích vyskytuje jako hydratovaný bicyklický monomer.

Oxidace kyseliny askorbové na dehydroaskorbovou probíhá pomocí enzymů (antivitaminu C), vzdušného kyslíku i chemických oxidačních činidel. Tato reakce je vratná a probíhá různými mechanismy, buď jednoelektronovým (vznik meziprojektu askorbylradikálu) nebo dvouelektronovým (vznik kyseliny dehydroaskorbové přímo) [2].

2.1.2.1 Enzymová oxidace

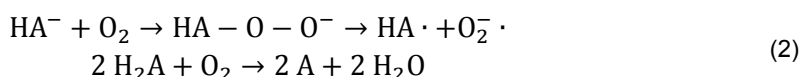
Tato oxidace je katalyzována askorbát oxidázou v přítomnosti vzdušného kyslíku. Hlavně probíhá v mechanicky poškozených rostlinných pletivech, výsledkem je degradace vitamínu. Ztrátám vitamínu v ovoci a zelenině při zpracování se předchází blanširováním, čímž se inaktivují enzymy oxidující kyselinu askorbovou [2].



Obecný mechanismus enzymové oxidace, H₂A = kys. askorbová, A = kys. dehydroaskorbová

2.1.2.2 Autooxidace

Nejvýznamnějším jevem je oxidace vzdušným kyslíkem, což zodpovídá za ztráty vitamínu C v potravinách při skladování a zpracování. Reakce závisí na pH prostředí, v kyselém prostředí je reakce pomalá, a s rostoucí alkalitou rychlost oxidace roste. Tento fakt je dán stálostí kyseliny askorbové.

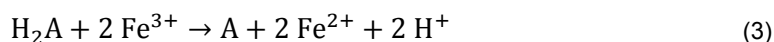


Obecný mechanismus autooxidace, HA⁻ = anion kys. askorbové, HA-O-O⁻ = hydroperoxid aniontu kys. ask., HA· = askorbylradikál, O₂⁻· = superoxidový radikál

Po přenosu 2 elektronů, dojde k disociaci a vzniku kyseliny dehydroaskorbové a peroxidu vodíku, který oxiduje další askorbovou kyselinu [2].

2.1.2.3 Redukce iontů kovů

Kyselina askorbová reaguje s ionty kovů za vzniku komplexů, ale za určitých podmínek může kovy redukovat. Reakce s ionty Cu²⁺ a Fe³⁺ probíhají následujícím způsobem:

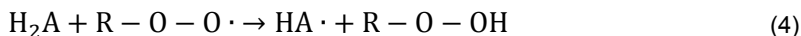


Obecný mechanismus redukce kovů

Tyto reakce urychlují oxidační reakce, které souvisejí s nepříznivými změnami chuti, vůně a barvy potravin [2].

2.1.2.4 Reakce s volnými radikály

Kyselina askorbová i její izomery a deriváty mohou reagovat s volnými radikály, způsobujícími oxidaci lipidů a jiných oxylabilních složek potravin. Těmito reakcemi dochází k inhibici řetězových pochodů a vitamin působí jako antioxidant.



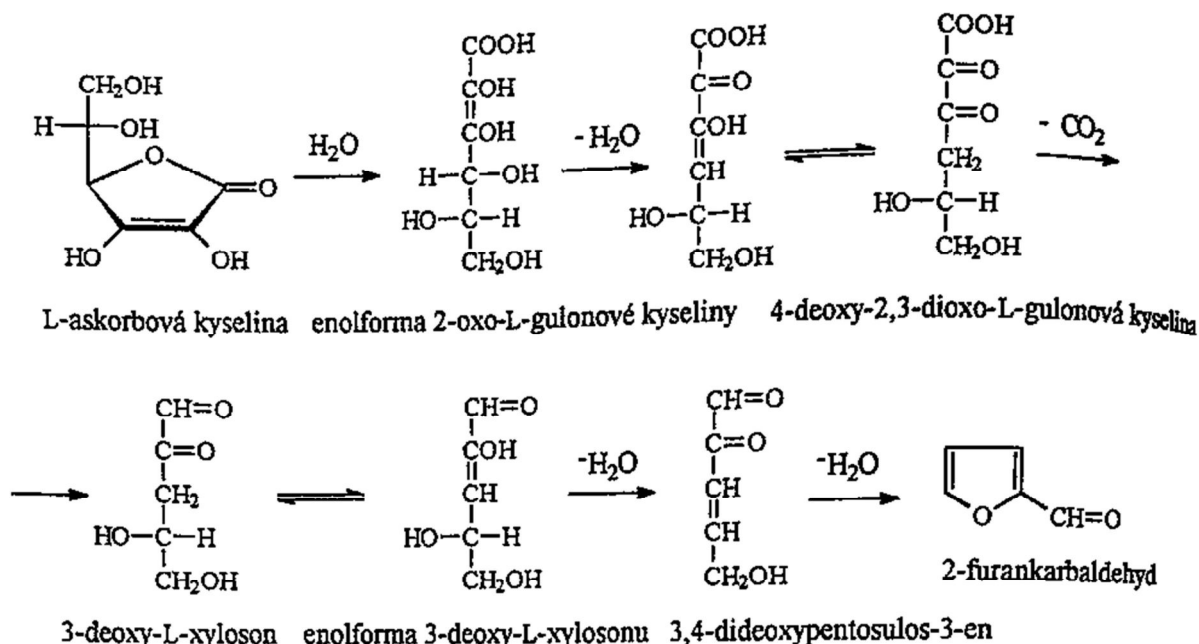
Obečný mechanismus reakce s peroxylovým radikálem mastné kyseliny,

R-O-OH = hydroperoxid mastné kyseliny

Vzniklý HA· radikál není schopen vyvolat další reakci a rozpadá se na kyseliny askorbovou a dehydroaskorbovou. Všeobecně platí, že kyselina askorbová je účinnějším antioxidantem v kombinaci s působením tokoferolů, které reagují s radikály přednostně [2].

2.1.2.5 Degradace katalyzovaná kyselinami

V silně kyselém prostředí dochází k dekarboxylaci a dehydrataci až na CO₂ a 2-furankarbaldehyd neboli furfural. (obr. 4)



Obr. 4: Schéma degradace kyseliny askorbové [2]

Této reakci je přisuzován největší vliv na ztráty vitamínu C ve výrobcích a produktech, u kterých bylo zamezeno přístupu vzdušného kyslíku [2].

2.1.2.6 Reakce s dalšími složkami potravin

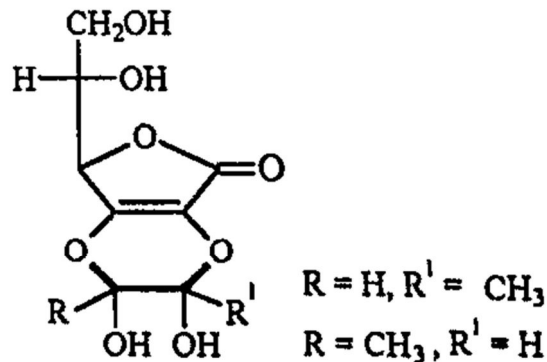
Ztráty vitamínu C mohou být způsobeny i interakcí se složkami potravin.

K reakcím s oxidovanými fenoly dochází při enzymovém hnědnutí, a to hlavně u potravin s nízkým obsahem kyseliny askorbové v přítomnosti oxidoreduktáz ze skupiny o-difenolsloučenin. V interakci se vzdušným kyslíkem dochází k oxidaci fenolů na o-chinony, ze kterých vznikají hnědé pigmenty. Kyselina askorbová též redukuje barviva na myoglobin, jenž se vyskytuje v mase částečně ve formě oxymyoglobinu a metmyoglobinu, tím pádem je k dispozici větší množství myoglobinu ke vzniku nitroxymyoglobinu, což je žádoucí barvivo [2].

Kyselina askorbová také oxiduje glutathion na disulfid, který neovlivňuje reologické vlastnosti těsta. V nepřítomnosti kyseliny dojde k reakci redukovaného glutathionu s proteiny lepku vázanými

disulfidickými vazbami za vzniku heterodisulfidů. Tyto mají negativní účinky na pekařské vlastnosti mouky [2].

Při reakci kyseliny askorbové s aldehydy ve vodném prostředí vznikají poloacetal. Při reakci s produktem degradace sacharidů methylglyoxalem vzniknou 2 cyklické poloacetal (obr. 5) [2].



Obr. 5: Acetaly s methylglyoxalem [2]

2.1.3 Stabilita

Kyselina askorbová je jeden z nejméně stálých vitaminů, k jejím ztrátám dochází různými způsoby. V kyselém prostředí je nejstabilnější. Nejvíce vitaminu C se ztrácí výluhem, oxidací anebo degradací kyselinami. Rozsah ztrát závisí na mnoha faktorech, jako pH prostředí, teplota, množství vody a mnoho dalších. Při vaření potravin dochází k oxidaci na L-dehydroaskorbovou kyselinu, která otevírá laktonový kruh a díky tomu dojde ke ztrátě biologické aktivity. Ztráty jsou vyšší u listové zeleniny z důvodu většího povrchu, při loupání plodů jsou ztráty též značné, jelikož se odstraňují povrchové vrstvy bohaté na vitamin [2, 4].

Kyselina askorbová je velmi citlivá na světlo, po ozáření snadno degraduje. Výsledky studií, zabývajících se působením různých typů světla na vitamin C v různobarevných nádobách, ukazují, že UV i viditelné světlo působí její degradaci, přičemž v lahvi z tmavého skla je pomalejší [5].

Dalším důležitým faktorem ovlivňujícím stabilitu kyseliny askorbové v roztoku je teplota. Studie dokazují, že extrakci kyseliny askorbové je nejvhodnější provádět při nízkých teplotách a s vychlazenými roztoky, nebo i na ledu [6].

Relativní stabilita a výtěžnost extrakce je zajišťována při pH okolo 2,1 [7].

K nejpoužívanějším extrakčním činidlům patří kyseliny metafosforečná, šťavelová, trichloroctová, lze použít i směsi jako methanol, ethanol, EDTA, L-cystein a další. Při extrakci je důležitá inaktivace degradačních enzymů, ty totiž snižují koncentraci kyseliny askorbové. Je vhodnější extrahovat kyselinou, jelikož v alkalickém prostředí kyselina askorbová snadno oxiduje. Stabilitu kyseliny askorbové snižují kovové ionty.

Ke zlepšení stability se přidávají chelatační činidla, jako například EDTA [2].

V průmyslu je snaha minimalizovat ztráty během skladování i zpracování, je založena na:

- omezování přístupu vzduchu, snižování přítomného kyslíku (odvzdušněním, zavedením inertní atmosféry a dalšími způsoby)
- snižování koncentrace iontů Fe^{3+} , Cu^{2+} vyloučením kontaktu se součástmi technologických strojů, vázání do neaktivních komplexů pomocí EDTA,...
- vytváření nepříznivých podmínek pro vznik komplexů kovových iontů s kyselinou askorbovou snížením aktivity vody, změnou pH,...

Nejnižších ztrát při skladování, kulinárním a průmyslovém zpracování se dosahuje vysokoteplotní krátkodobou sterilací UHT. Ovoce, které je ošetřeno SO_2 , podléhá nižším ztrátám, jelikož dochází k redukci vznikajícího peroxidu vodíku. Jak je známo, nejšetrnější úpravou je zmrazování, při velmi nízkých teplotách ($-18\text{ }^\circ\text{C}$) dochází k minimálním ztrátám. K opačnému efektu ovšem dochází při rozmrazování, a to až o 30 – 50 % [2].

2.1.4 Fyziologie, výživa a biochemie

Většina živočichů je schopna syntetizovat si vitamin C z glukózy pomocí čtyř enzymů nacházejících se v játrech. Člověk postrádá enzym L-gulonolaktonoxidázu, který se uplatňuje v posledním kroku syntézy vitaminu C a tudíž jej není schopen vytvářet [8, 9].

Vitamin C se významně podílí na hydroxylačních reakcích v organismu, jako je přenos sulfátů, hydroxylace prolinu a lysinu v prokolagenu, kde je vitamin C kofaktorem enzymu prolylhydroxylázy a umožňuje zesíťování kolagenu, a další. Účastní se biosyntézy mukopolysacharidů, prostaglandinů, transportu iontových forem železa, sodíku, chloru a vápníku, metabolismu cholesterolu, drog, imunitních reakcí a spousty dalších pochodů. Antioxidační vlastnosti vykazuje reakcemi s aktivovanými formami kyslíku (volnými radikály), čímž ochraňuje tokoferoly a lipidy membrán před oxidací. Mezi jeho další vlastnosti patří též ochrana nestabilních forem kyseliny listové, regulace tvorby nitrosaminů a inhibice mutageny a karcinogeny [2, 10].

Někteří odborníci dospěli k názoru, že vitamin C může působit jako prooxidant uvolňováním Fe^{3+} iontů z ferritinu (jedná se hlavně o poškozené tkáně). Ty jsou poté redukovány na Fe^{2+} ionty, jenž katalyzují reakce, jejichž produkty jsou hydroxylové radikály, přispívající k oxidačnímu poškození organismu. Antioxidační vlastnosti ovšem ve zdravém organismu převládají [11].

Doporučená denní dávka vitaminu C se dříve udávala na 30 – 50 mg, dnes se pohybuje v rozmezí 60 až 200 mg, samozřejmě při rekonvalescenci nebo jiných zátěžových situacích více, i 1000 mg [12]. Kouření značně snižuje hladinu vitaminu C. Je to dáno vysokým podílem těžkých kovů v kouři, vitamin je váže a vylučuje se spolu s nimi. Největším zdrojem vitaminu C jsou zelenina (kapusta, brokolice,...), ovoce (šípek, citrusy, rybíz,...) a brambory. Zdravou, vyváženou stravou je denní potřeba vitaminu plně pokryta, proto se v našem regionu avitaminóza, neboli totální nedostatek vitaminu nevyskytuje. [2, 13] Naproti tomu hypovitaminóza neboli částečný nedostatek vitaminu, je jev celkem častý. Při mírné formě nedostatku se objevují poruchy jako snížení obranyschopnosti, deprese, pocit slabosti, žaludeční problémy a další, známé pod pojmem jarní únava. Při výrazné hypovitaminóze dochází ke zpomalení růstu, křehnutí kostí, anémii, vypadávání vlasů a zubů, krvácení, což jsou projevy nemoci zvané skorbut (kurděje) [12].

Vzhledem k faktu, že je tento vitamin rozpustný ve vodě, není možno se jím předávkovat, neusazuje se totiž v organismu a vyloučí se močí.

Mezi příznaky zvýšeného příjmu vitaminu C řadíme průjem a ledvinové kameny [10].

Zvýšený příjem vitamínu C stimuluje tvorbu interferonů, což jsou přírodní bílkovinné látky, které chrání kromě jiného i proti infekcím. Testování na zvířatech potvrdilo, že podáváním vitamínu C dochází ke zvyšování odolnosti vůči chladu, což je důležitý poznatek, když víme, že nemoci z nachlazení bývají spouštěny stresem z chladu a infekcí. Při stresových situacích dochází k vyšší spotřebě vitamínu C [14].

Zajímavé je, že při silných záporných emocích organismu se spálí až 3000 mg vitamínu C [15].

Antivitaminy C jsou různé oxidoreduktázy uplatňující se v metabolismu vitamínu C, například askorbátoxidáza (oxiduje kyselinu askorbovou na dehydroaskorbovou) a askorbátperoxidáza (spotřebuje kyselinu askorbovou na redukci H_2O_2). Za ztráty kyseliny askorbové také nepřímo zodpovídají enzymy polyfenolázy [2].

2.1.5 Vitamin C v potravinách

90 – 95 % vitamínu C se nachází ve formě kyseliny askorbové, zbytek ve formě kyseliny dehydroaskorbové.

Nejbohatším zdrojem vitamínu C je čerstvé ovoce a zelenina. Jeho obsah je závislý od vegetativních podmínek během růstu, zralosti, způsobu sklizně i zpracování. Absolutně nejvyšší koncentraci vitamínu C, která dosahuje až 46 g/kg jedlého podílu obsahuje druh třešně *Malpighia punicefolia* (obr. 6) ze Západoindických ostrovů. Potravin s vysokým obsahem vitamínu C většinou nehrají významnou roli pro pokrytí potřeby, jelikož se konzumují sporadicky. Tudiž daleko většího významu nabývají suroviny s průměrným obsahem vitamínu, ale zato často konzumovatelné, jako třeba brambory [2, 16].

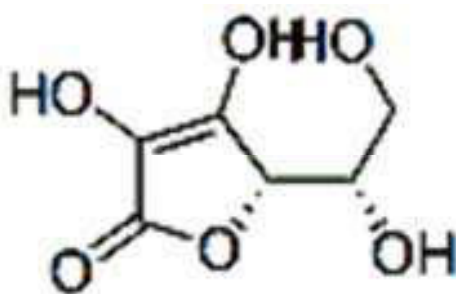


Obr. 6: *Malpighia punicefolia* [17]

Biologická dostupnost kyseliny askorbové ve vařené brokolici, částech pomeranče a pomerančových šťávách pro člověka je stejná jako v doplňcích stravy ve formě tablet. Využitelnost vitamínu C je v syrové brokolici o 20 % nižší než ve vařené, což je nejspíše způsobeno nedostatečným zpracováním v ústech nebo trávením [18].

Nejvýznamnějším zdrojem vitamínu C živočišného původu jsou játra, ostatní suroviny mají z pohledu obsahu vitamínu C zanedbatelný význam.

Ve vyšších houbách se vitamin C vyskytuje minimálně, ale v jejich tělech jsou přítomny jiné příbuzné látky jako kyselina 6-deoxy-L-askorbová, kyselina L-erythro-askorbová (obr. 7) a jejich glykosidy [2].



Obr. 7: Kyselina L-erythro-askorbová [19]

2.1.6 Vitamin C v potravinářství

Kyselina askorbová se přidává k džusům, konzervovanému nebo mraženému ovoci k ochraně před nežádoucími změnami aroma, které jsou způsobeny oxidací při skladování a zpracování. Též se používá jako inhibitor reakcí enzymového hnědnutí, často v kombinaci s kyselinou citronovou [2].

Přídavek kyseliny askorbové u alkoholických nápojů jako je pivo a víno slouží jako prevence tvorby zákalů a nežádoucích změn chuti a aroma [2].

Přídavkem kyseliny askorbové se zkvalitňuje a urychluje výroba masa a masných výrobků, například šunky, jelikož je umožněn kratší čas potřebný k uzení a stabilizuje se barva výrobku. Kyselina askorbová současně zvyšuje inhibiční účinky jiných látek na toxinogenní bakterie *Clostridium botulinum* [2].

Přídavek kyseliny askorbové také zlepšuje pekařské vlastnosti těsta [2].

2.2 Metody stanovení vitamínu C

V dnešní době existuje mnoho způsobů stanovení obsahu vitamínu C v potravinách, jejichž výběr významně ovlivňuje správnost výsledků.

Celkový obsah vitamínu C ve vzorcích lze stanovit jako sumu kyselin askorbové a dehydroaskorbové, k tomu se používá konverze kyseliny dehydroaskorbové na askorbovou, pomocí vhodných činidel [18].

Neustále dochází k vývoji nových metod, hlavně ke společnému stanovení těchto dvou kyselin, což je vzhledem k jejich odlišným vlastnostem a reakcím složité. Největšími problémy daných analytických metod jsou jejich citlivost a selektivita, výběr interních standardů a nejvhodnějšího detektoru, retence obou kyselin a jejich stabilita [20].

2.2.1 HPLC metody

Tyto metody dovolují přesné a citlivé stanovení celkového vitamínu C po působení redukčního činidla, nebo stanovení samotné kyseliny askorbové před jeho působením. Některé metody umožňují i simultánní stanovení askorbové a dehydroaskorbové kyseliny. Díky spojení chromatografické separace a různých typů detektorů je HPLC analýza o mnoho specifitější než ostatní metody. HPLC metody umožňují společné stanovení kyseliny askorbové, isoaskorbové i jejich dehydroforem [18].

U *HPLC-RP* se používají mobilní fáze s převahou vody a s částí anorganické nebo organické kyseliny nebo anorganického pufru. U této metody je problémem velmi slabá retence kyselin, tudíž horší rozlišení píku kyseliny askorbové od jiných interferujících látek.

U *iontově párové chromatografie* není pro stanovení vitamínu C vhodná, nemá příliš dobrou opakovatelnost a selektivitu.

U *iontově výměnné chromatografie* je kyselina askorbová (slabá organická kyselina) zachycena silným aniontovým měničem. Jako mobilní fáze se používá anorganický pufr nebo kyselina při nízkém pH.

Chromatografie s iontovou výlukou má stacionární na fázi sulfonovaných sférických PS/DVB pryskyřic v různé iontové formě. Mobilní fází bývá často nějaká anorganická kyselina. Působí zde elektrostatické odpuzivé síly, hydrofobní interakce a efekt iontové výluky, dělení probíhá i v důsledku velikosti molekul. Pro stanovení vitamínu C je tato metoda vhodná.

HILIC je kapalinová chromatografie založená na hydrofilních interakcích, je alternativou *HPLC-RP* a je vhodná k analýze malých polárních molekul slabě zadržovaných nebo vymývaných s mrtvým objemem *HPLC-RP* systémů [20].

2.2.1.1 UV detekce

UV detekce je nejpoužívanější metodou pro stanovení vitamínu C. Detekce jednotlivých složek je poměrně náročná, a to díky jejich různým vlastnostem.

Kyselina askorbová absorbuje UV záření v závislosti na pH v rozmezí 245 – 265 nm, ale přímé spektrofotometrické stanovení znemožňuje přítomnost chromoforů v potravíně. Kyselina dehydroaskorbová absorbuje při 185 nm, nad 220 nm je její absorpance slabá [18, 21].

Při společném stanovení, je v prvním kroku stanovena samotná kyselina askorbová, poté se provede redukce kyseliny dehydroaskorbové (např. pomocí dithiothreitolu (DTT) nebo L-cysteinu), a následně je stanoven celkový obsah vitamínu C [20].

Autoři Adam a kol. [22] použili ke stanovení kyseliny L-askorbové v nápojích moderní mikroextrakci na pevném sorbentu (MEPS) vyhodnocenou *HPLC-UV* analýzou. Tato metoda byla porovnáвана s jodometrickou titrací a metodou DPPH (stanovení antioxidační aktivity), u mikroextrakce se projevila vyšší selektivita.

2.2.1.2 Fluorescenční detekce

Kyseliny nejsou přirozeně fluorescenční, ale kyselina dehydroaskorbová reakcí s *o*-fenyldiaminem vytváří fluorescentní chinoxalinový derivát 3-(1,2-dihydroxyethyl)furo[3,4-*b*]chinoxalin-1-on. Při společném stanovení je možno kyselinu askorbovou oxidovat na dehydroaskorbovou, nebo může být provedeno společné stanovení duálním detekčním systémem, kde je kyselina askorbová detekována UV-detektorem a kyselina dehydroaskorbová fluorescenčním detektorem [20, 23].

2.2.1.3 Elektrochemická detekce

Kyselina askorbová je elektrochemicky aktivní, zato dehydroaskorbová ne. Tento způsob stanovení je vysoce citlivý a specifický a optimálním napětím lze dosáhnout redukce interferujících sloučenin zkoumané matrice. Nevýhodou této metody jsou vysoké nároky na pH použitých roztoků [20, 23].

2.2.1.4 Hmotnostní detekce

Pro stanovení obsahu kyseliny askorbové byla vyvinuta i metoda kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS). Jako mobilní fáze byla použita směs 70% methanolu a 30% kyseliny octové. Kyselina askorbová byla extrahována methanolem a směsí metafosforečné a octové kyseliny. Metoda byla nejprve použita u rajčat a dalších surovin [24].

2.2.2 Elektrochemické metody

Podstatou elektrochemických metod je studium toho, jak závisí elektrochemické chování roztoků na jejich složení a koncentraci. Objektem zkoumání je elektrochemický článek – soustava, v níž je analyzovaný roztok v kontaktu s elektrodami. Elektrody zprostředkují spojení článku s měřicím přístrojem, který sleduje některou z elektrických veličin.

- je-li elektrochemický článek zdrojem napětí jako důsledku spontánních dějů na elektrodách, používáme pro něj název *galvanický článek*
- *elektrolytickým článkem* se článek stává, dochází-li v něm k elektrolyze účinkem vnějšího zdroje napětí [25]

Vulcu a kol. [26] připravili elektrody na bázi guanin/thiocyosin a zlatých nanočástic, které byly analyzovány UV-VIS spektroskopii a transmisí elektronovou mikroskopií. Tyto nanočástice byly charakterizovány jako elektrochemický senzor pro stanovení mimo jiné i kyseliny askorbové. Tato čidla jsou citlivá a dobře reprodukovatelná.

Obsah vitamínu C lze stanovit i pomocí kyslíkové elektrody. Změnou potenciálu vlivem askorbát oxidázy a hovězího sérového albuminu, následované propojením s glutaraldehydem. Výsledky získané tímto biosenzorem byly srovnány s výsledky získanými titrací s 2,6-dichlorfenolindofenolem, výsledky se shodovaly a u metod se projevovaly stejné odchylky [27].

Další elektrochemické stanovení obsahu kyseliny askorbové je založeno na aplikaci methylenové zeleně jako čidla membrány na amperometrických senzorech. Testovaly se 2 typy elektrod, a to zlaté a platinové, obě po elektropolymerizaci methylenovou zelení. Na zlatých elektrodách byly polymerní vrstvy rozděleny rovnoměrněji, a tudíž byly oproti platinovým elektrodám na toto stanovení citlivější [28].

Voltametrická technika Behfara a kol. [29] je založena na studii IE křivek kyseliny askorbové při různých hodnotách pH. Výška píku první oxidační vlny je pro stanovení obsahu kyseliny směrodatná. Kyselina askorbová byla stanovována ve vodném prostředí prostřednictvím voltametrie se zlatými elektrodami. Tato metoda byla vyvinuta na stanovování hladiny vitamínu C v plazmě.

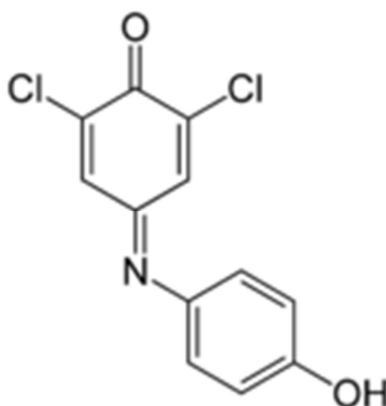
Další metodou na stanovení obsahu kyseliny askorbové je cyklická voltametrie. Oxidace kyseliny probíhá při 490 mV na platinové elektrodě (referentní elektrodou je zde SCE elektroda). Metoda byla určena k posouzení obsahu vitamínu C v ovocných šťávách [30].

Jako další metoda pro stanovení kyseliny askorbové v ovocném džusu a vzorcích léků byl použit průtokový injekční systém užívající modifikovanou grafitovou síťotiskovou elektrodu. Toto stanovení se jeví jako levné, univerzální a vhodné pro průmyslové využití [31].

Ke stanovení kyseliny askorbové v ovocných šťávách byla použita i metoda diferenční pulsní voltametrie s měď (II)-ftalokyanin uhlíkovou elektrodou [32].

2.2.3 Titrační stanovení 2,6-dichlorfenolindofenolem

Podstatou tohoto stanovení je extrakce kyseliny askorbové analyzovaného vzorku roztokem kyseliny šťavelové nebo roztokem kyseliny metafosforečné a octové, a poté následuje titrace barvivem (obr. 8) do lososově růžového zbarvení. Modré barvivo oxiduje kyselinu askorbovou na dehydroaskorbovou a samo se redukuje na bezbarvou sloučeninu, reakce probíhá v kyselém prostředí a tudíž je nezreagovaný přebytek barviva růžový [33, 34].



Obr 8: 2,6-dichlorfenolindofenol [35]

Tuto metodu lze použít pouze v nepřítomnosti interferujících látek (Fe, Cu, Sn, hydrogensulfidy, siřičitany, SiO₂ a redukčních činidel, které jsou přítomny v přehřátých vzorcích nebo v dlouho skladovaných vzorcích) a chromoforů [33].

Toto stanovení je vhodné pro většinu potravinářských výrobků. Bohužel není specifické, pokud jsou rušivé látky ve vyšších koncentracích je nutno použít speciálních postupů. Nejvyšší správnosti dosahuje u vzorků s nízkým obsahem kyseliny askorbové [36].

2.2.4 Spektrofotometrické metody

Ve spolupráci Vischnikina a kol. [37] byla testována spektrofotometrická metoda se syntetizovaným činidlem guanidinové soli heteropolymolybdenanu 11-molybdo-bismuthofosforečnanu. U tohoto stanovení nebyla prokázána interference s redukujícími činidly, cukry ani železnatými ionty. Výsledky této metody byly v souladu s výsledky získanými titrací 2,6-dichlorfenolindofenolem.

Roku 2008 byla vyvinuta citlivá a jednoduchá metoda založená na aktivujícím efektu na oxidaci barviva Ponceau 4R v přítomnosti mědi a borátovém pufru. Poté se při 22 °C po dobu jedné minuty spektrofotometricky stanovuje oxidační produkt. Metoda byla aplikována na stanovení kyseliny askorbové ve farmaceutických vzorcích [38].

Salkic a kol. [39] vyvinuli rychlou, přesnou a přímou spektrofotometrickou metodu na stanovení obsahu kyseliny L-askorbové. Tato metoda byla odzkoušena na vitaminových tabletách. Kyselina byla stabilizována kyselinou ethylendiamintetraoctovou v acetátovém pufru. Absorbance byla měřena při 256 nm, výsledky ovlivňuje přítomnost interferujících látek, jako jsou ionty železa, ostatní vitaminy a benzoáty. Výsledky se shodovaly s výsledky získanými jodometrickou titrací.

2.2.4.1 Stanovení 2,6-dichlorfenolindofenolem po extrakci xylenem

Podstatou tohoto stanovení je extrakce kyseliny askorbové analyzovaného vzorku roztokem kyseliny šťavelové nebo roztokem kyseliny metafosforečné a octové, poté se provede redukce kyseliny askorbové barvivem. Přebytečná barevná sloučenina se extrahuje xylenem a přebytek se stanovuje spektrofotometricky při vlnové délce 500 nm [33].

2.2.5 Polarografická metoda

Podstatou je oxidace kyseliny askorbové na rtuťové kapkové elektrodě a redukce chinoxalinového derivátu. Jedná se o velmi specifickou metodu, lze ji používat ke stanovení ve všech potravinářských materiálech [40].

2.3 Validace metody

Validace metody slouží ke statistickému prokázání spolehlivosti analytické metody včetně celého obslužného analytického systému, kdy proces získávání a zpracování experimentálních dat má významný vliv na konečný analytický výsledek. Validaci je možno definovat jako proceduru, jejímž cílem je demonstrovat a dokumentovat kvalitu analytické metody ustanovením definovaných kritérií a měřením hodnot těchto kritérií. Jednoduše řečeno se jedná o ověření platnosti zvoleného analytického postupu [41].

2.3.1 Validační parametry

Citlivost

Citlivost metody je definována jako rozdíl v koncentraci analytu, který odpovídá nejmenšímu rozdílu, jenž může být ještě detekován při odezvě instrumentace metody. Pro případ lineární závislosti $y = ax + b$ se jedná o směrnici kalibrační přímky vyjádřenou regresním koeficientem a [41].

Linearita

Linearita je chápána jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými, tj. odezvou instrumentace (analytickým signálem) a koncentrací analytu. Těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných charakterizuje korelační koeficient (R^2). Při lineární závislosti nabývá hodnoty +1 a čím více se blíží jedné, tím je závislost obou proměnných těsnější. Hodnota korelačního koeficientu nesmí klesnout pod hodnotu 0,98 [41].

Mez detekce a stanovitelnosti metody

Mez detekce (LOD) odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu [41]. Pro lineární závislosti spektrofotometrických metod platí pro výpočet koncentrace meze detekce vztah:

$$LOD = x_D = \frac{3 \cdot SD_L}{a} \quad (5)$$

Mez stanovitelnosti (LOQ) je nejmenší hodnota signálu, pro kterou je relativní směrodatná odchylka predikce z kalibračního modelu dostatečně malá a obvykle se pokládá hodnotě 0,1 [41]. Pro lineární závislosti spektrofotometrických metod platí pro výpočet koncentrace meze stanovitelnosti vztah:

$$LOQ = x_D = \frac{10 \cdot SD_L}{a} \quad (6)$$

Přesnost

Přesnost vyjadřuje míru rozptýlení výsledků pozorování okolo střední hodnoty. Přesnost závisí pouze na rozdělení náhodných chyb a nemá vztah k hodnotě skutečné. Výrok o přesnosti může být vztažen na jakýkoliv soubor měření uskutečněných za daných experimentálních podmínek, které mohou být zvoleny libovolně (opakovatelnost, reprodukovatelnost). Přesnost souboru měření může být vyjádřena kvantitativně některou z výběrových charakteristik rozptýlení, jako je výběrová odchylka, rozpětí a jiné. Nejčastěji se však vyjadřuje směrodatnou odchylkou nebo relativní směrodatnou odchylkou. Směrodatná odchylka udává kvadratický průměr odchylek hodnot znaku od jejich aritmetického průměru.

$$SD = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}} \quad (7)$$

Relativní směrodatná odchylka Sr je směrodatná odchylka, vyjádřená v procentech, vztažená na průměrnou hodnotu souboru \bar{x} [41].

$$Sr = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (8)$$

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

Cílem experimentální části bylo zavést a validovat na pracovišti ÚCHPBT spektrofotometrickou metodu stanovení vitamínu C po extrakci xylenem v barevných vzorcích. Metoda byla nejprve ověřována na vitaminových tabletách, potom na pomerančové šťávě a nakonec na barevných vzorcích.

Vitaminové tablety

Pro stanovení vitamínu C ve vitaminových tabletách byly použity tablety Celaskon s deklarovaným obsahem vitamínu C 250 mg v jedné tabletě. Ke stanovení byla jedna tableta rozetřena v třecí misce a kvantitativně převedena do odměrné baňky na 500 ml. Baňka byla doplněna extrakčním roztokem po rýsku a poté byl roztok přefiltrován.

Pomerančová šťáva

Ke stanovení vitamínu C byl použit vzorek džusu Hello 100% pomeranč. 5 ml tohoto vzorku bylo napipetováno do 50 ml odměrné baňky a doplněno extrakčním roztokem po rýsku.

Barevné vzorky

Jako barevné vzorky byly použity šťávy z následujících šlechtěných odrůd černého bezu: Allesö, Aurea, Sambu 1, Samyl 2 a Weihenstephan. Všechny uvedené odrůdy dodal Výzkumný ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.. Vzorky byly posbírány na konci léta roku 2011 a bobule jednotlivých odrůd byly uchovány v igelitových pytlích v mrazničce při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro stanovení byly vzorky rozmrazeny a pomocí mlýnku na ovoce byla získána šťáva, která byla zfiltrována nejprve přes vatou, a poté přes filtrační papír. Takto přichystaná šťáva byla uchovávána v plastových lahvích v mrazničce při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2 Metoda

Princip:

Po extrakci kyseliny askorbové ze zkušební vzorku roztokem kyseliny metafosforečné a kyseliny octové se provede redukce kyseliny askorbové barvivem 2,6-dichlorfenolindofenolem. Následně se přebytečná barevná sloučenina extrahuje xylenem a její přebytek se stanoví spektrofotometricky, měřením při vlnové délce 500 nm.

Použitelnost:

Normovaná metoda pro stanovení vitamínu C ve zbarvených vzorcích potravinářských produktů.

Chemikálie:

Roztok kyseliny metafosforečné a kyseliny octové o koncentraci 30 g/l (15 g kyseliny metafosforečné bylo rozpuštěno ve 200 ml vody a 40 ml ledové kyseliny octové a v odměrné baňce na 500 ml doplněno vodou po rýsku; roztok byl uchováván v ledničce a pravidelně připravován čerstvý), roztok 2,6-dichlorfenolindofenolu o koncentraci 250 mg/l (v odměrné baňce na 200 ml bylo rozpuštěno 50 mg sodné soli 2,6-dichlorfenolindofenolu ve 150 ml teplé vody, obsahující 42 mg hydroxidu sodného, a poté doplněno po rýsku vodou; roztok byl uchováván v ledničce a pravidelně připravován čerstvý), standardní roztok kyseliny askorbové o koncentraci 1 g/l, tlumivý roztok octan sodný/kyselina octová pH 4,0 (300 g bezvodého octanu sodného se bylo rozpuštěno v 700 ml vody a 1000 ml ledové kyseliny octové), xylene.

Přístroje a pomůcky:

Analytické váhy, zkumavky se zábrusem, odstředivka, spektrometr, pipety, kádinky, odměrná baňka 2000 ml, odměrná baňka 500 ml, odměrná baňka 200 ml, odměrná baňka 100 ml, odměrná baňka 50 ml.

Postup:

- *Příprava kalibrační křivky*

Byl připraven zásobní roztok kyseliny askorbové (1 g/l) rozpuštěním 100 mg kyseliny askorbové ve 100 ml odměrné baňce doplněné extrakčním roztokem. Dále byla připravena řada standardů o koncentracích 0,05 – 0,5 mg/ml. Poté bylo do zkumavek napipetováno 0,25 ml standardu, 0,25 ml tlumivého roztoku, 1,5 ml 2,6-dichlorfenolindofenolu a 5 ml xylenu. Zkumavky byly po přidání xylenu 10 sekund prudce protřepávány, 3 minuty odstředovány a poté byla změřena absorbance xylenové vrstvy při 500 nm.

- *Stanovení vitamínu C ve vitaminových tabletách*

Z předem připraveného a přefiltrovaného roztoku vzorku bylo do zkumavek napipetováno 0,25 ml, poté bylo přidáno 0,25 ml tlumivého roztoku, 1,5 ml 2,6-dichlorfenolindofenolu a 5 ml xylenu. Zkumavky byly po přidání xylenu 10 sekund prudce protřepávány, 3 minuty odstředovány a poté byla změřena absorbance xylenové vrstvy při 500 nm. Absorbance byla změřena třikrát.

- *Stanovení vitamínu C v pomerančové šťávě*

Z předem připraveného roztoku vzorku bylo do zkumavek napipetováno 0,25 ml, poté bylo přidáno 0,25 ml tlumivého roztoku, 1,5 ml 2,6-dichlorfenolindofenolu a 5 ml xylenu. Zkumavky byly po přidání xylenu 10 sekund prudce protřepávány, 3 minuty odstředovány a poté byla změřena absorbance xylenové vrstvy při 500 nm. Absorbance byla změřena třikrát.

- *Stanovení vitamínu C ve šťávě z černého bezu*

Ze vzorku rozmražené a přefiltrované šťávy bylo do 50 ml odměrné baňky napipetováno 5 ml a baňka byla doplněna extrakčním roztokem po rýsku. Poté bylo do předem připravených zkumavek napipetováno 0,25 ml zředěného vzorku a přidáno 0,25 ml tlumivého roztoku, 1,5 ml 2,6-dichlorfenolindofenolu a 5 ml xylenu. Zkumavky byly po přidání xylenu 10 sekund prudce protřepávány, 3 minuty odstředovány a poté byla změřena absorbance xylenové vrstvy při 500 nm. Absorbance byla změřena třikrát.

Výpočet:

Z rovnice regrese kalibrační křivky byla vypočítána koncentrace zředěného vzorku. Po vynásobení příslušným faktorem zředění, byl získán skutečný obsah vitamínu C ve vzorku.

Příklad pro hodnoty vzorku Allesö – kalibrační křivka 4. 3. 2013:

$$y = -1,6722x + 1,1836$$

$$c_{zř} = x = \frac{A_{500} - 1,1836}{-1,6722} = \frac{0,9083 - 1,1836}{-1,6722} = 0,164126 \text{ mg/ml}$$

- vzorek šťávy z bezu a džusu byl 10x zředěn:

$$c_{výsledná} = 10 \cdot c_{zř} = 1,6413 \text{ mg/ml} = \underline{\underline{1641,3 \text{ mg/l}}}$$

3.2.1 Validační parametry

Citlivost

Byla testována citlivost metody, přičemž kalibrační křivka byla v rozsahu koncentrací standardu kyseliny askorbové 0,05 – 0,5 mg/ml.

Tato statistická funkce byla vypočítána pomocí programu Microsoft Office Excel 2007.

Linearita

Pro testování linearity byla vytvořena škála roztoků standardu kyseliny askorbové o koncentracích 0,05 – 0,5 mg/ml a byla proměřena kalibrační křivka. Každý bod kalibrační křivky byl proměřen třikrát a do grafu byla použita jejich průměrná hodnota.

Tato statistická funkce byla vypočítána pomocí programu Microsoft Office Excel 2007.

Mez detekce a stanovitelnosti

Hodnoty mezí detekce a stanovitelnosti byly vypočteny z rovnice kalibrační závislosti.

Hodnoty použité při výpočtu byly zjištěny pomocí programu Microsoft Office Excel 2007.

Přesnost

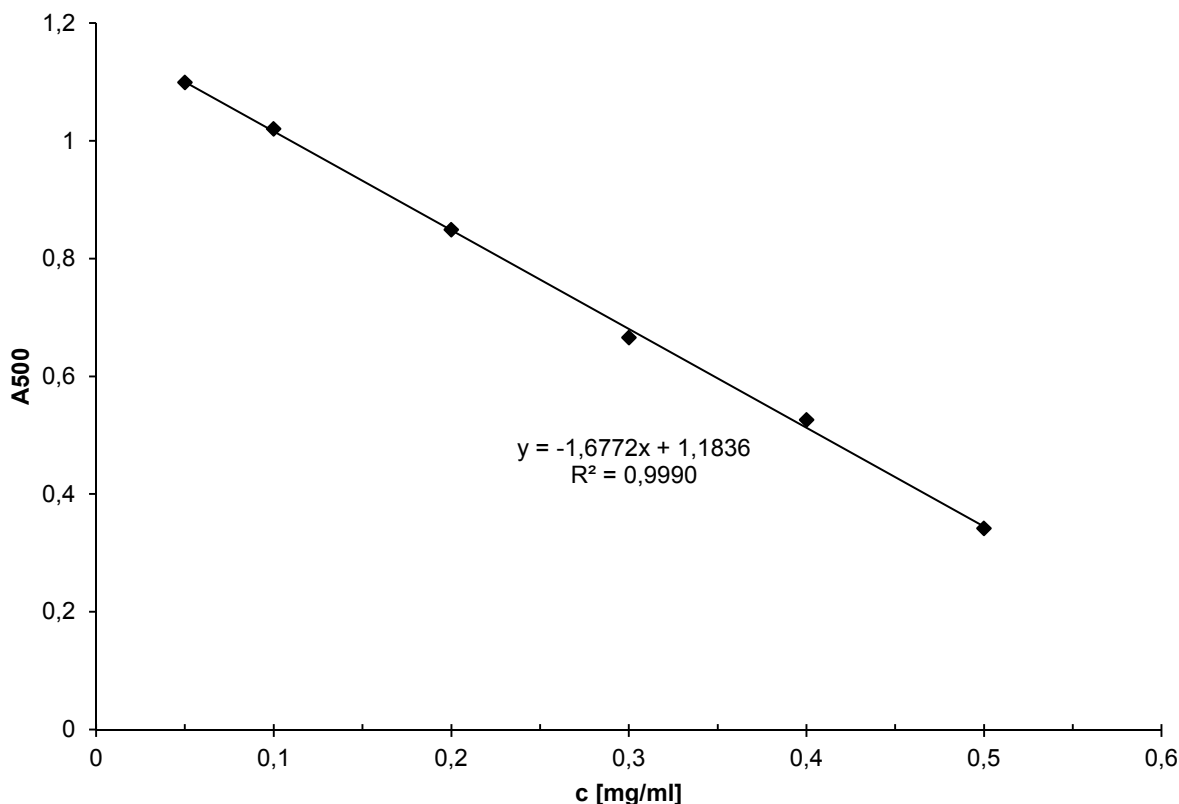
Pro určení přesnosti metody byla použita směrodatná odchylka za podmínek opakovatelnosti, což je výběrová směrodatná odchylka výsledků měření získaných za podmínek opakovatelnosti. Podmínky opakovatelnosti jsou podmínky, při nichž tentýž analytik získá nezávislé výsledky zkoušky stejnou metodou, na stejném vzorku, ve stejné laboratoři, v krátkém časovém intervalu a za použití stejného laboratorního vybavení.

Tato statistická funkce byla vypočítána pomocí programu Microsoft Office Excel 2007.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Kalibrační křivka

Nejprve byla sestrojena kalibrační závislost absorbance na koncentraci kyseliny askorbové ve standardech.



Graf č. 1: Kalibrační křivka

4.2 Validační parametry

Citlivost

Kalibrační závislost byla lineární ($R^2 = 0,9990$) a citlivost analytické metody byla vypočítána na $-1,6772$ (Graf č. 1).

Linearita

Z grafu č. 1 je patrné, že kalibrační křivka je lineární, což potvrzuje i korelační koeficient, jehož hodnota je $R^2 = 0,9990$. Tato hodnota splňuje podmínku linearity, která říká, že korelační koeficient nesmí být nižší než 0,98.

Mez detekce a stanovitelnosti

Tab. 1: Vypočtené hodnoty z rovnice kalibrační křivky

	koeficienty	směrodatné odchylky koeficientů
a	-1,6772	0,0260
b	1,1836	0,0079

$$LOD = \frac{3 \cdot SD_L}{a} = \frac{3 \cdot 0,0260}{1,6772} = \underline{\underline{0,0466 \text{ mg/ml}}}$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot SD_L}{a} = \frac{10 \cdot 0,0260}{1,6772} = \underline{\underline{0,1552 \text{ mg/ml}}}$$

Rovnice kalibrační křivky je $y = -1,6772x + 1,1836$. Koeficient a lze při výpočtech zanedbat, protože v horní a dolní mezi spolehlivosti je zahrnuta 0.

Přesnost

Odchylka nabývala hodnot v rozmezí 0,41 – 2,94 %, což lze považovat za vcelku přesné stanovení. Nejvyšší hodnota relativní směrodatné odchylky byla zjištěna u standardu o koncentraci 0,4 mg/ml.

4.3 Stanovení kyseliny askorbové v reálných vzorcích

4.3.1 Stanovení vitamínu C ve vitaminových tabletkách

Obsah vitamínu C v jedné tabletě byl stanoven na 224,849 mg, s hodnotou směrodatné odchylky 0,0304 a relativní směrodatnou odchylkou 3,04 %. Deklarovaný obsah kyseliny askorbové činí 250 mg v jedné tabletě. Výsledek spektrofotometrického stanovení se od deklarované hodnoty liší o 10 %.

4.3.2 Stanovení vitamínu C u pomerančové šťávy

Obsah vitamínu C v pomerančovém džusu byl stanoven na 506,301 mg/l. Při kontrolním titračním stanovení byl obsah vitamínu vypočten na 551,25 mg/l, tyto výsledky se od sebe liší o 8 %. Směrodatná odchylka byla při spektrofotometrickém stanovení vypočítána na 0,0031, relativní směrodatná odchylka na 0,31 %.

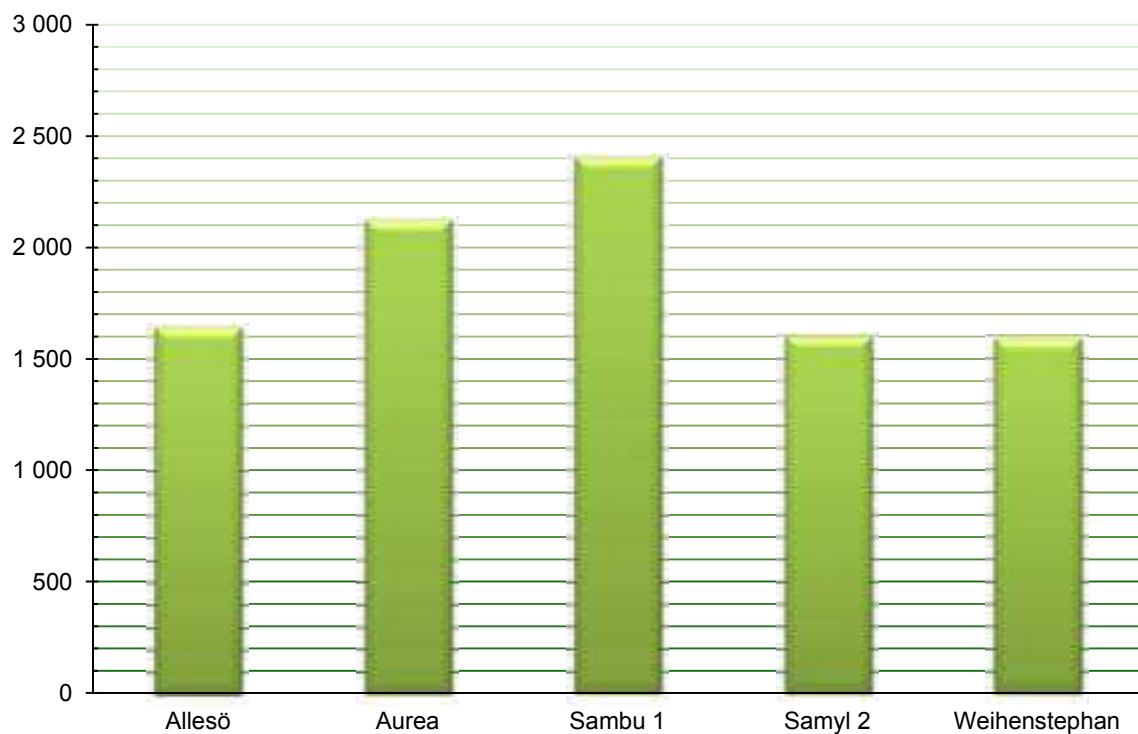
4.3.3 Stanovení vitamínu C ve šťávě ze šlechtěných odrůd černého bezu

Tab. 2: Shrnutí obsahu vitamínu C ve šlechtěných odrůdách černého bezu

odrůda bezu	koncentrace vit. C [mg/l]	SD	Sr [%]
Allesö	1 641,3	0,0564	5,64
Aurea	2 120,3	0,0380	3,80
Sambu 1	2 404,5**	0,0995	9,95
Samyl 2	1 599,5	0,0497	4,97
Weihenstephan	1 587,6*	0,0595	5,95
<i>medián</i>	1 641,3		

* nejmenší získaná hodnota

** největší získaná hodnota



Graf č. 3: Obsah vitamínu C v jednotlivých odrůdách

V literatuře se neudává obsah vitamínu C v jednotlivých šlechtěných odrůdách černého bezu, tak lze pouze porovnat získané výsledky se známými hodnotami jiného, na tento vitamin bohatého, ovoce. Koncentrace vitamínu C, například v černém rybízu, se udává v rozmezí 1 100 – 3 000 mg/l [2], což se s mými získanými výsledky shoduje (1 500 – 2 500 mg/l).

5 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo zavést, validovat a ověřit na reálných vzorcích spektrofotometrickou metodu stanovení kyseliny askorbové ve zbarvených vzorcích 2,6-dichlorfenolindofenolem po extrakci xylenem.

Citlivost metody byla určena na $-1,6772$ a linearita na $0,9990$, obě hodnoty byly vypočteny z rovnice lineární regrese. Mez detekce metody byla stanovena na $0,0466$ mg/ml a mez stanovitelnosti na $0,1552$ mg/ml. Dále byla zkoumána přesnost metody pomocí směrodatné odchylky za podmínek opakovatelnosti, odchylky se pohybovaly do $3,00$ %, což lze považovat za přesné.

Metoda byla ověřována na vzorcích vitaminových tablet, pomerančové šťávy a šťávy ze šlechtěných odrůd černého bezu.

U vitaminových tablet Celaskon byl obsah kyseliny askorbové určen na $224,849$ mg v jedné tabletě s relativní odchylkou $3,04$ %. Udávaný obsah na obale je 250 mg, odchylka od deklarovaného obsahu činí 10 %.

U stanovení koncentrace vitamínu C ve 100 % pomerančové šťávě Hello, byla hodnota obsahu stanovena na $506,301$ mg/l s relativní odchylkou $0,31$ %. Při kontrolním titračním stanovení byl obsah stanoven na $551,25$ mg/l. Minimální obsah vitamínu C v pomerančové šťávě daný normou je 200 mg/l, testovaný vzorek tedy vyhovoval normě.

Obsah vitamínu C byl ve šlechtěném bezu stanoven na $1\ 500 - 2\ 500$ mg/l, v závislosti od jednotlivých odrůd. Medián měl hodnotu $1\ 641,3$ mg/l. Nejmenší vypočtená hodnota byla stanovena na $1\ 587,6$ mg/l u odrůdy Weihenstephan. Nejvyšší koncentrace vitamínu C byla zjištěna u odrůdy Sambu 1, a to $2\ 404,5$ mg/l. Velmi podobnou hodnotu jako odrůda Sambu 1 vykazovala i odrůda Aurea ($2\ 120,3$ mg/l).

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] [www.chemicalland21.com](http://chemicalland21.com) [online]. [cit. 2013-03-18]. Dostupné z WWW: <http://chemicalland21.com/lifescience/foco/ASCORBIC%20ACID.htm>
- [2] VELÍŠEK, J.: *Chemie potravin 2*. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999. 328 s. ISBN 80-902391-4-5
- [3] www.ped.muni.cz [online] [cit. 2013-03-18]. Dostupné z WWW: <http://www.ped.muni.cz/wchem/comenius2000/vitaminC/struktura.htm>
- [4] BRÁZDOVÁ, Z.: *Výživa člověka*, 1. vydání, VVŠ PV Vyškov, 1995
- [5] MACHÁČEK, V; PANCHARTEK, J; PYTELA, O. *Organická chemie*. 3. vyd. Pardubice: Fakulta chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-7194-763-6
- [6] RIZZOLO, A.; BRAMBILLA, A.; VALSECCHI, S.; ECCHER-ZERBINI, P. *Evaluation of sampling and extraction procedures for the analysis of ascorbic acid from pear fruit tissue*. Food Chemistry. 2002, roč. 77, č. 2, s. 257-262.
- [7] HERNÁNDEZ, Y; GLORIA LOBO, M; GONZÁLEZ, M. *Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods*. Food Chemistry. 2006, roč. 96, č. 4, s. 654-664.
- [8] en.wikipedia.org [online] [cit. 2013-03-24]. Dostupné z WWW: http://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin_C
- [9] *Abeceda zdraví* [online] 2005 [cit. 2013-03-18]. Drogy. Dostupné z WWW: <http://drogy.abecedazdravi.cz/jak-prestat-kourit>
- [10] PÁNEK, J., POKORNÝ, J., DOSTÁLOVÁ, J.: *Základy výživy a výživová politika*, 1. vydání, Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2002, s. 219, ISBN 80-7080-468-8
- [11] HENRY, C. J. K., CHAPMAN, C.: *Nutrition Handbook for Food Processors*. Woodhead Publishing, 2002, p. 416, ISBN 1.59124-430-7
- [12] [www.nemoci.vitalion.cz](http://nemoci.vitalion.cz) [online] [cit. 2013-03-14]. Dostupné z WWW: <http://nemoci.vitalion.cz/nedostatek-vitaminu-c-a-skupiny-b/>
- [13] KHASSAF, M. and comp.: *Effect of vitamin C supplements on antioxidant defence and stress proteins in human lymphocytes and skeletal muscle*, Journal of physiology London 549 (2), 2003, ISSN: 0022-3751

- [14] MAHALANABIS, D. and comp.: *Antioxidant vitamins E and C as adjunct therapy of severe acute lower-respiratory infection in infants and young children*. European journal of clinical nutrition 60, p. 673-680, 2006, ISSN: 0954-3007
- [15] VODRÁŽKA, Z., *Biochemie 3*, Akademie věd České republiky, 1993
- [16] www.hort.purdue.edu [online] [cit. 2013-03-18]. Dostupné z WWW: http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/barbados_cherry.html
- [17] www.izekesivek.hu [online] [cit. 2013-03-1]. Dostupné z WWW: <http://www.izekesivek.hu/index.php?p=gyogynovenyek&l=98>
- [18] FENNEMA, O. R.: *Food chemistry*. 3. vydání, New York Marcel Dekker, Inc., 1996., p. 1069, ISBN 0-8247-9691-8
- [19] www.chemicalbook.com [online] [cit. 2013-03-18]. Dostupné z WWW: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB01270352.htm
- [20] NOVÁKOVÁ, L.; SOLICH, P.; SOLICHOVÁ, D.: *HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids*. Trends in Analytical Chemistry, 2008, roč. 27, č. 10, s. 942–958. ISSN 0165-9936
- [21] DEUTSCH, J. C.: *Dehydroascorbic acid*. Journal of chromatography A, 2000, roč. 881, č. 1-2, s. 299–307, ISSN 0021-9673
- [22] ADAM, M.; PAVLÍKOVÁ, P.; ČÍŽKOVÁ, A.; BAJEROVÁ, P.; VENTURA, K.: *Microextraction by packed sorbent (MEPS) as a suitable selective method for L-ascorbic acid determination in beverages*. Food chemistry. 2012, p. 1613 – 1618, ISSN: 0308-8146
- [23] NOLLET, L. M. L.: *Food Analysis by HPLC*. 2. vyd. New York: Marcel Dekker, Inc., 2000. 1049 s. ISBN 0-8247-8460-X
- [24] FRENICH, A. G.; TORRES, M. E. H.; VEGA, A. B.; VIDAL, J. L. M.; BOLANOS, P. P.: *Determination of ascorbic acid and carotenoids in food commodities by liquid chromatography with mass spectrometry detection*. Journal of agricultural and food chemistry. 2005, p. 7371 - 7376, ISSN: 0021-8561
- [25] KLOUDA, P.: *Moderní analytické metody*. 2. vyd., 2003, 132 s. Vydavatelství Pavel Klouda

- [26] VULCU, A.; GROSAN, C.; MURESAN, LM.; PRUNEANU, S; OLENIC, L.: *Modified gold electrodes based on thiocytosine/guanine-gold nanoparticles for uric and ascorbic acid determination*. *Elektrochimica acta*, 2013, p. 839 – 846, ISSN: 0013-4686
- [27] VARODI, C.; AXUC. O.; CIORCERI, S.; GLIGOR, D.; POPESCU, I. C.; MURESAN, L. M.: *Biosensor based on ascorbate oxidase for ascorbic acid determination*. *Revue roumaine de chimie*. 2010, p. 859, ISSN: 0035-3930
- [28] KOSSAKOWSKA, A.; PIJANOWSKA, D. G.; KRUK, J.; TORBICZ, W.: *Electropolymerization of methylene green on gold and platinum electrodes for quantitative ascorbic acid determination*. *Sensor letters*. 2010, p. 713 – 719, ISSN: 1546-198X
- [29] BEHFAR, A. A.; SADEGHI, N.; JANNAT, B.; OVEISI, M. R.: *Determination of L-ascorbic acid in plasma by voltammetric method*. *Iranian journal of pharmaceutical research*. 2010. p. 123 - 128, ISSN: 1735-0328
- [30] PISOSCHI, A. M.; DANET, A. F.; KALINOWSKI, S.: *Ascorbic acid determination in commercial fruit juice samples by cyclic voltammetry*. *Journal of automated methods & management in chemistry*. 2008, ISSN: 1463-9246
- [31] MATTOS, IL.; PADILLA, F.; ZAGAL, J. H.; FALCAO, E. H. L.; SEGURA, R.: *Screen-printed electrode modified with silver hexacyanoferrate-nafion (R) for ascorbic acid determination*. *Journal of the chilean chemical society*. 2011, p. 803 – 807, ISSN: 0717-9324
- [32] VAZQUEZ, D.; TASCÓN, M.; DEBAN, L.: *Determination of ascorbic acid in commercial juices, on a modified carbon paste electrode, by using a Taguchi experimental design*. *Food analytical methods*. 2012, p. 441 – 447, ISSN: 1936-9751
- [33] ČSN ISO 6557/2: 1996. *Ovoce, zelenina a výrobky z nich – Stanovení obsahu kyseliny askorbové. Část 2: Běžné metody*. Praha: Český normalizační institut, 1996. 8 s.
- [34] [www.web.vscht.cz](http://web.vscht.cz) [online] [cit. 2013-03-20]. Dostupné z WWW: <http://web.vscht.cz/kohoutkj/navodVitC%20HPLC%202006.pdf>
- [35] en.wikipedia.org [online] [cit. 2013-03-20]. Dostupné z WWW: <http://en.wikipedia.org/wiki/Dichlorophenolindophenol>
- [36] HRSTKA, Miroslav; VESPALCOVÁ, Milena. *Praktikum z analytické chemie potravin*. Brno, 2006. 58 s. VUT, Fakulta chemická.

- [37] VISHNIKIN, A. B.; SVINARENKO, T. Y.; SKLENÁŘOVÁ, H.; SOLICH, P.; BAZEL, Y. R.; ANDRUCH, V.: *11-molybdo-bismuthophosphate-A new reagent for the determination of ascorbic acid in batch and sequential injection systems*. Talanta. 2010, p. 1838 – 1845, ISSN: 0039-9140
- [38] GRAHOVAC, Z. M.; MITIC, S. S.; PECEV, T. G.; PECEV, E. T.; PAVLOVI, A. N.: *Kinetic spectrophotometric determination of ascorbic acid in pharmaceutical samples by oxidation of Ponceau 4R by hydrogen peroxide*. Journal of the chinese chemical society. 2008, p. 137 - 142, ISSN: 0009-4536
- [39] SALKIC, M.; JASIC, M.; KERAN, H.; PASALIC, H.: *Determination of L-ascorbic acid using direct ultraviolet spectrophotometry*. Actual talks on agricultural engineering. 2008, p. 451 - 458, ISSN: 1333-2651
- [40] HÁLKOVÁ, Jana; RUMÍŠKOVÁ, Marie; RIEGLOVÁ, Jana. *Analýza potravin*. 2. vyd.. Újezd u Brna: RNDr. Ivan Straka, 2001. Vitamíny, s. 73. ISBN 80-86494-02-0.
- [41] www.vscht.cz [online] [cit. 2013-04-14]. Dostupné z WWW: http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/ana/validace.pdf