

# **Stanovení vitamínu C metodou HPLC s rozdílnou možností detekce**

Bc. Kamila Šimánková

---

Diplomová práce  
2006



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav potravinářského inženýrství a chemie  
akademický rok: 2005/2006

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kamila ŠIMÁNKOVÁ**  
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie a ekonomika výroby tuků, detergentů  
a kosmetiky**

Téma práce: **Stanovení vitamínu C metodou HPLC s rozdílnou  
možností detekce**

Zásady pro vypracování:

1. Teoretické pojednání o fyziologických účincích vitamínu C
2. Základní principy kapalinové chromatografie
3. Zavedení metodiky pro stanovení vitamínu C metodami HPLC-UV/VIS, HPLC-ECD
4. Optimalizace izolačního postupu vitamínu C z reálných vzorků

Rozsah práce:  
Rozsah příloh:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury:  
Dle doporučení vedoucího DP.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Daniela Kramářová, Ph.D.**  
Ústav potravinářského inženýrství a chemie  
Datum zadání diplomové práce: **10. října 2005**  
Termín odevzdání diplomové práce: **31. května 2006**

Ve Zlíně dne 20. dubna 2006

  
prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.  
děkan



  
prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.  
ředitel ústavu

## **ABSTRAKT**

Cílem této práce bylo vypracování vhodného extrakčního postupu k izolaci vitamínu C a současně zavedení optimálních chromatografických metod pro stanovení vitamínu C v ovoci a zelenině. Ke stanovení vitamínu C byla použita metoda HPLC-UV/VIS a HPLC-ECD. Jako optimální provozní metoda ke stanovení vitamínu C byla ověřena titrační metoda s 2,6-dichlorfenolindofenolem.

Klíčová slova: vitamin C, kyselina askorbová, HPLC-UV/VIS, HPLC-ECD

## **ABSTRACT**

This aim of this work was to develop a suitable procedure for extraction of the vitamin C and installation of optimal chromatographic methods for determination of vitamin C in fruit and vegetables. The HPLC-UV/VIS and the HPLC-ECD was used to determine vitamin C, in addition vitamin C was determined by 2,6-dichlorphenolindofenol.

Keywords: vitamin C, ascorbic acid, HPLC-UV/VIS, HPLC-ECD

Poděkování:

Nejprve bych chtěla touto formou poděkovat vedoucí diplomové práce Ing. Daniele Kramářové, Ph.D. a Ing. Soni Škrovánkové, Ph.D. za odborné vedení v celém průběhu diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat své rodině za všestrannou podporu během studia.

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>9</b>
<b>1 VITAMIN C</b> .....	<b>10</b>
1.1 HISTORIE VITAMINU C.....	12
1.2 STRUKTURA A CHEMISMUS VITAMINU C.....	13
1.3 REAKCE VITAMINU C S VOLNÝMI RADIKÁLY.....	14
1.4 VZNIK KYSELINY ASKORBOVÉ.....	16
1.5 STABILITA VITAMINU C.....	16
1.6 FYZIOLOGIE VITAMINU C .....	18
1.7 VÝSKYT .....	20
1.8 AVITAMINOSA, HYPOVITAMINOSA A NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY VITAMINU C.....	21
1.8.1 Antivitaminy vitamínu C.....	22
1.9 DOPORUČENÁ DENNÍ DÁVKA VITAMINU C.....	23
<b>2 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE</b> .....	<b>24</b>
2.1 PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ.....	27
HPLC 27	
ESA Coulochem III multi - elektrodový detektor .....	29
2.2 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ KVANTITATIVNÍCH ANALÝZ .....	30
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>33</b>
<b>3 METODIKA</b> .....	<b>34</b>
3.1 CHEMIKÁLIE.....	34
POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY .....	34
3.2 METODY.....	35
3.2.1 Titrační stanovení vitamínu C.....	35
3.2.2 Stanovení vitamínu C metodou HPLC-UV/VIS .....	37
3.2.3 Kalibrační křivka pro stanovení vitamínu C metodou HPLC-UV/VIS .....	38
3.2.4 Stanovení vitamínu C metodou HPLC-ECD .....	38
3.2.5 Kalibrační křivka pro stanovení vitamínu C metodou HPLC-ECD.....	39
<b>4 VÝSLEDKY A DISKUSE</b> .....	<b>40</b>
4.1 TITRAČNÍ STANOVENÍ VITAMINU C 2,6 DICHLORFENOLINDOFENOLEM.....	40
4.1.1 Titrační stanovení vitamínu C v ovoci .....	40
4.1.2 Titrační stanovení vitamínu C v zelenině .....	44
4.1.3 Celkové srovnání vitamínu C ve vzorcích ovoce a zeleniny titrační metodou.....	47
4.2 STANOVENÍ VITAMINU C METODOU HPLC-UV/VIS.....	47
4.2.1 Kalibrační křivka pro stanovení vitamínu C metodou HPLC-UV/VIS .....	47
4.2.2 Stanovení vitamínu C metodou HPLC-UV/VIS v ovoci .....	48

4.2.3	Stanovení vitamínu C metodou HPLC-UV/VIS v zelenině.....	52
4.3	STANOVENÍ VITAMINU C METODOU HPLC-ECD .....	55
4.3.1	Kalibrační křivka pro stanovení vitamínu C metodou HPLC-ECD.....	55
4.3.2	Stanovení vitamínu C metodou HPLC-ECD v ovoci .....	58
4.3.3	Stanovení vitamínu C metodou HPLC-ECD v zelenině .....	68
4.3.4	Metoda standardního přídatku vitamínu C pro HPLC-ECD.....	73
4.3.5	Celkové srovnání vitamínu C ve vzorcích ovoce a zeleniny .....	73
<b>ZÁVĚR.....</b>		<b>76</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>		<b>CHYBA! ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>		<b>81</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>		<b>82</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>		<b>83</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>		<b>88</b>

## ÚVOD

Vitaminy jsou exogenní esenciální nízkomolekulární sloučeniny nezbytné pro život organismu, které si však heterotrofní organismus nedokáže sám syntetizovat a musí být dodávány zvnějšku. Vitaminy jsou organické molekuly, které plní úlohu katalyzátorů při biologických reakcích našeho těla. Velmi důležitou roli hrají antioxidanty, které jsou tzv. lapači volných radikálů. Při správné aplikaci mohou antioxidanty výrazně pomalit oxidační proces v biologickém objektu a tím prodloužit životnost citlivých organických sloučenin přítomných jako složky tkání.

Jedním z těchto významných antioxidantů je vitamin C neboli kyselina L-askorbová. Vitamin C je nejrozšířenější ze všech vitaminů. Je to i nejhojněji používaný potravinový doplněk. Skutečný rozsah jeho příznivých účinků však může překvapit i ty, kteří se domnívají, že dobře znají jeho všestranné použití. Dnes je zájem o tento vitamin především soustředěn na jeho schopnost chránit tkáňové buňky. Vitamin C působí především uvnitř buněk.

Kyselina askorbová je jedním z nejsilnějších biologických oxidačně-redukčních systémů a kromě schopností reagovat s volnými radikály je v organismu využívána i k regeneraci aktivních forem jiných antioxidantů. Brzdí tak řetězovou oxidační reakci. Jednou z hlavních biologických funkcí tohoto oxidačně redukčního systému je podíl na přenosu vodíku a elektronů z výchozích substrátů až na molekulární kyslík a potřeba pro lidský metabolismus je značná.

Jelikož v dnešní době se nám dostává čím dál menší přísun vitamínu C a to má pak negativní důsledky na organismus, je nesmírně nutná prevence a to úpravou stravovacích návyků s cílem obohatit stravu o vhodné komplexní zdroje. Nezanedbatelný je rovněž životní styl s negativními návyky, poněvadž riziko poškození organismu stoupá zejména u kuřáků, alkoholiků a obézních jedinců a rovněž při nadměrném vystavování těla UV záření. V případě nedostatečného přísunu potřebného vitamínu C v potravě je možnost podávání výživových doplňků a vhodných kombinovaných preparátů obsahující vitamin C.



## I. TEORETICKÁ ČÁST

## 1 VITAMIN C

Biokatalyzátory jsou látky, které v organismu vykonávají předem dané řídicí a regulační funkce. Vznikají-li přímo v živých objektech, pro něž jsou nezbytné, pak hovoříme o endogenních biokatalyzátorech. Mezi ně patří např. enzymy a hormony. Mnohé organismy však nedokáží veškeré biokatalyzátory syntetizovat a musí je přijímat zvnějšku, obvykle potravou. Jedná se o vitaminy, nezbytné pro živočichy, některé orgány rostlin a pro četná množství mikroorganismů. Takové biokatalyzátory nazýváme exogenní.

Nejdůležitější biokatalyzátory můžeme rozdělit na:

- Vitaminy
- Hormony
- Enzymy [1].

Vitaminy jsou exogenní esenciální nízkomolekulární sloučeniny nezbytné pro život organismu, které si však heterotrofní organismus nedokáže sám syntetizovat (někdy pouze v omezené míře) a musí být dodávány zvnějšku. Jako příklad vitamínu, který si lidský organismus může do jisté míry sám syntetizovat, můžeme uvést syntézu niacinu z tryptofanu. Vitamíny jsou organické molekuly, které plní úlohu katalyzátorů při biologických reakcích našeho těla. Katalyzátor je látka, která umožní proběhnutí chemické reakce za použití menší aktivační energie a kratšího času, než by to vyžadovaly standardní podmínky. Pokud tyto katalyzátory chybějí, pak mohou selhat normální tělesné funkce a tím může dojít k onemocnění. Vitamíny jsou tělem žádány v malých množstvích, řádově v mg nebo  $\mu\text{g}\cdot\text{den}^{-1}$  [2].

Vitaminy nejsou pro organismus ani zdrojem energie ani stavebními jednotkami tkání. Vykonávají v organismu několik funkcí. Plní v živých objektech významnou úlohu prekurzorů kofaktorů různých enzymů (vitaminy skupiny B), jiné se uplatňují v oxidačně redukčních systémech (vitamin C, vitamin E) apod. [1].

Potřeba jednotlivých vitaminů může být zásadně ovlivněna některou ze složek potravin, které zabrání plnému využití daného vitamínu nebo jej inhibují. Takovým látkám pak říká-

me antivitaminy. Jedná se o látky inhibující určitým mechanismem funkci daného vitamínu, což může vést až k projevům deficiencie.

Nedostatek každého vitamínu se projevuje u živých objektů chorobnými příznaky, které v lehčích formách označujeme jako hypovitaminosa, v těžších jako avitaminosa. Přestože většina příznaků avitaminosy po dodání nedostatkového vitamínu rychle mizí, dlouhotrvající avitaminosa může vést až ke smrti organismu. Příčinou nedostatečné resorpce vitamínů bývá většinou onemocnění zažívací soustavy, např. zánětlivá a průjmová onemocnění. Při těchto chorobách je třeba dbát na dostatečný přísun vitamínů. Naopak nadbytek některých vitamínů se označuje jako hypervitaminosa. V našich klimatických podmínkách se s ní prakticky nesetkáváme, objeví se většinou ve spojitosti s nadměrným přísunem pomocí aditivních preparátů [3].

Mezi jednotlivými vitamíny neexistují po stránce chemické žádné strukturní vztahy, podle nichž by mohly být klasifikovány. Pro jejich označení se používají buď písmena abecedy, přičemž vitamíny s podobnými fyziologickými účinky jsou dále rozlišeny číselnými indexy, nebo názvy odvozenými od chemického složení vitamínů. Důležitým rozlišovacím znakem je jejich rozpustnost. O vitamínech rozpustných v tucích mluvíme jako o lipofilních vitamínech,

tj. vitamínech nerozpustných ve vodě. Lipofilní vitamíny vykazují různé rozmanité funkce. Například vitamín A<sub>1</sub> (*all-trans*-retinol) se uplatňuje v biochemických reakcích zrakového vjemu. Ve vodě rozpustné vitamíny nazýváme hydrofilní. Funkce hydrofilních vitamínů spočívá v jejich katalytickém účinku, protože se uplatňují zejména jako kofaktory různých enzymů a to v metabolismu nukleových kyselin, proteinů, sacharidů, lipidů aj. Hydrofilní vitamíny nebývají v organismu zpravidla vůbec skladovány a jejich přebytek je vylučován močí, naopak lipofilní vitamíny jsou ukládány v játrech.

#### **Mezi vitamíny rozpustné ve vodě řadíme:**

Vitamin B<sub>1</sub> (thiamin)

Vitamin B<sub>2</sub> (riboflavin)

Vitamin B<sub>3</sub> (kyselina nikotinová a její amid)

Vitamin B<sub>5</sub> (kyselina pantothenová)

Vitamin B<sub>6</sub> (pyridoxin)

Vitamin B<sub>9</sub> (kyselina listová)

Vitamin B<sub>12</sub> (kyanokobalamin, dřívější název korinoidy)

Kyselina lipová

Biotin (dříve nazýván vitamin H)

Bioflavonoidy (dříve řazeny jako vitamin P)

Vitamin C (kyselina L-askorbová a L-dehydroaskorbová)

### **Mezi vitaminy rozpustné v tucích patří:**

Vitamin A (retinol) a jeho provitaminy (karotenoidy)

Vitaminy D (kalciferoly)

Vitaminy E ( tokoferoly a tokotrienoly)

Vitaminy K (fylochinony, farnochinony)

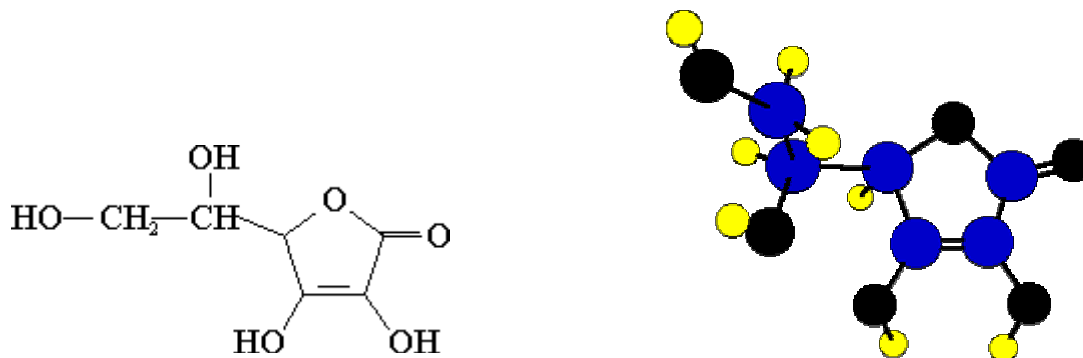
Vitamin F (esenciální mastné kyseliny) [1].

## **1.1 Historie vitamínu C**

K jednomu z nejznámějších projevů avitaminosy vitamínu C patří kurděje (scorbut), jejichž následky byly pozorovány už na kosterních nálezech z doby kamenné a bronzové. V roce 1747 objevil skotský lékař James Lind "záračnou moc" citrusových plodů. Trvalo to však ještě dalších 200 let, než se vědcům vitamín C podařilo izolovat [4].

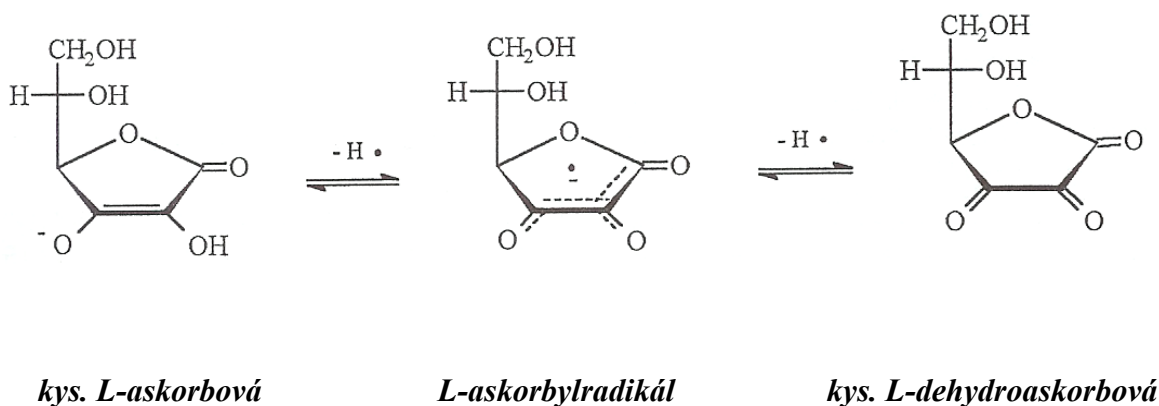
Vitamín C poprvé izoloval v roce 1926 maďarský vědec Albert Szent-Györgyi během jeho pobytu v cambridgské biochemické laboratoři. Nejprve získal necelý 1 g bělavé krystalické látky z hovězí nadledvinkové kůry, později další ze šťávy pomeranče a zelí. V roce 1928 tuto látku přejmenoval na hexuronovou kyselinu. První krystalky vitamínu C se začaly vyrábět v roce 1932. V následujícím roce Szent-Györgyi spolu s W. N. Haworthem přejmenovali vitamín na dnešní název kyselina askorbová. V roce 1937 obdržel Albert Szent-Györgyi za svoji práci za své objevy související s vitamínem C Nobelovu cenu [5].

## 1.2 Struktura a chemismus vitamínu C



Obr.1 Vitamin C

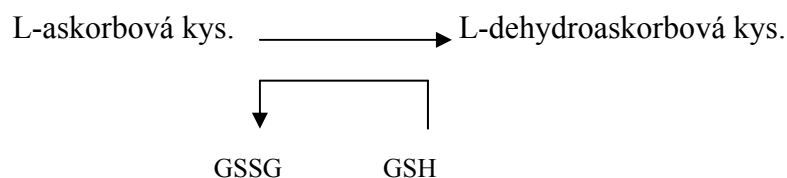
Komerční vitamin C je často směs kyseliny askorbové, askorbátu sodného nebo dalších askorbátů. Ze čtyř možných stereoisomerů vykazuje aktivitu vitamínu C pouze kyselina L-askorbová [6].



Obr.2 Oxidačně-redukční systém vitamínu C

Kyselina L-askorbová, obecně známá jako vitamin C, je  $\gamma$ -laktón hexonové kyseliny s endiolovou strukturou na druhém a třetím uhlíku. Lze ji odvodit od několika různých hexos. Názvem vitamin C se však označuje nejen kyselina L-askorbová, ale také celý její reverzibilní redoxní systém, který zahrnuje navíc její L-askorbylradikál (kyselinu L-monodehydro-askorbovou) a kyselinu L-dehydroaskorbovou [1].

Endiolový systém v konjugaci s karbonylovou skupinou uděluje kyselině L-askorbové dosti značnou kyselost. L-dehydroaskorbová kyselina může být zpětně redukována na kyselinu L-askorbovou, např. pomocí reductantu glutathionu (GSH), který oxidací vytvoří zdvojenou molekulu s -S-S- můstkem (GSSG).



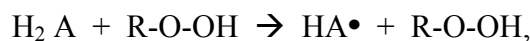
Obr.3 Zpětná redukce L-dehydroaskorbové kyseliny

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. Tuto oxidaci katalyzují různé enzymy jako jsou *peroxidasa*, *askorbasa* nebo *cytochromoxidasa*. 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 [1].

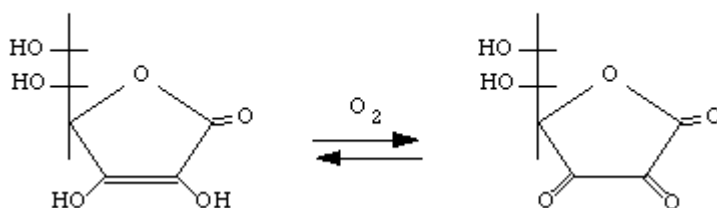
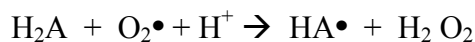
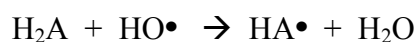
### 1.3 Reakce vitaminu C s volnými radikály

Kyselina askorbová i její isomery a deriváty mohou reagovat s volnými radikály. Brzdí tak řetězovou oxidační reakci a účinně působí jako antioxidanty. Reakci kyseliny askorbové s peroxylovým radikálem mastné kyseliny (R-O-O•), případně s alkoxylovým radikálem

(RO•), lze schematicky znázornit následující rovnicí:



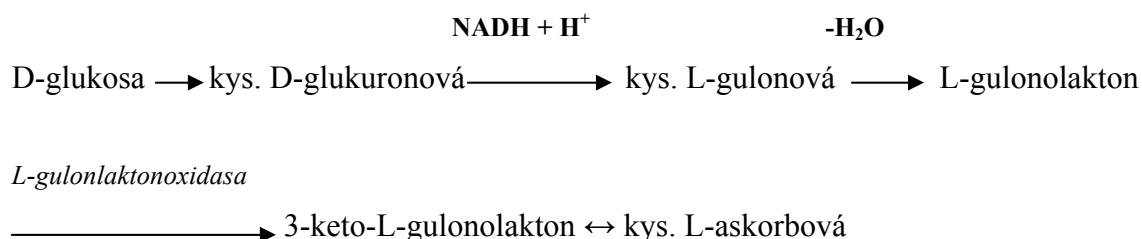
kde  $\text{H}_2\text{A}$  je kyselina L-askorbová. Vzniklý askorbylradikál ( $\text{HA}\bullet$ ) již není schopen vyvolat další řetězovou reakci a disproportionuje na kyselinu askorbovou a dehydroaskorbovou. Kyselina askorbová je obecně účinnějším antioxidantem, použije-li se v kombinaci s tokoferoly. Ty potom přednostně reagují s volnými radikály lipidů, vzniklé radikály tokoferolů jsou na fázovém rozhraní tuk-voda redukovány zpět na tokoferoly kyselinou askorbovou. Askorbát reaguje podobně také s toxickými formami kyslíku, jako je hydroxylový radikál ( $\text{HO}\bullet$ ), anion superoxidového radikálu ( $\text{O}_2\bullet$ ) a singletový kyslík ( $^1\text{O}_2$ ). Všechny tyto reakce tak současně zpomalují oxidaci lipidů [6].



Obr.4 Oxidační proces

## 1.4 Vznik kyseliny askorbové

Potřeba vitamínu C pro lidský metabolismus je značná. Lidé, primáti, netopýři a morčata díky mutaci v genetickém kódu *L-gulonolaktonoxidasy*, enzymu nezbytného pro biosyntézu vitamínu C, ztratili schopnost tento vitamin ve svém organismu syntetizovat. Biosyntéza kyseliny L-askorbové postupuje přes kyselinu *D-glukuronovou*, její redukcí na kyselinu L-gulonovou, která vytvoří lakton. Ten je pak oxidován L-gulonolaktonoxidasou na 3-keto-L-gulonolakton, který se enolizuje na kyselinu L-askorbovou [6]:



Obr.5 Vznik kyseliny L-askorbové

## 1.5 Stabilita vitamínu C

Ztráty při skladování, transportu a při přípravě potravin jsou známy u všech vitamínů. Vitamín C reaguje na vzduch, teplo a vlhkost mimořádně citlivě. Jako obecné pravidlo platí, že ztráty vitamínu C jsou obecně o tolik vyšší, o kolik tepleji a déle se potraviny skladují. Je třeba mít přitom na mysli, že zelenina reaguje z hlediska ztráty vitamínu C různě citlivě. Hlávkové zelí lze uchovávat dokonce několik měsíců beze ztráty vitamínu C. Teplo však odbourávání vitamínu C urychluje. Tomu napomáhají speciální enzymy, které jsou zvláště účinné při teplotách kolem 40°C, při 70°C dochází však k jejich inaktivaci. Proto by se měla



zelenina rychle přivést do vyšších teplot a pak pomalu připravovat. Přitom sice ztráta vitamínu pokračuje, ale značně pomaleji [7].

Při kuchyňské úpravě se může obsah vitamínu C v potravinách snížit o dalších 70 %. Vařením, např. oloupaných brambor, se sníží obsah vitamínu C o 30 až 50 %. Krátké omytí syrové nenakrájené zeleniny většinou nezpůsobuje žádné změny v obsahu vitamínu. Naproti tomu namáčení, které se často používá ve velkokapacitních kuchyních, vede ke ztrátám vitamínu C vyluhováním. Čím déle toto vyluhování trvá, tím jsou ztráty vitamínu C větší. Při rozměňování, krájení, strouhání nebo mixování ovoce a zeleniny se díky takto zvýšenému množství ploch a zároveň díky porušení buněčné tkáně urychluje enzymatické odbourávání vitamínu C. Při rychlém a pečlivém zmrazení lze ztráty vitamínu udržet relativně nízké, takže hluboko zmrazená zelenina často vykazuje více vitamínu C než čerstvé ovoce a zelenina, které je skladováno mnohem kratší dobu [8].

Pro předejití ztrát je nutno dodržet alespoň tato kritéria:

- Podávat ovoce a zeleninu syrovou, kdykoli je to možné.
- Vařit v páře nebo pozvolně vařit jídlo ve velmi malém množství vody.
- Vařit brambory ve slupce.
- Chlazené připravené šťávy skladovat ne déle jak 2 nebo 3 dny.
- Uchovávat syrové plody a zeleninu ve vzduchotěsné nádobě [9].

Kyselina L-askorbová se lehce oxiduje chinony a dalšími oxidačními látkami důsledkem reakcí neenzymového hnědnutí v potravinách. Kyselina L-dehydroaskorbová se zúčastňuje i na Streckeho degradaci. Těmito reakcemi se vysvětluje zapojení kyseliny L-dehydroaskorbové do reakcí neenzymového hnědnutí, hlavně při tepelné úpravě zeleniny a ovoce. Do potravin se na zpomalení autooxidace aplikuje jako antioxidant ve volné formě nebo ve formě sodné soli, do potravin tukového charakteru pak ve formě esteru s kyselinou palmitovou. Na retenci kyseliny L-askorbové má vliv celá řada vlivů jako je pH, způsob technologického opracování, skladování, teplota, množství kyslíku, přítomnost kovových kationů. Všeobecně platí, že čím jsou teplota a čas zpracování nižší, tím více kyseliny

L-askorbové se uchovává. Termodestrukce kyseliny L-askorbové nastává při teplotě nad 100°C [10].

## 1.6 Fyziologie vitamínu C

Jednou z hlavních biologických funkcí tohoto oxidačně redukčního systému je podíl na přenosu vodíku a elektronů z výchozích substrátů až na molekulární kyslík. To platí zejména pro rostlinný materiál. Tento redukční systém bývá často podporován bioflavonoidovým oxidačně redukčním systémem. Vitamin C působí jako kofaktor hydroxylace při konverzi prolinu na hydroxyprolin. Uplatňuje se také při vzniku tyrosinu nebo nadledvinových steroidů. Extracelulární funkce vitamínu C by mohly především spočívat v ochraně LDL (Low Density Lipoprotein) proti oxidaci, v regeneraci tokoferolu (vitamin E) z tokoferoxylového radikálu a v regeneraci glutathionu z jeho oxidované formy. Působí do jisté míry příznivě na snižování sérové hladiny celkového cholesterolu a zvyšuje koncentraci HDL (High Density Lipoprotein) cholesterolu u začínající hypercholesterolemie. Dále redukuje železo z potravy a zvyšuje tak jeho intestinální absorpci nebo blokuje reakci, při které vznikají karcinogenní nitrosaminy. Vitamin C napomáhá opět do jisté míry obranyschopnosti organismu. Askorbát totiž zvyšuje aktivitu fagocytů a chrání jejich membrány před oxidačním poškozením, zvyšuje hladinu protilátek. Syntetická kyselina L-askorbová se používá v potravinářském průmyslu k obohacování nápojů, nálevů, ale také při konzervování rostlinných produktů a masa jako antioxidační prostředek [1].

Vitamin C je potřebný pro produkci kolagenu. Tato vlákna jsou v těle všudypřítomná, poskytují pevnost a zároveň flexibilní strukturu. Kolagen je hlavní složkou pojivových tkání a představuje ¼ všech bílkovin v organismu savců. Vitamin C je požadovaný pro syntézu dopaminu, noradrenalinu a adrenalinu v nervové soustavě nebo v nadledvinkách a je také potřebný k syntéze karnitinu a při transferu energie k buňce mitochondrii. Je to silný antioxidant, zlepšuje vstřebávání železa, působí při syntéze žlučových kyselin, udržuje ion železa a mědi v redukovaném stavu. Velké množství vitamínu C se vyskytuje v krevní plazmě, v množství asi 10 mg v 1 litru [11].

Vitamin C je nejrozšířenější ze všech vitaminů. Je to i nejhojněji používaný potravinový doplněk. Skutečný rozsah jeho příznivých účinků však může překvapit i ty, kteří se domnívají, že dobře znají jeho všestranné použití. Dnes je zájem o tento vitamin především soustředěn na jeho schopnost chránit tkáňové buňky. Vitamin C působí především uvnitř buněk. Je nezbytný pro krvetvorbu a pružnost cévních stěn. Chrání oční čočku proti fotooxidačním účinkům a tak brání vzniku tzv. katarakty, neboli šedého zákalu [12].

Vitamin C je aktivní ve všech tělesných tkáních. Pomáhá posilovat vlasečnice a buněčné stěny. Podporuje hojení povrchových ran a tím snižuje riziko vzniku krevních sraženin a hematomů. Vitamin C zmírňuje následky nachlazení a zkracuje dobu léčby a napomáhá zvládat infekce dýchacích cest a je rovněž účinným prostředkem při léčení astmatu. Pomáhá ke vstřebávání určitých aminokyselin, větší množství jej proto potřebují lidé, kteří drží redukční diety. Vyšší dávky vitaminu C dokáží blokovat účinek látek, které vznikají v těle jako odpověď na podráždění alergenů. Ovlivňuje schopnost našeho organismu využít některé důležité živiny. Jedná se především o vápník a železo a napomáhá vylučovat z organismu škodliviny. Jsou to zejména kadmium, měď a rtuť. Cigaretový kouř obsahuje vysoký podíl těžkých kovů. Jedním z těchto toxických kovů je olovo. Vitamin C může toto olovo vázat a usnadnit jeho vyloučení [13].

Zvýšený příjem vitamínu C podporuje v těle také vlastní tvorbu interferonů. Interferon je přírodní bílkovinná látka, která chrání nejen proti virovým infekcím, má ale také celkové ochranné účinky. Při pokusech na zvířatech bylo dokázáno, že podáváním vitamínu C se zvyšuje odolnost vůči chladu. To je významné zjištění, když pomyslíme na to, že nemoci z nachlazení jsou zapříčiněny většinou souběhem stresu z chladu a infekce. Stresové situace jsou spojeny s vyšší spotřebou a tím i s vyšší potřebou vitamínu C. To je částečně objasněno zvýšenou tvorbou stresových hormonů, které jsou závislé na vitamínu C [14].

## 1.7 Výskyt

Vitamin C se vyskytuje nejčastěji zejména v ovoci a zelenině. Hlavními zdroji vitamínu C jsou citrusové plody. Množství vitamínu C kolísá v závislosti na původu rostliny, původních podmínkách, klimatu, době sklizni, uskladnění a metodě přípravy. Nejvíce vitamínu C najdeme v černém rybízu, kiwi, zelené paprice, kopru, šípčích. Snadno se ničí povařením, protože se rychle oxiduje na kyselinu L-dehydroaskorbovou, která snadno otevírá laktonový kruh, což má za následek ztrátu biologické aktivity. Rozklad vitamínu C urychlují i enzymy a stopy kovů z náradí a nádobí, takže ztráty nastávají již při opracování rostlinného materiálu [15].

Tabulka 1: Množství vitamínu C v ovoci a zelenině

Potravina	Obsah (mg.kg <sup>-1</sup> )	Potravina	Obsah (mg.kg <sup>-1</sup> )	Potravina	Obsah (mg.kg <sup>-1</sup> )
jablka	15-50	grapefruity	240-700	křen	450-1200
hrušky	20-40	ananas	150-250	zelí	170-700
švestky	25-45	banán	90-320	brokolice	1100-1130
broskve	70-100	kiwi	700-1270	květák	47-1610
višně, třešně	60-300	mango	100-350	kedluben	280-700
angrešt	330-480	papája	620-980	salát hlávkový	60-300
rybíz červený	200-500	šípky	2500-10000	špenát	350-840
rybíz černý	1100-3000	mrkev	50-100	rajčata	80-380
hroznové víno	20-50	petržel kořenová	230	lilek	80
jahody	400-700	petržel kadeřavá	1500-2700	paprika	620-3000
borůvky	90	pažitka	430	okurka	65-110
melouny	130-590	pór	150-300	chřest	150-400
pomeranče	300-600	cibule	90-100	hrášek	80-410
citrony	300-640	česnek	150-160	brambory	80-400

## 1.8 Avitaminosa, hypovitaminosa a nežádoucí účinky vitamínu C

Avitaminosa se projevuje onemocněním kurděje nebo též skorbut. Příznakem je krvácivost, uvolňování zubů, snadná lomivost kostí, špatné hojení ran. To vše souvisí se selháním tvorby biosyntézy kolagenu. Dlouhodobý nedostatečný příjem vitamínu C potravou vyvolává u dětí Moellerovu-Barlowovu nemoc, u dospělých kurděje. Vitamin C také zasahuje do biosyntézy katecholaminů a jeho nedostatek je v této oblasti spojován s výskytem depresí, hypochondrií a změnami nálad [16].

Kurděje (skorbut) je nemoc způsobená dlouhodobým nedostatkem vitamínu C ve stravě. Dnes už je tato choroba poměrně vzácná, vyskytuje se občas jen ve velmi chudých oblastech tzv. třetího světa. Dříve jí trpěli zejména chudí lidé, obzvláště v zimních měsících, nebo námořníci při dlouhých plavbách [17].

Horní příjmy pro vitamin C z dietních zdrojů a doplňků jsou následující:

- Ve věku 1 - 3: 400 mg.den<sup>-1</sup>
- Ve věku 4 - 8: 650 mg.den<sup>-1</sup>
- Ve věku 9 –13: 1200 mg.den<sup>-1</sup>
- Ve věku 14 –18: 1800 mg.den<sup>-1</sup>
- Ve věku 19 +: 2000 mg.den<sup>-1</sup> [15].

Příjem vysokých dávek vitamínu C nad 1000 až 2000 mg.den<sup>-1</sup> může vést k dráždění sliznice žaludku a jícnu, což bývá doprovázené průjmy, bolestmi hlavy, slabostí, nespavostí, dále může docházet ke zvýšenému okyselení moči a ke tvorbě ledvinových oxalátových kamínků, k úbytku vitamínu B<sub>12</sub> v těle a ke zvýšení hladiny cholesterolu. U alergiků se ojediněle může objevit kopřivka. Vitamin C ve vyšších dávkách může ovlivnit správnost výsledků některých laboratorních testů (např. stanovení glukózy v moči), proto je vhodné případné vysazení před podobnými testy konzultovat s lékařem.



Obr.6 Projevy avitaminosy

### 1.8.1 Antivitaminy vitaminu C

Vitamin C má i spoustu antivitaminů. Mezi ně se řadí hlavně aspirin, sirupy na vykašlávání, antihistamika, barbituráty, antikoncepční pilulky a prednisony. Vitamin C by se měl užívat s vitaminem B<sub>6</sub> a hořčíkem, aby se vyloučilo srážení kyseliny šťavelové [18].

## 1.9 Doporučená denní dávka vitamínu C

Denní příjem 100 mg vitamínu C je spojován s udržení maximální zásoby vitamínu C v lidském organismu, která činí 3 g. Při uvedeném příjmu činí poločas obratu přibližně 14 dní. Zásoby vitamínu C jsou v organismu nerovnoměrně rozloženy v tkáních s vysokou metabolickou aktivitou. Dříve se uvádělo, že snížení rizika kardiovaskulárních chorob a rakoviny je podmíněno minimálním denním příjmem 90 až 100 mg vitamínu C. Nicméně finští vědci potvrdili, že je to vitamin E, který snižuje oxidativní modifikaci lipoproteinů a zároveň neprokázali podobný pozitivní efekt ze strany askorbátu, ani při použití relativně vysoké dávky  $500 \text{ mg} \cdot \text{den}^{-1}$ . Další autoři také uvádějí, že užití vysokých dávek askorbátu nemá žádný znatelně pozitivní vliv na zlepšení funkce myokardu, který byl poškozen ischemií. Také nejrozšířenější mýtus o léčebném účinku askorbátu u běžného nachlazení nebyl dosud prokázán. Požadavek se zvyšuje při extrémní tělesné zátěži, trvalém psychickém stresu, alkoholismu apod. U kuřáků dochází ke snížení absorpce, takže denní doporučený příjem se pohybuje kolem 150 mg. Pro doporučený denní příjem vitamínu C pro muže i ženy v produktivním věku v ČR zatím platí hodnota  $75 \text{ mg} \cdot \text{den}^{-1}$ . Pro děti od 3-10 let se doporučuje dávka poloviční. Potřeba vitamínu C však výrazně stoupá při vyšší tělesné zátěži, infekčních onemocněních, stresu a při kouření. Denní doporučená dávka vitamínu C závisí na věku, pohlaví, na životním stylu a na mnoha dalších faktorech [19].

Podle francouzského Afssa (French Agency For Food Safety) potřebuje dospělý člověk denně 110 mg vitamínu C, děti 60 až 90 mg, těhotné a kojící matky 120 až 130 mg. Tým doktora Levina z Marylandu stanovil v roce 1996 denní dávku na celých 200 mg. Studie z roku 2001 tuto hranici ještě zvýšila. Teprve 500 až 1000 mg vitamínu C denně prý účinně chrání tkáň před stárnutím. Pokud se konzumuje méně než 200 mg vitamínu C denně,

vzrůstá podle epidemiologů riziko úmrtnosti. Stravovací režim našich paleolitických předků, který je prý nejlépe přizpůsobený genetické výbavě člověka, dodával asi 500 mg vitamínu C denně. Tabák ničí velice rychle zásoby vitamínu C v těle a znásobuje škody, které na tkáních a buňkách způsobují volné radikály [15].

Zajímavá je skutečnost, že při silných záporných emocích organismu dokážeme spálit až 3000 mg vitamínu C [20].

## 2 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Chromatografie je separační proces, při kterém se látky rozdělují mezi dvě nemísitelné fáze, jednou pohyblivou (mobilní) a druhou nepohyblivou (stacionární), na základě fyzikálně chemických interakcí, jako jsou adsorpce, rozpouštění, iontová výměna a podobně. Chromatografické metody rozdělujeme podle: [21]

### 1) Převažujícího mechanismu separace

- rozdělovací
- adsorpční
- iontoměničová (iontová)
- gelová permeační (separace podle velikosti molekul)

### 2) Mobilní fáze

- plynová (GC, Gas Chromatography)
- kapalinová (LC, Liquid Chromatography)
- chromatografie s mobilní fází v nadkritickém stavu (SFC, Supercritical Fluid Chromatography) [22]

### 3) Stacionární fáze

- tuhá látka - plynová adsorpční chromatografie (GSC, Gas Solid Chromatography)
  - kapalinová adsorpční chromatografie (LSC, Liquid Solid Chromatography)
- kapalina - plynová rozdělovací chromatografie (GLC, Gas Liquid Chromatography)
  - kapalinová rozdělovací chromatografie (LLC, Liquid Liquid Chromatography)
- zvláštní typy - gelová permeační chromatografie (GPC, Gel Permeatic Chromatography)
  - iontově výměnná chromatografie (IEC, Ion Exchange Chromatography)



Základní výhodou HPLC (High Performance Liquid Chromatografie) je široký rozsah použitelnosti. Lze analyzovat až 80 % veškerých látek, které se podstatně liší v chemických a fyzikálních vlastnostech. Další předností je možnost účinně ovlivňovat separaci nejenom volbou stacionární fáze, ale rovněž změnami složení mobilní fáze, protože kapalná mobilní fáze není pouze inertním nosičem vzorků, ale podílí se přímo na interakcích rozpuštěných látek se stacionární fází. Chromatografickou separaci látek v koloně lze provést třemi rozdílnými technikami [23]

- frontální
- vytěšňovací
- eluční.

Současná praxe využívá výhradně eluční chromatografii. Její princip spočívá v tom, že chromatografickým systémem protéká konstantní mobilní fáze o určitém složení a fyzikálních vlastnostech, jejíž složky neinteragují se stacionární fází v koloně. Do proudu této mobilní fáze se nastříkují směsi látek ve formě úzké symetrické zóny [24].

Zadržování látek rozpuštěných v mobilní fázi – solutů – kolonou se nazývá retence, zatímco vymývání solutů z kolony se nazývá eluce. Mobilní fázi se říká eluční činidlo a její schopnost vymývat látky z kolony se posuzuje relativním parametrem tzv. eluční silou. Mobilní fáze

o vyšší eluční síle vymývá látky z kolony rychleji, než mobilní fáze o nižší eluční síle. Rozpouštědla, seřazená podle stoupající eluční síly, tvoří tzv. eluotropní řadu. Látky lze eluovat třemi způsoby [10]:

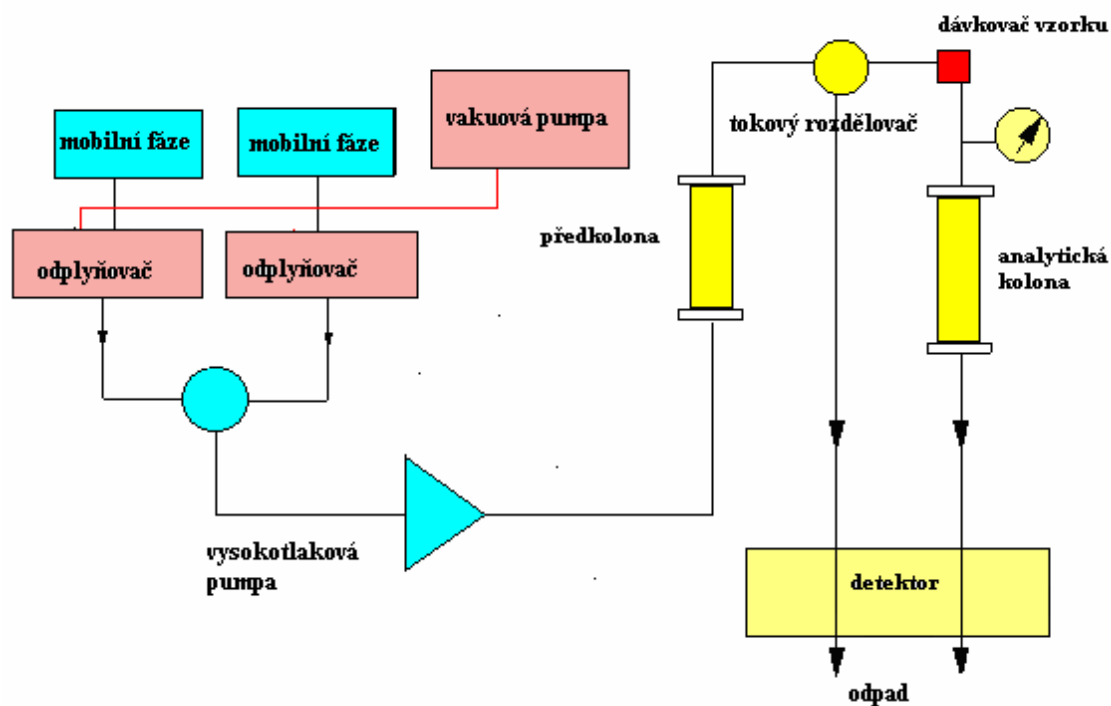
- izokratická eluce
- gradientová eluce
- elucí skokem

Pokud se celá chromatografická separace provádí s použitím mobilní fáze o konstantním složení, tedy o konstantní eluční síle jde o techniku izokratické eluce. Pokud se ovšem eluční síla mobilní fáze podle určitého programu mění v průběhu separace, pak jde o techniku gradientové eluce. Kolony se vybírají podle tří základních kritérií:

- požadovaného rozlišení
- požadované rychlosti analýzy
- potřebného zatížení kolony.

Jako náplně do kolon se v současné době používají pórovité částice silikagelu o průměru 10  $\mu\text{m}$  a méně. Umožňují separace s podstatně vyšší účinností, přičemž se dosahuje i vyšší kapacity kolony pro dávkované vzorky a zvyšuje se rychlost analýzy. Účinnost separace vzrůstá s klesajícím průměrem částic [25]

Nejběžnějším adsorbentem používaným v HPLC je silikagel. Silikagel je charakterizován průměrem pórů ( $5 \cdot 10^{-6}$  až  $25 \cdot 10^{-6}$  mm), specifickým povrchem (od 100 do  $860 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) a specifickým objemem ( $0,7$  až  $1,2 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ ). Na povrchu silikagelu jsou volné silanolové  $-\text{Si-OH}$  a siloxanové  $-\text{Si-O-Si}$  skupiny. Koncentrace silanolových skupin je nejdůležitějším faktorem při separaci, naopak siloxanové jsou nežádoucí, neboť způsobují nespecifické interakce. V adsorpční chromatografii s polárními adsorbenty se používají nepolární rozpouštědla jako mobilní fáze. Postupem času převládají separace s fázemi méně polárními než fáze mobilní. Zatímco adsorpční chromatografie se hodí pro separace směsí látek nízkomolekulárních sloučenin lipofilního charakteru a geometrických isomerů, homologické řady látek se nejlépe dělí chromatografií s obrácenými fázemi. Reverzní fáze se nehodí pro separace silných kyselin a bází, neboť silikagel, který slouží jako nosič reverzní fáze, se rozkládá při extrémních hodnotách pH. Na povrchu silikagelu jsou už zmíněné volné hydroxylové (silanolové) skupiny  $-\text{Si-OH}$  s aktivním vodíkovým atomem, který může být nahrazen různými organickými skupinami a tak mohou být připraveny stacionární fáze s různými vlastnostmi. V současné době je většina komerčně vyráběných stacionárních fází siloxanového typu  $\text{Si-O-Si-R}$ . Takto se vyrábějí například fáze se skupinami  $-\text{Si-O-Si-ethyl}$ ,  $-\text{hexyl}$ ,  $-\text{oktyl}$ ,  $-\text{amino}$  a další. Vysoce účinné kolony, naplněné částicemi o průměru menším než 10  $\mu\text{m}$ , vyžadují k dosažení optimálních průtokových rychlostí vysokých tlaků (jednotky až desítky MPa) [10].



Obr.7 Schéma HPLC-UV/VIS

## 2.1 Přístroje a zařízení

### HPLC

Mobilní fáze se přivádí ze zásobníku do vysokotlakého čerpadla, které ji přes dávkovací zařízení vzorku dopravuje do kolony. Na výstupu z kolony je připojen detektor, jehož signál se zpracovává na počítači. Pro gradientovou eluci je zapotřebí dvou nebo více zásobníků pro složky mobilní fáze a zařízení pro jejich směšování. Někdy je nezbytné převádět složky vzorku na deriváty, takže systém může obsahovat reaktory pro derivatizaci. Řada vzorků obsahuje balastní látky, proto se do systému zařazuje předkolona, ve které se tyto látky zachytí. Ze zásobníku se mobilní fáze čerpá přes filtr. Některé přístroje umožňují odplynění mobilní fáze. Čerpadlo musí zajistit definovaný a konstantní průtok mobilní fáze.

V současné době se používá dávkování pomocí dávkovacích ventilů, které umožňují podstatně přesnější dávkování a nevyžadují zastavení toku mobilní fáze. Dávkovací ventily jsou vícecestné ventily s vyměnitelnou dávkovací smyčkou. Smyčkové dávkovače umožňují dávkovat libovolný objem vzorku mikrostříkačkou do smyčky při atmosférickém tlaku. Po naplnění smyčky se její obsah vymyje pootočením ventilu mobilní fází do kolony. Předkolony bývají nejčastěji umístěny před chromatografickou kolonou. Jednotlivé části kapalinového chromatografu se nejčastěji spojují nerezovými kapilárami s minimálním mrtvým objemem. Termostatovat lze kolonu, detektor i celý okruh vedení mobilní fáze. Současně se tím sníží viskozita mobilní fáze. S chemicky vázanými fázemi se obvykle pracuje v rozsahu 20 až 65° C [25].

Detektor by měl mít co nejvyšší citlivost detekce solutu a co nejnižší hodnotu meze detekce. Základní linie detektoru (tj. hodnota signálu za nepřítomnosti solutu) by měla mít co nejnižší hodnotu, co nejmenší šum a neměla by vykazovat drift (únik, tj. pomalý systematický posun). Je žádoucí, aby detektor byl stejně citlivý ke všem detekovaným solutům, a aby jeho signál

co nejméně závisel od experimentálních podmínek. Nejvíce se v praxi používají spektrofotometrické detektory. Jsou selektivní, takže základním požadavkem je, aby při dané vlnové délce detekovaná látka absorbovala co nejvíce. Vlnovou délku lze programovat. Mezi další používané detektory pro HPLC patří fluorimetrické, refraktometrické, elektrochemické nebo kombinace s hmotnostní spektrometrií (LC-MS).

Na analýzu řady vitamínových složek je dokonale využívána vysokoúčinná kapalinová chromatografie s použitím reverzní fáze (C8 nebo C18). Jako eluční způsob se nejčastěji používá izokratická nebo gradientová eluce. Jako mobilní fáze bývá nejvíce používán methanol, ethanol, acetonitril a voda v různých poměrech [26]



Obr.8 HPLC HP 1100



Obr.9 Kolona HPLC HP 1100

### ESA Coulochem III multi - elektrodový detektor

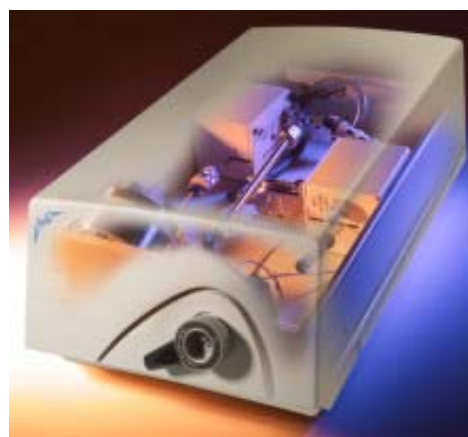
Tento detektor umožňuje měřit v tzv. DC-módu tzn., že aplikovaný potenciál je konstantní během celého analytického měření. V elektrochemickém detektoru eluent prochází skrz průtokovou kvyetu a poskytuje vhodné potenciály a kontroluje proudění. Citlivost ECD je významně lepší než pro mnoho jiných běžně užívaných režimů z detekce pro HPLC (například UV absorbance). Selektivita ECD spočívá v tom, že jestliže se z kolony vymývají dvě a více látek a mají-li různý oxidační nebo redukční potenciál, můžeme vybrat potenciál tak, že budeme selektivně detekovat pouze jednu z těch látek. ECD využívá dvou typů detekce. U amperometrického detektoru eluent teče po povrchu elektrody. Většina elektroaktivních prvků směsi teče na povrchu elektrody a nereaguje. Pouze 5-15 % elektroaktivních látek reaguje s touto elektrodou. U coulometrického detektoru eluent protéká pórovitou grafitovou elektrodou. Detektor tak může poskytnout zvýšenou citlivost. Proud je pak úměrný koncentraci vzorků [27]

Elektrochemický detektor Coulochem III může obsahovat dvě cely. Standardní analytická cela model 5010A poskytne potenciál pro oxidaci nebo redukci vzorků. Cela obsahuje dvě sériově zapojené komory, každá komora obsahuje pórovitou grafitovou coulometrickou

elektrodu a dvojitou referenční elektrodu. Ochranná cela model 5020 je užívána pro oxidované nebo redukované elektrolyticky aktivní součásti vzorků, které by mohly být přítomny jako nečistoty v mobilní fázi. Ochranná cela je obvykle umístěna mezi čerpadlem a nástřikem. Elektrochemická cela je místo, kde nastane oxidace nebo redukce analytu a proud, který je tak vytvořen, je převedený na výstupní napětí potenciostatu, kde se tento signál zpracovává. Potenciál je po celou dobu měření konstantní (DC mód) a proud je měřený jako funkce času. Operační výhody coulometrického detektoru jsou takové, že signální odezva je velmi stabilní, signální rozsah může být maximální, plocha píku a výška píku pro vzorek jsou předvídatelné, coulometrická detekce může poskytnout navíc selektivitu a lepší odezvu pro nevratné analýzy [27].



Obr.10 Coulochem III



Obr.11 Kolona Coulochemu III

## 2.2 Statistické zpracování výsledků kvantitativních analýz

Výsledky kvantitativní analýzy hodnotíme podle správnosti, tj. schopnosti metody kvantitativně určovat danou veličinu, dále podle přesnosti, tj. schopnosti metody poskytovat konzistentně stejné výsledky pro řadu opakovaných stanovení a podle reprodukovatelnosti, tj. schopnosti metody poskytovat konzistentně stejné výsledky pro nezávislá měření, prováděná se stejným vzorkem a stejným postupem různými pracovníky v různých laboratořích. Analytická chyba představuje rozdíl mezi nalezeným obsahem analytu ( $x$ ) a jeho skutečným obsahem ( $\mu$ ) ve vzorku. Malé nepravidelné odchylky od skutečné hodnoty se určují statisticky ze souboru paralelních (opakovatelných) analýz. Ovlivňují přesnost (reprodukovatelnost) či opakovatelnost stanovení. Aritmetický průměr všech výsledků se zpravidla nejvíce blíží skutečné hodnotě:

$$\bar{x} = \sum_{n=1}^n \frac{x_i}{n} \quad (1)$$

Základní charakteristikou nahodilých chyb je odhad směrodatné odchylky:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \left[ \sum_{n=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \right]} \quad (2)$$

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{s}{\sqrt{n}} \cdot t \quad (3)$$

Ve skutečnosti máme k dispozici jen omezený počet výsledků, který je podstatně menší než  $n \rightarrow \infty$  a tudíž je směrodatná odchylka závislá na počtu paralelních výsledků. Byl definován Studentův koeficient  $t$ , který charakterizuje Studentovo rozložení náhodných odchylek pro daný stupeň volnosti (daný počet výsledků analýz a použitou hladinou významnosti  $1 - \alpha$ ). Studentovým koeficientem pak násobíme hodnotu směrodatné odchylky. Nejlepším vyjádřením pro průměrný výsledek se série paralelních stanovení je proto vztah [10].





## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

### 3 METODIKA

#### 3.1 Chemikálie

kyselina šťavelová (dodavatel-Chemapol Praha)

kyselina *m*-fosforečná (dodavatel-Dorapis Praha)

kyselina askorbová (dodavatel-Spofa Praha)

kyselina octová 98% (dodavatel-Lachema Brno)

mořský písek (dodavatel-Chemapol Praha)

ethanol 96% (dodavatel- Ing. Petr Lukeš,Uherský Brod)

methanol čistoty pro HPLC (dodavatel-Sigma Aldrich)

redestilovaná voda

ZnSO<sub>4</sub> (dodavatel-Chemapol Praha)

K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (dodavatel-Chemapol Praha)

2,6-dichlorfenolindofenol (dodavatel-LOBA, Chemie Wien, Fischamend)

octan olovnatý (dodavatel-Chemapol Praha)

#### Použité přístroje a pomůcky

Standardní laboratorní vybavení:

předvážky (Kern, SRN)

lednice (Samsung- Calex, CZ)

temperovaná vodní lázeň ( Memmert, SRN)

běžné laboratorní sklo a pomůcky

Aparatura pro HPLC-UV/VIS (Hewlett Packard 1100)

- vakuovaný odplyňovací modul G1322A
- binární pumpy G1312A
- termostat kolon G1316A
- detektor UV/VIS DAD G1315A
- dávkovací ventil analytický smyčkový (dávkovací smyčka o objemu 20 µl)
- kolona SUPELCOSIL - LC8 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm, Supelco, USA)
- PC s vyhodnocovacím programem ChemStation – Instrument1 (Agilent, USA)

Dávkovací stříkačka (Hamilton, USA)

Mikrofiltry 0,45 µm, PTFE (Supelco, USA)

Aparatura pro HPLC-ECD (ESA – Coulochem III)

- analytická cela 5010A
- guard cela 5020
- detektor Coulochem III
- dávkovací ventil analytický smyčkový (dávkovací smyčka o objemu 20 µl)
- kolona SUPELCOSIL - LC8 (15 cm x 4,6 mm; 5 µm, Supelco, USA)
- PC s vyhodnocovacím programem ChemStation – Instrument1 (Agilent, USA)

Dávkovací stříkačka (Hamilton, USA)

Mikrofiltry 0,45 µm, PTFE (Supelco, USA)

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Titrační stanovení vitamínu C

Principem stanovení vitamínu C je oxidace kyseliny L-askorbové 2,6-dichlorfenolidofenolem za vzniku kyseliny L-dehydroaskorbové a bezbarvé leukobáze indofenolu. Titrace 2,6-dichlorfenolidofenolem byla prováděna v prostředí 2% kyseliny šťavelové. Prvním přebytkem odměrného roztoku se vzorek zabarvil do růžova.

Před vlastním stanovením byly připraveny následující standardní roztoky:

1. **Odměrný roztok 2,6-dichlorfenolindofenolu ( $c = 0,001 \text{ mol.l}^{-1}$ ):** 0,29008 g 2,6-dichlorfenolindofenolu bylo rozpuštěno v převařené destilované vodě a roztok byl kvantitativně doplněn destilovanou vodou po značku do 1000 ml odměrné baňky a byl přefiltrován přes filtrační papír. Odměrný roztok byl uchováván v tmavé lahvi při  $4^{\circ}\text{C}$ .
2. **Kyselina šťavelová (2% roztok):** 5,00 g kyseliny šťavelové bylo rozpuštěno v destilované vodě a doplněno do 250 ml odměrné baňky po značku.
3. **Standardní roztok kyseliny askorbové o koncentraci ( $c = 10 \text{ mg.ml}^{-1}$ ):** s přesností na 0,0001 g byl navážen 1,00 g standardního preparátu kyseliny L-askorbové a toto množství bylo rozpuštěno v 100 ml odměrné baňce v destilované vodě.

V rámci titračního stanovení kyseliny askorbové byla nejprve provedena standardizace odměrným roztokem 2,6-dichlorfenolindofenolu. K 1 ml standardního roztoku kyseliny askorbové ( $c = 1 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) bylo přidáno 10 ml 2% roztoku kyseliny šťavelové a vše bylo titrováno odměrným roztokem 2,6-dichlorfenolindofenolu do růžového zbarvení, které se nesmí během 15 sekund měnit. Titrace byla provedena celkem pětkrát a byla vypočtena průměrná spotřeba odměrného roztoku  $V_b$ . Zároveň byl proveden i slepý pokus pouze s 10 ml 2% roztoku kyseliny šťavelové. Výpočtem podle vzorce (4) byl stanoven faktor (f), který udává počet mg kyseliny askorbové a to odpovídajících 1 ml titračního činidla.

$$f = V_a / (V_b - V_c), \quad (4)$$

kde  $V_a$  je objem standardního roztoku kyseliny askorbové (ml),  $V_b$  je spotřeba titračního činidla na standardní roztok kyseliny askorbové (ml) a  $V_c$  je spotřeba titračního činidla na slepý pokus (ml).

Na titrační stanovení vitamínu C bylo odváženo 10 g vzorku s přesností na 0,0001 g. Před vlastní titrací kyseliny askorbové v ovoci a zelenině byl vzorek ve třecí misce důkladně rozetřen s mořským pískem. K rozetřenému vzorku bylo přidáno 50 ml 2% kyseliny šťave-

lové a tato směs se nechala 15 minut odstát za nepřístupu světla. Získaný extrakt se pak přefiltroval a k titraci se pipetovala jeho alikvotní část (10 ml). Vzniklý roztok byl titrován odměrným roztokem 2,6-dichlorfenolindofenolu o koncentraci  $c = 0,001 \text{ mol.l}^{-1}$  do růžového zbarvení, které se alespoň 15 sekund nemění. Titrace byla provedena pro každý vzorek celkem pětkrát a k výpočtu byla použita průměrná hodnota objemu spotřebovaného odměrného roztoku. V počátečních fázích byla titrace prováděna po kapkách a z stálého míchání, čímž se do jisté míry eliminoval vliv reduktonů, které reagují pomaleji než kyselina askorbová. Zároveň byl proveden slepý pokus.

Obsah kyseliny askorbové v navážce vzorku byl vypočítán podle vztahu:

$$W = [(V_x - V_c) \cdot f] / m, \quad (5)$$

kde  $V_x$  je spotřeba 2,6-dichlorfenolindofenolu na titraci vzorku (ml),  $V_c$  je spotřeba 2,6-dichlorfenolindofenolu na slepý pokus (ml),  $f$  je přepočítávací faktor na mg kyseliny askorbové a  $m$  je hmotnost vzorku v alikvotní části.

### 3.2.2 Stanovení vitamínu C metodou HPLC-UV/VIS

S přesností na 0,0001 g bylo naváženo 10 g vzorku. Ten byl důkladně rozetřen ve třecí misce s mořským pískem. K rozetřenému vzorku bylo přidáno 50 ml směsi ( $\text{CH}_4:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$  v poměru 99:0,5:0,5) a nechal se 15 minut odstát. Získaný extrakt se poté přefiltroval a tím byl získán zásobní roztok pro další ředění. Z každého filtrátu bylo provedeno pět měření. Alikvotní část vzorku byla přefiltrována před vstřikem na kolonu přes mikrofiltr o velikosti póru 0,45  $\mu\text{m}$ . Tímto postupem byly připraveny vzorky z ovoce a zeleniny. Rozdílným způsobem byl izolován vitamin C z brambor.

Před vlastním stanovením kyseliny askorbové v bramboře metodou HPLC bylo ve třecí misce důkladně rozetřeno 10 g vzorku s mořským pískem. K rozetřenému vzorku bylo přidáno 50,0 ml směsi ( $\text{CH}_4:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$  v poměru 99:0,5:0,5) a vzorek se nechal 15 minut extrahovat. Získaný extrakt se pak přefiltroval a do filtrátu bylo přidáno 15 ml 45%  $\text{FeSO}_4$

a 15 ml 18,5%  $K_4[Fe(CN)_6]$ , aby byly vysráženy škroby obsažené v bramboře a roztok byl opět přefiltrován. Do tohoto přefiltrovaného roztoku bylo poté přidáno 16,0 ml octanu olovnatého na konečné vysrážení škrobu a roztok byl opět přefiltrován. Z filtrátu bylo provedeno taktéž pět měření a vzorek byl přefiltrován před vstřikem na kolonu přes mikrofiltr o velikosti póru 0,45  $\mu\text{m}$ .

Chromatografická separace u vzorků ovoce a zeleniny probíhala na koloně SUPELCOSIL C8, 5  $\mu\text{m}$  (15 cm x 4,6 mm). Eluce byla prováděna izokraticky methanolem při 30<sup>o</sup>C a průtoku 1,1 ml.min<sup>-1</sup>. Detekce kyseliny askorbové byla prováděna spektrofotometricky v UV oblasti při vlnové délce 254 nm. Absorpční maximum bylo ověřeno stanovením absorpčního spektra standardního roztoku kyseliny L-askorbové.

### 3.2.3 Kalibrační křivka pro stanovení vitamínu C metodou HPLC-UV/VIS

S přesností na 0,0001 g bylo naváženo 0,0020 g kyseliny L-askorbové a byla rozpuštěna ve 250 ml odměrné baňce a doplněna po rysku směsí ( $\text{CH}_4:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$  v poměru 99:0,5:0,5). Výchozí koncentrace zásobního roztoku tedy byla 8  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Ze zásobního roztoku kyseliny L-askorbové byly připraveny dalším ředěním směsí ( $\text{CH}_4:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$  v poměru 99:0,5:0,5) kalibrační roztoky o koncentraci 1; 2; 4; 6; 8  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a analyzovány metodou HPLC postupem popsaným v kapitole 3.3.2. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost plochy píku ( $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ) na koncentraci kyseliny askorbové ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

### 3.2.4 Stanovení vitamínu C metodou HPLC-ECD

Izolace vitamínu C byla provedena stejným postupem uvedeným v kapitole 3.2.2. Chromatografická separace probíhala na koloně SUPELCOSIL C8, 5  $\mu\text{m}$  (15 cm x 4,6 mm). Eluce byla prováděna izokraticky s mobilní fází ( $\text{CH}_4:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$  v poměru 99:0,5:0,5) při 30<sup>o</sup>C a průtoku 1,1 ml.min<sup>-1</sup>. Detekce kyseliny askorbové byla prováděna pomocí potenciálu na dvou kanálech s napětími  $K_1 = 600 \text{ mV}$  a  $K_2 = 650 \text{ mV}$ .

### 3.2.5 Kalibrační křivka pro stanovení vitamínu C metodou HPLC-ECD

S přesností na 0,0001 g bylo naváženo 0,0020 g kyseliny L-askorbové. Navážka byla rozpuštěna ve 250 ml odměrné baňce a doplněna po rysku směsí ( $\text{CH}_4:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$  v poměru 99:0,5:0,5). Výchozí koncentrace zásobního roztoku tedy byla  $8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Ze zásobního roztoku kyseliny L-askorbové byly připraveny dalším ředěním směsí ( $\text{CH}_4:\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$  v poměru 98,5:0,5:0,5) kalibrační roztoky o koncentraci 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 4,5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a analyzovány metodou HPLC postupem popsáním v kapitole 3.2.4. Kalibrační křivka byla měřena při vloženém napětí  $K_1 = 600 \text{ mV}$  a  $K_2 = 650 \text{ mV}$ . Byla sestrojena jako závislost plochy píku ( $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ) na koncentraci kyseliny askorbové ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1 Titrační stanovení vitamínu C 2,6 dichlorfenolindofenolem

Titrační stanovení obsahu kyseliny L-askorbové pomocí  $0,001 \text{ mol.l}^{-1}$  2,6-dichlorfenolindofenolu bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 3.2.1. Nejprve byl stanoven faktor (f), který udává počet mg kyseliny L-askorbové na jehož titraci se spotřebuje 1 ml odměrného roztoku. Titrace byla provedena pětkrát a průměrná spotřeba 2,6- dichlorfenolindofenolu byla 32,0 ml. Spotřeba titračního činidla na slepý pokus byla 0,10 ml. K výpočtu faktoru (f) byl použit vzorec uvedený v kapitole 3.2.1.

$$\begin{aligned} 1 \text{ ml } 2,6\text{-dichlorfenolindofenolu } (c = 0,001 \text{ mol.l}^{-1}) \text{ odpovídá } 0,1567 \text{ mg kyseliny askorbo-} \\ \text{vé} \\ f = 0,1567 \text{ mg.ml}^{-1} \end{aligned}$$

Pro vlastní titrační stanovení kyseliny askorbové v ovoci a v zelenině bylo použito 9 druhů ovoce a 2 druhy zeleniny. Každý vzorek byl titrován pětkrát a průměrná spotřeba odměrného roztoku 2,6-dichlorfenolindofenolu o koncentraci ( $c = 0,001 \text{ mol.l}^{-1}$ ) je uvedena v tabulce 16. Uvedené vzorky ovoce a zeleniny byly zváženy s přesností na 0,0001 g.

#### 4.1.1 Titrační stanovení vitamínu C v ovoci

Stanovení bylo provedeno ve vzorcích grepu, pomeranče, kiwi, citronu, mandarince, jahody, v hroznu červeném a bílém a v limetě. Průměrný obsah vitamínu C v ovoci byl vypočten pomocí statistického parametru vyjádřeného vzorcem (1) z kapitoly 2.2. Dále byl vypočten podle vzorce (2) odhad směrodatné odchylky s, který je základní charakteristikou u nahodilých chyb. Skutečný obsah vitamínu C byl vypočten pomocí vzorce (3). Hodnota Studentova koeficientu t je při testované hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  a při čtyřech stupních volnosti 2,776 [10].



Tabulka 2: Přesnost stanovení vitamínu C v grepu

$V_x$ (ml)	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
3,5	26,63	0,24	0,0576
3,5	26,63	0,24	0,0576
3,6	27,63	0,76	0,5776
3,6	26,63	0,24	0,0576
3,5	27,63	0,76	0,5776
	$\bar{x} = 26,87$		$\sum = 1,328$

$V_x$  = spotřeba 2,6-dichlorfenolindofenolu

Směrodatná odchylka  $s = 0,576$  mg

Průměrný obsah vitamínu C titrační metodou

$\mu = 26,87 \pm 0,421$  mg.100 g<sup>-1</sup> ( $\alpha = 0,05$ )

Tabulka 3: Přesnost stanovení vitamínu C v pomeranči

$V_x$ (ml)	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
3,7	28,20	0,234	0,0547
3,7	28,20	0,234	0,0547
3,8	28,98	0,549	0,3014
3,8	28,98	0,549	0,3014
3,7	28,20	0,234	0,0547
	$\bar{x} = 28,44$		$\sum = 0,767$

Směrodatná odchylka  $s = 0,437$  mg

Průměrný obsah vitamínu C titrační metodou

$\mu = 28,44 \pm 0,542$  mg.100 g<sup>-1</sup> ( $\alpha = 0,05$ )

Tabulka 4: Přesnost stanovení vitamínu C v kiwi

$V_x$ (ml)	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
7,9	59,54	0,48	0,2304
8,0	60,33	0,31	0,0961
8,0	60,33	0,31	0,0961
7,9	59,54	0,48	0,2304
8,0	60,33	0,31	0,0961
	$\bar{x} = 60,02$		$\sum = 0,749$

Směrodatná odchylka  $s = 0,432$  mg

Průměrný obsah vitamínu C titrační metodou

$$\mu = 60,02 \pm 0,536 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 5: Přesnost stanovení vitamínu C v citronu

$V_x$ (ml)	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
5,2	39,95	0,79	0,6241
5,3	40,73	0,01	0,0001
5,4	41,52	0,78	0,6084
5,3	40,73	0,01	0,0001
5,3	40,73	0,01	0,0001
	$\bar{x} = 40,74$		$\Sigma = 1,232$

Směrodatná odchylka  $s = 0,555$  mg

Průměrný obsah vitamínu C titrační metodou

$$\mu = 40,74 \pm 0,689 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 6: Přesnost stanovení vitamínu C v mandarince

$V_x$ (ml)	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
3,6	27,42	0,31	0,0961
3,5	26,63	0,48	0,2304
3,6	27,42	0,31	0,0961
3,5	26,63	0,48	0,2304
3,5	26,63	0,48	0,2304
	$\bar{x} = 27,11$		$\Sigma = 0,883$

Směrodatná odchylka  $s = 0,469$  mg

Průměrný obsah vitamínu C titrační metodou

$$\mu = 27,11 \pm 0,582 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 7: Přesnost stanovení vitamínu C v jahodách

$V_x$ (ml)	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
5,1	39,17	0,01	0,0001
5,2	39,95	0,77	0,5929
5,0	38,39	0,79	0,6241
5,1	39,17	0,01	0,0001
5,1	39,17	0,01	0,0001
	$\bar{x} = 39,18$		$\sum = 1,217$

Směrodatná odchylka  $s = 0,551$  mg

Průměrný obsah vitamínu C titrační metodou

$$\mu = 39,18 \pm 0,684 \text{ mg.100 g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 8: Přesnost stanovení vitamínu C v červeném hroznu

$V_x$ (ml)	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
0,5	3,13	0,24	0,0576
0,6	3,71	0,34	0,1156
0,5	3,13	0,24	0,0576
0,6	3,71	0,34	0,1156
0,5	3,13	0,24	0,0576
	$\bar{x} = 3,37$		$\sum = 0,404$

Směrodatná odchylka  $s = 0,317$  mg

Průměrný obsah vitamínu C titrační metodou

$$\mu = 3,37 \pm 0,393 \text{ mg.100 g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 9: Přesnost stanovení vitamínu C v bílém hroznu

$V_x$ (ml)	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
0,30	1,57	0,16	0,0256
0,35	1,97	0,24	0,0576
0,30	1,57	0,16	0,0256
0,35	1,97	0,24	0,0576
0,30	1,57	0,16	0,0256
	$\bar{x} = 1,73$		$\sum = 0,19$ 2

Směrodatná odchylka  $s = 0,192$  mg

Průměrný obsah vitamínu C titrační metodou

$$\mu = 1,73 \pm 0,238 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 10: Přesnost stanovení vitamínu C v limetě

$V_x$ (ml)	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_i - \bar{x} $	$ x_i - \bar{x} ^2$
3,0	22,72	0,27	0,0729
2,9	22,06	0,39	0,1521
3,0	22,72	0,27	0,0729
3,0	22,72	0,27	0,0729
2,9	22,06	0,39	0,1521
	$\bar{x} = 22,45$		$\sum = 0,52$ 2

Směrodatná odchylka  $s = 0,522$  mg

Průměrný obsah vitamínu C titrační metodou

$$\mu = 22,45 \pm 0,648 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

#### 4.1.2 Titrační stanovení vitamínu C v zelenině

Ze vzorku zeleniny byly pro titrační stanovení vitamínu C vybrány vzorky oranžové, zelené, červené a žluté papriky a brambor. Přesnost stanovení byla vyjádřena ve formě standardních statistických parametrů. Průměrný obsah vitamínu C ve vzorcích zeleniny byl vypočten pomocí statistického parametru vyjádřeného vzorcem (1) z kapitoly 2.2. Dále byl vypočten podle vzorce (2) odhad směrodatné odchylky  $s$ , který je základní charakteristikou u nahodilých chyb. Skutečný obsah vitamínu C byl vypočten pomocí vzorce (3). Hodnota Studentova koeficientu  $t$  je při testované hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  a při čtyřech stupních volnosti 2,776 [10].

Tabulka 11: Přesnost stanovení vitamínu C v paprice oranžové

$V_x$ (ml)	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
20,7	162,96	0,24	0,0576
20,8	163,75	0,55	0,3025
20,7	162,96	0,24	0,0576
20,7	162,96	0,24	0,0576
20,8	163,75	0,55	0,3025
	$\bar{x} = 163,20$		$\sum = 0,778$

Směrodatná odchylka  $s = 0,440$  mg

Průměrný obsah vitamínu C titrační metodou

$\mu = 163,2 \pm 0,546$  mg.100 g<sup>-1</sup> ( $\alpha = 0,05$ )

Tabulka 12: Přesnost stanovení vitamínu C v paprice zelené

$V_x$ (ml)	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
6,5	50,92	0,31	0,0961
6,4	50,14	0,47	0,2209
6,5	50,92	0,31	0,0961
6,5	50,92	0,31	0,0961
6,4	50,14	0,47	0,2209
	$\bar{x} = 50,61$		$\sum = 0,730$

Směrodatná odchylka  $s = 0,427$  mg

Průměrný obsah vitamínu C titrační metodou

$\mu = 50,61 \pm 0,530$  mg.100 g<sup>-1</sup> ( $\alpha = 0,05$ )

Tabulka 13: Přesnost stanovení vitamínu C v paprice žluté

$V_x$ (ml)	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
20,8	162,96	0,31	0,0961
20,7	162,18	0,47	0,2209
20,7	162,18	0,47	0,2209
20,8	162,96	0,31	0,0961
20,8	162,96	0,31	0,0961
	$\bar{x} = 162,65$		$\sum = 0,730$

Směrodatná odchylka  $s = 0,427$  mg

Průměrný obsah vitamínu C titrační metodou

$$\mu = 162,65 \pm 0,530 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 14: Přesnost stanovení vitamínu C v paprice červené

$V_x$ (ml)	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
18,0	140,25	0,32	0,1024
17,9	139,46	0,47	0,2209
18,0	140,25	0,32	0,1024
17,9	139,46	0,47	0,2209
18,0	140,25	0,32	0,1024
	$\bar{x} = 139,93$		$\sum = 0,749$

Směrodatná odchylka  $s = 0,749$ mg

Průměrný obsah vitamínu C titrační metodou

$$\mu = 139,93 \pm 0,929 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 15: Přesnost stanovení vitamínu C v brambore

$V_x$ (ml)	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
1,0	7,05	0,31	0,0961
0,9	6,26	0,48	0,2304
1,0	7,05	0,31	0,0961
1,0	7,05	0,31	0,0961
0,9	6,26	0,48	0,2304
	$\bar{x} = 6,74$		$\sum = 0,749$

Směrodatná odchylka  $s = 0,432$  mg

Průměrný obsah vitamínu C titrační metodou

$$\mu = 6,74 \pm 0,536 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

### 4.1.3 Celkové srovnání vitamínu C ve vzorcích ovoce a zeleniny titrační metodou

Tabulka 16: Přehled obsahu vitamínu C v ovoci a zelenině

Druh vzorku	průměrná spotřeba odměrného roztoku $V_x$ (ml)	směrodatná odchylka odměrného roztoku (ml)	obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )
mandarinka	3,56	0,058	27,11 ± 0,582
pomeranč	3,73	0,058	28,44 ± 0,542
gřep	3,53	0,058	26,87 ± 0,715
kiwi	7,74	0,058	60,02 ± 0,536
jahoda	5,10	0,100	39,18 ± 0,684
limeta	2,95	0,054	22,45 ± 0,648
citron	5,30	0,100	40,74 ± 0,689
červené hrozno	0,53	0,058	3,37 ± 0,393
bílé hrozno	0,32	0,055	1,73 ± 0,238
paprika oranžová	20,93	0,058	163,2 ± 0,546
paprika žlutá	20,86	0,058	162,6 ± 0,530
paprika červená	17,96	0,054	139,93 ± 0,929
paprika zelená	6,56	0,058	50,61 ± 0,530
brambora	0,96	0,058	6,74 ± 0,536

## 4.2 Stanovení vitamínu C metodou HPLC-UV/VIS

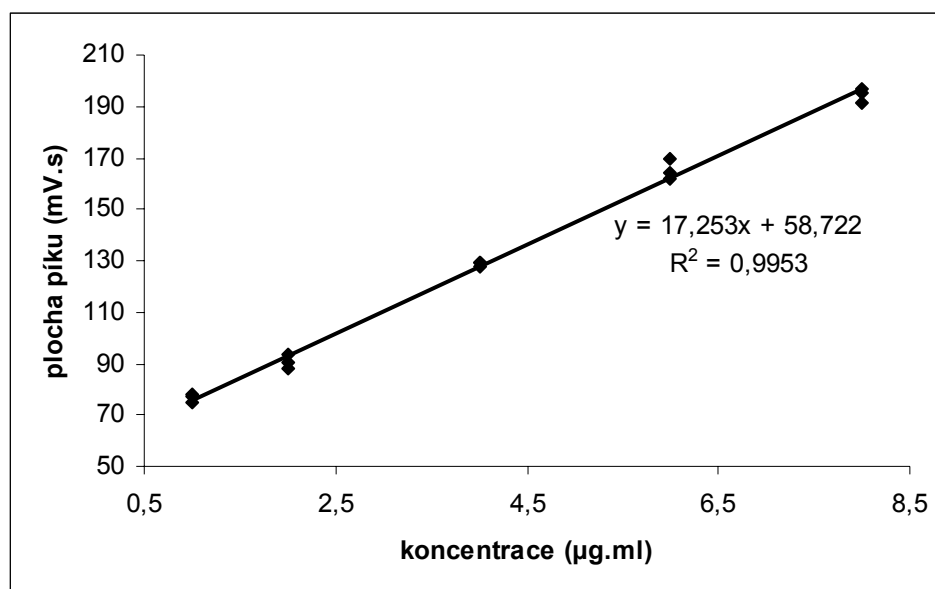
### 4.2.1 Kalibrační křivka pro stanovení vitamínu C metodou HPLC-UV/VIS

Kalibrační křivka vitamínu C pro chromatografické stanovení byla sestrojena podle postupu uvedeného v kapitole 3.2.3 Každý bod kalibrační křivky byl proměřen pětkrát. Z naměřených dat jednotlivých ploch píků byla vypočtena jejich průměrná hodnota. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost průměrné plochy příslušného píku ( $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ) na koncentraci vitamínu C ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

Tabulka 17: Kalibrace vitamínu C metodou HPLC-UV/VIS

Koncentrace vitamínu C ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Průměrná plocha píku ( $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ )	Směrodatná odchylka plochy píku ( $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ )
1	76,78	1,67
2	90,55	2,47
4	128,65	1,03
6	165,33	4,00
8	194,53	2,96

Graf 1: Kalibrační křivka s regresní rovnicí pro stanovení vitamínu C metodou HPLC



#### 4.2.2 Stanovení vitamínu C metodou HPLC-UV/VIS v ovoci



Stanovení vitamínu C bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 3.2.2 ve vzorcích grepu, pomeranče, kiwi, citronu, mandarince, jahod, v hroznu červeném a bílém a v limetě. Průměrný obsah vitamínu C v ovoci byl vypočten pomocí statistického parametru vyjádřeného vzorcem (1) z kapitoly 2.2. Dále byl vypočten podle vzorce (2) odhad směrodatné odchylky  $s$ , který je základní charakteristikou u nahodilých chyb. Skutečný obsah vitamínu C byl vypočten pomocí vzorce (3). Hodnota Studentova koeficientu  $t$  je při testované hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  a při čtyřech stupních volnosti 2,776 [10].

Tabulka 18: Stanovení vitamínu C v grepu metodou HPLC-UV/VIS

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
130,75	83,50	0,30	0,0256
130,56	83,28	0,52	0,0036
130,43	83,13	0,48	0,0441
130,45	83,15	0,65	0,0361
130,87	83,64	0,16	0,0900
	$\bar{x} = 83,34$		$\Sigma = 0,199$

Směrodatná odchylka  $s = 0,223$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC UV/VIS

$$\mu = 83,34 \pm 0,277 \text{ mg.100 g}^{-1} \quad (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 19: Přesnost stanovení vitamínu C v pomeranči metodou HPLC-UV/VIS

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
114,26	32,19	0,17	0,0289
113,21	31,58	0,78	0,6084
113,56	31,78	0,58	0,3364
115,88	33,13	0,77	0,5929
115,85	33,11	0,75	0,5625
	$\bar{x} = 32,36$		$\Sigma = 2,129$

Směrodatná odchylka  $s = 0,730$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC UV/VIS

$$\mu = 32,36 \pm 0,906 \text{ mg.100 g}^{-1} \quad (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 20: Přesnost stanovení vitamínu C v kiwi metodou HPLC-UV/VIS

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
94,01	20,45	0,73	0,5329
94,44	20,70	0,48	0,2304
96,29	21,77	0,59	0,3481
95,45	21,29	0,11	0,0121
95,23	21,16	0,02	0,0004
	$\bar{x} = 21,08$		$\Sigma = 1,124$

Směrodatná odchylka  $s = 0,530$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC UV/VIS

$$\mu = 21,08 \pm 0,658 \text{ mg.100 g}^{-1} \quad (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 21: Přesnost stanovení vitamínu C v citronu metodou HPLC-UV/VIS

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
108,44	28,82	0,64	0,4096
108,97	29,12	0,94	0,8836
105,49	27,11	1,07	1,1449
107,34	28,18	0,00	0,0000
106,45	27,66	0,52	0,2704
	$\bar{x} = 28,18$		$\Sigma = 2,708$

Směrodatná odchylka  $s = 0,822$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC UV/VIS

$$\mu = 28,18 \pm 1,020 \text{ mg.100 g}^{-1} \quad (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 22: Přesnost stanovení vitamínu C v mandarince metodou HPLC-UV/VIS

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
85,66	15,61	0,59	0,3481
88,94	17,51	1,31	1,7161

85,43	15,48	0,72	0,5184
87,09	16,44	0,24	0,0576
86,25	15,96	0,24	0,0576
	$\bar{x} = 16,20$		$\sum = 2,697$

Směrodatná odchylka  $s = 0,821$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC UV/VIS

$$\mu = 16,20 \pm 1,019 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \quad (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 23: Přesnost stanovení vitamínu C v jahodě metodou HPLC-UV/VIS

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
185,08	73,24	0,03	0,0009
185,56	73,52	0,31	0,0961
184,60	72,96	0,25	0,0625
185,40	73,42	0,21	0,0441
184,49	72,90	0,31	0,0961
	$\bar{x} = 73,21$		$\sum = 0,300$

Směrodatná odchylka  $s = 0,274$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC UV/VIS

$$\mu = 73,21 \pm 0,340 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \quad (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 24: Přesnost stanovení vitamínu C v červeném hroznu metodou HPLC-UV/VIS

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
64,1	0,78	0,36	0,1296
61,50	0,40	0,02	0,0004
59,05	0,05	0,37	0,1369
60,03	0,19	0,23	0,0529
63,39	0,68	0,26	0,0676
	$\bar{x} = 0,42$		$\sum = 0,387$

Směrodatná odchylka  $s = 0,311$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC UV/VIS

$$\mu = 0,42 \pm 0,386 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \quad (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 25: Přesnost stanovení vitamínu C v bílém hroznu metodou HPLC-UV/VIS

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
76,12	2,52	0,12	0,0144
74,12	2,23	0,17	0,0289
78,40	2,85	0,45	0,2025
72,51	2,00	0,40	0,1600
75,20	2,39	0,01	0,0001
	$\bar{x} = 2,40$		$\sum = 0,405$

Směrodatná odchylka  $s = 0,318$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC UV/VIS

$$\mu = 2,40 \pm 0,395 \text{ mg.100 g}^{-1} \quad (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 26: Přesnost stanovení vitamínu C v limetě metodou HPLC-UV/VIS

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
65,60	7,97	0,58	0,3364
66,34	8,83	0,28	0,0784
66,20	8,67	0,12	0,0144
66,11	8,56	0,01	0,0001
65,23	7,54	1,01	1,0201
	$\bar{x} = 8,32$		$\sum = 1,449$

Směrodatná odchylka  $s = 0,602$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC UV/VIS

$$\mu = 8,32 \pm 0,747 \text{ mg.100 g}^{-1} \quad (\alpha = 0,05)$$

#### 4.2.3 Stanovení vitamínu C metodou HPLC-UV/VIS v zelenině

Stanovení vitamínu C bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 3.2.2. Ze vzorku zeleniny byly vybrány vzorky oranžové, zelené, červené a žluté papriky a brambory. Přes-

nost stanovení byla vyjádřena ve formě standardních statistických parametrů. Průměrný obsah vitamínu C ve vzorcích zeleniny byl vypočten pomocí statistického parametru vyjádřeného vzorcem (1) z kapitoly 2.2. Dále byl počten podle vzorce (2) odhad směrodatné odchylky

$s$ , který je základní charakteristikou u nahodilých chyb. Skutečný obsah vitamínu C byl vypočten pomocí vzorce (3). Hodnota Studentova koeficientu  $t$  je při testované hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  a při čtyřech stupních volnosti 2,776 [10].

Tabulka 27: Přesnost stanovení vitamínu C v paprice oranžové metodou HPLC-UV/VIS

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
146,38	101,61	0,52	0,2704
147,99	103,48	1,35	1,8225
147,04	102,38	0,25	0,0625
145,90	101,06	1,07	1,1449
146,82	102,12	0,01	0,0001
	$\bar{x} = 102,13$		$\Sigma = 3,300$

Směrodatná odchylka  $s = 0,908$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC UV/VIS

$$\mu = 102,13 \pm 1,128 \text{ mg.100 g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 28: Přesnost stanovení vitamínu C v paprice zelené metodou HPLC-UV/VIS

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
163,65	121,63	0,41	0,1681
163,45	121,40	0,64	0,4096
164,72	122,87	0,83	0,6889
163,29	121,22	0,82	0,6724
164,89	123,07	1,03	1,0609
	$\bar{x} = 122,04$		$\Sigma = 3,00$

Směrodatná odchylka  $s = 0,866$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC UV/VIS

$$\mu = 122,04 \pm 1,075 \text{ mg.100 g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 29: Přesnost stanovení vitamínu C v paprice žluté metodou HPLC-UV/VIS

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
174,99	134,78	0,08	0,0064
174,87	134,64	0,22	0,0484
175,40	135,26	0,40	0,1600
174,92	134,70	0,16	0,0256
175,10	134,91	0,05	0,0025
	$\bar{x} = 134,86$		$\sum = 0,243$

Směrodatná odchylka  $s = 0,246$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC UV/VIS

$$\mu = 134,86 \pm 0,306 \text{ mg.100 g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 30: Přesnost stanovení vitamínu C v paprice červené metodou HPLC-UV/VIS

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
124,40	76,14	0,08	0,0064
124,65	76,42	0,20	0,0400
125,34	77,22	1,00	1,0000
125,49	77,40	1,18	1,3924
124,49	76,24	0,02	0,0004
	$\bar{x} = 76,68$		$\sum = 2,429$

Směrodatná odchylka  $s = 0,781$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC UV/VIS

$$\mu = 76,68 \pm 0,969 \text{ mg.100 g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Z důvodů velmi nízkého obsahu vitamínu C a velmi složité matrice vzorku brambory se nepodařilo touto metodou stanovit vitamin C. Negativním způsobem mohlo ovlivnit jeho stanovení i stáří vzorku, neboť šlo o brambor starý, vypěstovaný našimi pěstiteli v loňském roce. Je taktéž otázka, zda vzorky brambor byly skladovány za příznivých podmínek, či nikoliv. Mohlo také dojít k přemrznutí vzorku, což by také nasvědčovalo nazelenalému zbarvení bramboru ihned pod slupkou.

Tabulka 31: Obsah vitamínu C ve vzorcích metodou HPLC-UV/VIS

Vzorek	Průměrná plocha píku ( $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ )	Směrodatná odchylka plochy píku ( $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ )	Obsah vitamínu C ( $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ )
gřep	130,612	0,192	$84,34 \pm 0,277$
pomeranč	114,552	1,257	$32,36 \pm 0,906$
kiwi	95,084	0,891	$21,08 \pm 0,658$
citron	107,338	1,421	$28,18 \pm 1,023$
mandarinka	86,674	1,420	$16,20 \pm 1,022$
jahoda	125,026	0,773	$73,21 \pm 0,340$
limeta	65,896	1,075	$8,32 \pm 0,747$
červené hrozno	61,614	2,147	$0,42 \pm 0,386$
bílé hrozno	75,270	2,206	$2,40 \pm 0,397$
paprika oranžová	146,826	0,784	$102,13 \pm 1,128$
paprika zelená	164,000	0,748	$122,04 \pm 1,075$
paprika žlutá	175,056	0,211	$134,86 \pm 0,306$
paprika červená	124,874	0,505	$76,68 \pm 0,781$

Vzhledem k technickým problémům s HPLC HP 1100 nemohla být naměřena metoda stanovení vitamínu C se standardním přídatkem.

### 4.3 Stanovení vitamínu C metodou HPLC-ECD

#### 4.3.1 Kalibrační křivka pro stanovení vitamínu C metodou HPLC-ECD

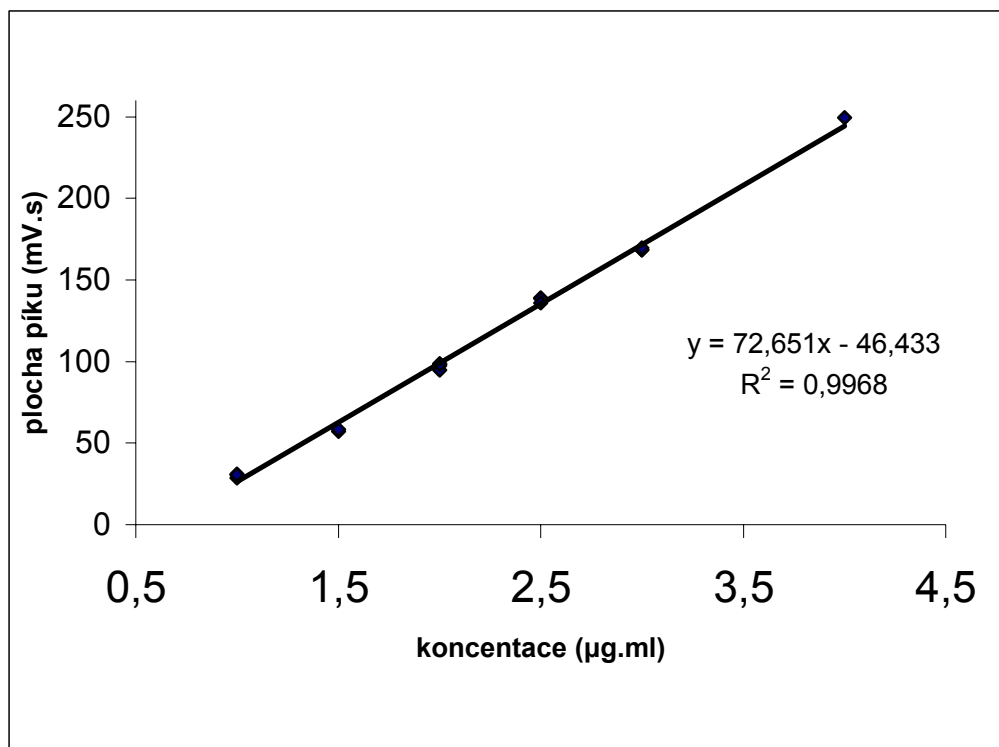
Kalibrační křivka pro chromatografické stanovení vitamínu C byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 3.2.5. Každý bod kalibrační křivky byl proměřen pětkrát a vypočtena odpovídající průměrná plocha píku. Naměřené hodnoty ploch píků jsou uvedeny v tabulce 62 a v tabulce 63. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost průměrné plochy příslušného píku na koncentraci kyseliny askorbové. Kalibrační křivka byla měřena za použití kanálů, kde byly stanoveny potenciály  $K_1 = 600$  mV a  $K_2 = 650$  mV.

Tabulka 32: Kalibrace vitamínu C metodou HPLC-ECD na  $K_1 = 600$  mV.

Koncentrace kyseliny askorbové ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Průměrná plocha píku ( $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ )	Směrodatná odchylka plochy píku ( $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ )
1	29,89	1,20
1,5	57,76	1,07
2	97,25	1,66
2,5	137,85	0,31
3	168,82	0,66
4	249,45	0,61

Graf 2: Kalibrační křivka s regresní rovnicí pro stanovení vitamínu C metodou HPLC-ECD na kanálu  $K_1 = 600$  mV.

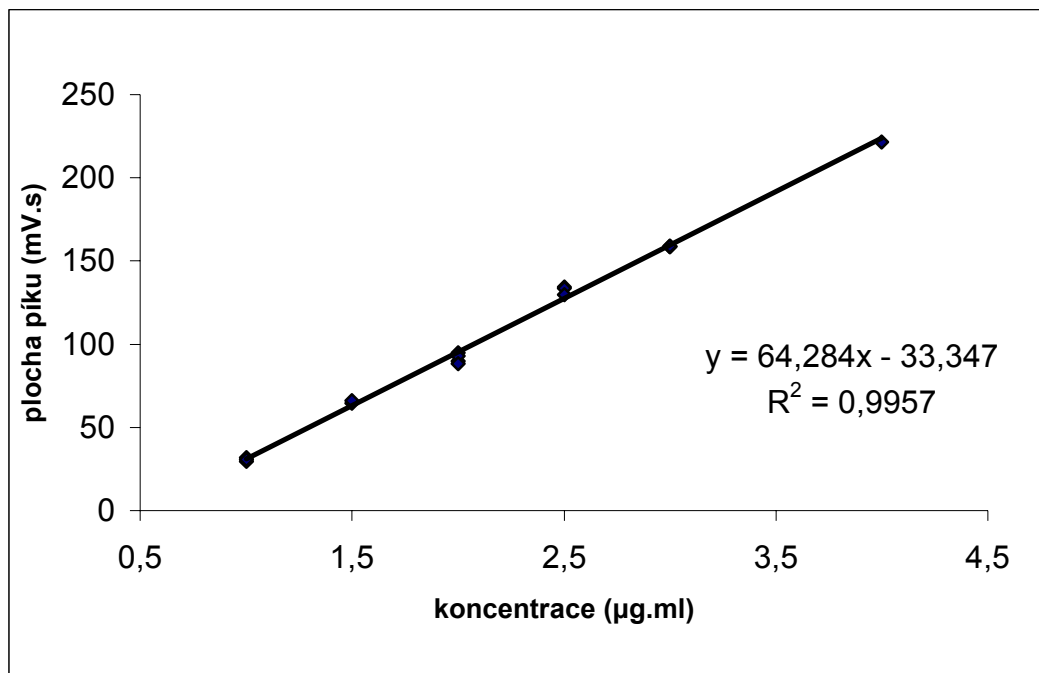




Tabulka 33: Kalibrace vitamínu C metodou HPLC-ECD na  $K_2 = 650$  mV.

Koncentrace kyseliny askorbové ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	Průměrná plocha píku ( $\text{mV.s}^{-1}$ )	Směrodatná odchylka plochy píku ( $\text{mV.s}^{-1}$ )
1	30,77	1,00
1,5	65,13	1,10
2	91,43	2,93
2,5	132,64	2,39
3	158,74	0,28
4	222,24	1,24

Graf 3: Kalibrační křivka s regresní rovnicí pro stanovení vitamínu C metodou HPLC-ECD na kanálu  $K_2 = 650$  mV.



#### 4.3.2 Stanovení vitamínu C metodou HPLC-ECD v ovoci

Byly porovnány vzorky od různých dodavatelů a to z Delvity a.s a z Kauflandu. Z důvodu lepší odezvy signálu byl použit první kanál  $K_1 = 600$  mV pro přesnější stanovení. Stanovení vitamínu C bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 3.2.4 ve vzorcích grepu, pomeranče, kiwi, citronu, mandarince, jahodách, v hroznu červeném a bílém a v limetě. Průměrný obsah vitamínu C v ovoci byl vypočten pomocí vzorce (1) z kapitoly 2.2. Dále byl počten podle vzorce (2) odhad směrodatné odchylky  $s$ , který je základní charakteristikou u nahodilých chyb. Skutečný obsah vitamínu C byl vypočten pomocí vzorce (3). Hodnota Studentova koeficientu  $t$  je při testované hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  a při čtyřech stupních volnosti 2,776 [10].

*Tabulka 34: Přesnost stanovení vitamínu C v grepu metodou HPLC-ECD u vzorků*

*z Delvity*

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
166,45	58,60	0,63	0,3969
164,68	58,12	0,15	0,0225
160,77	57,04	0,93	0,8649
163,56	57,81	0,16	0,0256
165,34	58,30	0,33	0,1089
	$\bar{x} = 57,97$		$\sum = 1,418$

Směrodatná odchylka  $s = 0,595$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC-ECD

$$\mu = 57,97 \pm 0,739 \text{ mg.100 g}^{-1} \quad (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 35: Přesnost stanovení vitamínu C v grepu metodou HPLC-ECD u vzorků

z Kauflandu

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
58,46	36,09	0,22	0,0484
62,00	37,31	1,44	2,0736
54,94	34,88	0,99	0,9801
56,37	35,38	0,49	0,2401
57,23	35,67	0,20	0,0400
	$\bar{x} = 35,87$		$\sum = 3,382$

Směrodatná odchylka  $s = 0,920$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC-ECD

$$\mu = 35,87 \pm 1,142 \text{ mg.100 g}^{-1} \quad (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 36: Přesnost stanovení vitamínu C v pomeranči metodou HPLC-ECD u vzorků

z Delvity

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
116,36	44,82	0,13	0,0169
117,18	45,04	0,09	0,0081
118,17	45,31	0,36	0,1296
116,98	44,99	0,04	0,0016
115,54	44,59	0,36	0,1296
	$\bar{x} = 44,95$		$\sum = 0,286$

Směrodatná odchylka  $s = 0,267$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC-ECD

$$\mu = 44,95 \pm 0,332 \text{ mg.100 g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 37: Přesnost stanovení vitamínu C v pomeranči metodou HPLC-ECD u vzorků

z Kauflandu

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
134,68	49,86	0,19	0,0361
135,84	50,18	0,13	0,0169
134,87	49,91	0,14	0,0196
135,65	50,13	0,08	0,0064
135,90	50,19	0,14	0,0196
	$\bar{x} = 50,05$		$\sum = 0,099$

Směrodatná odchylka  $s = 0,157$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC-ECD

$$\mu = 50,05 \pm 0,195 \text{ mg.100 g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 38: Přesnost stanovení vitamínu C v kiwi metodou HPLC-ECD u vzorků

z Delvity

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
68,03	31,51	0,59	0,3481
69,56	31,93	0,17	0,0289
73,56	33,03	0,93	0,8649
70,43	32,17	0,07	0,0049
69,29	31,86	0,24	0,0576
	$\bar{x} = 32,10$		$\Sigma = 1,304$

Směrodatná odchylka  $s = 0,571$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC-ECD

$$\mu = 32,10 \pm 0,709 \text{ mg.100 g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 39: Přesnost stanovení vitamínu C v kiwi metodou HPLC-ECD u vzorků

z Kauflandu

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
52,42	34,02	0,08	0,0064
52,44	34,02	0,08	0,0064
51,98	33,86	0,08	0,0064
52,79	34,14	0,20	0,0400
51,39	33,66	0,28	0,0784
	$\bar{x} = 33,96$		$\Sigma = 0,138$

Směrodatná odchylka  $s = 0,185$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC-ECD

$$\mu = 33,96 \pm 0,230 \text{ mg.100 g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 40: Přesnost stanovení vitamínu C v citronu metodou HPLC-ECD u vzorků

z Delvity

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
109,68	53,72	0,34	0,1156
108,98	53,48	0,58	0,3364
114,69	55,44	1,38	1,9044
110,59	54,03	0,03	0,0009
109,40	53,62	0,44	0,1936
	$\bar{x} = 54,06$		$\sum = 2,551$

Směrodatná odchylka  $s = 0,799$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC-ECD

$$\mu = 52,75 \pm 0,991 \text{ mg.100 g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 41: Přesnost stanovení vitamínu C v citronu metodou HPLC-ECD u vzorků

z Kauflandu

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
89,59	46,81	1,12	1,2544
82,93	44,52	1,17	1,3689
85,38	45,36	0,33	0,1089
88,48	46,43	0,74	0,5476
85,28	45,32	0,37	0,1369
	$\bar{x} = 45,69$		$\sum = 3,417$

Směrodatná odchylka  $s = 0,924$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC-ECD

$$\mu = 45,69 \pm 1,147 \text{ mg.100g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 42: Přesnost stanovení vitamínu C v mandarince metodou HPLC-ECD u vzorků

z Delvity

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
66,34	15,52	0,04	0,0016
65,89	15,46	0,02	0,0004
66,57	15,55	0,07	0,0049
65,91	15,46	0,02	0,0004
65,44	15,40	0,08	0,0064
	$\bar{x} = 15,48$		$\Sigma = 0,013$

Směrodatná odchylka  $s = 0,058$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC-ECD

$$\mu = 15,48 \pm 0,073 \text{ mg.100 g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 43: Přesnost stanovení vitamínu C v mandarince metodou HPLC-ECD u vzorků

z Kauflandu

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
61,64	37,19	0,16	0,0256
61,63	37,19	0,16	0,0256
60,37	36,75	0,28	0,0784
61,95	37,30	0,27	0,0729
60,27	36,72	0,31	0,0961
	$\bar{x} = 37,03$		$\Sigma = 0,299$

Směrodatná odchylka  $s = 0,273$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC-ECD

$$\mu = 37,03 \pm 0,339 \text{ mg.100 g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 44: Přesnost stanovení vitamínu C v jahodě metodou HPLC-ECD u vzorků

z Delvity

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
129,63	60,59	0,08	0,0064
131,67	61,29	0,62	0,3844
130,55	60,90	0,23	0,0529
129,45	60,52	0,15	0,0225
128,12	60,07	0,60	0,3600
	$\bar{x} = 60,67$		$\Sigma = 0,826$

Směrodatná odchylka  $s = 0,454$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC-ECD

$$\mu = 60,67 \pm 0,564 \text{ mg.100 g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 45: Přesnost stanovení vitamínu C v jahodě metodou HPLC-ECD u vzorků

z Kauflandu

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
117,37	56,37	0,85	0,7225
123,20	58,37	1,15	1,3225
120,38	57,40	0,18	0,0324
118,90	56,89	0,33	0,1089
119,37	57,05	0,17	0,0289
	$\bar{x} = 57,22$		$\Sigma = 2,215$

Směrodatná odchylka  $s = 0,744$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC-ECD

$$\mu = 57,22 \pm 0,924 \text{ mg.100 g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 46: Přesnost stanovení vitamínu C v červeném hroznu metodou HPLC-ECD u vzorků z Delvity



Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
109,26	1,07	0,04	0,0016
117,26	1,13	0,02	0,0004
118,11	1,13	0,02	0,0004
115,20	1,11	0,00	0,0000
112,29	1,09	0,02	0,0004
	$\bar{x} = 1,11$		$\sum = 0,002$

Směrodatná odchylka  $s = 0,026$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC-ECD

$$\mu = 1,11 \pm 0,033 \text{ mg.100 g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 47: Přesnost stanovení vitamínu C v červeném hroznu metodou HPLC-ECD u vzorků z Kauflandu

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
100,45	1,01	0,02	0,0004
105,38	1,04	0,01	0,0001
102,47	1,02	0,01	0,0001
103,48	1,03	0,00	0,0000
105,18	1,04	0,01	0,0001
	$\bar{x} = 1,03$		$\sum = 0,000$ 7

Směrodatná odchylka  $s = 0,013$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC-ECD

$$\mu = 1,03 \pm 0,016 \text{ mg.100 g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 48: Přesnost stanovení vitamínu C v bílém hroznu metodou HPLC-ECD u vzorků z Delvity

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
86,04	4,56	0,46	0,2116
112,24	5,46	0,44	0,1936
95,93	4,90	0,12	0,0144
98,40	4,98	0,04	0,0016
105,23	5,22	0,20	0,0400
	$\bar{x} = 5,02$		$\sum = 0,461$

Směrodatná odchylka  $s = 0,339$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC-ECD

$$\mu = 5,02 \pm 0,421 \text{ mg.100 g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 49: Přesnost stanovení vitamínu C v bílém hrozně metodou HPLC-ECD

u vzorků z Kauflandu

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
65,89	3,87	0,03	0,0009
65,03	3,84	0,00	0,0000
65,37	3,85	0,01	0,0001
65,38	3,85	0,01	0,0001
64,58	3,82	0,02	0,0004
	$\bar{x} = 3,84$		$\sum = 0,001$ 5

Směrodatná odchylka  $s = 0,002$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC-ECD

$$\mu = 3,84 \pm 0,024 \text{ mg.100 g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 50: Přesnost stanovení vitamínu C v limetě metodou HPLC-ECD u vzorků

*z Delvity*

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
70,40	32,16	0,53	0,2809
72,40	32,71	0,02	0,0004
73,65	33,06	0,37	0,1369
73,28	33,96	0,27	0,0729
71,90	32,58	0,11	0,0121
	$\bar{x} = 32,69$		$\Sigma = 0,503$

Směrodatná odchylka  $s = 0,354$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC-ECD

$$\mu = 32,69 \pm 0,439 \text{ mg.100 g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

*Tabulka 51: Přesnost stanovení vitamínu C v limetě metodou HPLC-ECD u vzorků*

*z Kauflandu*

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
79,44	43,31	0,35	0,1225
77,47	42,64	0,32	0,1024
78,37	42,95	0,01	0,0001
77,39	42,61	0,35	0,1225
79,36	43,29	0,33	0,1089
	$\bar{x} = 42,96$		$\Sigma = 0,338$

Směrodatná odchylka  $s = 0,338$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC-ECD

$$\mu = 42,96 \pm 0,419 \text{ mg.100 g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

### 4.3.3 Stanovení vitamínu C metodou HPLC-ECD v zelenině

Ze vzorku zeleniny byly vybrány vzorky oranžové, zelené, červené a žluté papriky a brambory. Všechny vzorky byly měřeny při napětí  $K_1 = 600$  mV s výjimkou brambory, kde lepší odezva byla na  $K_2 = 650$  mV. Průměrný obsah vitamínu C v zelenině byl vypočten pomocí vzorce (1) z kapitoly 2.2. Dále byl počten podle vzorce (2) odhad směrodatné odchylky  $s$ , který je základní charakteristikou u nahodilých chyb. Skutečný obsah vitamínu C byl vypočten pomocí vzorce (3). Hodnota Studentova koeficientu  $t$  je při testované hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  a při čtyřech stupních volnosti 2,776 [10].

Tabulka 52: Přesnost stanovení vitamínu C v paprice oranžové metodou HPLC-ECD u vzorků z Delvity

Plocha píku ( $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ )	Obsah vitamínu C ( $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
110,51	108,01	0,69	0,4761
109,05	107,01	0,31	0,0961
109,52	107,33	0,01	0,0001
110,12	107,74	0,42	0,1764
108,30	106,49	0,83	0,6889
	$\bar{x} = 107,32$		$\sum = 1,438$

Směrodatná odchylka  $s = 0,599$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC-ECD

$$\mu = 107,32 \pm 0,744 \text{ mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 53: Přesnost stanovení vitamínu C v paprice oranžové metodou HPLC-ECD u vzorků z Kauflandu

Plocha píku ( $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ )	Obsah vitamínu C ( $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
67,87	78,67	0,76	0,5776
67,65	78,51	0,60	0,3600
65,48	77,02	0,89	0,7904
67,38	78,33	0,42	0,1756
65,49	77,03	0,88	0,7744
	$\bar{x} = 77,91$		$\sum = 2,679$

Směrodatná odchylka  $s = 0,818$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC-ECD

$$\mu = 77,91 \pm 1,016 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 54: Přesnost stanovení vitamínu C v paprice zelené metodou HPLC-ECD u vzorků z Delvity

Plocha píku ( $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ )	Obsah vitamínu C ( $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
35,40	61,95	0,11	0,0121
35,87	62,31	0,47	0,2209
34,89	61,57	0,27	0,0729
35,90	62,33	0,49	0,2401
34,19	61,04	0,80	0,6400
	$\bar{x} = 61,84$		$\sum = 1,186$

Směrodatná odchylka  $s = 0,544$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC-ECD

$$\mu = 61,84 \pm 0,676 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 55: Přesnost stanovení vitamínu C v paprice zelené metodou HPLC-ECD u vzorků z Kauflandu

Plocha píku ( $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ )	Obsah vitamínu C ( $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
87,50	92,18	0,72	0,5184
87,39	92,10	0,64	0,4096
86,38	91,40	0,12	0,0144
84,49	90,10	1,56	2,4336
86,98	91,82	0,33	0,1089
	$\bar{x} = 91,52$		$\sum = 3,485$

Směrodatná odchylka  $s = 0,933$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC-ECD

$$\mu = 91,52 \pm 1,159 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 56: Přesnost stanovení vitamínu C v paprice žluté metodou HPLC-ECD u vzorků z Delvity

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
93,06	96,00	0,03	0,0009
93,17	96,08	0,11	0,0121
92,67	95,73	0,24	0,0576
93,8	96,51	0,54	0,2916
92,40	95,55	0,42	0,1764
	$\bar{x} = 95,97$		$\sum = 0,538$

Směrodatná odchylka  $s = 0,366$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC-ECD

$$\mu = 95,97 \pm 0,455 \text{ mg.100 g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 57: Přesnost stanovení vitamínu C v paprice žluté metodou HPLC-ECD u vzorků z Kauflandu

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
73,38	82,46	0,46	0,2116
74,42	83,17	0,26	0,0676
73,38	82,46	0,46	0,2116
74,92	83,52	0,60	0,3600
74,10	82,95	0,04	0,0016
	$\bar{x} = 82,91$		$\sum = 0,852$

Směrodatná odchylka  $s = 0,462$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC-ECD

$$\mu = 82,91 \pm 0,573 \text{ mg.100g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 58: Přesnost stanovení vitamínu C v paprice červené metodou HPLC-ECD u vzorků z Delvity

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
86,99	91,82	0,21	0,0441
88,84	93,10	1,07	1,1449
85,76	90,98	1,05	1,1025
87,54	92,20	0,17	0,0289
87,34	92,07	0,04	0,0016
	$\bar{x} = 92,03$		$\sum = 2,322$

Směrodatná odchylka  $s = 0,762$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC-ECD

$$\mu = 92,03 \pm 0,946 \text{ mg.100 g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 59: Přesnost stanovení vitamínu C v paprice červené metodou HPLC-ECD u vzorků z Kauflandu

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
63,11	75,39	0,04	0,0016
63,61	76,42	0,99	0,9801
61,87	74,54	0,89	0,7921
62,48	74,96	0,47	0,2209
63,75	75,85	0,42	0,1764
	$\bar{x} = 75,43$		$\sum = 2,171$

Směrodatná odchylka  $s = 0,737$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC-ECD

$$\mu = 75,43 \pm 0,915 \text{ mg.100g}^{-1} (\alpha = 0,05)$$

Tabulka 60: Přesnost stanovení vitamínu C v bramboře metodou HPLC-ECD u vzorků

z Delvity

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
12,41	5,74	0,01	0,0001
11,45	5,67	0,08	0,0064
12,57	5,76	0,01	0,0001
13,24	5,81	0,06	0,0036
12,9	5,78	0,03	0,0009
	$\bar{x} = 5,75$		$\sum = 0,0111$

Směrodatná odchylka  $s = 0,053$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC-ECD

 $\mu = 5,78 \pm 0,065$  mg.100g<sup>-1</sup> ( $\alpha = 0,05$ )

Tabulka 61: Přesnost stanovení vitamínu C v bramboře metodou HPLC-ECD u vzorků

z Kauflandu

Plocha píku (mV.s <sup>-1</sup> )	Obsah vitamínu C (mg.100 g <sup>-1</sup> )	$ x_1 - \bar{x} $	$ x_1 - \bar{x} ^2$
11,56	5,68	0,01	0,0001
10,98	5,64	0,03	0,0009
10,67	5,61	0,06	0,0036
10,66	5,61	0,06	0,0036
12,9	5,78	0,11	0,0121
	$\bar{x} = 5,67$		$\sum = 0,020$

Směrodatná odchylka  $s = 0,071$  mg

Průměrný obsah vitamínu C metodou HPLC-ECD

 $\mu = 5,67 \pm 0,088$  mg.100g<sup>-1</sup> ( $\alpha = 0,05$ )



#### 4.3.4 Metoda standardního přídávku vitamínu C pro HPLC-ECD

Standardní přídavek byl přidán k pomeranči jehož průměrná plocha píku pro proměření byla  $143,7 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  a po dosazení do kalibrační rovnice byl obsah vitamínu C  $5,23 \text{ mg}\cdot 10\text{g}^{-1}$ . Poté byl s přesností na  $0,0001 \text{ g}$  naměřen  $1 \text{ mg}$  standardního preparátu vitamínu C a tento byl přidán ke vzorku pomeranče. Izolační postup byl zopakován stejným způsobem, jako byl popsán v kapitole 3.2.2 a stejně tak byl tento vzorek chromatograficky stanoven. Výsledná plocha píku vzorku se standardním přídávkem byla  $181,48 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . Dosazením této hodnoty do kalibrační křivky pro kanál  $K_1 = 600 \text{ mV}$  a vynásobením příslušným ředěním byl vypočten obsah vitamínu C  $6,26 \text{ mg}\cdot 10\text{g}^{-1}$ . Jak je patrné z výsledků měření, byl ověřen postup izolace vitamínu C a jeho stanovení při daných chromatografických podmínkách.

#### 4.3.5 Celkové srovnání vitamínu C ve vzorcích ovoce a zeleniny

Stanovení bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 3.2.3. Výsledný filtrát byl vždy těsně před každým nástřikem na kolonu ředěn, poněvadž kyselina askorbová je málo stabilní. Z každého filtrátu bylo provedeno pět analýz a z naměřených hodnot ploch píků byla vypočtena průměrná hodnota. Obsah vitamínu C ve vzorcích byl zjištěn dosazením průměrné hodnoty plochy píku do regresní rovnice a vynásobením příslušným koeficientem ředění.

Pro každé ovoce bylo použito jiné ředění, protože každý vzorek obsahuje jiné množství vitamínu C. U této metody bylo zvoleno měření paralelně dvou vzorků od různých dodavatelů a to z Delvity a z Kauflandu. K výpočtu obsahu vitamínu C byl použit první kanál  $K_1 = 600 \text{ mV}$  pro přesnější stanovení. Kromě složitější matrice vzorku brambory, kde byla lepší odezva při  $K_2 = 650 \text{ mV}$ .

*Tabulka 62: Obsah vitamínu C ve vzorcích měřených metodou HPLC-ECD a zakoupených v Delvitě a v Kauflandu*

Vzorek	Průměrná plocha píku ( $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ )		Směrodatná odchylka plochy píku ( $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ )		Obsah vitamínu C ( $\text{mg}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ )	
	Delvita	Kaufland	Delvita	Kaufland	Delvita	Kaufland
gřep	164,16	57,80	2,17	2,68	$57,97 \pm 0,739$	$35,87 \pm 1,142$
pomeranč	116,84	135,39	0,97	0,57	$44,95 \pm 0,332$	$50,05 \pm 0,195$
kiwi	70,17	52,20	2,07	0,54	$32,10 \pm 0,709$	$33,94 \pm 0,230$
citron	110,66	86,33	2,32	2,68	$54,06 \pm 0,991$	$45,69 \pm 1,147$
mandarinka	66,03	61,17	0,44	0,79	$15,48 \pm 0,073$	$37,03 \pm 0,339$
jahoda	129,88	119,84	1,32	2,17	$60,67 \pm 0,564$	$57,22 \pm 0,924$
limeta	72,33	78,41	1,28	0,99	$32,69 \pm 0,439$	$42,96 \pm 0,419$
červené hrozno	114,42	103,39	3,66	2,04	$1,11 \pm 0,033$	$1,03 \pm 0,016$
bílé hrozno	99,57	35,25	9,88	0,48	$5,02 \pm 0,421$	$3,84 \pm 0,024$
paprika oranžová	109,50	66,77	0,87	1,19	$107,32 \pm 0,774$	$77,91 \pm 1,016$
paprika zelená	35,25	86,55	0,72	1,23	$61,74 \pm 0,676$	$91,52 \pm 1,159$
paprika žlutá	93,02	54,04	0,53	0,67	$95,97 \pm 0,455$	$82,91 \pm 0,573$
paprika červená	87,29	62,79	1,10	1,74	$92,03 \pm 0,946$	$75,43 \pm 0,915$
brambora	12,54	11,35	0,67	0,93	$5,78 \pm 0,065$	$5,67 \pm 0,088$

Tabulka 63: Obsah vitamínu C ve vzorcích ovoce a zeleniny

Vzorek	Titrační metoda	HPLC-UV/VIS	HPLC-ECD	
			Delvita	Kaufland
gřep	27,11 ± 0,582	84,34 ± 0,277	57,97 ± 0,739	35,87 ± 1,142
pomeranč	28,44 ± 0,542	32,36 ± 0,906	44,95 ± 0,332	50,05 ± 0,195
kiwi	26,87 ± 0,715	21,08 ± 0,658	32,10 ± 0,709	33,94 ± 0,230
citron	60,02 ± 0,536	28,18 ± 1,023	54,06 ± 0,991	45,69 ± 1,147
mandarinka	39,18 ± 0,684	16,20 ± 1,022	15,48 ± 0,073	37,03 ± 0,339
jahoda	22,45 ± 0,648	73,21 ± 0,340	60,67 ± 0,564	57,22 ± 0,924
limeta	40,74 ± 0,689	8,32 ± 0,747	32,69 ± 0,439	42,96 ± 0,419
červené hrozno	3,37 ± 0,393	0,42 ± 0,386	1,11 ± 0,033	1,03 ± 0,016
bílé hrozno	1,73 ± 0,238	2,40 ± 0,397	5,02 ± 0,421	3,84 ± 0,024
paprika oranžová	163,2 ± 0,546	102,13 ± 1,128	107,32 ± 0,774	77,91 ± 1,016
paprika zelená	162,6 ± 0,530	122,04 ± 1,075	61,74 ± 0,676	91,52 ± 1,159
paprika žlutá	139,93 ± 0,929	134,86 ± 0,306	95,97 ± 0,455	82,91 ± 0,573
paprika červená	50,61 ± 0,530	76,68 ± 0,781	92,03 ± 0,946	75,43 ± 0,915
brambora	6,74 ± 0,536	-	5,78 ± 0,065	5,67 ± 0,088

## ZÁVĚR

Cílem této předložené diplomové práce bylo vypracování, zavedení a ověření provozních analytických metod vhodných ke stanovení vitamínu C. V rámci této práce byly testovány optimální extrakční postupy vhodné ke kvantitativní izolaci vitamínu C z ovoce a zeleniny.

K analýze vitamínu C byly testovány chromatografické metody a posléze i titrační metoda. Výsledky jednotlivých analýz byly zpracovány pomocí standardních statistických parametrů za použití Studentova rozložení náhodných odchylek pro daný stupeň volnosti. Výsledky byly testovány na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  (95 %).

Nejprve byly provedeny pokusy na optimalizaci izolace vitamínu C z matrice ovoce a zeleniny a speciálně z brambor. Stanovení bylo provedeno ve vzorcích grepu, pomeranče, kiwi, citronu, mandarince, jahody, v hroznu červeném, bílém a v limetě. U zeleniny byly použity vzorky papriky oranžové, zelené, žluté a červené a brambor.

Na stanovení vitamínu C byla zavedena chromatografická metodika HPLC-UV/VIS. Byly testovány různé vlnové délky v rozmezí od 230 nm až po 320 nm, přičemž nejlepší absorbance vitamínu C bylo dosaženo při vlnové délce 254 nm. Taktéž byl testován průtok mobilní fáze od 0,8 do 1,2 ml.min<sup>-1</sup>. Jako optimální průtok mobilní fáze byl zvolen 1,1 ml.min<sup>-1</sup>. Byly testovány zároveň různé mobilní fáze jako methanol, methanol:redestilovaná voda v poměru 50:50, methanol:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> v poměru 98:2 a posléze v poměru 99:1. Nejlépe se osvědčil methanol o již zmiňovaném průtoku 1,1 ml.min<sup>-1</sup>. Vzorky byly měřeny na koloně SUPELCOSIL-LC8 (15 cm x 4,6 mm; 5 μm). Nejprve byla pro izolaci vitamínu C použita kyselina šťavelová, ale po smíchání s methanolem se roztok zakalil a to by mohlo způsobit ucpání kolony. Z tohoto důvodu byla pro izolaci vitamínu C zvolena směs CH<sub>4</sub>:H<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> v poměru 99:0,5:0,5. Eluce byla provedena izokraticky, retenční čas vitamínu C byl cca 1,8 min. Protože u tohoto přístroje došlo k technické závadě, metodu nebylo možno ověřit standardním přídatkem. V době, než byl přístroj opraven, byl stanoven vitamin C titrační metodou, kdy byly vzorky titrovány roztokem 2,6-dichlorfenolindofenolem v prostředí 2 % kyseliny šťavelové.

Na stanovení vitamínu C byla dále zavedena metodika HPLC-ECD, kde byl také testován průtok mobilní fáze. Jako nejlepší byl zvolen opět 1,1 ml.min<sup>-1</sup>. Jako mobilní fáze zde byla použita směs CH<sub>4</sub>:H<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> v poměru 99:0,5:0,5. Izolace vitamínu C byla provedena přímo v této mobilní fázi. Vzorky byly měřeny taktéž na koloně SUPELCOSIL-LC8

(15 cm x 4,6 mm; 5  $\mu$ m). Na elektrody byly vloženy různá napětí v rozmezí od 500 mV do 700 mV a ochranná guard cela byla zvolena 750 mV. Nejlepší odezvy bylo dosaženo při vložení napětí 600 mV u vzorků ovoce a zeleniny a 650 mV u bramboru. Eluce probíhala izokraticky. U tohoto přístroje byla provedena i metoda standardního přídatku, kdy jsme ověřili přesnost stanovení vitamínu C a zároveň postup jeho extrakce z reálných vzorků.

Ke stanovení obsahu vitamínu C v ovoci a zelenině byly zavedeny dvě chromatografické metody HPLC-UV/VIS a HPLC-ECD. Zároveň byla provedena titrační metoda s 2,6-dichlorfenolindofenolem jako odměrným roztokem. Tyto metodiky byly zavedeny jako podklad pro další práci, např. při měření a zkoumání ztrát vitamínu C při úpravě ovoce a zeleniny v pokrmech.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] Hoza, I., Kramářová, D.: Potravinařská biochemie II, FT - UTB ve Zlíně, 2006, ISBN 80-7318-395-1
- [2] Liste, A.J., Del Mastro, N.L.: Ascorbic acid as radiation protektor on polysacharides used in food industry, Colloids and surfaces A-physicochemical and engineering aspekt 249, p.1-3, 2004, ISSN: 0927-7757
- [3] Wirth, R.: Vitamins and trace elemets in nutritio, Medizinsche klinik 101 p.163-166, 2006, ISSN: 0723-5003
- [4] Barker, J.: Lind and limeys .1. a brief early history of scurvy and the search for its cure in the 18th-century, Journal of biological education 26, p.45-53, 1992  
ISSN: 0021-9266
- [5] Hanus, J.: Albert Szent-Gyorgyi and his life, Journal of molecular structure-theochem 666, p. 786-691, 2003, ISSN: 0166-1280
- [6] Velíšek, J.: Chemie potravin 2, VŠCHT Praha, OSSIS-Tábor, 1999
- [7] Combs, Gerald F.: The Vitamins, second edition, ACADEMIC PRESS, 1999
- [8] Leskova, E., Kubikova, J. at all.: Vitamin losses, retention during heat treatment and continual changes expressed by methematical models, Journal of food composition and analysis 19, p. 252-276, 2006, ISSN: 0889-1575
- [9] Halasz, S., Bordor, B.: On the morphological and chemical stability of vitamin C  
Journal of crystal growth 128, p. 1-4, 1993, ISSN: 0022-0248
- [10] Kramářová, D.: Účinné složky vitaminových preparátů, VUT Brno, 2000
- [11] Kolektiv autorů: Fyziologie a hygiena výživy, 2.vydání, VVŠ PV Vyškov, 2003
- [12] Pánek, J., Pokorný, J., Dostálová J., Kohout P.: Základy výživy, vydání první, Svoboda Servis, 2002
- [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) [online]. 2003, [cit. 2003-01-01]. 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] Brázdová, Z.: Výživa člověka, 1.vydání, VVŠ PV Vyškov, 1995
- [16] Gebert, S. and comp.: Influence of different dietary vitamin C levels on vitamin E and C content and oxidative stability in various tissues and stored m-longissimus dorsi of growing pigs, Meat science 73, p. 362-367, 2006, ISSN: 0309-1740
- [17] Halligan, T., Russell, D. and comp.: Identificatin and treatment of scurvy , Oral surgery oral medicine oral pathology oral radiology and endodontics 100 [online]. 2005  
ISSN: 1079-2104
- [18] Velíšek, J.: Chemie potravin 2, VŠCHT Praha, OSSIS-Tábor, 1999
- [19] Vodrážka, Z., Biochemie 3, Akademie věd České republiky, 1993
- [20] Squadrito, GL. and comp.: HPLC-ECD analysis of water-soluble antioxidants in biological symplex, Free radical biology and medicine 39 [online]. 2005,  
ISSN: 0891-5849
- [21] Hernandez, Y. and comp.: Determination of vitamin C in tropical fruit, Food chemistry 96 [online].2006, ISSN: 0308-8146
- [22] Sommer, L.: Teoretické základy analytické chemie III., FCH VUT Brno, 1995
- [23] Pacáková, K., Štuhlík, K.: Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, UK Praha, SPN Praha 1986
- [24] Romeu-Nadal, M. and comp.:Rapid high-performance liquid chromatographic method for Vitamin C determination in human milk versus an enzymatic Metod, Journal of chromatography B.analytical technologies in the biomedical and life science p. 41-46, 2006, ISSN: 1570-0232
- [25] Klouda, P.: Moderní analytické metody, 1. vydání, Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava 1996

[26] ESA, Inc. (USA) – Coulochem III REFERENCE MANUAL

[27] Wilson, K., Walker, J.: Principles and Technique of Practical Biochemistry, University

Press, Cambridge 2000



**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

HPLC Vysokoučinná kapalinová chromatografie

UV Ultrafialová oblast spektra

VIS Viditelná oblast spektra

ECD Elektrochemický detektor

Afssa Francouzská agentura pro potravinářskou bezpečnost

LDL Lipoprotein s nízkou hustotou

HDL Lipoprotein s vysokou hustotou

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1. Vitamin C.....	13
Obrázek 2. Oxidačně-redukční systém vitamínu C.....	13
Obrázek 3. Zpětná redukce L-dehydroaskorbové kyseliny.....	14
Obrázek 4. Oxidační proces.....	15
Obrázek 5. Vznik kyseliny L-askorbové.....	16
Obrázek 6. Projevy avitamino- sy.....	22
Obrázek 7. Schéma HPLC-UV/VIS.....	27
Obrázek 8. HPLC HP 1100.....	29
Obrázek 9. Kolona HPLC HP 1100.....	29
Obrázek 10. Coulochem III.....	30
Obrázek 11. Kolona Coulochemu III.....	30
Obrázek 12. Celaskon v tabletách	
Obrázek 13. Celaskon s dlouhotrvajícím účinkem	
Obrázek 14. Celaskon šumivé tablety	
Obrázek 15. Injekční forma vitamínu C	

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Množství vitamínu C v ovoci a zelenině.....	20
Tabulka 2: Přesnost stanovení vitamínu C v grepu.....	41
Tabulka 3: Přesnost stanovení vitamínu C v pomeranči.....	41
Tabulka 4: Přesnost stanovení vitamínu C v kiwi.....	41
Tabulka 5: Přesnost stanovení vitamínu C v citronu.....	42
Tabulka 6: Přesnost stanovení vitamínu C v mandarince.....	42
Tabulka 7: Přesnost stanovení vitamínu C v jahodě.....	43
Tabulka 8: Přesnost stanovení vitamínu C v červeném hrozně.....	43
Tabulka 9: Přesnost stanovení vitamínu C v bílém hrozně.....	43
Tabulka 10: Přesnost stanovení vitamínu C v limetě.....	44
Tabulka 11: Přesnost stanovení vitamínu C v paprice oranžové.....	45
Tabulka 12: Přesnost stanovení vitamínu C v paprice zelené.....	45
Tabulka 13: Přesnost stanovení vitamínu C v paprice žluté.....	45
Tabulka 14: Přesnost stanovení vitamínu C v paprice červené.....	46

Tabulka	15:	Přesnost	stanovení	vitaminu	C	v brambore	46
Tabulka	16:	Přehled	obsahu	vitaminu	C	v ovoci a zeleni- ně	47
Tabulka	17:	Kalibrace	vitaminu	C	metodou	HPLC- UV/VIS	48
Tabulka	18:	Stanovení	vitaminu	c	v	grepu metodou	HPLC- UV/VIS
Tabulka	19:	Stanovení	vitaminu	c	v	pomeranči metodou	HPLC- UV/VIS
Tabulka	20:	Stanovení	vitaminu	c	v	kiwi metodou	HPLC- UV/VIS
Tabulka	21:	Stanovení	vitaminu	c	v	citronu metodou	HPLC- UV/VIS
Tabulka	22:	Stanovení	vitaminu	c	v	mandarince metodou	HPLC- UV/VIS
Tabulka	23:	Stanovení	vitaminu	c	v	jahodě metodou	HPLC-UV/VIS
Tabulka	24:	Stanovení	vitaminu	c	v	červeném hroznu metodou	HPLC-UV/VIS
Tabulka	25:	Stanovení	vitaminu	c	v	bílém hroznu metodou	HPLC- UV/VIS
Tabulka	26:	Stanovení	vitaminu	c	v	limetě metodou	HPLC- UV/VIS
Tabulka	27:	Stanovení	vitaminu	c	v	paprice oranžové metodou	HPLC-UV/VIS
Tabulka	28:	Stanovení	vitaminu	c	v	paprice zelené metodou	HPLC- UV/VIS
Tabulka	29:	Stanovení	vitaminu	c	v	paprice žluté metodou	HPLC-UV/VIS
Tabulka	30:	Stanovení	vitaminu	c	v	paprice červené metodou	HPLC- UV/VIS

Tabulka 31: Obsah vitamínu C ve vzorcích.....	55
Tabulka 32: Kalibrace vitamínu C metodou HPLC-ECD na kanále k1=600 mV.....	56
Tabulka 33: Kalibrace vitamínu C metodou HPLC-ECD na kanále k2=650 mV.....	57
Tabulka 34: Přesnost stanovení vitamínu C v grepu metodou HPLC-ECD u vzorku z Delvity.....	59
Tabulka 35: Přesnost stanovení vitamínu C v grepu metodou HPLC-ECD u vzorku z Kauflandu.....	59
Tabulka 36: Přesnost stanovení vitamínu C v pomeranči metodou HPLC-ECD u vzorku z Delvity.....	60
Tabulka 37: Přesnost stanovení vitamínu C v pomeranči metodou HPLC-ECD u vzorku z Kauflandu.....	60
Tabulka 38: Přesnost stanovení vitamínu C v kiwi metodou HPLC-ECD u vzorku z Delvity.....	61
Tabulka 39: Přesnost stanovení vitamínu C v kiwi metodou HPLC-ECD u vzorku z Kauflandu.....	61
Tabulka 40: Přesnost stanovení vitamínu C v citronu metodou HPLC-ECD u vzorku z Delvity.....	62
Tabulka 41: Přesnost stanovení vitamínu C v citronu metodou HPLC-ECD u vzorku z Kauflandu.....	62
Tabulka 42: Přesnost stanovení vitamínu C v mandarince metodou HPLC-ECD u vzorku z Delvity.....	63
Tabulka 43: Přesnost stanovení vitamínu C v mandarince metodou HPLC-ECD u vzorku z Kauflandu.....	63
Tabulka 44: Přesnost stanovení vitamínu C v jahodě metodou HPLC-ECD u vzorku z Delvity.....	64
Tabulka 45: Přesnost stanovení vitamínu C v jahodě metodou HPLC-ECD u vzorku z Kauflandu.....	64

Tabulka 46: Přesnost stanovení vitamínu C v červeném hroznu metodou HPLC-ECD u vzorku z Delvity.....	65
Tabulka 47: Přesnost stanovení vitamínu C v červeném hroznu metodou HPLC-ECD u vzorku z Kauflandu.....	65
Tabulka 48: Přesnost stanovení vitamínu C v bílém hroznu metodou HPLC-ECD u vzorku z Delvity.....	66
Tabulka 49: Přesnost stanovení vitamínu C v bílém hroznu metodou HPLC-ECD u vzorku z Kauflandu.....	66
Tabulka 50: Přesnost stanovení vitamínu C v limetě metodou HPLC-ECD u vzorku z Delvity.....	67
Tabulka 51: Přesnost stanovení vitamínu C v limetě metodou HPLC-ECD u vzorku z Kauflandu.....	67
Tabulka 52: Přesnost stanovení vitamínu C v paprice oranžové metodou HPLC-ECD u vzorku z Delvity.....	68
Tabulka 53: Přesnost stanovení vitamínu C v paprice oranžové metodou HPLC-ECD u vzorku z Kauflandu.....	68
Tabulka 54: Přesnost stanovení vitamínu C v paprice zelené metodou HPLC-ECD u vzorku z Delvity .....	69
Tabulka 55: Přesnost stanovení vitamínu C v paprice zelené metodou HPLC-ECD u vzorku z Kauflandu.....	69
Tabulka 56: Přesnost stanovení vitamínu C v paprice žluté metodou HPLC-ECD u vzorku z Delvity.....	70
Tabulka 57: Přesnost stanovení vitamínu C v paprice žluté metodou HPLC-ECD u vzorku z Kauflandu.....	70
Tabulka 58: Přesnost stanovení vitamínu C v paprice červené metodou HPLC-ECD u vzorku z Delvity.....	71

---

Tabulka 59: Přesnost stanovení vitamínu C v paprice červené metodou HPLC-ECD u vzorku z Kauflandu.....	71
Tabulka 60: Přesnost stanovení vitamínu C v bramboře metodou HPLC-ECD u vzorku z Delvity.....	72
Tabulka 61: Přesnost stanovení vitamínu C v bramboře metodou HPLC-ECD u vzorku z Kauflandu.....	72
Tabulka 62: Obsah vitamínu C ve vzorcích měřených metodou HPLC-ECD a zakoupených v Delvitě a v Kauflandu .....	74
Tabulka 63: Srovnání obsahu vitamínu C různými metodami.....	75

## SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA P 1: Vitamin C na trhu

PŘÍLOHA P 2: Chromatogramy ovoce a zeleniny

PŘÍLOHA P 3: Determination of ascorbic acid by HPLC with electrochemical detection



## PŘÍLOHA P 1: VITAMIN C NA TRHU

Klasické tabletové balení, např. od Léčivý Celaskon (tablety od 100 mg do 500 mg)



Celaskon 250 a APO C 500mg.

Obr.12 Celaskon v tabletách

Vitamin C "s dlouhotrvajícím účinkem", výhoda spočívá v tom, že se dané množství vitamínu uvolňuje do organismu např. v průběhu celého dne. Např. od Léčivý, Celaskon effect 500.



Obr.13 Celaskon s dlouhotrvajícím účinkem

Šumivé tablety přidávající se do vody.



Obr.14 Celaskon šumivé tablety

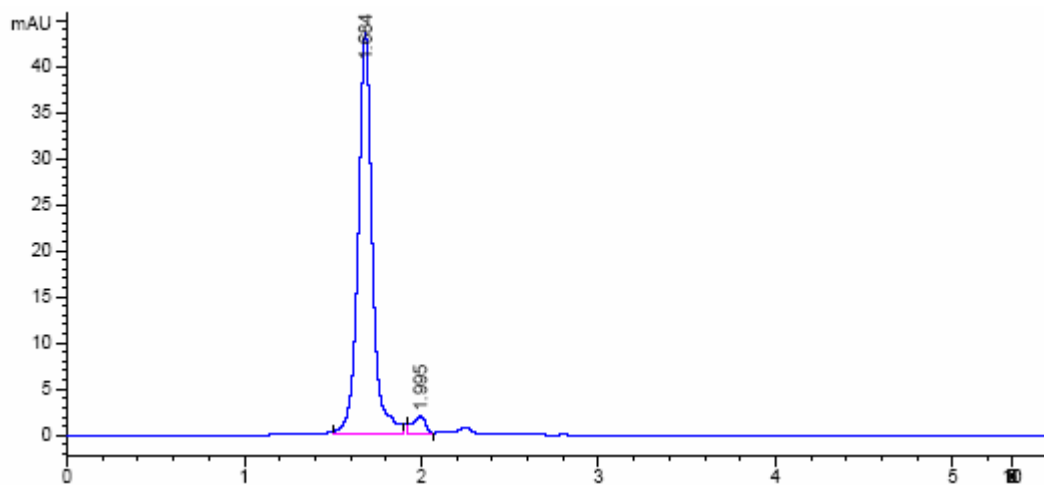
Injekční příjem vitamínu C. Na našem trhu jsou ampule 5 x 5 ml s obsahem 500 mg účinné látky v každé z nich. Nutno však dodat, že tato forma je pouze na lékařský předpis a při aplikaci (nitrožilní) není příliš příjemná.



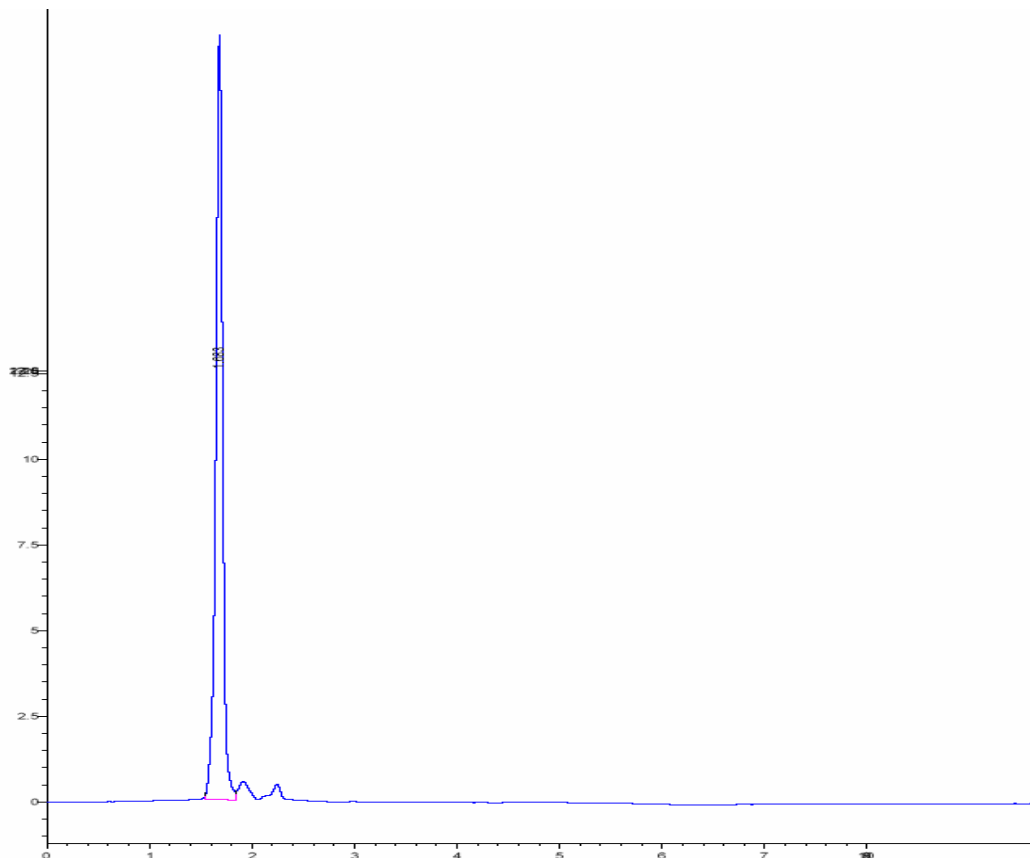
Obr.15 Injekční forma vitamínu C

## PŘÍLOHA P 2: CHROMATOGRAMY OVOCE A ZELENINY

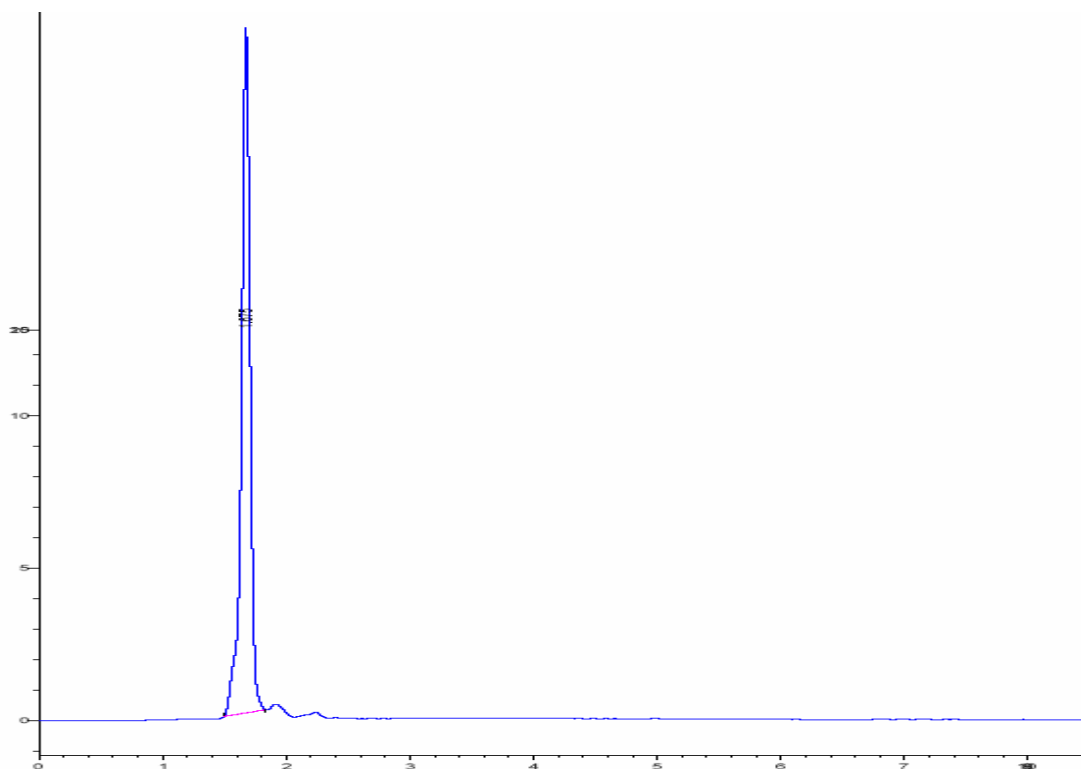
Graf 4. Stanovení vitamínu C v grepu metodou HPLC-UV/VIS



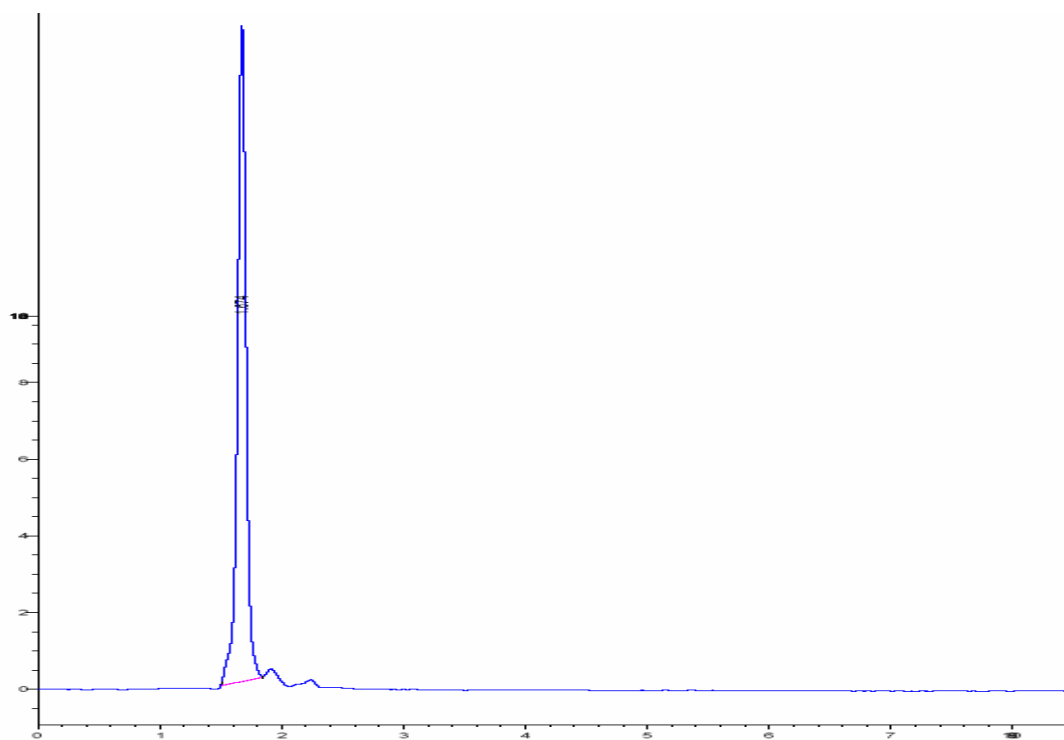
Graf 5. Stanovení vitamínu C v pomeranči metodou HPLC-UV/VIS



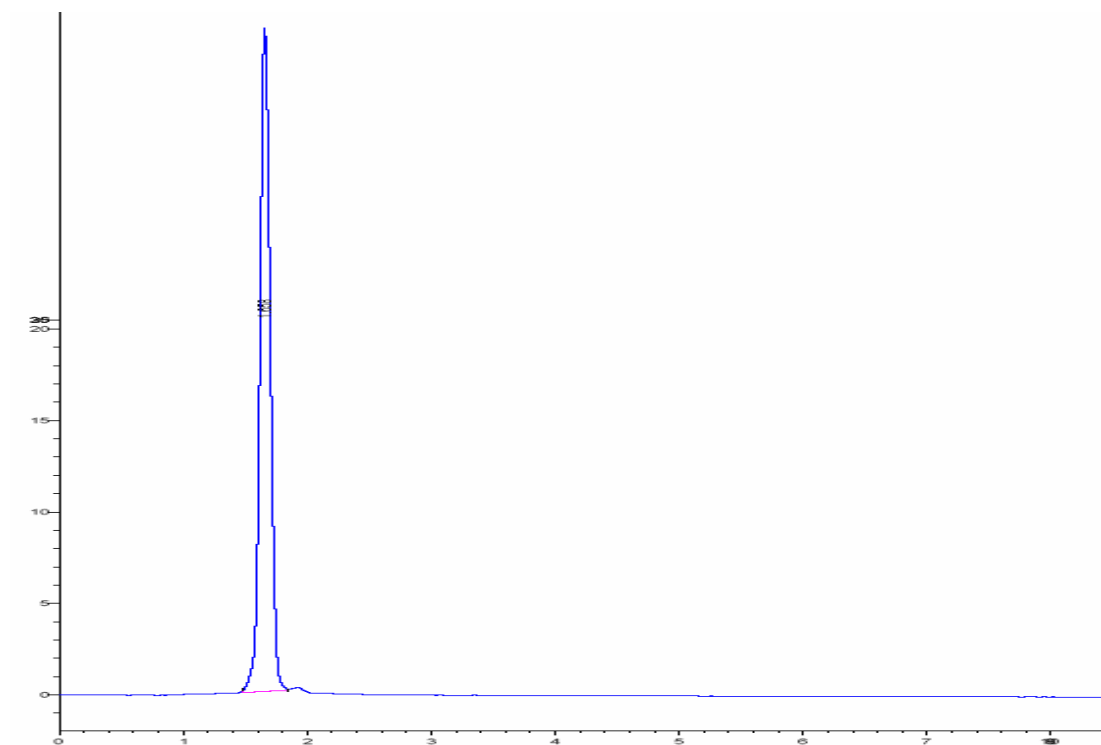
Graf 6. Stanovení vitamínu C v citronu metodou HPLC-UV/VIS



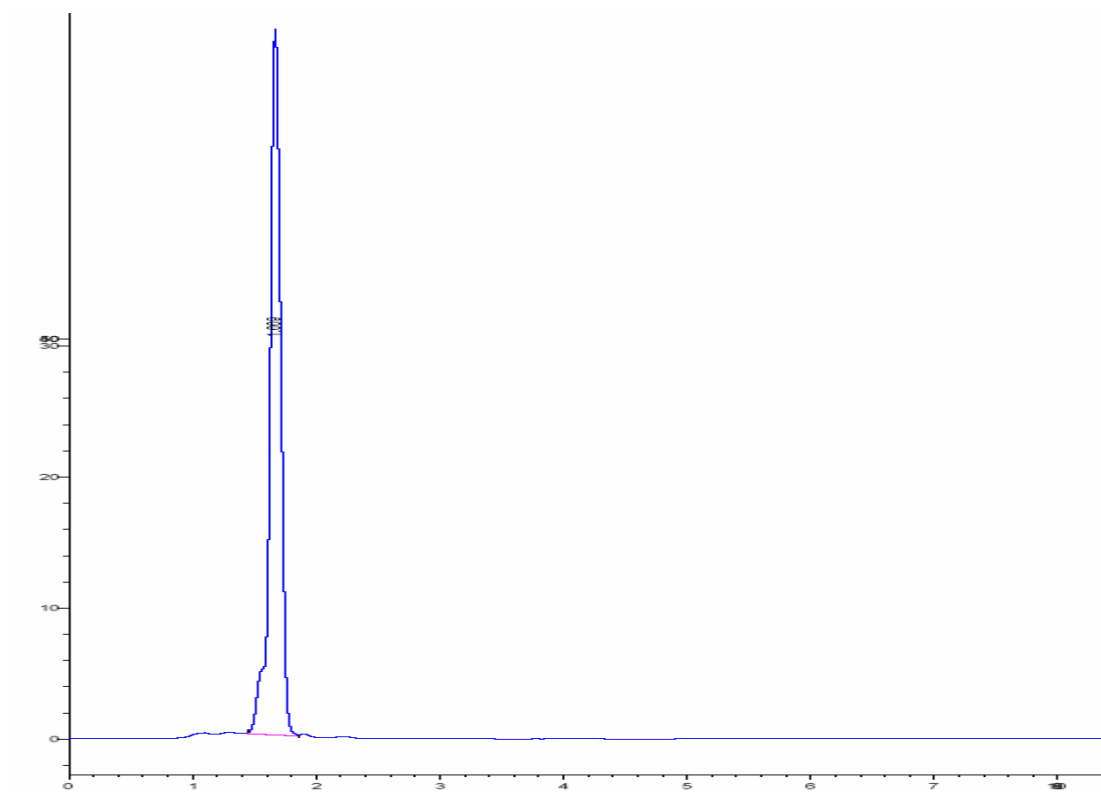
Graf 7. Stanovení vitamínu C v kiwi metodou HPLC-UV/VIS



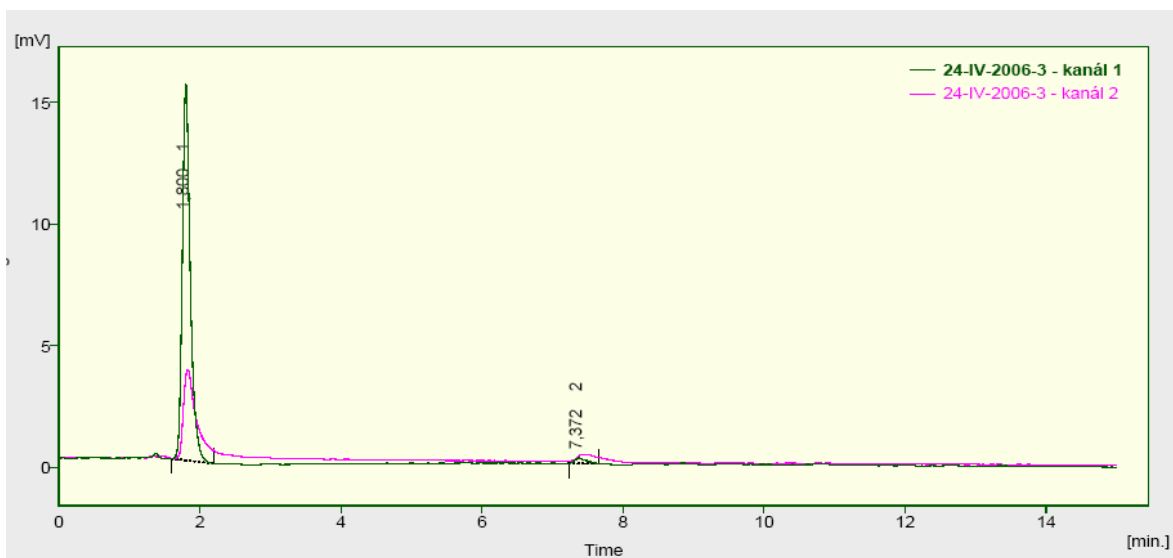
Graf 8. Stanovení vitamínu C v paprice oranžové metodou HPLC-UV/VIS



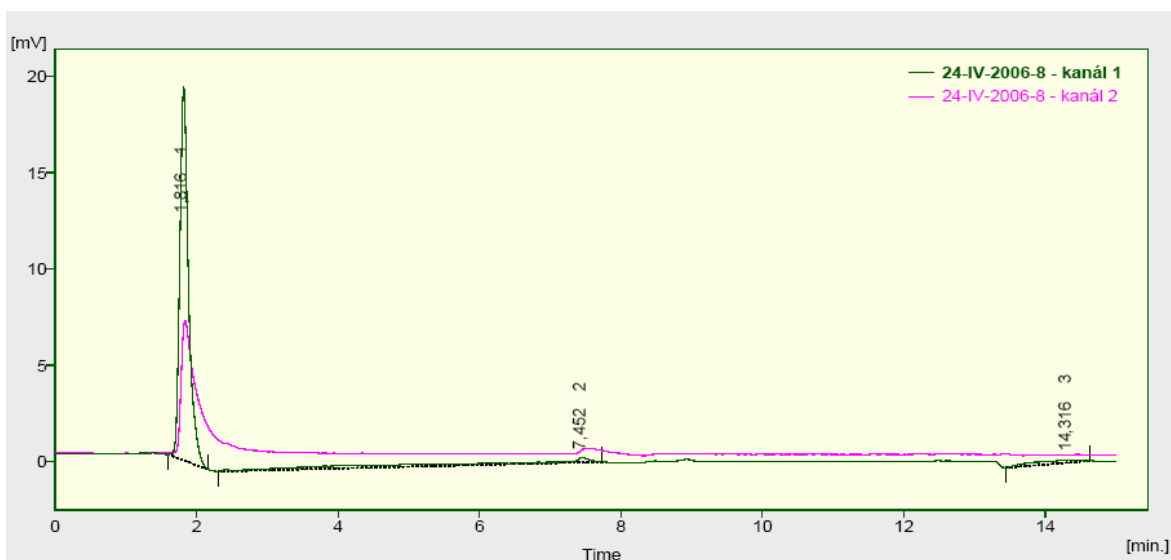
Graf 9. Stanovení vitamínu C v paprice zelené metodou HPLC-UV/VIS



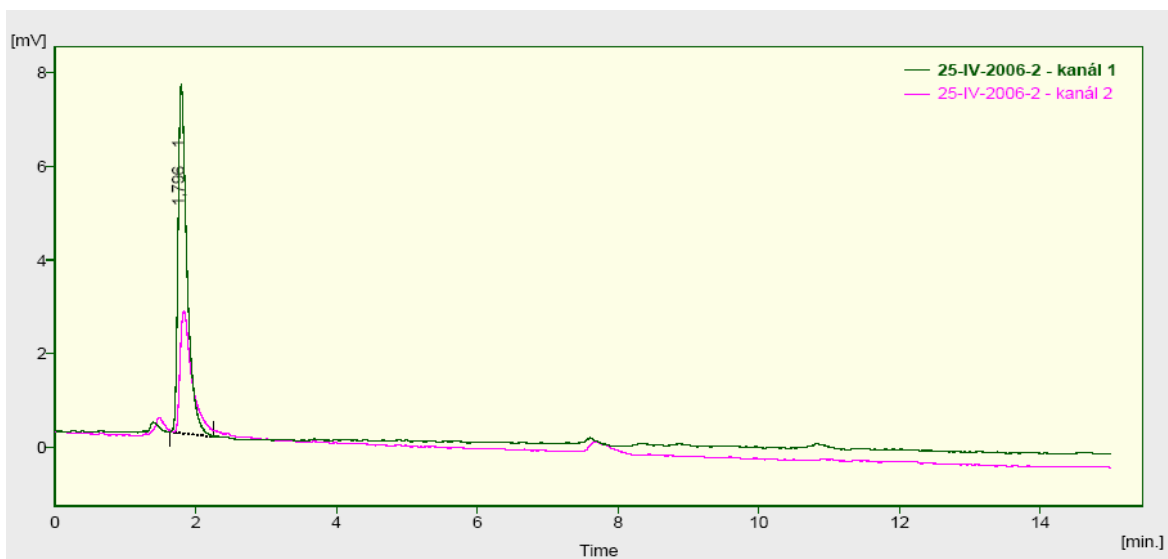
Graf 10. Stanovení vitamínu C v pomeranči metodou HPLC-ECD



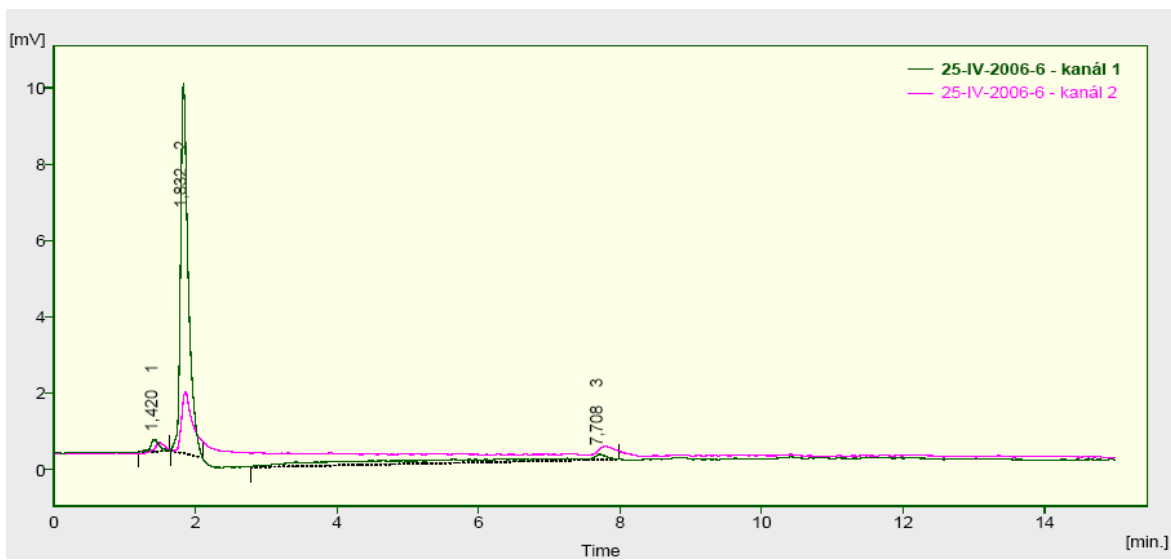
Graf 11. Stanovení vitamínu C v grepu metodou HPLC-ECD



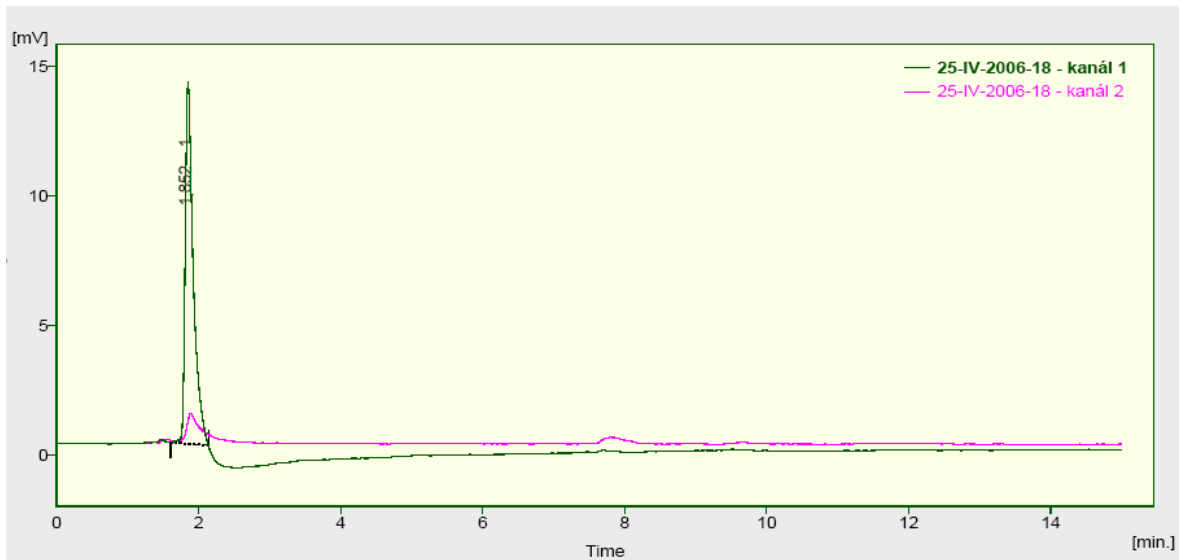
Graf 12. Stanovení vitamínu C v mandarince metodou HPLC-ECD



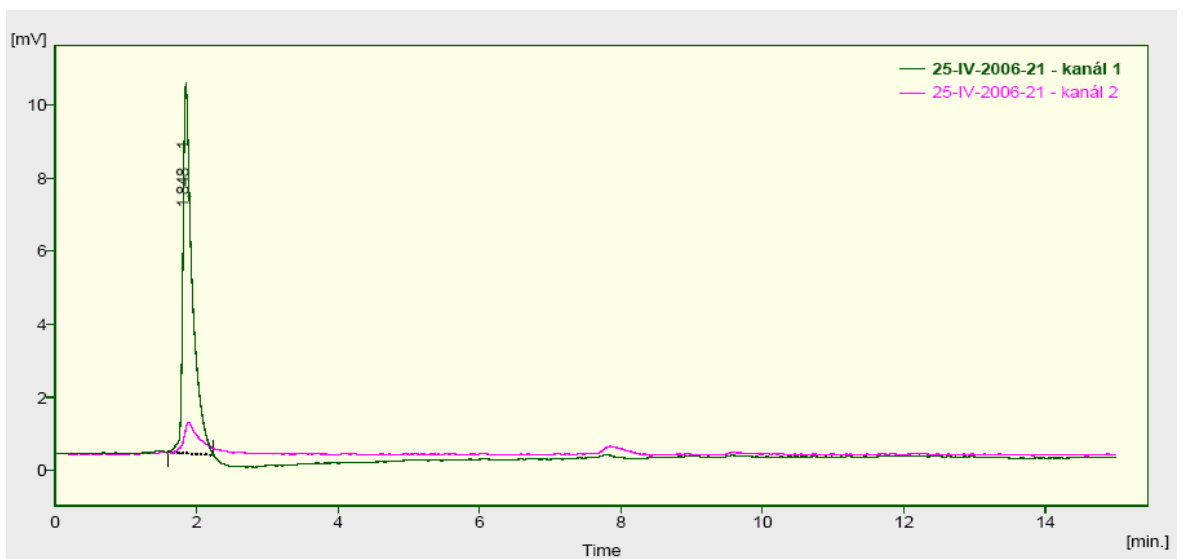
Graf 13. Stanovení vitamínu C v kiwi metodou HPLC-ECD



Graf 14. Stanovení vitamínu C v paprice červené metodou HPLC-ECD



Graf 15. Stanovení vitamínu C v paprice žluté metodou HPLC-ECD





## **PŘÍLOHA P 3: DETERMINATION OF ASCORBIC ACID BY HPLC WITH ELECTROCHEMICAL DETECTION**

**SOŇA ŠKROVÁNKOVÁ, DANIELA KRAMÁŘOVÁ, KAMILA ŠIMÁNKOVÁ, IGNÁC HOZA**

*Tomas Bata University, Faculty of Technology, Dept. of Food Engineering, 275 Nám. T.G.Masaryka, 762 72 Zlín, CZ*

*skrovankova@ft.utb.cz*

Vitamin C is considered to be the most important vitamin for human nutrition which could be best supplied by fruits and vegetables. The main biologically active form of vitamin C is L-Ascorbic acid (AA). As a effective antioxidant, AA has the capacity to eliminate free toxic radicals and other reactive oxygen species, formed in cell metabolism, which are associated with several forms of tissue damage and disease and also with the process of ageing.

Keeping in view its importance, the analysis of food products containing this vitamin assumes great significance. Several analytical methods have been reported. The preferred choice for AA determination is liquid chromatography (HPLC) with UV-visible or electrochemical detection<sup>3,4</sup>. HPLC is quite popular because avoids the problems of non-specific interference and offers the advantages of low detection limits with high selectivity.

For accurate dietary exposure determination we determined ascorbic acid in fruits and vegetables, commonly consumed in spring in the Czech Republic, using HPLC with electrochemical detection (ECD). The Coulochem III electrochemical detector was designed for the detection of electroactive species in the eluent. For these reasons, new quick reliable method for determination ascorbic acid was found. Because of very simple matrices such as tropical fruits, vitamin C could be extracted directly by mobile phase during the time of 15 minutes at laboratory temperature. Obviously, the samples were store in such a way to be kept from sunlight.

Chromatographic conditions for EC-detection of vitamin C were specific:

Sample preparation: filtration (0,45  $\mu\text{m}$ , PTFE)

Injection volume: 20  $\mu\text{l}$

Mobile phase: filtration (0,20  $\mu\text{m}$ ), (isocratic elution)



Column: Supelcosil LC-8, 5  $\mu\text{m}$ , [4,6 x 150 mm]

Flow rate: 1,1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$

Temperature of column: 30°C

Detector: ECD Coulochem III, type of cells 5010A

We determined that grapefruit contained  $9,17 \pm 0,191 \text{ mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ , in orange  $6,62 \pm 0,415 \text{ mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ , in lemon  $12,38 \pm 0,198 \text{ mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$  and in strawberry  $8,62 \pm 0,310 \text{ mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ .

#### LITERATURE

1. Hernández Y., Lobo M.G., González M.: *Food Chem.*, *96*, 654 (2006).
2. Arrigoni O., De Tullio M.C.: *Biochim. Biophys. Acta*, *1569*, 1 (2002).
3. Arya P., Mahajan M., Jain P.: *Anal. Chim. Acta*, *417*, 1 (2000).
4. Iwase H., Ono I.: *J. Agric. Food Chem.*, *45*, 4664 (1997).

Článek je přijat jako publikace v Chemických listech, v rámci konference 58. SJEZDU ASOCIACÍ ČESKÝCH A SLOVENSKÝCH CHEMICKÝCH SPOLEČNOSTÍ.