

# Stanovenie vitamínu C v brokolici

Zdenka Kuceková

---

Bakalárska práca  
2007



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav potravinářského inženýrství  
akademický rok: 2006/2007

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Zdenka KUČEKOVÁ**  
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**  
  
Téma práce: **Stanovení vitamínu C v brokolici**

Zásady pro vypracování:

1. popsat fyziologii vitamínu C
2. vyizolovat vitamin C z brokolice
3. stanovit množství vitamínu C metodou HPLC

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

**Dle doporučení vedoucího práce**

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Daniela Kramářová, Ph.D.**

Ústav potravinářského inženýrství a chemie

Datum zadání bakalářské práce:

**8. ledna 2007**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**4. června 2007**

Ve Zlíně dne 2. května 2007

prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.  
*děkan*



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

## **ABSTRAKT**

Cieľom tejto práce bolo vyizolovať a stanoviť obsah vitamínu C v brokolici pri rôznych tepelných úpravách. Vitamín C bol stanovovaný v brokolici čerstvej, v brokolici varenej vo vode po dobu 10 a 15 minút a v brokolici parenej po dobu 10 a 15 minút. K stanoveniu vitamínu C bola použitá metóda HPLC–ECD.

Kľúčové slová: vitamín C, kyselina L–askorbová, HPLC–ECD, brokolica

## **ABSTRACT**

The aim of this work was to isolate and measure the content of vitamin C in brocoli at various thermal conditions. Vitamin C was measured in fresh brocoli, brocoli boiled in water for 10 and 15 minutes and brocoli steamed for 10 and 15 minutes. The HPLC-ECD method has been used for measuring vitamin C.

Keywords: vitamin C, L-ascorbic acid, HPLC-ECD, brocoli

Pod'akovanie:

V prvom rade by som touto formou chcela poďakovať vedúcej mojej bakalárskej práce Ing. Daniele Kramárovej, Ph.D. za odborné vedenie, cenné rady a pripomienky. Pod'akovanie patrí aj Ing. Magde Hábovej a pani laborantke Jaroslave Živočkej za pomoc. A v neposlednom rade mojej rodine za veľkú podporu.

# OBSAH

ÚVOD .....	7
<b>I TEORETICKÁ ČASŤ .....</b>	<b>9</b>
<b>1 VITAMÍNY .....</b>	<b>10</b>
1.1 VITAMÍN C.....	11
1.1.1 Vznik kyseliny L – askorbovej.....	12
1.1.2 Štruktúra a chemizmus vitamínu C .....	13
1.1.3 Fyziológia vitamínu C .....	14
1.1.4 Reakcie vitamínu C s voľnými radikálmi.....	15
1.1.5 Výskyt .....	16
1.1.6 Stabilita vitamínu C.....	16
1.1.7 Doporučená denná dávka vitamínu C .....	18
1.1.8 Avitaminosa, hypovitaminosa .....	18
<b>2 CHROMATOGRAFIA .....</b>	<b>19</b>
2.1 KVAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIA .....	20
2.1.1 Kvapalinový chromatograf .....	20
2.1.2 Princíp kvapalinovej chromatografie.....	21
2.1.3 Detektory v kvapalinovej chromatografii.....	21
<b>3 BROKOLICA.....</b>	<b>23</b>
<b>II PRAKTICKÁ ČASŤ .....</b>	<b>25</b>
<b>4 STANOVENIE VITAMÍNU C METÓDOU HPLC - ECD .....</b>	<b>26</b>
4.1 CHEMIKÁLIE .....	26
4.2 POUŽITÝ PRÍSTROJ .....	26
4.3 KALIBRAČNÁ KRIVKA PRE STNOVENIE VITAMÍNU C.....	26
4.4 POSTUP PRI STANOVENÍ VITAMÍNU C V BROKOLICI .....	28
<b>5 VÝSLEDKY A DISKUSIA.....</b>	<b>29</b>
5.1 VÝSLEDKY STANOVENIA VITAMÍNU C V BROKOLICI.....	29
<b>6 METÓDA ŠTANDARDNÉHO PRÍDAVKU .....</b>	<b>34</b>
<b>ZÁVER .....</b>	<b>35</b>
<b>ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY .....</b>	<b>36</b>
<b>ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK.....</b>	<b>38</b>
<b>ZOZNAM OBRÁZKOV .....</b>	<b>39</b>
<b>ZOZNAM TABULIEK .....</b>	<b>40</b>
<b>ZOZNAM PRÍLOH .....</b>	<b>41</b>

## ÚVOD

Organizmy získavajú energiu na svoju činnosť zo základných živín, ktoré prijímajú z okolitého prostredia. Biochemickou premenou látok prítomných v živinách sa spolu s uvoľňovaním energie syntetizujú aj zlúčeniny potrebné na stavbu bunkových štruktúr. Bunky však nie sú schopné niektoré potrebné zlúčeniny tvoriť pri metabolických premenách, preto musia byť prítomné v potrave. Takéto látky sa nazývajú esenciálne.

Medzi esenciálne látky patria vitamíny, ktoré spolu s bielkovinami, tukmi a sacharidmi patria k základným zložkám ľudskej stravy. V ľudskom organizme majú funkciu katalyzátorov biochemických reakcií, hrajú významnú úlohu pri procesoch vstrebávania a výmeny látok medzi vonkajším prostredím a živým organizmom. Veľmi dôležitú rolu hrajú antioxidanty, ktoré sú tzv. lapači voľných radikálov.

Jedným z významných antioxidantov je vitamín C. Antioxidačný účinok vitamínu C pomáha likvidovať voľné radikály, detoxikovať ďalšie chemické látky z ovzdušia a potravín a súčasne zvyšovať aktivitu imunologického systému, napríklad proti infekciám, stresom, depresiám, únave. Bráni vzniku karcinogénnych nitrózoamínov z dusičnanov nachádzajúcich sa v strave. Pomáha odstraňovať zápaly, svalové bolesti, pomáha pri regenerácii organizmu ako celku, ale aj pri hojení rán, šedom zákale, normalizácii krvného tlaku, prevencii anémie, rozklade cholesterolu, je aj protivráskovým činiteľom, je prirodzeným antihistaminikom, a tým aj antialergikom, chráni spermie pred oxidačným poškodením ich genetického materiálu, chráni a posilňuje naše cievy, znižuje tvorbu krvných zrazenín.

Okrem ochranných účinkov má vitamín C aj mnohé nezastupiteľné fyziologické funkcie v spolupráci s inými látkami. Je nenahraditeľný pre správnu funkciu mozgu a nervového systému, pomáha pri vstrebávaní železa i aminokyselín, znižuje straty vápnika a fosforu z kostí, zúčastňuje sa mnohých enzymatických reakcií.

V dnešnej dobe je nízky príjem vitamínu C závažným nedostatkom výživy. Je preto nevyhnutné zaraďovať do jedálneho lístka potraviny obsahujúce vitamín C pravidelne a v dostatočnom množstve. Zo zvýšenou spotrebou vitamínu C súvisí fyzická námaha, psychický stres, životný štýl s negatívnymi návykmi ako je alkohol, fajčenie, obézni ľudia apod.

Vysokým obsahom vitamínu C sa vyznačuje i brokolica. V brokolici sa nachádza veľa cenných látok. Jednou z nich je vláknina. Pravidelný prísun vlákniny čistí črevné steny a povzbudzuje činnosť žalúdka, čím pomáha predchádzať zápche. Okrem toho znižuje hladinu cholesterolu, bojuje proti osteoporóze a hemoroidom, znižuje riziko infarktu a mŕtvice až o tretinu. Dostatok vlákniny je aj prevenciou proti vzniku rakoviny, predovšetkým hrubého čreva a konečníka. Zbavuje telo škodlivín. Vláknina je nesmierne dôležitá pre správnu látkovú výmenu. Nabaľuje na seba odpadové látky, rozpustné vo vode a podporuje ich vylučovanie z tela.

Bakalárska práca sa zaoberá stanovením obsahu vitamínu C v brokolici a zmenami obsahu vitamínu C pri tepelných úpravách. Pre stanovenie obsahu vitamínu C bola použitá analytická metóda HPLC-ECD.



## **I. TEORETICKÁ ČASŤ**

## 1 VITAMÍNY

Vitamíny sú organické nízko molekulárne zlúčeniny syntetizované autotrofnými organizmami. Heterotrofné organizmy ich syntetizujú len v obmedzenej miere a získavajú ich ako exogénne látky predovšetkým potravou a niektoré prostredníctvom črevnej mikroflóry. V živých objektoch plnia významnú úlohu prekursorov kofaktorov rôznych enzýmov (vitamíny sk. B), iné sa uplatňujú v oxidačne redukčných systémoch (vitamín C a E). V ľudskom tele majú vitamíny funkciu katalyzátorov biochemických reakcií. Podieľajú sa na metabolizme bielkovín, tukov a cukrov [1].

Niektoré látky, ktoré samé nevykazujú fyziologické účinky môžu slúžiť ako prekursor vitamínov, sú to tzv. provitamíny. Provitamíny sa v živočíšnom tele pôsobením UV žiarenia alebo pomocou enzýmov menia na vitamíny.

Vitamíny sú látky s rôznou chemickou štruktúrou. Pre ich označenie sa používajú triviálne názvy alebo veľké písmená abecedy, pri vitamínoch s podobnými fyziologickými účinkami sa používajú pri písmene číselné indexy [2].

Dôležitým rozlišovacím znakom vitamínov je ich rozpustnosť. Vitamíny sa takto delia na dve skupiny. Vitamíny rozpustné vo vode, tzv. **hydrofilné vitamíny** a vitamíny rozpustné v tukoch, tzv. **lipofilné vitamíny**.

Medzi hydrofilné vitamíny patria vitamíny skupiny B (thiamin, riboflavin, kyselina nikotínová a jej amid, kyseliny pantothenová, pyridoxin, kyselina listová, kyanokobalamin), kyselina lipoová, biotin, bioflavonoidy a vitamín C. Ich funkcia spočíva v katalytickom účinku, pretože sa uplatňujú ako kofaktory rôznych enzýmov v metabolizme nukleových kyselín, bielkovín, sacharidov, lipidov a iných látok.

Medzi lipofilné vitamíny sa radia vitamín A (retinol), vitamíny D (kalciferoly), vitamíny E (tokoferoly a tokotrienoly), vitamíny K (fylochinony a farnochinony) a vitamín F (esenciálne mastné kyseliny). Lipofilné vitamíny vykazujú rôzne funkcie. Napríklad vitamín A<sub>1</sub> (all-*trans*-retinol) sa uplatňuje v biochemických reakciách zrakového vnemu [3].

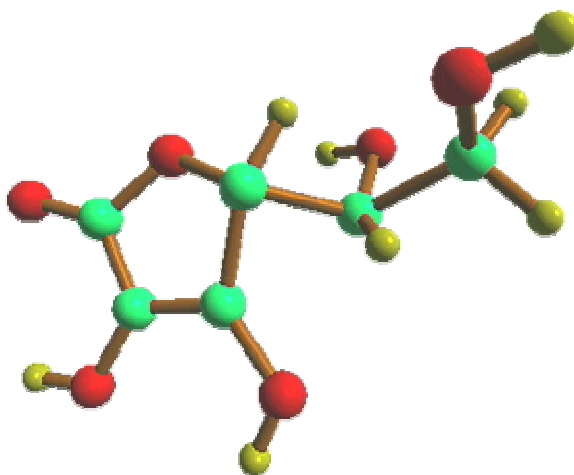
Látky, ktoré inhibujú vitamíny alebo bránia plnému využitiu vitamínov sa nazývajú antivitamíny. Tieto látky určitým spôsobom eliminujú funkciu daného vitamínu, to môže viesť až k prejavom deficiencie.

Deficiencia (nedostatok) niektorého vitamínu sa označuje ako **hypovitaminóza**, ktorá sa na živých objektoch prejavuje chorobnými príznakmi. Ťažšia forma nedostatku vitamínu sa označuje ako **avitaminóza**, dlhotrvajúca avitaminóza môže viesť až k smrti organizmu. Naopak nadbytok niektorých vitamínov sa označuje ako **hypervitaminóza**. Jedná sa hlavne o zvýšené dávky vitamínov A a D [4].

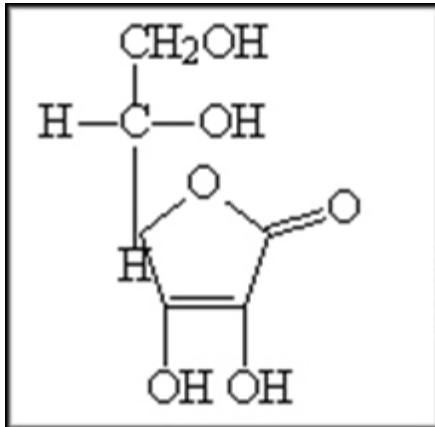
V potravinách sa vitamíny vyskytujú spravidla v množstve od  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  do stoviek až tisícov  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  podľa druhu vitamínu, druhu potravy a spôsobu ich spracovania [1].

Dnes sa vitamíny používajú v potravinárskom priemysle k obohacovaniu potravinárskych výrobkov. A to buď k resistícii potravín, doplneniu ich obsahu na pôvodnú hladinu v surovine alebo k fortifikácii potravín, obohateniu na vyššiu koncentráciu ako bolo ich pôvodné množstvo [2].

## 1.1 Vitamín C



Obr. č. 1: Vitamín C – 3D model



*Kyselina L-askorbová*

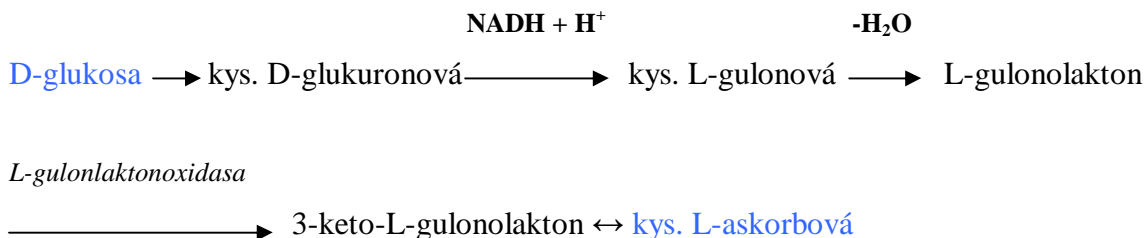
Chemicky bol vitamín C po prvýkrát izolovaný v roku 1928 maďarským biochemikom, laureátom Nobelovej ceny za fyziológiu a lekárstvo z roku 1937 Albertem Szent-Györgyim, vtedy ešte pod názvom kyselina hexuronová. O štyri roky neskôr, v apríli 1942, Charles Glen King z Pittsburghskej univerzity dokázal, že sa jedná o rovnakú chemickú látku, ktorá je obsiahnutá napríklad v ovocí a zabraňuje skorbutu (nezávisle na ňom a približne v rovnakej dobe k tomuto objavu

dospel i Albert Szent-Györgyi). Sir Walter Norman Haworth z Birminghamskej univerzity, držiteľ Nobelovej ceny za chémiu z roku 1937, dokázal ako prví vypracovať presnú chemickú štruktúru vitamínu C a vyrobiť ho syntetickou cestou [5].

Vitamín C je dôležitá antioxidantná látka, ktorá sa v ľudskom organizme účastní dlhej rady rôznych procesov – účastní sa biosyntézy mukopolysacharidov, prostaglandinov, absorpcie iónových foriem železa, jeho transportu, stimuluje transport sodných, chloridových iónov a zrejme aj vápenatých iónov, uplatňuje sa v metabolizme cholesterolu, drog, má význam pri syntéze kolagénu, pri premene niektorých aminokyselín, pri syntéze steroidov v nadľadvinách a v mnohých ďalších oblastiach.

### 1.1.1 Vznik kyseliny L – askorbovej

Ľudský organizmus sa od väčšiny živých organizmov odlišuje tým, že si nedokáže vitamín C syntetizovať sám. Rastliny a takmer všetky zvieratá (okrem primátov, morčiat a netopierov živiacich sa ovocím) v tomto ohľade človeka prekonávajú. Ľudia, primáty, morčatá a netopiere stratili schopnosť syntetizovať vitamín C z dôvodu mutácie v genetickom kóde *L-gulonolaktonoxidasy*, enzýmu potrebného pre biosyntézu vitamínu C. Biosyntéza kyseliny L-askorbovej postupuje cez kyselinu D-glukuronovú, jej redukciou na kyselinu L-gulonovú, ktorá vytvára lakton. Ten je potom oxidovaný *L-gulonolaktonoxidasou* na 3-keto-L-gulonolakton, ktorý sa enolizuje na kyselinu L-askorbovú [6]:

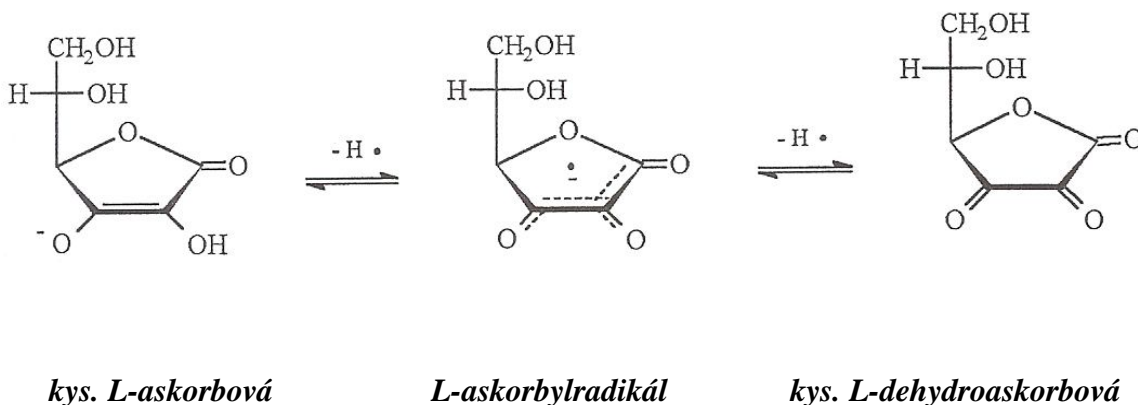


Obr. č. 2: Vznik kyseliny L - askorbovej

### 1.1.2 Štruktúra a chemizmus vitamínu C

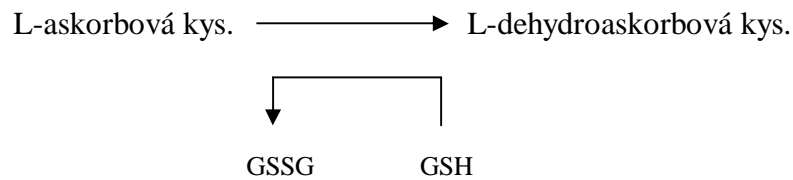
Základnou biologicky aktívnou zlúčeninou je L-askorbová kyselina ( $\gamma$ -lakton L-threo-2-hexenovej kyseliny). Jej izomér D-askorbová kyselina a druhý pár enantiomérov tj. L- a D-isoaskorbová kyselina aktivitu vitamínu C prakticky nevykazujú.

Názvom vitamín C sa neoznačuje len L-askorbová kyselina, ale aj jej celý reverzibilný redoxný systém, ktorý okrem L-askorbovej kyseliny zahŕňa i jej produkt jednoelektrónovej oxidácie L-askorbylradikál (L-monodehydroaskorbová kyselina) a produkt dvojelektrónovej oxidácie L-dehydroaskorbovú kyselinu [2].



Obr. č. 3: Oxidačno-redukčný systém vitamínu C

Endiolový systém v konjugácii s karbonylovou skupinou udeľuje kyseline L-askorbovej dosť značnú kyslosť. L-dehydroaskorbová kyselina môže byť spätne redukovaná na kyselinu L-askorbovou, napr. pomocou reductantu glutathionu (GSH), ktorý oxidáciou vytvorí zdvojenú molekulu s -S-S- mostíkom (GSSG) [2].



Obr. č. 4: Spätná redukcia L – dehydroaskorbovej kyseliny

Vitamín C je veľmi dobre rozpustný vo vode, v neutrálnom, kyslom a alkalickom prostredí za katalytických účinkov ťažkých kovov (Cu, Fe) podlieha ľahko oxidácii za vzniku kyseliny L-dehydroaskorbovej. Túto oxidáciu katalyzujú rôzne enzýmy a to *peroxidasa*, *askorbasa* alebo *cytochromoxidasa*. Prenos elektrónov je reverzibilný, pokiaľ nie je porušená kruhová štruktúra kyseliny L-dehydroaskorbovej. Pokiaľ dôjde k jej hydrolytickému rozštiepeniu, vzniká kyselina 2,3-dioxo-L-gulonová a aktivita vitamínu C zaniká [1].

### 1.1.3 Fyziológia vitamínu C

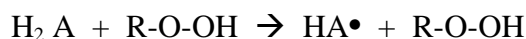
Jednou z hlavných biologických funkcií tohto oxidačne redukčného systému je podiel na prenose vodíka a elektrónov z východiskových substrátov až na molekulárny kyslík. To platí hlavne pre rastlinný materiál. Tento redukčný systém býva často podporovaný bioflavonoidovým oxidačne redukčným systémom. Vitamín C pôsobí ako kofaktor hydroxylácie pri konverzii prolinu na hydroxyprolin. Uplatňuje sa tiež pri vzniku tyrosínu alebo nad ľadvinových steroidov. Extracelulárne funkcie vitamínu C by mohli predovšetkým spočívať v ochrane LDL (Low Density Lipoprotein) proti oxidácii, v regenerácii tokoferolu (vitamín E) z tokoferoxylového radikálu a v regenerácii glutathionu z jeho oxidovanej formy. Pôsobí do istej miery priaznivo na znižovanie sérovej hladiny celkového cholesterolu a zvyšuje koncentráciu HDL (High Density Lipoprotein) cholesterolu pri začínajúcej hypercholesterolémie. Ďalej redukuje železo z potravy a zvyšuje tak jeho intestinálnu absorpciu alebo blokuje reakciu, pri ktorej vznikajú karcinogénne nitrosaminy. Vitamín C napomáha do istej miery obranyschopnosti organizmu. Askorbát totiž zvyšuje aktivitu fagocytov a chráni ich membrány pred oxidačným poškodením, zvyšuje hladinu protilátok [7].

K oxidácii askorbovej kyseliny na dehydroaskorbovú kyselinu dochádza pôsobením enzýmov, ktoré sa radia do kategórie antivitamínov vitamínu C. Askorbovú kyselinu tiež oxiduje vzdušný kyslík a rôzne chemické oxidačné činidlá. Oxidácia na dehydroaskorbovú

kyselinu je vratná reakcia a môže prebiehať rôznymi mechanizmami. V prípadoch, keď prenosom jedného elektrónu vzniká ako medziprodukt radikál askorbovej kyseliny sa oxidácia označuje ako jedoelektrónová. Ak vzniká dehydroaskorbová kyselina priamo, hovorí sa o dvojelektrónovej oxidácii [2].

#### 1.1.4 Reakcie vitamínu C s voľnými radikálmi

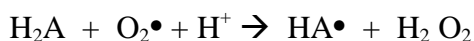
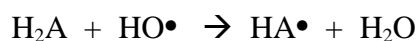
Kyselina askorbová a jej izoméry a deriváty môžu reagovať aj s voľnými radikálmi, ktoré spôsobujú oxidáciu lipidov a ďalších oxylabilných zložiek potravín. Brzdia tak reťazovú autooxidačnú reakciu a účinne pôsobia ako antioxidanty. Reakciu askorbovej kyseliny s peroxylovým radikálom mastnej kyseliny (R-O-O•), prípadne s alkoxylovým radikálom (RO•), možno schématicky znázorniť nasledujúcou rovnicou (kde R-O-OH je hydroperoxid mastnej kyseliny a H<sub>2</sub>A je kyselina L-askorbová):



Vzniknutý askorbylradikál už nie je schopný vyvolať ďalšiu reťazovú reakciu a disproportionuje na askorbovú a dehydroaskorbovú kyselinu.

Askorbová kyselina je obecné účinným antioxidantom, ak sa používa v kombinácii s tokoferolmi. Tie potom prednostne reagujú s voľnými radikálmi lipidov, vzniknuté radikály tokoferolov sú na fázovom rozhraní tuk-voda redukované späť na tokoferoly askorbovou kyselinou. Z askorbylpalmitátu vzniká cez príslušný radikál dehydroaskorbylpalmitát, ktorý však na rozdiel od dehydroaskorbovej kyseliny nemôže tvoriť cyklický hydrát.

Askorbová kyselina reaguje podobne aj s toxickými formami kyslíka ako je hydroxylový radikál (HO•) alebo anión superoxidového radikálu (O<sub>2</sub>•) a singletový kyslík (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). Všetky tieto reakcie tak súčasne spomaľujú oxidáciu lipidov [6].



### 1.1.5 Výskyt

Vitamín C sa vyskytuje najčastejšie vo forme kyseliny askorbovej hlavne v ovocí a zelenine. Hlavnými zdrojmi vitamínu C sú citrusové plody, čierne ríbezle, kiwi, šípky, paprika, jahody, rajčiny, brokolica, zemiaky, kapusta. Množstvo vitamínu C sa mení v závislosti na odrode, klimatických podmienkach, skladovaní a spôsobe spracovania surovín [8].

Tabuľka č. 1: Obsah vitamínu C v niektorých potravinách

Potravina	Obsah ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	Potravina	Obsah ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )
mäso	10-20	mrkva	50-100
vnútornosti	50-340	petržlen koreňový	230
mlieko	5-20	petržlen kučeravý	1500-2700
jablká	15-50	pažitka	430
hrušky	20-40	pór	150-300
slivky	25-45	cibule	90-100
broskyne	70-100	cesnak	150-160
višne, čerešne	60-300	chren	450-1200
egreše	330-480	kapusta	170-700
červené ríbezle	200-500	kel	700-1400
čierne ríbezle	1100-3000	kapustičky	1000-1030
hrozno	20-50	brokolica	1100-1130
jahody	400-700	karfiol	47-1610
čučoriedky	90	kaleráb	280-700
melóny	130-590	šalát hlávkový	60-300
pomaranče	300-600	špenát	350-840
citróny	300-640	rajčiny	80-380
grapefruity	240-700	fazuľové struky	90-300
ananás	150-250	paprika	620-3000
banány	90-320	uhorky	65-110
kiwi	700-1270	špargľa	150-400
mango	100-350	hrášok	80-410
papája	620-980	cvikla červená	65
šípky	2500-10000	zemiaky	80-400

### 1.1.6 Stabilita vitamínu C

Askorbová kyselina je jedným z najmenej stabilných vitamínov. Pri skladovaní, kulinárnom a priemyselnom spracovaní ľahko dochádza k stratám vitamínu C. Najvýznamnejšie sú straty výluhom a oxidáciou. V neprítomnosti vzdušného kyslíka sú straty spôsobené hlavne kyselinami katalyzovanou degradáciou. Pri varení sa ľahko ničí z dôvodu rýchlej oxidácie na



kyselinu L-dehydroaskorbovú, ktorá ľahko otvára laktonový kruh, čo spôsobuje stratu biologickej aktivity.

Vitamín C reaguje na vzduch, teplo a vlhkosť mimoriadne citlivo. Teplo však odbúravanie vitamínu C podporuje. To spôsobujú špeciálne enzýmy, ktoré sú zvlášť účinné pri teplotách okolo 40°C, pri 70°C dochádza však k ich zničeniu. Preto by sa mala zelenina rýchlo priviesť do vyšších teplôt a potom pomaly pripravovať. Pritom síce strata vitamínu pokračuje, ale značne pomalšie [9].

Pri kuchynskej úprave sa môže obsah vitamínu C v potravinách znížiť o ďalších až 70 %. Varením napr. ošúpaných zemiakov sa zníži obsah vitamínu C o 30-50 %. Pri mletí, krájaní, strúhaní alebo mixovaní ovocia a zeleniny sa vďaka takto zvýšenému množstvu plôch a zároveň vďaka porušeniu bunkového tkaniva urýchľuje enzymatické odbúravanie vitamínu C. Pri rýchlom a opatrnom zmrazení možno straty vitamínu udržať relatívne nízke, takže hlboko zmrazená zelenina často vykazuje viac vitamínu C ako čerstvé ovocie a zelenina, ktoré sú skladované oveľa kratšiu dobu. Je samozrejme dôležité vedieť, že aj proces rozmrazovania, ak nie je urobený správne, môže byť príčinou znehodnotenia celej rady cenných živín vrátane vitamínu C – pri pomalom rozmrazovaní dochádza k potrhaniu bunkových stien a k úniku značného podielu vitamínu spolu s uvoľnenou šťavou. Straty potom môžu dosiahnuť až 60 %. Pomalé rozmrazovanie je teda z hľadiska obsahu vitamínov (ale i minerálnych látok) vyslovene nevhodné. Vhodnejšie je upravovať priamo zmrazenú zeleninu vložím do vriacej vody alebo na rozpálený tuk [10].

Vzdušný kyslík rozkladá vitamín C na obnažených plochách potravín. Rozsah tejto deštrukcie je tým väčší, čím dlhšia doba uplynie medzi olúpaním zeleniny a jej vložím do vriacej vody a čím väčšia plocha je vystavená pôsobeniu vzduchu. Preto je šetrné, keď sa suroviny lúpu a krájajú tesne pred vložím do vriacej vody alebo pred konzumáciou.

Straty kyseliny askorbovej výluhom sú obvyklé pri umývaní, predvarení, varení a konzervovaní ovocia a zeleniny. V prípadoch, keď sa príslušný výluh ďalej nespracováva. Povaha a rozsah strát závisí na teplote, pH, množstve vody, veľkosti povrchu materiálu, zrelosti, rozsahu kontaminácie ťažkými kovmi a prívode kyslíka. Straty výluhom sú vyššie na listovej zelenine s veľkým povrchom ako na koreňovej zelenine.

K stratám vitamínu C môže dochádzať tiež reakciou askorbovej kyseliny s niektorými reaktívnymi zložkami potravín. Technologicky významné sú reakcie s chinonmi

vznikajúcimi reakciami enzýmového hnednutia, reakcie s dusitanmi a hemovými farbivami v mäse a mäsových výrobkoch.

### **1.1.7 Doporučená denná dávka vitamínu C**

Denný príjem 100mg vitamínu C je spojený s udržaním maximálnej zásoby vitamínu C v ľudskom organizme, ktorá činí 3g. Zásoby vitamínu C sú v organizme nerovnomerne rozložené v tkanivách s vysokou metabolickou aktivitou. Skôr sa uvádzalo, že zníženie rizika kardiovaskulárnych chorôb a rakoviny je podmienené minimálnym denným príjmom 90 až 100mg vitamínu C, a však fínsky vedci potvrdili, že oxidatívnu modifikáciu lipoproteínov znižuje vitamín E a zároveň nepreukázali podobný pozitívny efekt zo strany askorbátu. Ďalší autori uvádzajú, že užitie vysokých dávok askorbátu nemá žiadny pozitívny vplyv na zlepšenie funkcie myokardu, ktorý bol poškodený ischémiou. Tak isto nebol doposiaľ preukázaný ani najrozšírenejší mýtus o liečebnom účinku askorbátu pri bežnom prechladnutí. Denná doporučená dávka vitamínu C závisí na veku, pohlaví, na životnom štýle a na mnohých ďalších faktoroch. V ČR je priemerná denná doporučená dávka pre bežných jedincov 75mg na jeden deň. Pre deti od 3 do 10 rokov sa odporúča polovičná dávka. Potreba vitamínu C sa však výrazne zvyšuje pri vyššej telesnej záťaži, infekčných ochoreniach, trvalom psychickom strese, alkoholizme, v tehotenstve a pod [11,12,13,14].

### **1.1.8 Avitaminosa, hypovitaminosa**

Nedostatok vitamínu C (hypovitaminóza) sa prejavuje zvýšenou únavou, slabosťou, bolesťami v kostiach, krvácaním ďasien, poškodením zubného lôžka. Avitaminóza sa prejavuje ochorením nazvaným skorbut. Príznaky tohto ochorenia sú krváčavosť, uvoľňovanie zubov, ľahká lámavosť kostí a zlé hojenie rán. Vitamín C tiež zasahuje do biosyntézy catecholaminov a jeho nedostatok je v tejto oblasti spojený s výskytom depresí, hypochondriou a zmenami nálad [1].

## 2 CHROMATOGRAFIA

Chromatografia je fyzikálno-chemická separačná metóda. Jej podstatou je rozdeľovanie zložiek zmesi medzi dvoma fázami: nepohyblivou (stacionárnou) a pohyblivou (mobilnou). Samotná separácia je dôsledkom rozdielnej afinity jednotlivých zložiek ku týmto dvom fázam. Stacionárna a mobilná fáza sa od seba odlišujú niektorou základnou fyzikálno-chemickou vlastnosťou, napr. polaritou [15].

Chromatografické metódy sa dajú klasifikovať z rôznych hľadísk:

Z hľadiska mobilnej fázy:

- ◆ plynová chromatografia (Gas Chromatography — GC)
- ◆ kvapalinová chromatografia (Liquid Chromatography — LC)

Z hľadiska mechanizmu separácie:

- ◆ adsorpčná chromatografia— prebieha adsorpcia zložiek na stacionárnej fáze
- ◆ rozdeľovacia chromatografia
- ◆ ionexová chromatografia — stacionárnu fázou tvorí ionex (menič iónov)
- ◆ gélová chromatografia — stacionárnu fázou tvorí pórovitý gél
- ◆ afinitná chromatografia

Z hľadiska usporiadania stacionárnej fázy:

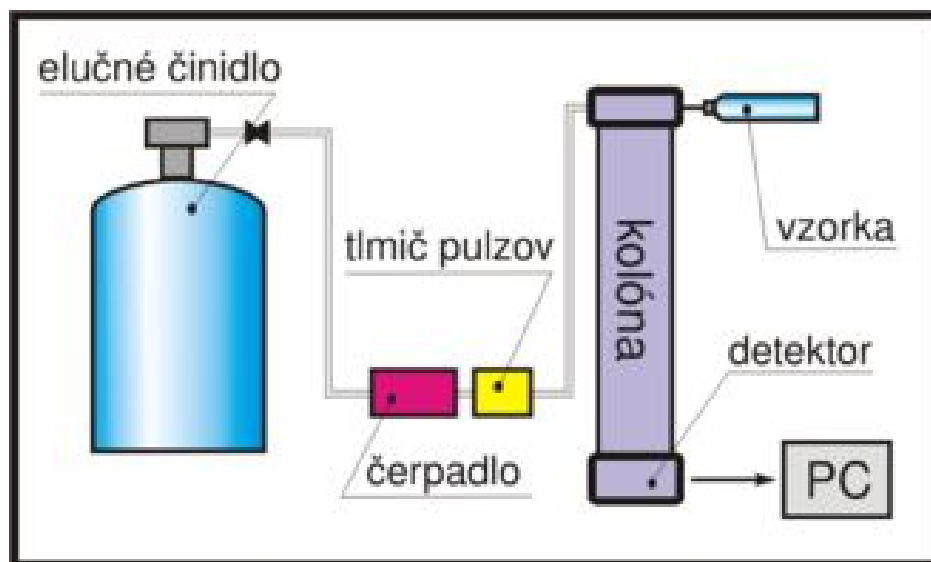
- ◆ chromatografia v plošnom usporiadaní
- ◆ papierová chromatografia (Paper Chromatography — PC)
- ◆ chromatografia na tenkej vrstve (Thin Layer Chromatography — TLC)
- ◆ kolónová chromatografia (niekedy tiež stĺpcová) — stacionárna fáza má tvar stĺpca

Z hľadiska vyhodnocovacej techniky:

- ◆ elučná chromatografia
- ◆ frontálna chromatografia
- ◆ vytesňovacia chromatografia

Chromatografia je vždy spojená s určitou detekčnou technikou [16,17].

## 2.1 Kvapalinová chromatografia



Obr. č. 5: Zjednodušená schéma kvapalinového chromatografu.

Elučné činidlo (eluent) zo zásobnej fľaše prúdi za pomoci čerpadla cez tlmič pulzov do kolóny, preteká kolónou a vyteká z kolóny cez detektor. Vzorka sa pomocou injekčnej striekačky dávkuje na kolónu. Pri postupe cez kolónu sa rozdelí na jednotlivé zložky, ktoré postupne vystupujú cez detektor. Signály z detektora sa spracujú na počítači pomocou vyhodnocovacieho softwaru.

Kvapalinová chromatografia (angl. Liquid Chromatography — LC) je chromatografická metóda, pri ktorej je mobilnou fázou kvapalina. Využíva sa na delenie kvapalín, alebo na delenie rozpustených zložiek v kvapaline. Dá sa využívať na preparatívne účely, ale aj na analytické stanovenie látok, prípadne na identifikáciu jednotlivých zlúčenín [18].

### 2.1.1 Kvapalinový chromatograf

Medzi hlavné časti kvapalinového chromatografu patrí:

- ◆ zásobná fľaša — slúži ako zdroj elučného činidla (mobilná fáza). Tu sa elučné činidlo aj uchováva.
- ◆ čerpadlo — prečerpáva elučné činidlo zo zásobnej fľaše na kolónu
- ◆ tlmič pulzov — zabezpečuje ustálený prietok elučného činidla do kolóny

- ◆ kolóna — podobne ako pri plynovej chromatografii je to miesto samotnej separácie. Kolóny pre kvapalinovú chromatografiu majú priemer 0,2 až 2 cm a dĺžku 10 až 100 cm.
- ◆ detektor — detekuje vyplavované zložky z kolóny
- ◆ vyhodnocovacie zariadenie (integrátor) — väčšinou osobný počítač s príslušným softvérovým vybavením [19].

Kvapalinová chromatografia môže prebiehať pri normálnom tlaku alebo pri zvýšenom tlaku (HPLC — High Performance Liquid Chromatography). Základnou výhodou HPLC je široký rozsah použiteľnosti. Možno analyzovať až 80 % všetkých látok, ktoré sa podstatne líšia v chemických a fyzikálnych vlastnostiach. Ďalšou prednosťou je možnosť účinne ovplyvňovať separáciu nielen voľbou stacionárnej fázy, ale rovnako zmenami zloženia mobilnej fázy, pretože kvapalná mobilná fáza nie je len inertným nosičom vzoriek, ale podieľa sa priamo na interakciách rozpustených látok so stacionárnou fázou [15].

### 2.1.2 Princíp kvapalinovej chromatografie

Elučné činidlo (mobilná fáza) prúdi pomocou čerpadla a prechádza cez tlmič pulzov, kde sa stabilizuje jeho prietok cez kolóny. Mobilná fáza a vzorka vstupujú temenom do kolóny a nastáva separácia zložiek v dôsledku rôznej afinity zložiek k stacionárnej fáze. Po určitom čase (retenčný čas) začnú jednotlivé zložky kolónu opúšťať - nastáva elúcia. Vychádzajúce zložky zaznamenáva detektor a jeho signál je ďalej spracovaný integrátorom (počítač) [20].

### 2.1.3 Detektory v kvapalinovej chromatografii

Detektor je zariadenie, ktoré premieňa analytický signál (elúciu zložiek zmesi) na elektrický signál, ktorý je ďalej spracúvaný. Voľba detektora je závislá od povahy separovanej zmesi aj od povahy mobilnej fázy.

Základné typy detektorov používaných v kvapalinovej chromatografii:

- ◆ Elektrochemický – pr. Coulochem III
- ◆ fluorometrický

- ◆ konduktometrický detektor (meria vodivosť eluátu)
- ◆ UV/VIS



Obr. č. 6: HPLC - kompletná aparatúra.



Obr. č. 7 : Coulochem III

### 3 BROKOLICA



Obr. č. 8 : Brokolica špargľová

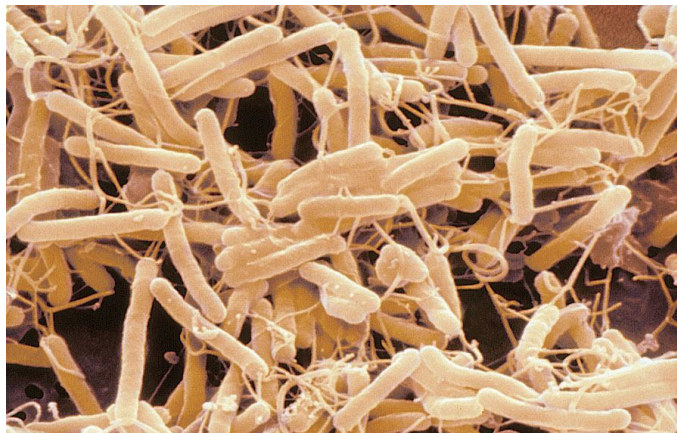
Brokolica – Kapusta obyčajná špargľová (*Brassica oleracea*, var. *italica*) z čeľade *Brassicaceae* je druh hlúbavej zeleniny so zhrubnutou stonkou zakončenou zelenými alebo modrastými kvetmi v tvare ružice. Pochádza pravdepodobne z oblasti Stredozemného mora a jej názov je odvodený z latinského *brachium*, čo znamená konár. V bývalom Československu sa brokolica začala šľachtiť a pestovať na začiatku päťdesiatych rokov. Najväčší rozmach nastal až v osemdesiatych a deväťdesiatych rokoch, keď mali ľudia o kvalite cennej zeleniny viac informácií. V súčasnosti sú jej hlavnými pestovateľmi USA a zeme južnej Európy. Je bohatá na obsah zdraviu prospešných vitamínov a minerálov [21,22].

Brokolica má svoju typickú arómu, ktorá je vyvolaná 3-methyl-sulfinyl-propyl-isothio- kyanátom, ktorý vzniká z glukozinolátu nazývaného glukoberin. Má významné dietetické účinky na ľudský organizmus, svojím obsahom účinných látok pôsobí silne protiskleroticky, je vhodná pre diabetikov. Je podporným prostriedkom pri dvanástnikových vredoch, ukludňuje črevá. Obsahuje kyselinu tartronovú a inositol, látky, ktoré brzdia premenu glykozidov na tuky a cholesterol. Je v nej tiež obsiahnutý celý rad voľných aminokyselín - fenylalanín, leucín, tryptofán, treonín.

Brokolica je bohatá na vitamín C, draslík, fosfor a síru. Ďalej obsahuje veľké množstvo železa a kyseliny listovej, vitamín E, niacín, biotín,  $\beta$ -karotén, horčík, selén a zinok. Obsahuje 90 % vody a málo sacharidov a tukov. Je dobrým čistiacim prostriedkom pre telo

a pomáha pri redukcii váhy. Rovnako ako karfiol, ružičkový kel a kapusta, patrí medzi hlúbovitú zeleninu, ktorá obsahuje mnoho blahodarných fytochemických látok napr. glukozinolátov (sulforafan), indoly, karotenoidy, dithiolthiony, fenoly, terpeny, ktoré majú protinádorový účinok. Brokolica má priaznivý vplyv na úpravu tráviacich ťažkostí. Obsahuje aj cennú vlákninu, potrebnú pre správnu činnosť čriev a žalúdka [23,24].

Brokolica je nezanedbateľným pomocníkom pri prevencii rôznych ochorení a podporou imunitného systému pri liečebných procesoch. Pomáha pri prevencii rakoviny pľúc, znižuje riziko vzniku nádorových ochorení, detoxikuje organizmus, zlepšuje činnosť srdca, svalov a nervov. Obsahuje glukorafanin, ktorý je prekurzorom sulforafanu, látky preukázateľne brániacej nádorovému bujneniu. Sulforafan zabíja aj baktériu *Helicobacter pylori*, zodpovednú za vredovú chorobu. Práve táto baktéria je považovaná aj za pôvodcu väčšiny prípadov rakoviny žalúdka [25, 26].



Obr. č. 9 : *Helicobacter pylori*



## **II. PRAKTICKÁ ČASŤ**

## 4 STANOVENIE VITAMÍNU C METÓDOU HPLC - ECD

### 4.1 Chemikálie

kyselina *m*-fosforečná (dodávateľ – Dorapis Praha)

methanol čistoty pre HPLC (dodávateľ – Sigma Aldrich)

morský piesok (dodávateľ – Chemapol Praha)

redestilovaná voda

$K_4[Fe(CN)_6]$  (dodávateľ – Chemapol Praha)

$ZnSO_4$  (dodávateľ – Chemapol Praha)

### 4.2 Použitý prístroj

Aparatura pre HPLC-ECD (ESA – Coulochem III)

- analytická cela 5010A
- guard cela 5020
- detektor Coulochem III
- dávkovací ventil analytický slučkový (dávkovacia slučka o objeme 20  $\mu$ l)
- kolóna SUPELCOSIL - LC8 (15 cm x 4,6 mm; 5  $\mu$ m), (Supelco, USA)
- PC s vyhodnocovacím programom ChemStation – Instrument1 (Agilent, USA)

Dávkovacia stiekačka (Hamilton, USA)

Mikrofiltre 0,45  $\mu$ m, PTFE (Supelco, USA)

Mikrofilter na mobilnú fázou 0,2  $\mu$ m (Supelco, USA)

### 4.3 Kalibračná krivka pre stnovenie vitamínu C

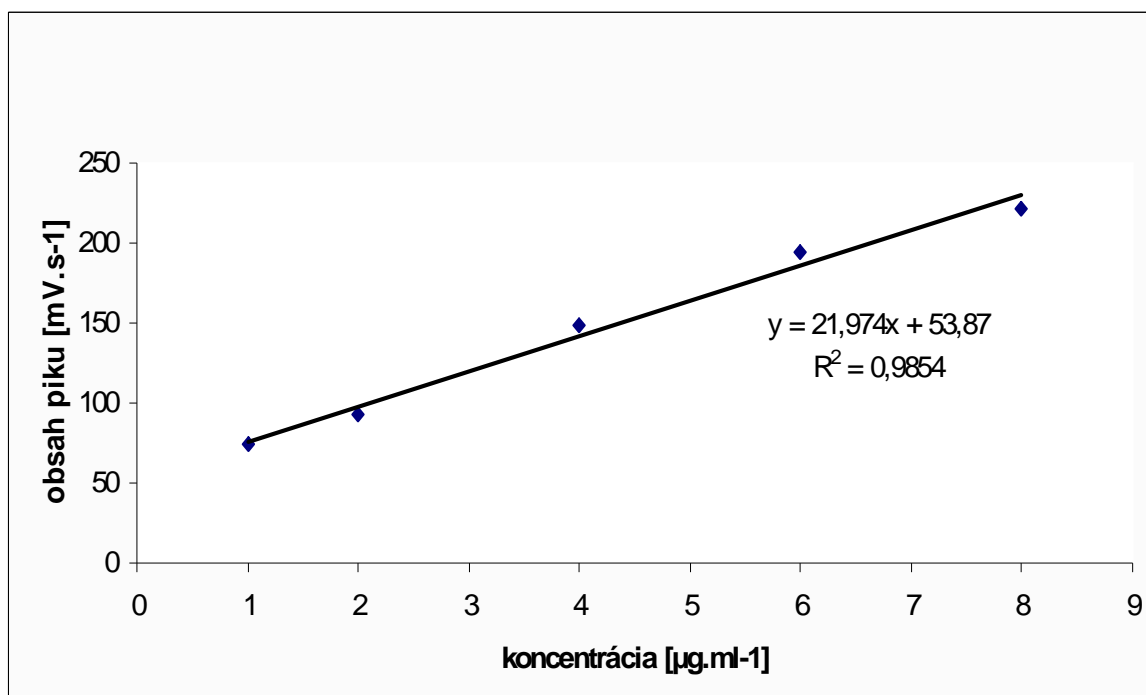
S presnosťou na 0,0001g bolo navážených 0,0020g kyseliny L-askorbovej. Navážka bola rozpustená v 250 ml odmernej banke a bola doplnená po rysku mobilnou fázou (zmes  $CH_3OH$ :  $H_3PO_4$ :  $rH_2O$  v pomere 99:0,5:0,5). Koncentrácia zásobného roztoku bola 8  $\mu$ g. $ml^{-1}$ . Zo zásobného roztoku kyseliny L – askorbovej boli pripravené kalibračné roztoky o koncentráciach 1, 2, 4 a 6  $\mu$ g. $ml^{-1}$  riedením zásobného roztoku s mobilnou fázou.

Chromatografická separácia prebiehala na kolóne SUPELCOSILL C8, 5  $\mu\text{m}$  (15 cm x 4,6 mm). Elúcia bola robená izokraticky s mobilnou fázou pri 30°C a prietoku 1,1 ml.min<sup>-1</sup>. Kalibračná krivka bola meraná pri napätí  $K_1 = 600$  mV a  $K_2 = 650$  mV. Bola zostrojená ako závislosť plochy píku [mV.s<sup>-1</sup>] na koncentrácii kyseliny askorbovej [ $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ].

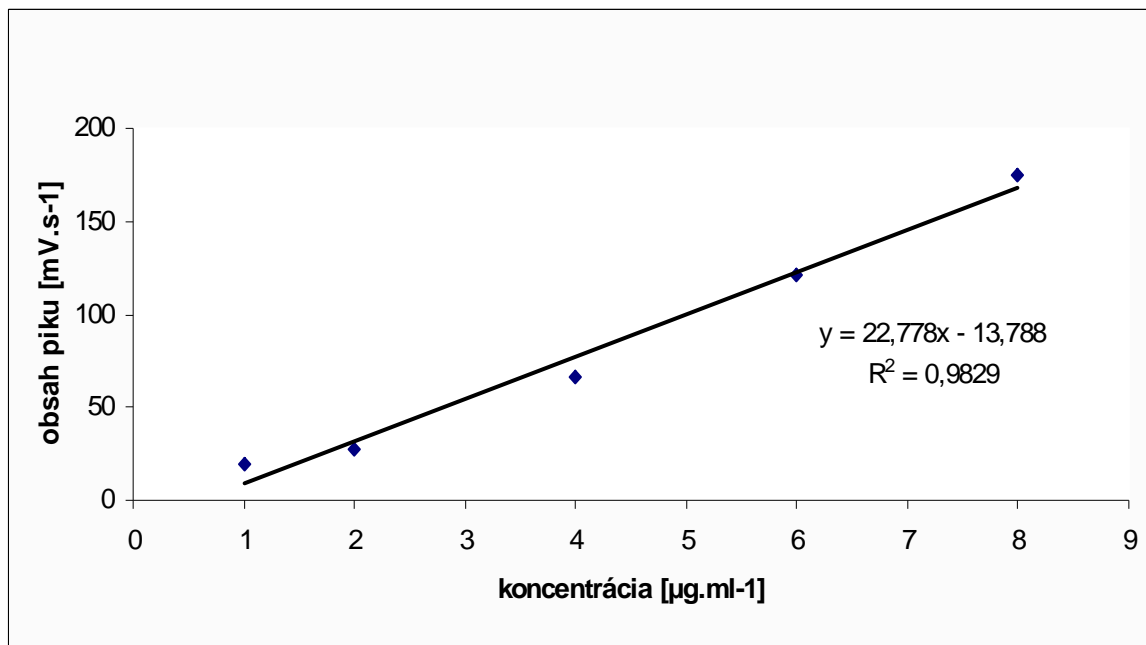
Tabuľka č. 2: Kalibrácia vitamínu C metódou HPLC

Koncentrácia kyseliny L – askorbovej [ $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ]	Priemerná plocha píku [mV.s <sup>-1</sup> ]
1	73,7
2	92,7
4	148,7
6	194,7
8	221,0

Graf č. 1: Kalibračná krivka s rovnicou regresie pre stanovenie vitamínu C metódou HPLC na kanále  $K_1 = 600$  mV.



Graf č. 2: Kalibrační krivka s rovnicou regrese pro stanovení vitamínu C metodou HPLC na kanále  $K_1 = 650 \text{ mV}$



#### 4.4 Postup pri stanovení vitamínu C v brokolici

Pre stanovenie vitamínu C bolo odvážených 10g brokolice s presnosťou na 0,001g. Brokolica bola v trecej miske rozotrená s morským pieskom. Bolo pridaných 50 ml mobilnej fáze (zmes  $\text{CH}_3\text{OH}$ :  $\text{H}_3\text{PO}_4$ :  $\text{rH}_2\text{O}$  v pomere 99:0,5:0,5). Vzorka sa nechala 15 minút extrahovať a následne bola prefiltrovaná. Filtrát bol vyčírený podľa Carreza. K filtrátu bolo odpipetovaných 10 ml Carrezovho činidla ( $\text{ZnSO}_4$ ) I a 10 ml Carrezovho činidla II ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ). Roztok bol opäť prefiltrovaný. Filtrát bol zriedený s mobilnou fázou v pomere 1:4. Alikvotná časť filtrátu bola pred vstrekom na kolónu prefiltrovaná cez mikrofilter PTFE o veľkosti pórov  $0,45 \mu\text{m}$ . Chromatografická separácia prebiehala na kolóne SUPELCOSIL C8,  $5 \mu\text{m}$  ( $15 \text{ cm} \times 4,6 \text{ mm}$ ). Elúcia bola robená izokraticky s mobilnou fázou pri  $30^\circ\text{C}$  a prietoku  $1,1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Detekcia kyseliny askorbovej bola robená pomocou potenciálu na dvoch kanáloch s napätím  $K_1 = 600 \text{ mV}$  a  $K_2 = 650 \text{ mV}$ . Z dôvodu lepšej odozvy signálu bol použitý kanál  $K_1 = 600 \text{ mV}$  pre presnejšie stanovenie. Každá vzorka bola meraná 5-krát.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

### 5.1 Výsledky stanovenia vitamínu C v brokolici

Obsah vitamínu C bol stanovený v čerstvej brokolici, v brokolici varenej vo vode a brokolici varenej v pare po dobu 10 a 15 minút. Z dôvodu lepšej odozvy signálu bol použitý kanál  $K_1 = 600$  mV pre presnejšie stanovenie. Odhad smerodajnej odchýlky  $s$ , ktorá je základnou charakteristikou pri náhodných chybách, bol vypočítaný podľa vzorca:

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

Skutočný obsah vitamínu C bol vypočítaný vzorca:

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{s}{\sqrt{n}} \cdot t$$

Hodnota Študentovho koeficientu  $t$  je pri testovanej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$  a pri štyroch stupňoch voľnosti 2,1319.

Tabuľka č. 3: Stanovenie vitamínu C v čerstvej brokolici

Plocha píku [mV.s <sup>-1</sup> ]	Obsah vitamínu C [mg.100g <sup>-1</sup> ]
406,62	56,19
399,00	54,97
407,23	56,28
405,32	55,98
403,29	55,66
$\bar{x} = 404,29$	$\bar{x} = 55,82$
Smerodajná odchýlka	0,473 mg

Priemerný obsah vitamínu C:  $55,82 \pm 0,451$  mg.100g<sup>-1</sup> ( $\alpha = 0,05$ )

Tabuľka č. 4: Stanovenie vitamínu C v 10 minút varenej brokolici vo vode

Plocha píku [mV.s <sup>-1</sup> ]	Obsah vitamínu C [mg.100g <sup>-1</sup> ]
384,31	52,63
383,66	52,53
383,53	52,51
382,94	52,41
383,74	52,54
$\bar{x} = 383,63$	$\bar{x} = 52,53$
Smerodajná odchýlka	0,070 mg

Priemerný obsah vitamínu C:  $52,53 \pm 0,067 \text{ mg.100g}^{-1}$  ( $\alpha = 0,05$ )

Tabuľka č. 5: Stanovenie vitamínu C v 15 minút varenej brokolici vo vode

Plocha píku [mV.s <sup>-1</sup> ]	Obsah vitamínu C [mg.100g <sup>-1</sup> ]
322,58	42,80
322,67	42,81
321,84	42,68
322,74	42,83
321,95	42,70
$\bar{x} = 322,355$	$\bar{x} = 42,76$
Smerodajná odchýlka	0,061 mg

Priemerný obsah vitamínu C:  $42,76 \pm 0,058 \text{ mg.100g}^{-1}$  ( $\alpha = 0,05$ )

Tabuľka č. 6: Stanovenie vitamínu C v 10 minút parenej brokolici

Plocha píku [mV.s <sup>-1</sup> ]	Obsah vitamínu C [mg.100g <sup>-1</sup> ]
382,71	52,38
384,47	52,66
385,64	52,84
386,24	52,94
385,79	52,87
$\bar{x} = 384,969$	$\bar{x} = 52,74$
Smerodajná odchýľka	0,202 mg

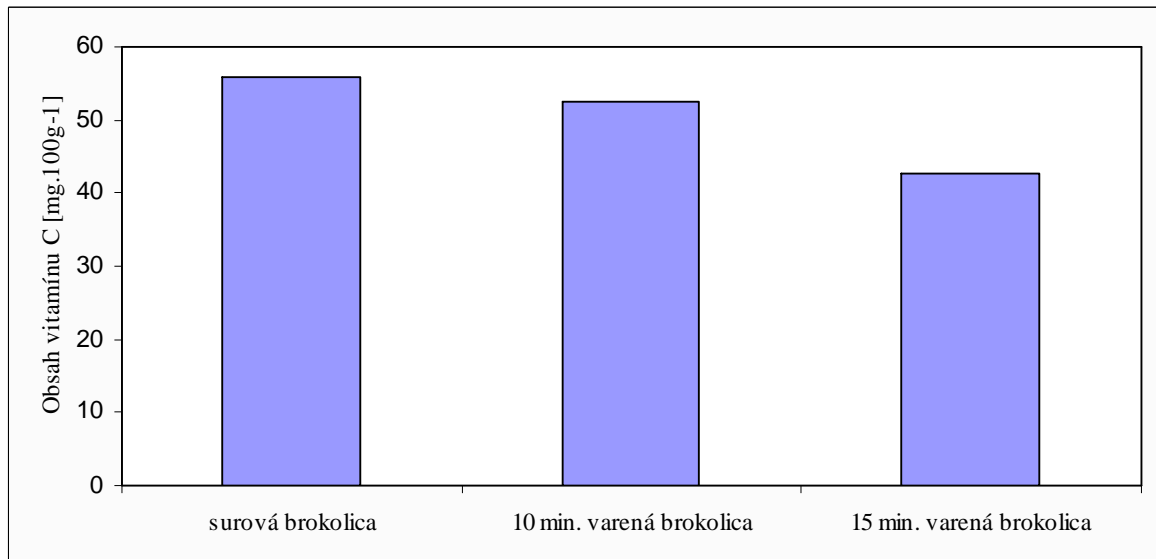
Priemerný obsah vitamínu C:  $52,74 \pm 0,193 \text{ mg.100g}^{-1}$  ( $\alpha = 0,05$ )

Tabuľka č. 7: Stanovenie vitamínu C v 15 minút parenej brokolici

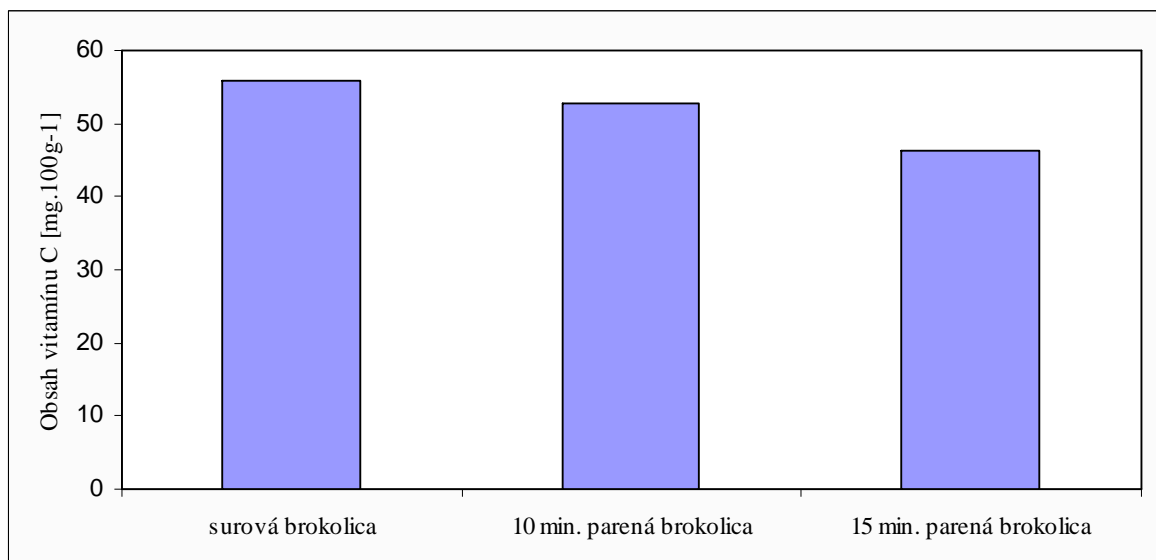
Plocha píku [mV.s <sup>-1</sup> ]	Obsah vitamínu C [mg.100g <sup>-1</sup> ]
342,00	45,89
345,66	46,48
343,43	46,12
344,59	46,31
343,67	46,16
$\bar{x} = 343,87$	$\bar{x} = 46,19$
Smerodajná odchýľka	0,195 mg

Priemerný obsah vitamínu C:  $46,19 \pm 0,185 \text{ mg.100g}^{-1}$  ( $\alpha = 0,05$ )

Graf č. 3: Porovnanie obsahu vitamínu C v surovej a varenej brokolici vo vode

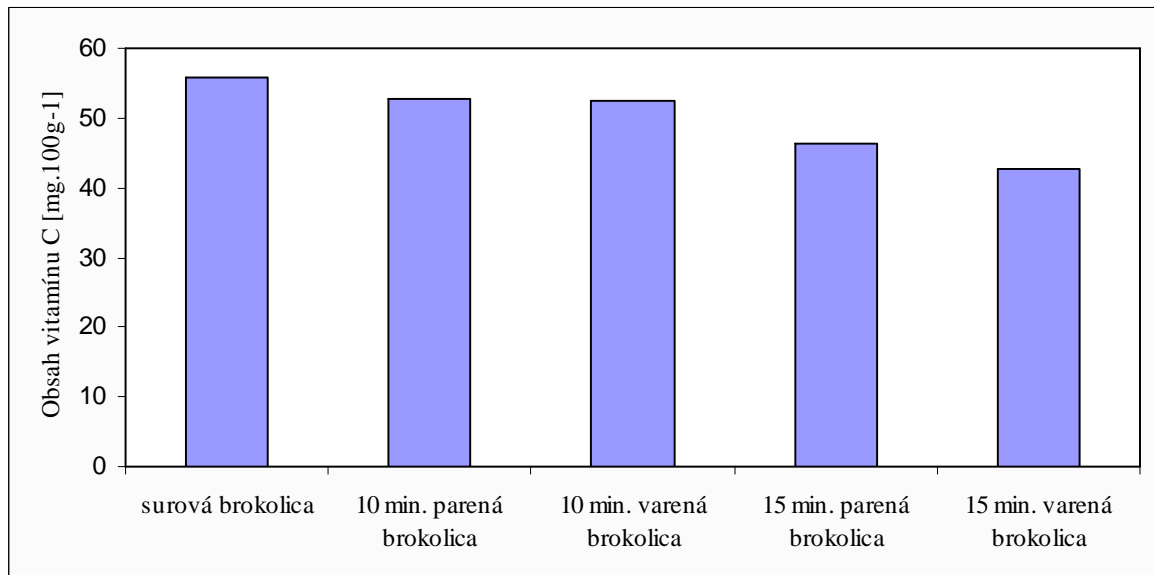


Graf č. 4: Porovnanie obsahu vitamínu C v surovej a parenej brokolici





Graf č. 5: Porovnanie obsahu vitamínu C v surovej, varenej vo vode a parenej brokolici



Z grafov č. 3-5 vyplýva, že tepelnou úpravou sa obsah vitamínu C znižuje. Pri brokolici varenej vo vode a parenej po dobu 10 minút rozdiel obsahu vitamínu C nie je vysoký. Pri brokolici varenej a parenej po dobu 15 minút je však tento rozdiel už výraznejší. Z čoho plynie, že pri dlhšej tepelnej úprave je z hľadiska obsahu vitamínu C výhodnejšie varenie v pare ako vo vode.

Najnižší úbytok vitamínu C bol pri brokolici parenej po dobu 10 minút, percentuálny úbytok činil 5,52 %. Pri brokolici varenej vo vode po dobu 10 min. bol percentuálny úbytok vitamínu C 5,89 %. Pri brokolici parenej po dobu 15 minút úbytok činil už 17,25 % a najvyšší úbytok vitamínu C bol pri brokolici varenej vo vode po dobu 15 minút, ktorý bol až 23,40 %.

## 6 METÓDA ŠTANDARDNÉHO PRÍDAVKU

S presnosťou na 0,0001g boli navážené 3mg štandardného preparátu vitamínu C. Štandardný prídavok bol pridaný k čerstvej brokolici, ktorá v priemere obsahovala 55,82 mg vitamínu C na 100g brokolice a jej priemerná plocha píku bola  $404,29 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . Postup pri stanovení bol zopakovaný rovnakým spôsobom ako v kapitole 4.4. Hodnota píku so štandardným prídavkom bola  $422,02 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . Dosadením tejto hodnoty do kalibračnej krivky a vynásobením príslušným riedením bol vypočítaný obsah vitamínu C  $58,64 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ . Postup izolácie vitamínu C a jeho stanovenie pri daných chromatografických podmienkach bol overený.

## ZÁVER

Cieľom tejto bakalárskej práce bola izolácia vitamínu C a stanovenie jeho obsahu v brokolici. Obsah vitamínu C bol stanovovaný v brokolici čerstvej, v brokolici varenej po dobu 10 a 15 minút a v brokolici varenej po tú istú dobu.

Na stanovenie obsahu vitamínu C bola použitá vysokoúčinná kvapalinová chromatografia HPLC - ECD. Vzorky boli merané na kolóne SUPELCOSIL-LC8 (15 cm x 4,6 mm; 5  $\mu$ m). Ako mobilná fáza bola použitá zmes  $\text{CH}_3\text{OH}$ :  $\text{H}_3\text{PO}_4$ :  $\text{rH}_2\text{O}$  v pomere 99:0,5:0,5. Prietok mobilnej fázy bol 1,1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Na elektródy bolo vložené napätie 600 mV a 650 mV a ochranná guard cela bola nastavená na 750 mV. Elúcia prebiehala izokraticky. Bola urobená i metóda štandardného prídavku, ktorou sa overila presnosť stanovenia a postup extrakcie vitamínu C.

Výsledky jednotlivých analýz boli spracované pomocou štandardných štatistických parametrov s použitím Študentovho rozloženia náhodných odchýliek pre daný stupeň voľnosti. Výsledky boli testované na hladine významnosti  $\alpha = 0,05$  (95 %).

Priemerný obsah vitamínu C bol stanovený v brokolici čerstvej  $55,82 \pm 0,451 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ , v brokolici varenej po dobu 10 minút  $52,53 \pm 0,067 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ , v brokolici varenej 15 minút  $42,76 \pm 0,058 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ , v brokolici varenej 10 minút  $52,74 \pm 0,193 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$  a v brokolici varenej po dobu 15 minút  $46,19 \pm 0,185 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ .

Odborná literatúra udáva v brokolici vyššie množstvo vitamínu C ako bolo zistené analýzou pomocou HPLC. To môže byť spôsobené nevhodnými skladovacími podmienkami v obchodnom reťazci, zrelosti brokolice, vystavením svetelnému žiareniu v predajni atď.

Pri tepelných úpravách došlo k stratám vitamínu C. Vyššie straty boli stanovené v brokolici varenej ako v brokolici varenej. Priemerný rozdiel v obsahu vitamínu C v brokolici varenej a varenej po dobu 10 minút bol  $0,21 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ , v brokolici varenej a varenej o 5 minút dlhšie bol už rozdiel obsahu vitamínu C  $3,43 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ . Z čoho vyplýva, že pri dlhšej tepelnej úprave sú pri varení vyššie straty vitamínu C ako pri parení.

Pridaním štandardného prídavku bol overený izolačný postup a metóda stanovenia vitamínu C.

**ZOZNAM POUŽITÉJ LITERATURY**

- [1] Hoza, I., Kramářová, D. *Potravinářská biochemie II*, FT UTB ve Zlíně, 2006, ISBN 80-7318-395-1
- [2] Velíšek, J. *Chemie potravin 2*, VŠCHT Praha, Tábor: OSSIS, 1999
- [3] Finaud, J., Lac, G. Oxidative stress – relationship with exercise and training, *Sports medicine* 36, p. 328-358, 2006, ISSN 0112-1642
- [4] Wirth, R. Vitamins and trace elements in nutrition, *Medizinische klinische* 101 p.163-166, 2006, ISSN 0723-5003
- [5] Hanus, J. Albert Szent-Gyorgyi and his life, *Journal of molecular structure-theochem* 666, p. 786-691, 2003, ISSN 0166-1280
- [6] Geng, H., Meng, ZQ. Inhibition of superoxide dismutase, Vitamin C and glutathione on chemiluminescence produced by luminol and the mixture of sulfite and bisulfite, *Spectrochimica acta part A-molecular and biomolecular spectroscopy* 64, p. 87-92. 2006, ISSN 1386-1425
- [7] Woodgate, D.E., Conquer, J.A. Effects of a stimulant-free dietary supplement on body weight and fat loss in obese adults, *Current therapeutic research-clinical and experimental* 64, p. 248-262, 2003, ISSN 0011-393X
- [8] Brázdová, Z. *Výživa člověka*, 1.vydání, VVŠ PV Vyškov, 1995
- [9] Combs, Gerald F. *The Vitamins*, second edition, ACADEMIC PRESS, 1999
- [10] Leskova, E., Kubikova, J. *at all*. Vitamin losses, retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models, *Journal of food composition and analysis* 19, p. 252-276, 2006, ISSN 0889-1575
- [11] Vodrážka, Z. *Biochemie 3*, Akademie věd České republiky, 1993
- [12] Hickman, D.L. *at all*. What is your diagnosis? Subclinical hypovitaminosis C, *LAB animal* 32, p. 23-25, 2003, ISSN 0093-7355
- [13] Dawson, E.E. *at all*. The effect of ascorbic acid supplementation on the nicotine metabolism of smokers, *Preventive medicine* 29, p.451-454, 1999, ISSN 0091-7435

- [14] McAnulty, S. *at all.* Effect of daily fruit ingestion on angiotensin converting enzyme activity, blood pressure, and oxidative stress in chronic smokers, *Free radical search* 39, p. 1241-1248, 2005, ISSN 1071-5762
- [15] Pacáková, K. Štulík, K. *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie*, UK Praha, SPN Praha, 1986
- [16] Zýka, J. *a kol.* *Analytická příručka díl I.*, SNTL – Nakladatelství technické literatury, Praha 1, 1979
- [17] Sommer, L. *Teoretické základy analytické chemie III.*, FCH VUT Brno, 1995
- [18] Mikeš, O. *a kol.* *Příručka laboratorních chromatografických metod*, Státní nakladatelství technické literatury, Praha 1, 1961
- [19] Dostupné na: [http://sk.wikipedia.org/wiki/Kvapalinová\\_chromatografia](http://sk.wikipedia.org/wiki/Kvapalinová_chromatografia)
- [20] Káš, J., Kodlíček, M., Valentová, O. *Laboratorní techniky biochemie*, Vysoká škola chemicko – technologická v Praze, Praha, 2006, ISBN 80-7080-588-2
- [21] Havlů, K. *Brokolice na 150 způsobů*, vyd. 1., Nakladatelství Vyšehrad 2005, ISBN 80-7021-794-4
- [22] Hallósy, M. *Dajme zelenú brokolici*, 14.júna 2005, Dostupné na: URL:<http://www.primar.sk/Page.spx?ID=3997>
- [23] Bernstein, L., Ross, R. K. (1993): Endogenous hormones and breast cancer risk, *Epidemiol. Rev.*, 15, 48-65
- [24] Fowke, J. H., Longcope, Ch., Hebert, J. R. Brassica vegetables consumption shifts estrogen metabolism in healthy postmenopausal women, *Cancer Epid.*, 9, 773-779, 2000
- [25] Steinmetz, K. A, Potter, J. D. Vegetables, fruit and cancer prevention: a review. *Journ. Am. Diet. Assoc.*, 96, 1027-39, 1996
- [26] Dostupné na: URL: <http://www.pelargonie.cz/brokolice.html>

**ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK**

HPLC Vysokoučinná kvapalinová chromatografia.

ECD Elektrochemický detektor.

LDL Lipoprotein s nízkou hustotou.

HDL Lipoprotein s vysokou hustotou.

GC Plynová chromatografia.

LC Kvapalinová chromatografia.

PC Papierová chromatografia.

TLC Chromatografia na tenkej vrstve.

**ZOZNAM OBRÁZKOV**

<i>Obrázok č. 1: Vitamín C.....</i>	<i>11</i>
<i>Obrázok č. 2: Vznik kyseliny L – askorbovej.....</i>	<i>13</i>
<i>Obrázok č. 3: Oxidačno-redukčný systém vitamínu C.....</i>	<i>13</i>
<i>Obrázok č. 4: Spätná redukcia L – dehydroaskorbovej kyseliny.....</i>	<i>14</i>
<i>Obrázok č. 5: Zjednodušená schéma kvapalinového chromatografu.....</i>	<i>20</i>
<i>Obrázok č. 6: HPLC - kompletná aparátúra.....</i>	<i>22</i>
<i>Obrázok č. 7 : Coulochem III.....</i>	<i>22</i>
<i>Obrázok č. 8: Brokolica špargľová.....</i>	<i>23</i>
<i>Obrázok č. 9: Helicobacter pylori.....</i>	<i>24</i>

**ZOZNAM TABULIEK**

<i>Tabuľka č. 1: Obsah vitamínu C v niektorých potravinách.....</i>	<i>16</i>
<i>Tabuľka č. 2: Kalibrácia vitamínu C metódou HPLC.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabuľka č. 3: Stanovenie vitamínu C v čerstvej brokolici metódou HPLC.....</i>	<i>29</i>
<i>Tabuľka č. 4: Stanovenie vitamínu C v 10 minút varenej brokolici metódou HPLC.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabuľka č. 5: Stanovenie vitamínu C v 15 minút varenej brokolici metódou HPLC.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabuľka č. 6: Stanovenie vitamínu C v 10 minút parenej brokolici metódou HPLC.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabuľka č. 7: Stanovenie vitamínu C v 15 minút parenej brokolici metódou HPLC.....</i>	<i>31</i>



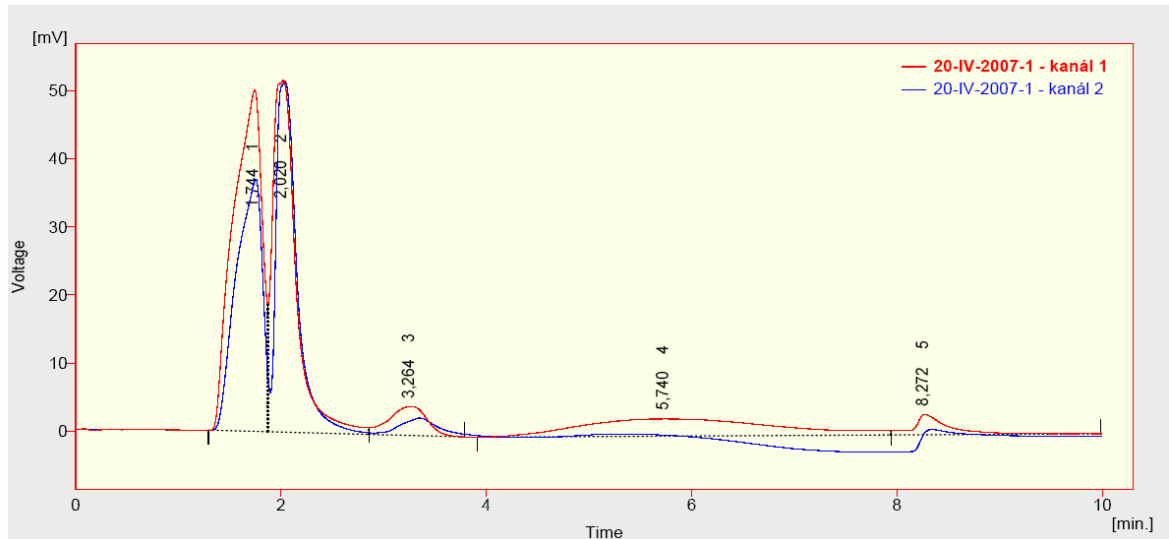
## ZOZNAM PRÍLOH

PRÍLOHA P I: Chromatografy brokolice

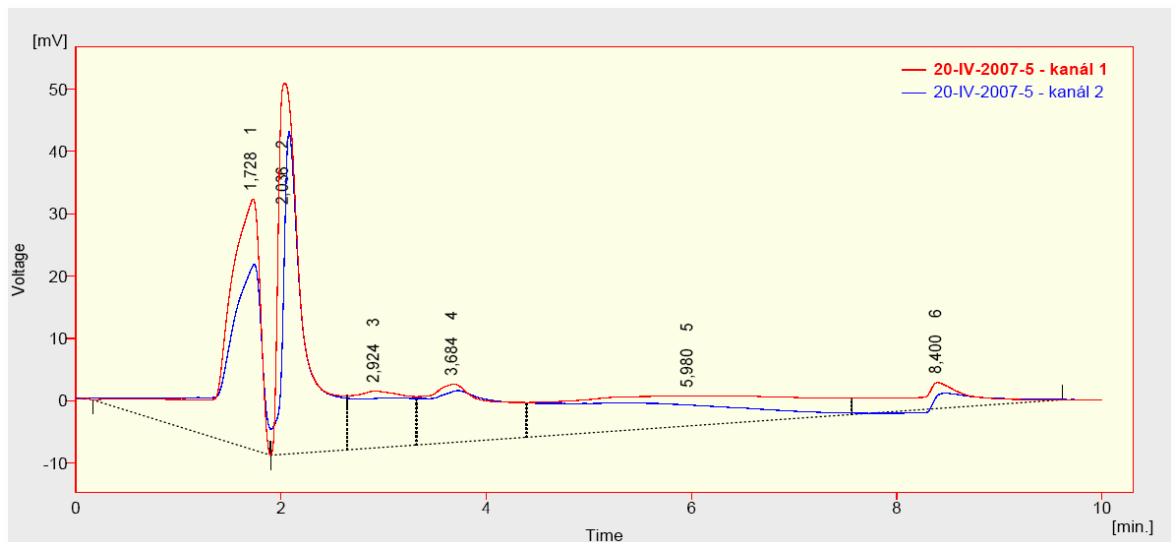
PRÍLOHA P II: Vitamín C na trhu

## PRÍLOHA P I: CHROMATOGRAFY BROKOLICE

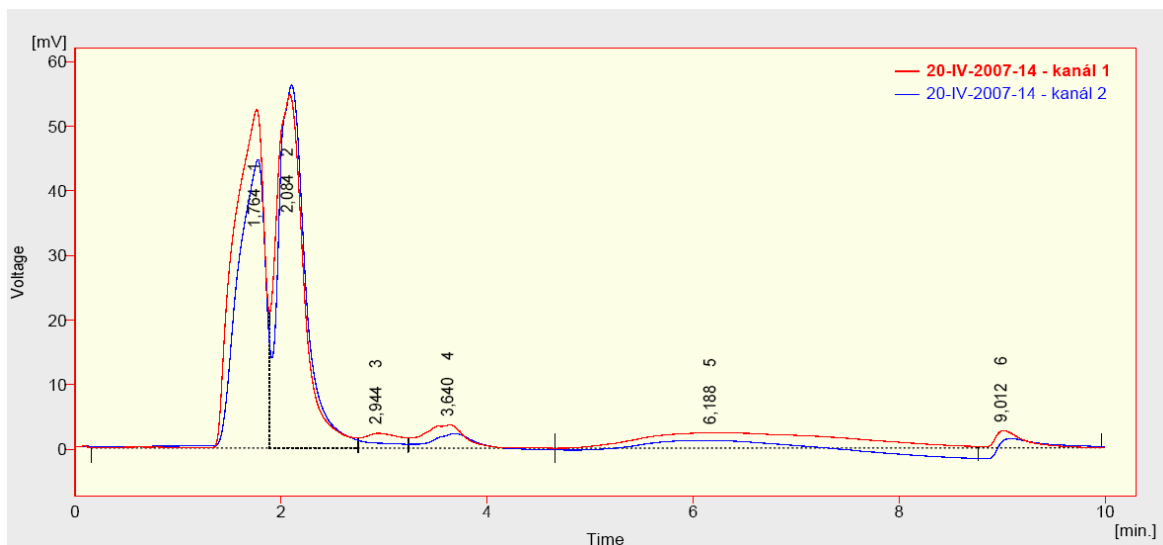
Graf č. 6: Stanovenie vitamínu C v čerstvej brokolici



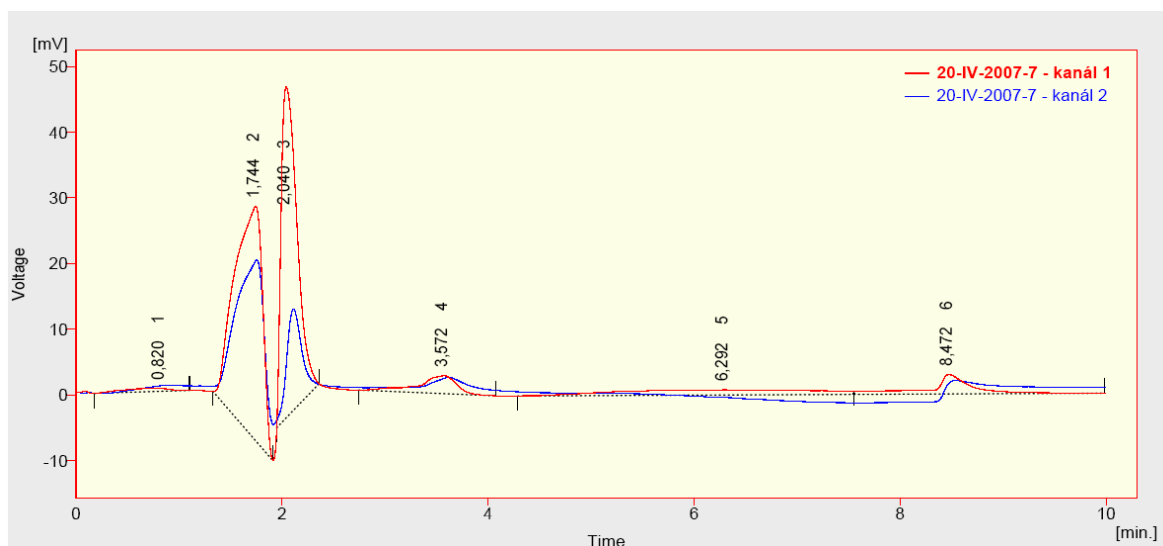
Graf č. 7: Stanovenie vitamínu C v brokolici 10 minút varenej vo vode



Graf č. 8: Stanovenie vitamínu C v brokolici 15 minút varenej vo vode



Graf č. 9: Stanovenie vitamínu C v brokolici 15 minút parenej



## PRÍLOHA P II: VITAMÍN C NA TRHU



Obrázok č. 10: Šumivé tablety Celaskon do vody



Obrázok č. 11: Celaskon s dlhotrvajúcim účinkom



Obrázok č. 12: Vitamín C s výťažkami zo šípok



Obrázok č. 13: Prírodný vitamín C s ovocnou príchuťou