

# Stanovení změn vitamínu C v potravinách pomocí HPLC

Jana Konečná

---

Bakalářská práce  
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: **Jana KONEČNÁ**  
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Stanovení vitamínu C v potravinách pomocí HPLC**

Zásady pro vypracování:

**V teoretické části rozebrat význam a vlastnosti vitamínu C.  
Provést rešerši v oblasti využití HPLC pro stanovení vitamínu C v potravinách s důrazem  
na nápoje.**

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

**Dle doporučení vedoucího práce.**

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Marta Severová**

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**

Bakalářská práce se v teoretické části zabývá charakteristikou, chemickou strukturou, působením v organismu a stabilitou vitamínu C. Součástí je rešerše o využití vitamínu C v potravinářském průmyslu. Ve stručnosti se zabývá běžně používanými metodami laboratorního stanovení vitamínu C. Obsahuje obecnou charakteristiku metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie a přehled metod HPLC pro stanovení vitamínu C v potravinách se zaměřením na nápoje.

Klíčová slova:

vitamin C, HPLC, metody

## **ABSTRACT**

In this bachelor paper, characteristic, chemical structure, activity in human organism and stability of vitamin C are discussed. There is a literature research of usage of vitamin C in food industry in this paper. It is briefly engaged in common methods used for lab determination of vitamin C. Short characteristic of high-performance liquid chromatography and survey of HPLC methods for determination of vitamin C in foodstuffs aimed at beverages are introduced.

Keywords:

vitamin C, HPLC, methods

Děkuji touto cestou vedoucí bakalářské práce Ing. Martě Severové za odborné vedení a pomoc při zpracování práce.

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>8</b>
<b>1 CHARAKTERISTIKA VITAMINU C</b> .....	<b>9</b>
1.1 CHEMICKÉ VLASTNOSTI VITAMINU C.....	9
1.2 PŮSOBENÍ VITAMINU C V ORGANISMU .....	11
1.3 DOPORUČENÉ DENNÍ DÁVKY VITAMINU C .....	13
1.3.1 Hypovitaminosa a avitaminosa.....	14
1.3.2 Hypervitaminosa.....	15
1.4 ZDROJE VITAMINU C.....	15
1.5 STABILITA VITAMINU C.....	16
1.6 VYUŽITÍ VITAMINU C V POTRAVINÁŘSTVÍ .....	17
<b>2 NÁPOJE V TRŽNÍ SÍTI OBSAHUJÍCÍ VITAMIN C</b> .....	<b>19</b>
<b>3 METODY STANOVENÍ VITAMINU C</b> .....	<b>21</b>
<b>4 HPLC-VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE</b> .....	<b>22</b>
4.1 SESTAVA ZAŘÍZENÍ HPLC.....	23
4.1.1 Druhy kolon .....	25
4.1.2 HPLC detektory .....	26
4.1.2.1 Pracovní techniky při vyhodnocování chromatogramů .....	28
4.2 VLIV PODMÍNEK NA ÚČINNOST HPLC.....	29
<b>5 METODY HPLC PRO STANOVENÍ VITAMINU C</b> .....	<b>31</b>
5.1 METODY HPLC PRO STANOVENÍ VITAMINU C V POTRAVINÁCH.....	31
5.2 METODY HPLC PRO STANOVENÍ VITAMINU C V NÁPOJÍCH.....	36
<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>41</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>42</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	<b>46</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>47</b>
<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	<b>48</b>

## ÚVOD

Výživa člověka je důležitý společenský jev, jehož určujícím faktorem je potrava. Biologicky hodnotná potrava kryje fyziologickou potřebu člověka úměrně k podmínkám jeho prostředí (věku, pohlaví, pracovní zátěži); musí obsahovat všechny látky, které lidský organismus potřebuje, v odpovídajícím množství a v optimálním vzájemném poměru [1].

Důležitý je dostatek živin kalorických – sacharidů, tuků a bílkovin, ale i dostatečné množství nekalorických živin – vody, minerálních látek a vitaminů [2].

Vitaminy jsou organické nízkomolekulární sloučeniny syntetizované autotrofními organismy. Heterotrofní organismy je syntetizují jen v omezené míře (např. niacin si člověk dokáže syntetizovat z tryptofanu) a získávají je jako exogenní látky především potravou a některé z nich prostřednictvím střevní (intestinální) mikroflóry. V určitém minimálním množství jsou vitaminy nezbytné pro látkovou přeměnu a regulaci metabolismu člověka. Nejsou zdrojem energie, ani stavebním materiálem, ale vesměs jsou součástí katalyzátorů biochemických reakcí [3]. Právě do skupiny vitaminů se řadí předmět předkládané bakalářské práce - vitamin C, který ve výživě člověka hraje velmi důležitou roli. Vzhledem k tomu, že si jej člověk nedokáže vytvořit sám, je nutný exogenní příjem, ať už z potravin nebo nápojů. Cílem předkládané bakalářské práce je provedení literárního výzkumu stanovení vitaminu C pomocí HPLC v potravinách z důrazem na nápoje. Proto je práce doplněna průzkumem trhu nápojů vitaminem C obohacených.

## I. TEORETICKÁ ČÁST



## 1 CHARAKTERISTIKA VITAMINU C

Vitaminy mají různou chemickou strukturu. Nejběžnější hledisko třídění vitaminů je podle společných fyzikálních vlastností, rozpustnosti ve vodě (vitaminy hydrofilní) a v tucích (vitaminy lipofilní). Vitamin C řadíme mezi vitaminy hydrofilní. Funkce hydrofilních vitaminů spočívá v katalytickém účinku, neboť se vesměs uplatňují jako kofaktory různých enzymů v metabolismu nukleových kyselin, bílkovin, sacharidů, tuků a dalších látek. Potřeba většiny vitaminů je poměrně nízká. Množství potřebné k zajištění normálních fyziologických funkcí člověka je však závislé na mnoha faktorech jako je stáří, pohlaví, zdravotní stav, životní styl, stravovací zvyklosti, pracovní aktivita apod.

Ve vodě rozpustné vitaminy nejsou zpravidla v organismu skladovány vůbec nebo jen omezeně a jejich přebytek je vylučován močí. Při nedostatku vitaminu C dochází k hypovitaminose nebo až k avitaminose (přechodný úplný nedostatek vitaminu projevující se poruchou některých biochemických procesů), naopak při nadbytku hypervitaminose [3]. Oba tyto stavy nastávají při nevhodném stravování a jsou rozebrány dále.

### 1.1 Chemické vlastnosti vitaminu C

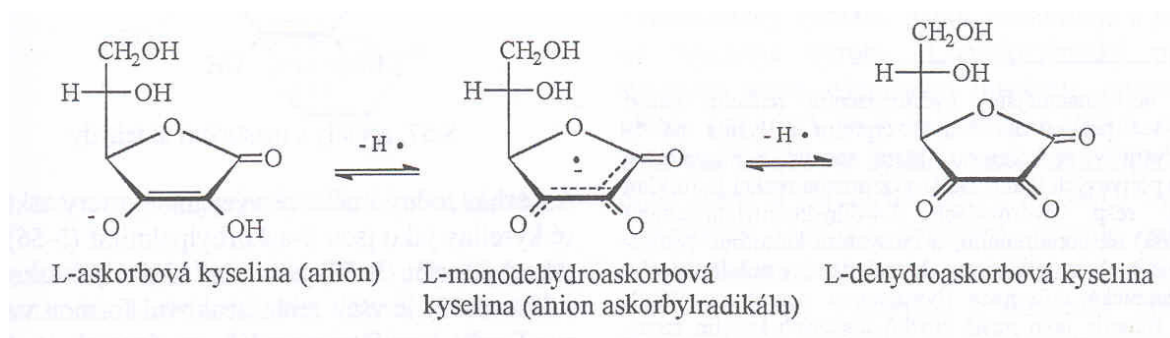
Názvem vitamin C se označuje nejen L-askorbová kyselina, ale také celý reversibilní redoxní systém. Ten zahrnuje L-askorbovou kyselinu, produkt její jednoelektronové oxidace, který se nazývá L-askorbylradikálem nebo také L-monodehydroaskorbovou kyselinou a produkt dvouelektronové oxidace, tj. L-dehydroaskorbovou kyselinu (Obr.1). Vitamin C zařazujeme do skupiny hydrofilních vitaminů. Tvoří bezbarvé až světle žluté krystalky kyselé chuti, bez zápachu, dobře rozpustné ve vodě (cca 30g ve 100ml), mírně rozpustné v ethanolu a téměř nerozpustné v etheru a petroletheru, chloroformu, olejích a tucích [3].

Je velmi labilní látkou, štěpí se v závislosti na pH prostředí v principu dvěma způsoby. V alkalických vodných roztocích vznikají především kyseliny, respektive soli, reduktony v neutrálním a především v kyselém prostředí se pak tvoří různé deriváty furanu. Jako hlavní produkty degradace v alkalickém prostředí vznikají kyselina šťavelová a L-threonová. Reakce je katalyzována hydroxylovými ionty a za anaerobních podmínek v neutrálním prostředí již neproběhne kvantitativně. V neutrálním a kyselém prostředí byl jako degradační produkt identifikován redukton C a B, L-xyloson, lyxonová kyselina, xylonová a

mnoho dalších produktů. Jako hlavní produkt vzniká 2-furaldehyd. Probíhá-li reakce za přítomnosti kyslíku, oxiduje se kyselina askorbová na kyselinu dehydroaskorbovou a přes 2,3-dioxogulonovou kyselinu vzniká opět L-xyloson [4].

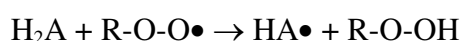
Na vzduchu je vitamin C stálý, je-li chráněn před vlhkostí, ale je termolabilní (tepelně nestálý). Ze čtyř možných stereoisomerů (asymetrický uhlík C-4 a C-5) vykazuje aktivitu vitaminu C pouze L-askorbová kyselina ( $\gamma$ -lakton L-threo-2-hexenonové kyseliny). Její isomer D-askorbová kyselina a druhý pár enantiomerů, tj. L- a D-isoaskorbová kyselina aktivitu vitaminu C prakticky nevykazují [3].

**Obrázek 1 Chemické vzorce forem vitaminu C**



Oxidace kyseliny askorbové bývá zpravidla autooxidace vzdušným kyslíkem v přítomnosti i nepřítomnosti přechodným kovů. Aktivní jsou hlavně  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ . Reakce závisí na hodnotě pH prostředí. V kyselém prostředí je pomalá, rychlejší je v neutrálním a nejrychlejší v alkalickém prostředí.

Askorbová kyselina i její isomery a deriváty mohou reagovat s volnými radikály, které způsobují oxidaci lipidů a dalších oxylabilních složek potravin. Brzdí tak řetězovou autooxidační reakci a účinně působí jako antioxidanty. Reakci askorbové kyseliny s peroxylovým radikálem mastné kyseliny ( $\text{R-O-O}\cdot$ ), popřípadě s alkoxylovým radikálem ( $\text{RO}\cdot$ ) lze schematicky znázornit následující rovnicí:



Reakcí vzniká askorbylradikál a hydroperoxid mastné kyseliny. Vzniklý askorbylradikál již není schopen vyvolat další řetězovou reakci a disproportionuje na askorbovou a dehydroaskorbovou kyselinu. Askorbová kyselina je obecně účinnějším antioxidantem,

použije-li se v kombinaci s tokoferoly. Podobně reaguje také s toxickými formami kyslíku jako je hydroxylový radikál ( $\text{HO}\bullet$ ) nebo aniont superoxidového radikálu a singletový kyslík. Všechny tyto reakce zpomalují oxidaci lipidů [5].

## 1.2 Působení vitamínu C v organismu

Vitamin C je vitamínem pouze pro člověka a několik dalších živočichů. Patří k nejčastěji užívaným vitamínům. Po požití je vstřebáván do krve, kde se mění ve svou aktivní formu. V té ho pak využívají téměř všechny buňky těla. Lidský organismus má tendenci s ním plýtvat. Je to tím, že nadměrnou nabídku nedokáže uskladnit a schovat na „horší časy“ [6].

Většinu lidí je známý jeho preventivní účinek proti nachlazení a chřipce. Vitamín C má i dalších velmi důležitých funkcí pro organismus. Jeho účinky by měli především ocenit lidé z velkoměst, kuřáci, alkoholici, starší lidé a ženy užívající hormonální antikoncepci. Při časté konzumaci alkoholu dochází ke zvýšené spotřebě tohoto vitamínu, a to v důsledku jeho potřeby pro vyloučení alkoholu z krve. Ke zvýšení spotřeby dochází i u kuřáků, protože vitamin C spolu se selenem neutralizuje jedy vdechované cigaretami [7]. Vitamín C pomáhá chránit funkci vitamínu E. Kuřáci s dostatečným přísunem vitamínu C mají podle některých lékařů téměř stejnou hladinu antioxidantů v těle jako nekuřáci. Pravidelný příjem vitamínu C může snížit riziko vzniku rakoviny u kuřáků [8]. Při užívání hormonální antikoncepce dochází k vyšší potřebě kvůli udržení hladiny cholesterolu v normě [7].

Velkou měrou přispívá k regeneraci organismu. Hojí popáleniny a krvácející dásně, urychluje hojení ran po operacích a tvoření jizev, podporuje snížení hladiny cholesterolu a krevního tlaku. Podílí se na odbourávání cholesterolu v játrech, čímž předchází ateroskleróze (ukládání cholesterolu a tuků do stěny cév s jejich následným kornatěním a ucpáváním). Zlepšuje vstřebávání železa. Dále je důležitý pro tvorbu kolagenu, který je hlavní složkou organické matrice v kostech. Je nejvýznamnějším kofaktorem jeho syntézy, přičemž v současné době ještě nelze stanovit doporučení pro vitamin C z hlediska prevence osteoporózy, ale rozhodně je třeba dbát na přiměřený přívod. Za dostatečné se považují obvyklé DDD pro prevenci (75 – 150 mg) [9]. Působí preventivně proti vzniku vrásek, rozšířených žilek a křečových žil. Napomáhá k produkci protistresových hormonů. Působí jako přírodní projímadlo (laxativum). Snižuje četnost tvorby krevních sraženin [7].

Je důležitý pro správnou funkci všech buněk lidského těla, podílí se na tvorbě mezibuněčné hmoty. Je nezbytný pro správnou stavbu kostí, cév, svalů, šlach, kůže, dásní a zubů, a hraje důležitou roli při jejich obnově nebo léčení. V neposlední řadě váže těžké kovy, například olovo [9]. V organismu jeho spotřeba stoupá hlavně při stresových situacích. Někteří lékaři ho doporučují jako preventivní prostředek při SIDS (Syndrom náhlého úmrtí kojenců). Vitamín C se při nadbytku vylučuje močí a musí se průběžně doplňovat. Jeho zásoba v organismu vydrží přibližně 2-6 týdnů [8].

Dále chrání oční čočku proti fotooxidačním účinkům a tak brání vzniku tzv. katarakty neboli šedého zákalu. Je prevencí vzniku únavy a zvyšuje bdělost. Vitamin C má v těle mnoho dalších funkcí, které z něj dělají esenciální vitamin s účinky protibolestivými, protinádorovými, protikurdějovými, protistresovými, hojivými, protiinfekčními, proti únavě atd. [10].

Aby vitamin C mohl efektivně zastávat všechny funkce v organismu, je nutné jeho správné vstřebávání a také vylučování, protože i jeho nesprávný průběh tohoto procesu může způsobit potíže. Jak kyselina askorbová, tak kyselina dehydroaskorbová jsou transportovány přes buněčné membrány. U nízkých koncentrací kyseliny askorbové převládá aktivní transport, zatímco u vysokých koncentrací se vyskytuje difúze. Ve většině případů je transport v lidských a zvířecích tkáních závislý na sodíku a vyžaduje metabolickou energii, při poměru sodíku a energie 1:1 nebo 2:1. Účinek různých potravin na biologickou využitelnost kyseliny askorbové zatím není z velké části znám. Střevní absorpce a vstup kyseliny askorbové do buněk může být usnadněn její přeměnou na kyselinu dehydroaskorbovou, která proniká lépe než redukováná forma při fyziologickém pH. Specifický transport v buňkách tkání dovoluje vstup široké variantě rozmezí koncentrací kyseliny askorbové. Vysokou hladinu vitaminu C lze nalézt v hypofýze, nadledvinách, leukocytech, oční čočce či mozku, nízká hladina je zastoupena v plasmě a slinách. V nízkých dávkách (<30 mg /den) je kyselina askorbová absorbována téměř úplně, 70 – 90 % obvyklého denního příjmu je absorbován. Zbytek po absorpci obíhá volně v plasmě, leukocytech a červených krvinkách a vstupuje do všech tkání, s maximální koncentrací 68-86  $\mu\text{mol/l}$ , které bývá dosaženo po ústním příjmu 90-150 mg/den. Nadbytek vitaminu C je vylučován ledvinami, které uchovávají tento vitamin na hladině 46-96  $\mu\text{mol/l}$  pomocí reabsorpčního procesu, závislého na sodíku.

Uvnitř buněk a v plasmě existuje vitamin C převážně ve volné formě jako monoaniont. Dehydroaskorbová kyselina je buď nezjistitelná, anebo ji lze nalézt pouze v malém množství v oběhu zdravého člověka. Redukce kyseliny dehydroaskorbové uvnitř buněk je zprostředkována dvěma hlavními cestami – chemickou redukcí pomocí glutathionu a enzymatickou redukcí [11].

### 1.3 Doporučené denní dávky vitaminu C

Denní potřeba vitamínu C v ČR se odhaduje na 60 mg, doporučená je 80 mg na den. Jako fyziologicky optimální dávka se uvádí 200 mg/den. Jeho potřeba stoupá při kouření, a to o 50 až 100 %, při chladu, stresu, infekci, úrazech, fyzické námaze a nádorech, operaci, u žen a dívek užívajících orální antikoncepci se potřeba zvyšuje o 100 % , v těhotenství asi o 30 %, při kojení asi o 60 % (80 – 120 mg), při dlouhodobém užívání kyseliny acetylsalicylové (aspirinu, acylpyrinu, anopyrinu), krátkodobé zvýšení denní dávky na 500 mg je vhodné například při nachlazení, větší tělesné námaze či stresu [8]. Doporučené denní dávky pro jednotlivé skupiny obyvatel jsou uvedeny v tabulce (Tab.1).

**Tabulka 1 Doporučené denní dávky pro jednotlivé skupiny obyvatelstva [12]**

Skupina	Podskupina	Výživová doporučená dávka [mg]
kojenci	0-6 měsíců	50
	7-12 měsíců	50
děti ve věku 1-3 let		50
děti ve věku 4-6 let		55
děti školního věku	7-10 let	60
	11-14 let (chlapci)	80
	11-14 let (dívky)	80
dospívající chlapci 15-18 let	studující	100
	fyzicky pracující	110
dospívající dívky 15-18 let	studující	90
	fyzicky pracující	100
pracující ženy 19-34 let	lehká práce	75
	střední práce	75
	namáhavá práce	90
ženy těhotné od II. trimestru		120

**Pokračování tabulky 1 Doporučené denní dávky pro jednotlivé skupiny obyvatelstva [12]**

ženy kojící		130
pracující ženy 35-54 let	lehká práce	75
	střední práce	75
	namáhavá práce	90
nepracující ženy	55-74 let	75
	75 a více let	75
pracující muži 19-34 let	lehká práce	75
	střední práce	90
	namáhavá práce	100
pracující muži 35-59 let	lehká práce	75
	střední práce	90
	namáhavá práce	100
nepracující muži	60-74 let	75
	75 a více let	75

### 1.3.1 Hypovitaminosa a avitaminosa

Nedostatek vitamínu C se projeví kurdějemí (skorbutem), což je onemocnění způsobující krvácivostí dásní, vypadáváním zubů a celkovou náchylností k ostatním onemocněním. Široké množství příznaků a symptomů skorbutu může znamenat poruchy v rozmanitých metabolických systémech, ve kterých vitamin C figuruje. Zahrnuje se tvorba kolagenu, metabolismus steroidů a peptidů, endokrinní funkce, imunitní systém, kontrola vysokého tlaku, rovnováha mědi a železa a proces rozkladu mitochondriálních mastných kyselin. S nízkým příjmem vitamínu C se spojuje rostoucí riziko vzniku chronických onemocnění – rakoviny či onemocnění srdce [7].

Následky nedostatku vitamínu C byly pozorovány už na kosterních nálezech z doby kamenné a bronzové. V našich zeměpisných šířkách lidé trpí hlavně částečným nedostatkem tohoto vitamínu [8]. Další z příčin vzniku hypovitaminosy může být nevhodná technologická příprava stravy ničící vitamin, který zde původně byl přítomen. Ke vzniku

hypovitaminosy přispívá i nadměrný příjem dusičnanů stravou. Vitamin C sice účinně blokuje přeměnu  $\text{NO}_3^-$  na  $\text{NO}_2^-$ , sníží se tím však množství jeho biologicky účinné formy [13].

Kritický pro vznik viditelných obtíží je příjem nižší než 10 mg denně. Projevy zahrnují únavu, podrážděnost a sklon k infekcím. Při hlubším nedostatku vitamínu C pak mohou nastat krevní výrony, chudokrevnost, bolesti při krvácení do podkoží, svalů a kloubů [8]. Příčinou vzniku onemocnění může být dlouhodobá konzumace stravy bez čerstvého ovoce a zeleniny. V takové stravě chybí kromě vitamínu C i některé jiné výživové faktory, jako je kyselina listová, železo, provitamin A a další. Z uvedeného důvodu sice podávání syntetického vitamínu C zmírní nejhorší příznaky avitaminosy, nevede však k úplnému vyléčení. K tomu je třeba podávat čerstvé ovoce a zeleninu.

### 1.3.2 Hypervitaminosa

Nadměrný příjem vitamínu C pak způsobuje zvýšení hladiny kyseliny močové a šťavelové v moči, snižuje hladinu cukrů v krvi a způsobuje nadměrné vstřebávání železa. Dávka vyšší než 4 g denně může zvýšit výskyt oxalátových ledvinných kamenů. Vysoké dávky tohoto vitamínu také zvyšují vstřebávání rtuti a zatěžují játra [8]. Dalším nežádoucím účinkem je vymývání vitamínu  $\text{B}_{12}$  a  $\text{B}_9$  [14].

## 1.4 Zdroje vitamínu C

Vitamin C se vyskytuje zejména v ovoci a zelenině. Hlavními zdroji jsou citrusové plody, černý rybíz, paprika, jahody, rajčata, brokolice, brambory, zelená listová zelenina (zelí, kapusta) či bobulovité plody. Vysoký obsah vitamínu C obsahují brusinky. Množství vitamínu C kolísá v závislosti na odrůdě, klimatu, způsobu sklizně, skladování a zpracování potravin. Ze živočišných zdrojů obsahují vitamín C především játra a ledviny, ale jeho množství je v zde ve srovnání s rostlinnými zdroji velice malé. Další potraviny jako maso, mléko nebo vejce, mají jako zdroj vitamínu téměř zanedbatelný význam. Obsah vitamínu C ve vybraném ovoci a zelenině je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2 Obsah vitamínu C ve 100 g u některých potravin [15]

<i>Potravina</i>	<i>Obsah vitamínu C [mg]</i>
křen	67,1
paprika	65,6
kiwi	63,9
rybíz černý	59,6
jahody	34,0
grapefruit	24,3
citrony	23,2
květák	22
rajčata	19,9
meruňky	19,4
rybíz červený	19,4
brambory rané	10,6
zelí bílé	7,8
kapusta mražená	4,5
jablka	3,8
brambory pozdní	3,5
kapusta růžičková	3,3
hrušky	2,4

### 1.5 Stabilita vitamínu C

Vitamin C je jedním z nejméně stabilních vitaminů. Ke ztrátám při skladování, kulinárním a průmyslovém zpracování dochází různými způsoby. Nejvýznamnější jsou ztráty výluhem a oxidací. Celkové ztráty se pohybují zpravidla mezi 20 až 80%. Shrneme-li vliv podmínek na změny vitamínu C, pak je nutno konstatovat, že povaha a rozsah jeho ztrát K značnému úbytku dochází rovněž loupáním plodů, kdy se odstraňují povrchové vrstvy bohaté na vitamin. Při mytí jsou ztráty nižší než při blanšírování a vaření. Ke ztrátám vitamínu dochází také při mléčném kvašení zeleniny. Kysané zelí např. obsahuje asi 50 % vitamínu ve srovnání s čerstvým hlávkovým zelím (90-190 mg.kg<sup>-1</sup>). Snahou konzervářů je pochopitelně uchování maximálního množství vitamínu v ovoci a zelenině během skladování a



v příslušných výrobcích po jejich zpracování. Používané metody a postupy jsou založeny na omezení kontaktu se vzduchem, snížení množství přítomných iontů  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  a vytváření nepříznivých podmínek pro vznik komplexů kovových iontů s kyselinou askorbovou.

Během zpracování je stabilita vitamínu vyšší u ovoce, které má nižší pH než zelenina. Nejmenší ztráty se dosahují aplikací vysokoteplotní krátkodobé sterilace. U kompotů dochází k největším ztrátám během jejich skladování. Výše těchto ztrát je závislá na době a teplotě skladování a pohybuje se v rozmezí 10-50 %. Průměrná retence u obohacených ovocných šťáv se pohybuje v rozmezí 60-80 %.

U ovoce ošetřeného (konzervovaného) oxidem siřičitým jsou ztráty vitamínu během technologického zpracování nižší, neboť přítomný oxid siřičitý redukuje peroxid vodíku vznikající oxidací vitamínu C v přítomnosti těžkých kovů. Nejstabilnější je vitamin C při zmrazování a mrazírenském skladování ovoce a zeleniny. Při teplotách  $-18^{\circ}\text{C}$  dochází jen k minimálním ztrátám, naopak ke značným ztrátám může doházet při rozmrazování.

Ztráty při skladování syrového mléka jsou značné. Při chladírenském skladování činí asi 50 % a se zvyšující se teplotou rostou. Při tepelném ošetření mléka klesá obsah v závislosti na teplotě a době záhřevu o 20-50 %. Relativně dobrá je stabilita vitamínu u sušeného, vitaminem obohaceného mléka baleného v inertní atmosféře [3].

## 1.6 Využití vitamínu C v potravinářství

Vitamin C se podle Vyhlášky Ministerstva zdravotnictví č. 298/1997 Sb. řadí mezi látky přídatné, které se smějí vyskytovat v potravinách s uvedením jejich kódu, pod kterým je přídatná látka označována v číselném systému Evropské unie [16]. Kód vitamínu C je E 300. Látky používané k výrobě potravin jako přídatné látky musí odpovídat požadavkům na identitu a čistotu. Podle účelu použití jej v látkách přídatných zařazujeme do skupiny antioxidantů. Jedná se o látky, které prodlužují údržnost potravin a chrání je proti zkáze způsobené oxidací, jejímiž projevy jsou např. žluknutí tuků a barevné změny potravin. Vitamin C jako přídatná látka samozřejmě nesmí obsahovat mikroorganismy a mikrobiální metabolity, působící onemocnění z potravin, v množství přesahujícím nejvyšší mezní hodnoty stanovené zvláštním předpisem. Jeho přítomnost v potravině musí být uvedena na obalu. Přítomnost látek přídatných se označuje uvedením názvu látky nebo číselného kódu a pokud je to v této vyhlášce stanoveno i jejího množství a údajů o možnostech nepříznivého

ovlivnění zdraví lidí. Požadavky na čistotu u vitamínu C jsou sulfátový popel ne více než 0,1 %, pH 2 % vodného roztoku 2,4 až 2,8, arzén ne více než 3 mg/kg, olovo ne více než 5 mg/kg, rtuť ne více než 1 mg/kg a těžké kovy (jako olovo) ne více než 10 mg/kg [17].

Askorbová kyselina má díky svým vlastnostem vitamínu, antioxidantu a cheletačního činidla široké použití jako potravinářské aditivum především v konzervářské a kvasné technologii a v technologii masa, tuků a v cereální technologii. Jako antioxidant se používá také ve vodě rozpustná sůl askorbát sodný a lipofilní 6-palmitoyl-L-askorbová kyselina, která současně zodpovídá za inhibici tvorby nitrosaminů v nakládaném masu a v masných výrobcích. Zabraňuje přeměně dusičnanů obsažených v zelenině, vodě či uzeninách, na nebezpečné nitrosaminy, způsobující rakovinu. Pro inhibici tvorby nitrosaminů se přidává 300-1000 mg. kg<sup>-1</sup> hydrofilního askorbátu či lipofilního askorbylpalmitátu.

Do tuků se přidává jako antioxidant askorbylpalmitát, a to v množství 0,006-0,04%. Přídavek askorbové kyseliny (respektive askorbátu nebo askorbylpalmitátu) k masu a masným výrobkům spolu s dusitany v množství 60-180 mg.kg<sup>-1</sup>, např. při výrobě šunky, má funkční i ekonomický význam, neboť zkvalitňuje a podstatně urychluje výrobu. Přídavek askorbové kyseliny umožňuje zkrátit dobu uzení a stabilizuje barvu hotových výrobků. Například do zmražených broskví se přidává, aby se předešlo ztrátě zbarvení plodu. Současně zvyšuje inhibiční účinek dusitanů na toxinogenní bakterie *Clostridium botulinum*. Přídavek askorbové kyseliny v množství 20-30 mg.kg<sup>-1</sup> je prevencí tvorby tzv. chladových a oxidačních zákalů piva a prevencí nežádoucích změn chuti a aroma v důsledku oxidace, ke které dochází při pasteraci a skladování. Použití askorbové kyseliny při výrobě vína umožňuje snížení množství použitého oxidu siřičitého k sření. Kyselina askorbová se také přidává jako prostředek zlepšující pekařské vlastnosti [3].

## 2 NÁPOJE V TRŽNÍ SÍTI OBSAHUJÍCÍ VITAMIN C

Běžně se v potravinářství používá obohacování (fortifikace) vitamínem C u potravin a nápojů, které tento vitamín původně neobsahují a jeho obsah je zde žádoucí. Vzhledem k jeho lability dochází v nápojích vyráběných z přírodních zdrojů k vysokým ztrátám.

**Tabulka 3 Obsah vitamínu C v nápojích (volně dostupné v prodejnách)**

	Název nápoje	Objem nápoje [l]	Obsah vitamínu C [mg/l]
Nápoje v tekutém stavu	Big Energy Shock	0,5	200
	Cappy Icefruit Orange and grapefruit	0,5	45
	Cappy Icefruit Apple and pear	0,5	45
	Cappy Multivitamin	1	150
	Dobrá voda Multivitamin	1	9
	Figo Multivitamin	0,3	30
	Figo Tropic	0,3	30
	Figo Pomeranč a mandarinka	0,3	30
	Hello Kiwi	0,7	500
	Kubík Play! Mrkev-červený grapefruit	0,4	75
	Pfanner Multivitamins Red fruits	1	90
	Relax Černý rybíz	1	100
	Semtex	0,25	100
	Název nápoje	Obsah nápoje [g]	Obsah vitamínu C [mg/100 g]
Instantní nápoje	Instant Tea Multivitamin	200	12
	Nesquik Plus, Vitamins & Minerals	200	86
	Boncao, směs kakaa s cukrem	250	5
	Tang pomeranč-jahoda-banán	100	150
Čaje	Fruite Exotic Multivitamin	250	12
	Jemča - citron se zázvorem	100	1500

Nápoje, kde výrobce deklaruje jeho obsah, jsou jím fortifikovány. Vysoké dávky vitamínu C se aplikují kvůli antioxidační funkci a zároveň je splněna i funkce nutriční. Do skupiny obohacovaných nápojů patří např. jablečné a grepové džusy. Cereálie určené ke konzumaci bývají ochucovány vitamínem C. Obohacené cereálie obvykle obsahují nejméně 25% doporučené denní dávky vitamínu C.

Vitamínem C se dnes také obohacují i nápoje určené pro děti. Firma Hamé vyrábí přírodní ovocné nápoje, 100% šťávu z jablek a dalšího ovoce. Kromě tohoto vitamínu se do takových nápojů nepřidává žádný cukr (obsahují pouze přírodní ovocné cukry), konzervační chemické přísady, barviva ani ochucovadla [18].

Při literárním průzkumu byla nalezena metoda HPLC s UV detekcí, která v současné době umožňuje stanovení kyseliny askorbové a kyseliny isoaskorbové ve fortifikovaných potravinách. Metoda je založena na kyselé extrakci AA v přítomnosti redukčního činidla tris [2-karboxyethyl] fosfinu (TCEP), který udržuje AA v redukované formě. Separace se provádí na koloně C<sub>18</sub>, jako eluent je použit octan sodný (pH=5,4) obsahující TCEP a decylamin jako iontově párové činidlo. Limit detekce u této metody je 0,1mg/100g [19].

V rámci bakalářské práce byl proveden průzkum v tržní síti s cílem shromáždit nabídku nápojů vitamín C obsahujících. Několik takovýchto nápojů je uvedeno v tabulce (Tab. 3).

### 3 METODY STANOVENÍ VITAMINU C

Metod stanovení vitamínu C je více. Rychlou a jednoduchou metodou je titrace kyseliny L-askorbové 2,6-dichlorfenolindofenolem v kyselém prostředí s vizuální nebo potenciometrickou detekcí. Metoda je vhodná pro většinu potravinářských výrobků. Není však specifická a je rušena látkami obsahujícími thiolové skupiny a reduktony. Titrační metoda je vhodná především pro sledování úbytku kyseliny L-askorbové během technologického procesu [20]. Nevýhodou metody je nestálost odměrného roztoku činidla, který vyžaduje standardizaci před použitím. Metoda není také vhodná pro titrační stanovení barevných vzorků, kdy vzniká problém při určení barevné změny v bodě ekvivalence.

K enzymovému stanovení kyseliny L-askorbové se používá enzym peroxidáza z křenu. Uvádí se, že enzymová metoda stanovení je specifická, rychlá, spolehlivá, ekonomická, zahrnuje jednoduché postupy přepravy vzorku a analýzy, je bezpečná a pracuje s reagensy připravenými k přímému použití [15].

Pro stanovení vitamínu C v nápojích a potravinách existuje i přenosný coulometrický analyzátor C-Vit (výrobce firma 2 THETA), který je znázorněn na obrázku (Obr.2). Tento přístroj využívá principy průtokové elektrochemie, coulometrie a coulometrických titrací, přičemž měření je řízeno vlastním mikroprocesorem. Před měřením je nutná úprava vzorků. Při stanovení vitamínu C v nápojích a šťávách z ovoce a zeleniny předešlé úpravy nejsou nutné. Pokud vitamin C stanovujeme ve vzorku vody (pitné, povrchové, spodní a odpadní) není nutná předchozí úprava. Meze stanovitelnosti se pohybují od 10 µg/l. Výhodou tohoto přístroje je možnost přenosu přístroje pro rychlou analýzu v terénu. Úprava vzorku, obsluha i dávkování jsou jednoduché. Přístroj bez problémů analyzuje i barevné vzorky [21].

Používá se také vysokoúčinná kapalinová chromatografie-HPLC. Jedná se o metodu široce využívanou pro analýzu velké škály složek potravin.

**Obrázek 2 Coulometrický analyzátor C-Vit**



## 4 HPLC-VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

HPLC patří k nejdůležitějším analytickým metodám a představuje nejvýznamnější pokrok analytické chemie ve 20. století. Jedná se o nejmodernější variantu kolonové kapalinové chromatografie, pro niž se dnes vyrábějí speciální automatické vysokotlaké chromatografy s krátkými kolonami plněnými speciálními jemnými stejnoměrnými sorbenty s chemicky upraveným povrchem. Takové uspořádání umožní dosáhnout vysoké frakcionační kapacity a účinnosti dělení i u velmi složitých směsí látek, které bychom jinak obtížně dělili pomocí jiných metod. Jedná se o směsi vysokomolekulárních organických látek včetně biochemicky a farmaceuticky významných polymerů, ale i látky iontového charakteru, např. anorganické látky [22].

V 70. letech minulého století došlo k prudkému rozvoji této technologie. Zdokonalily se detektory a kolony. Nové přístroje byly již schopné dosáhnout vysokých tlaků [23].

Rozsah použitelnosti HPLC s ohledem na chemickou povahu dělitelných látek je mimořádný. Lze analyzovat ionty, látky polární i nepolární, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární (cca 80% veškerých známých látek je možné analyzovat touto metodou). Metody HPLC se díky možnosti nasazení prakticky všech separačních chromatografických mechanismů a rychlému získání chromatogramu rázem dostaly do čela moderních technik pro kvalitativní i kvantitativní analýzu složitých směsí. Zvýšením průtoku mobilní fáze pomocí přetlakových systémů bylo dosaženo podstatného zkrácení doby analýzy. Byly vyvinuty nové detektory, které odpovídají požadavkům rychlé a citlivé detekce. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie doplňuje aplikační možnosti plynové chromatografie zejména v oblasti látek netěkavých nebo nestálých za vyšší teploty [22]. Nevýhodou ve srovnání s plynovou chromatografií je, že HPLC má náročnější instrumentaci a složitější mechanismus separace. Srovnání s některými dalšími separačními metodami je zaznačeno v tabulce 4.

Mezi základní požadavky na HPLC patří kolony plněné velmi jemnými částicemi sorbetu a vysoké průtoky mobilní fáze, kdy řešením je použití vysokotlakých čerpadel, kontinuálních detektorů, dávkovacích systému či nových druhů chromatografických sorbetů. Mimoto je HPLC rychlá, účinná, automatizovatelná, snadno lze kvantifikovat a reprodukovat výsledky.

Tabulka 4 Rozsah použitelnosti ve srovnání s ostatními separačními metodami [20]

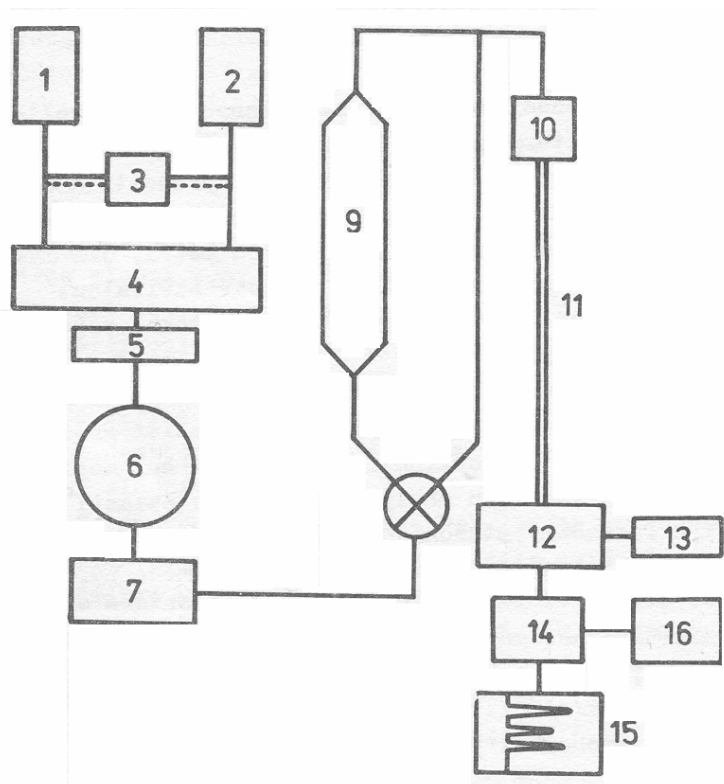
Metoda	Přibližný rozsah molekulových hmotností analytů $M_r$	Analyzované látky
HPLC	3-10 <sup>6</sup>	ionty, látky polární i nepolární, nízkomolekulární i polymery
GC	1-400	plyny, látky těkavé a teplotně stabilní, po derivatizaci a netěkavé, po pyrolýze i makromolekulární
PC a TLC	100-2000	ionty, látky polární i nepolární

Při srovnání metody HPLC (UV detekce) a spektrofluorimetrie analýzou vitamínu C v zelených fazolích HPLC vykázala vyšší citlivost, zatímco spektrofluorimetrie větší přesnost. Obě metody byly pro danou analýzu přiměřené, proto je při výběru třeba zohlednit přesné požadavky analýzy. Spektrofluorimetrii lze preferovat, pokud se zaměřujeme na obsah vitamínu C, ale je méně vhodná pro analýzy jednotlivých forem vitamínu C. HPLC (s použitým UV – detektorem) je vhodnější pro zaměření na jednotlivé formy a pro zjišťování stupně rozkladu zeleninových produktů [24].

#### 4.1 Sestava zařízení HPLC

Zařízení pro chromatografii obsahuje rezervoár mobilní fáze, programování gradientu, směšovač, odplynovač neboli degasér, vysokotlaké čerpadlo, tlumič tlakových pulsů, trojcestný ventil, saturační předkolonu, dávkovač vzorku, kolonu s chromatografickým materiálem, detektor, jímač frakcí, zesilovač, zapisovač a integrátor. Blokové schéma moderního kapalinového chromatografu (Obr.3) může mít řadu obměn, v zásadě však musí být zachováno zařazení základních elementů za sebou, i když je možno mnohé při speciálních pracech buď vynechat nebo naopak zapojit. Ze zásobníků mobilní fáze je buď (při isokratické eluci) vedena mobilní fáze z jednoho ze zásobníků do vysokotlakého čerpadla, anebo při gradientové eluci se převáděné proudy z obou zásobníků mísí dle programu ve směšovači a jsou vedeny do vysokotlakého čerpadla [25].

Obrázek 3 Schéma HPLC



1. Zásobník mobilní fáze
2. Zásobník mobilní fáze
3. Programování gradientu
4. Směšovač
5. Odplynovač
6. Vysokotlaké čerpadlo
7. Tlumič tlakových pulsů
8. Trojcestný ventil
9. Saturační předkolona
10. Dávkovací zařízení
11. Kolona
12. Detektor



13. Jímač frakcí

14. Zesilovač

15. Zapisovač

16. Integrátor

Podle druhu čerpadla je zařazen do toku mobilní fáze tlumič tlakových rázů a přes něho je mobilní fáze vedena přes dávkovací zařízení do chromatografické kolony.

Kolona je spojena přímo s detektorem, z něhož může být výstup do sběrače frakcí. Z detektoru jde signál přes zesilovač do zapisovače, eventuálně i integrátoru. Zásobníky mobilní fáze jsou skleněné nádoby. Většina rozpouštědel používaných jako mobilní fáze jsou látky hořlavé, vesměs značně těkavé, jejichž páry se vzduchem tvoří výbušnou směs. Zásobníky fáze musí být dobře uzavřeny, avšak tak, aby kapalina v nich mohla dobře odtékat a její páry neunikaly do okolní atmosféry. Spojení zásobníků mobilní fáze s odplynovačem, směšovačem a vysokotlakým čerpadlem může být zhotoveno jak z plastické hmoty jako je teflon, tak i z trubiček z nerezové oceli. Antikoroze celého systému je samozřejmostí. Vysokotlaká čerpadla vyvíjejí tlak 1-60 MPa. Průtok je měnitelný v rozhraní 0,2-10 ml/min s přesností nastavení průtoku do 5%. Možnost tvorby gradientu podle předem zvolené závislosti je bezpodmínečně nutná [25].

Mobilní fáze může být jednosložková či vícesložková (izokratická nebo gradientová eluce). Při gradientové eluci dochází ke změně poměru složek mobilní fáze, což umožňuje zkrácení času analýzy, zlepšení rozdělení složitějších směsí a zvýšení citlivosti.

#### 4.1.1 Druhy kolon

Obecně rozlišujeme tyto typy kolon:

*Analytické kolony* mají průměr okolo 4 mm, délku 30, 100 nebo 250 mm. Jsou vyrobeny z nerezavějící oceli. Částice plniva mají průměru 3 – 10  $\mu\text{m}$ , většinou se jedná o anorganickou matici – silikafel, na němž jsou zakotvené různé stacionární fáze - tzv. sekcionované kolony (pro dělení složitých směsí látek).

*Preparativní kolony* mají větší průměr, délku a také objem naneseného vzorku. Jsou navrženy pro dělení většího množství látek, řádově miligramů až desítek miligramů.

*Kapilární kolony* jsou tvořeny kovovou nebo skleněnou kapilárou o vnitřním průměru 0,2 až 0,5 mm. Kapalná fáze vytvoří na vnitřních stěnách kapiláry rovnoměrný tenký film. Pracovní podmínky se volí tak, aby proudění bylo laminární. Kapilární kolony se vyznačují velkou dělicí účinností. Na její účinnost má vliv poloměr a rozdělovací koeficient.

V posledních letech je patrná silná tendence ke zmenšování rozměrů částic sorbentů. Tento fakt je spojen s trendem zkracování chromatografických kolon. Výsledkem je podstatné zkrácení dob analýz bez ztráty účinnosti ve srovnání se separacemi provedenými na kolonách tradiční délky (10 cm) plněných 5  $\mu\text{m}$  sorbentem. Vedle zkracování kolon dochází postupně také ke zmenšování jejich vnitřního průměru. Tradiční průměr analytických kolon 4,6 mm je postupně opouštěn a nahrazován dnes již běžnějšími průměry kolon 3-4 mm. Tento trend souvisí nejen se snahou o zrychlení analýz, ale také s úsilím o zlepšení ekonomiky provozu (nižší spotřeba mobilních fází) [26].

Chromatografická kolona je v podstatě trubice nebo kapilára rovnoměrně naplněná nebo pokrytá stacionární fází. Plášť kolony má za úkol udržet pohromadě stacionární fázi, přičemž musí být chemicky inertní, musí odolávat poměrně vysokým tlakům a vnitřní povrch pláště musí být dostatečně hladký. Nejpoužívanější materiál k výrobě kolon je nerezová ocel, plasty nebo sklo. Vlastní klasická HPLC kolona se skládá z kovového pláště, který je uzavřen porézní kovovou fritou, která zabraňuje uvolňování stacionární fáze z kolony a současně umožňuje plynulý průtok mobilní fáze. Oba konce kolony jsou ukončeny ochranným kroužkem a koncovou hlavicí, ve které je navrtán vstup pro kapiláru se šroubem [7].

Na trhu je dnes bohatý sortiment chromatografických kolon. Pro vitaminy rozpustné ve vodě se využívá např. kolon Discovery C18, C8, RP-Amide C16, SUPELCOSIL LC-8-DB či ABZ+Plus, které využívají techniky obrácené fáze.

#### **4.1.2 HPLC detektory**

Detektory slouží k indikaci látek vycházejících z chromatografické kolony. Zpravidla se od nich žádá, aby sledovaly koncentrace separovaných složek v eluátu. Detektor sleduje pomocí vhodného snímače některou z vlastností eluátu, signál se pro zesílení přivádí do zapisovače, jenž nám poskytuje záznam intenzity daného signálu na čase. V některých

speciálních případech může detektor poskytnout i některé konkrétní údaje o charakteru separované složky (celé UV spektrum, molekulovou hmotnost a další). K detekci separovaných látek se zpravidla využívá jejich určitých vlastností, jimiž se tyto látky liší od složek mobilní fáze.

Rozlišujeme detektory universální nebo selektivní. Požadavky kladené na dobrý detektor jsou linearita odezvy v co nejširším rozmezí koncentrací, dostatečně velký poměr mezi šumem a měřenou hodnotou, vysoká citlivost, malá citlivost na změny průtoku a tlaku, možnost využití gradientové eluce. Převážná většina detektorů poskytuje diferenciální záznam, z něhož se lépe určují retenční charakteristiky a současně připojený elektrický integrátor poskytuje integrální údaje nutné ke kvantitativnímu vyhodnocování chromatogramů.

Používají se různé typy detektorů. Jsou to např. UV/Vis, fluorescenční, radiochemické, elektrochemické, nukleárně magnetická resonance (NMR), refraktometrické, polarometrické a IR detektory.

*UV detektory* patří sice k selektivním, ale lze je využít ve více než 80% aplikací. Jsou vhodné pro svoji vysokou citlivost, velký rozsah linearity odezvy a též pro svoji selektivitu a možnost volby mobilní fáze v poměrně širokém výběru rozpouštědel. Na trhu jsou k dispozici i detektory, u nichž lze detegovat látku současně při řadě různých vlnových délek (diode array detector-DAD). Diode Array Detektor umožňuje simultánní měření celé oblasti a data jsou vytvářena okamžitě. Existuje zde možnost tvorby 3D chromatogramu [27]. Pro vyvolání celého spektra v jakémkoli okamžiku eluce je DAD vybaven účelovým minipočítačem. Citlivost UV detekce je velmi vysoká a záleží na molární adsorptivitě analyzované složky a na celkovém objemu celý detektoru. UV detektor patří mezi nejrozšířenější a nejcitlivější detektory, je selektivní pro řadu sloučenin, velmi dobře se hodí pro gradientovou eluci, neboť je k dispozici řada rozpouštědel od nepolárních k polárním, s jejichž kombinací lze gradient realizovat. Je všeobecně platnou zásadou, že použité rozpouštědlo nemá absorbovat při vlnové délce nastavené na detektoru. U dvoupaprskových UV detektorů, kde dochází ke kompenzaci, lze slabší absorpci rozpouštědla eliminovat, necháme-li protékat mobilní fázi referenční celou [5].

*Fluorescenční detektory* jsou vysoce selektivní, citlivé a poskytují odezvu pro látky vykazující fluorescenci. Měří schopnost absorbovat a vydávat světlo při určité vlnové délce.

Zdroj excitace prochází průtokovou celou do fotodetektoru, který měří vlnovou délku excitovaného světla.

*Refraktometrický detektor* umožňuje detekci v podstatě všech látek, vyznačuje se však nižší citlivostí a vyššími mezemi detekce než spektrofotometrické, fluorescenční či elektrochemické detektory. Při analýze refraktometry se měří celkový index lomu jak analyzované látky, tak i rozpouštědla tvořícího mobilní fázi. Detektor je tím citlivější, čím větší rozdíl je mezi indexem lomu látky a indexem lomu rozpouštědla. Další jeho nevýhodou je velká závislost měřeného indexu lomu na teplotě [27]. Používané detektory a jejich využití v závislosti na měřené veličině jsou uvedeny v tabulce (Tab.5).

**Tabulka 5** Přehled používaných typů detektorů [25]

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

#### 4.1.2.1 Pracovní techniky při vyhodnocování chromatogramů

Účelem zapojení detektorů do HPLC systému je rozpoznání analyzovaných látek a vytvoření záznamu o jejich přítomnosti v analytu. Tyto záznamy nazýváme chromatogramy, mají formu grafu tvořícího píky. K určení obsahu analyzovaných látek na základě změřených ploch nebo výšek píků jsou v chromatografii používány čtyři základní metody.

Nejjednodušší je metoda *vnitřní normalizace*. Při ní se provede jeden nástřik vzorku, vyhodnotí se všechny plochy nebo výšky píků a určí se relativní zastoupení všech složek ve směsi.

Nejběžnější metodou je *absolutní kalibrace*, která používá buď přímé srovnání, nebo kalibrační křivku.

Při metodě *vnitřní standardizace* se ke vzorku o určitém objemu přidá vnitřní standart (roztok látky, která není obsažena ve vzorku) o daném objemu a hmotnostní koncentraci. Po nástřiku se vyhodnotí plochy píku analytu a standardu a vypočte se hmotnostní koncentrace analytu. Tato metoda se často používá v případech, kdy analýze předchází úprava vzorku, např. při derivatizaci. Někdy bývá obtížné najít vhodný standart. Standart nesmí být přítomen ve vzorku, musí být dobře oddělen, nesmí integrovat s analytem.

Při metodě *standartního přídatku* se nejprve provede nástřik vzorku a vyhodnotí se plocha. Poté se k definovanému objemu vzorku přidá určitý objem standartního roztoku analytu s danou koncentrací. Provede se druhý nástřik a vyhodnotí příslušná plocha. Poté se vypočítá hmotnostní koncentrace vzorku [20].

## 4.2 Vliv podmínek na účinnost HPLC

Volba pracovních podmínek a jejich optimalizace zahrnuje obecně několik postupných kroků. V první řadě je důležitá volba chromatografického systému, poté určité kolony, vhodných pracovních podmínek. Eventuálně lze použít programové změny podmínek v průběhu eluce či změnit vhodný program. Přístup k volbě pracovní metody a podmínek závisí především na povaze separačního problému a dále možnostech pracovníků. Je třeba vzít v úvahu složitost vzorku, cíl separace, experimentální vybavení, zkušenosti s jednotlivými metodami, předběžné znalosti o charakteru vzorku a také ekonomické a hygienické aspekty.

Vzorek se někdy skládá z malého počtu složek, stačí oddělit a stanovit pouze jednu nebo některou ze složek složité směsi. V tomto případě je řešení jednodušší než když požadujeme vzájemné rozdělení všech složek ve složité směsi. Při výběru metody a pracovních podmínek jsme limitováni přístrojem a kolonami, které máme k dispozici a bereme v úvahu i předchozí zkušenosti s jednotlivými metodami kapalinové chromatografie. Předběžné

znalosti o vzorku nám mohou velmi usnadnit volbu metody a pracovních podmínek. Pokud neznáme přesně strukturu látek očekávaných ve vzorku, jsou velmi cenné i orientační údaje o jejich charakteru, jako je jejich přibližná polarita, přibližná relativní molekulová hmotnost, povaha látek (jde-li o látky kyselé, bazické či neutrální).

Je třeba také uvážit *koncentrace látek ve vzorku* a očekávaný poměr obsahu hlavní komponenty a nečistot a podle toho volit metodu detekce. V neposlední řadě je třeba uvážit předpokládanou spotřebu rozpouštědel v mobilních fázích, jejich cenu a toxicitu, cenu kolon a další náklady na provoz přístroje na jedné straně a dobu potřebnou k jedné analýze na straně druhé.

Při hledání optimálních pracovních podmínek v HPLC se snažíme o dosažení požadovaného rozlišení jednotlivých složek dělené směsi v co nejkratší době, přičemž však musíme brát v úvahu i tlaková omezení daná použitou instrumentací. Dobu analýzy lze zkrátit zmenšením délky kolony a kapacitního poměru poslední eluované látky, což však současně vede ke snížení separační účinnosti a rozlišení [28].

Celý proces analýzy ovlivňuje mnoho faktorů. K nejdůležitějším patří složení mobilní fáze, teplota a rozměry kolony [29].

*Rozměry kolony* mají vliv na účinnost HPLC. Délka a vnitřní průměr mají vliv na rozlišení a šířku píku, dobu analýzy ovlivňuje délka kolony. Mez stanovitelnosti, tlakový spád na koloně a objemový průtok mobilní fáze jsou určovány vnitřním průměrem kolony [30].

Po volbě vhodné kolony je pro účinnou separaci v HPLC velmi významná volba a optimalizace *složení mobilní fáze*. Toto složení má pak vliv na účinnost kolony, kapacitní poměr, retenční poměr, rozlišení, dobu analýzy a citlivost. Průtok mobilní fáze ovlivní účinnost, ne však selektivitu nebo kapacitní příspěvek k rozlišení [31].

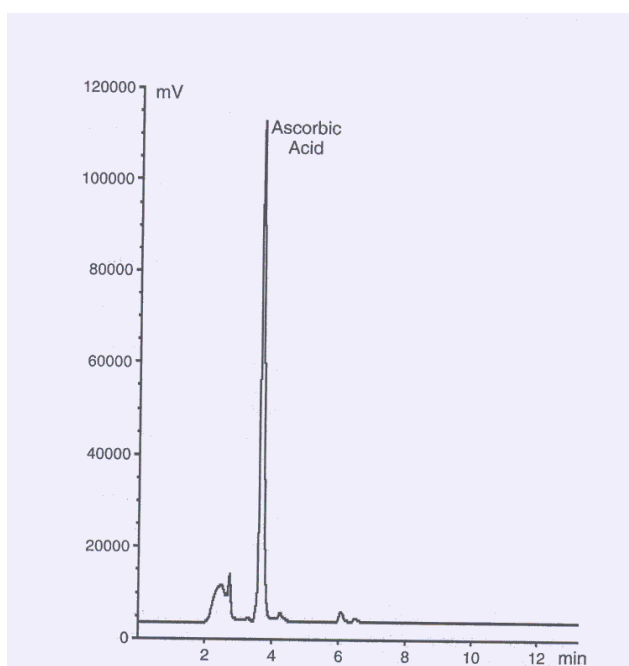
*Teplota* má vliv na termodynamický a kinetický aspekt chromatografického procesu. Zvýšením teploty roste účinnost chromatografické kolony, klesá kapacitní, zkracuje se doba analýzy, klesá viskozita, dochází ke snížení tlakového spádu na koloně a zvyšují se difúzní koeficienty [29].

## 5 METODY HPLC PRO STANOVENÍ VITAMINU C

### 5.1 Metody HPLC pro stanovení vitamínu C v potravinách

Pro stanovení vitamínu C existuje celá řada metodik HPLC. Při stanovení je využíváno různých typů kolon, detektorů a extrakčních technik při přípravě vzorků. Literární průzkum byl zaměřen především na využití detekce pomocí UV-DAD detektoru. Vzhledem k malé stabilitě vitamínu C je velmi důležité zvolit správný typ extrakčního media a stabilizační roztok, aby se zabránilo jeho oxidaci. Při extrakci je vitamin stabilizován zajištěním nízkého pH, přítomností komplexotvorných redukcujících látek. Těmto podmínkám vyhovuje kyselina šťavelová, která v extraktu udržuje nízké pH a má i komplexotvorné vlastnosti. Přítomnost vzdušného kyslíku je možno eliminovat probubláváním extraktu dusíku. Rozklad také katalyzují přítomné kovy. K jejich omezení se používá EDTA nebo se extrakce provádí organickými rozpouštědly. Při extrakci se nedoporučuje používat vyšších teplot, neboť při nich dochází k rychlému rozkladu. Z dalších roztoků se pro extrakci používá kyselina metafosforečná (MPA), případně její směs s kyselinou octovou. Výsledkem analýzy pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie je graf s píky, vyznačujícími složení dělené směsi. Následující obrázek (Obr. 4) je ukázka chromatogramu obsahujícího zřetelný pík vyznačující vyeluovanou kyselinu askorbovou (analýza vitamínu C v lidském mléce).

**Obrázek 4 Chromatogram HPLC analýzy kyseliny askorbové**



Běžně se HPLC používá při stanovení vitamínu C v zelenině a ovoci, které jsou surovinami pro výrobu ovocných či zeleninových nápojů. Publikované metody stanovení pro některé druhy zeleniny a ovoce jsou uvedeny v tabulce (Tab.6).

**Tabulka 6 Metody stanovení vitamínu C v ovoci a zelenině [32]**

<b>Materiál</b>	<b>Příprava vzorku</b>	<b>Stacionární fáze</b>	<b>Mobilní fáze</b>	<b>Detekce</b>
<b>Brambory, jahody</b>	extrakce MPA ( $c=0,0625 \text{ mol.l}^{-1}$ ) míchání odstředění filtrace (papírový filtr)	Animex HPX-87H (9 $\mu\text{m}$ )	A: $\text{H}_2\text{SO}_4$ ( $c=0,0045 \text{ mol/l}$ ) Průtok: 0,5 ml/min	DAD, 245 nm
<b>Jablka, brambory</b>	extrakce směsí MPA (2%) - mobilní fáze 1:2 filtrace čištění skrz Sep-Pak $\text{C}_{18}$ filtrace (nylonový filtr: 0,45 $\mu\text{m}$ ) Celková AA: redukce DHAA pomocí dithiothreitolu	Rainin $\text{NH}_2$ (8 $\mu\text{m}$ )	A: $\text{CH}_3\text{CN}$ B: $\text{H}_2\text{SO}_4$ ( $c=0,05 \text{ mol/l}$ ) 75:25 Průtok: 2 ml/min	UV, 254 nm
<b>Zelenina</b>	homogenizace 5% MPA odstředění filtrace (papírový filtr) zředění čištění skrz Sep-Pak $\text{C}_{18}$ filtrace (membránový filtr 0,45 $\mu\text{m}$ )	$\mu\text{Bondapac}$ k $\text{NH}_2$	A: $\text{CH}_3\text{CN}$ B: $\text{H}_2\text{SO}_4$ ( $c=0,05 \text{ mol/l}$ ) pH=4,6 70:30 průtok: 1 ml/min	UV, 254 nm
<b>Ovoce, zelenina</b>	homogenizace ve fosfátovém pufru pH=2, $c=0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ extrakce v 3% MPA filtrace (nylonový filtr: 0,45 $\mu\text{m}$ )	PLRP-S (5 $\mu\text{m}$ )	A: 1,8% $\text{H}_4$ folová kyselina + 0,3% MPA v $\text{H}_2\text{O}$	DAD, 244 nm



FONTANNAZ, KILINC a HEUDI stanovili celkový vitamin C (kyselinu askorbovou a isoaskorbovou) ve fortifikovaných produktech pomocí HPLC s UV detekcí. Během stanovení byla AA (aktivní forma vitaminu C) extrahována kyselou extrakcí, poté byla DHAA převedena na AA v přítomnosti D-askorbové kyseliny, která je legálně používána jako antioxidační aditivum. Pro konverzi DHAA na redukovanou formu (AA) a její stabilizaci se používá cystein, homocystein či dithiothreitol (DTT). Pro udržení AA ve její redukované formě byl použit tris [2-karboxyethyl] fosfan (TCEP).

Při přípravě roztoku TCEP·HCl (tris [2-karboxyethyl] fosfan hydrochloridu) v koncentraci 250 µg/l bylo 125 mg TCEP rozpuštěno v odměrné baňce s 500 ml destilované vody. Roztok kyseliny trichloroctové (1%) byl připraven v odměrné baňce smícháním 5 g TCA s 500 ml destilované vody. Mobilní fáze byla připravena smícháním 1,6 g decylaminu, 80 ml acetonitrilu, 100 ml octanu sodného (0,25 M) o pH 5,4 s 820 ml destilované vody, vše bylo převedeno do 1000 ml baňky. Poté bylo u mobilní fáze pH upraveno na 5,4 85% kyselinou orthofosforečnou a ta spolu s 50 ml TCEP·HCl byla přidána do konečného roztoku.

Při přípravě vzorku bylo 10 gramů kapaliny nebo pevné látky odváženo do 100 ml odměrné baňky z tmavého skla, přidáno 40 ml TCEP·HCl (250 µg/l). Suspenze byla důkladně promíchána pro získání kašovitě směsi a odměrná baňka byla po rysku doplněna 1% roztokem TCA. Výsledný roztok byl 60 s protřepáván a poté přefiltrován přes speciální filtrační papír. Alikvotní podíl byl zředěn mobilní fází a injekcí vpraven na HPLC systém. Pro vzorky obsahující škrob bylo 10 g kapalné nebo pevné látky odváženo do 100 ml odměrné baňky z tmavého skla, poté bylo přidáno 40 ml TCEP·HCl (250 µg/l) a 10 mg taka-diastázy. Suspenze byla inkubována při 42°C po dobu 30 minut a poté byla doplněna po rysku roztokem TCA. Decylamin byl použit jako iontově párové činidlo pro zlepšení retence AA isomerů na koloně. Použita byla kolona LiChrospher RP-18 o rozměrech 4,6×250 mm se sorbentem 5 µm. Rychlost toku byla 1ml.min<sup>-1</sup> s UV detekcí při 265 nm [19].

NISHIYAMA, YAMASHITA a kolektiv se zabývali stanovením obsahu vitaminu C v kiwi plodech. Při přípravě vzorku byl ovocný extrakt pro stanovení AA připraven ze směsi obsahující různé druhy kiwi plodů. Jedlý podíl byl homogenizován a 10 g homogenizátu bylo smícháno s 20 ml ledově vychlazené kyseliny metafosforečné obsahující EDTA (v

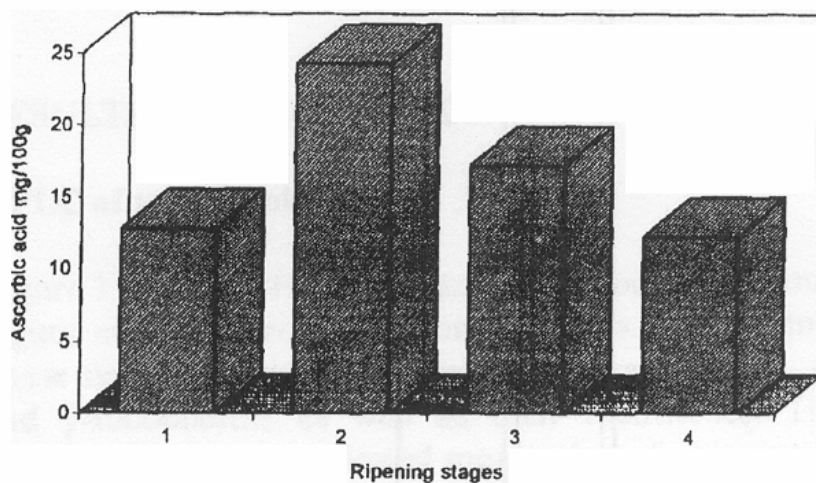
koncentraci 1 mmol.l<sup>-1</sup>). Pro extrakci AA byla směs rozmíchána v mixéru po dobu 30 s a vzniklá suspenze byla odstředěna při 4°C po dobu 10 minut. Výsledná kapalina nad sedlinou byla použita pro extrakci provedenou za chladu za účelem minimalizace nežádoucí oxidace AA.

Pro stanovení celkové AA byla provedena redukce vzorku. Testovaný vzorek byl ošetřen pomocí TCEP (konverze DHAA na AA). Bylo smícháno 100 µl roztoku vzorku s 400 µl tlumivého roztoku (pH 4,5) obsahujícího TCEP (0,312 mmol.l<sup>-1</sup>) a směs byla inkubována ve tmě při 20°C po dobu 90 minut. Zredukované vzorky byly analyzovány pomocí HPLC. Celková AA byla stanovena iontovýměnnou chromatografií na ODS koloně při 254 nm.

Pro analýzu byla použita LiChroCART 250,4 LiChrospher 100 RP-18e kolona (5 µm). Izokratická mobilní fáze byla získána smícháním 1,55 ml 0,5 M tetrabutylamonium hydroxidu s 30 ml metanolu a 970 ml 0,01 M roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného. Rychlost toku byla 1 ml/ min [33].

Stanovením vitamínu C vedle karotenoidů a tokoferolů v rajčatech se zabývali ABUSHITA, HEBSHI a kolektiv. Pro oddělení kyseliny askorbové od ostatních organických kyselin obsažených v rajčeti využili chromatografie iontových párů. Pro zjištění rušivých látek v píku kyseliny askorbové byl nejprve proveden test čistoty. Vedle vysoké citlivosti (3-4 µg kyseliny askorbové) vykazovala tato metoda vysokou reprodukovatelnost. Chromatografické píky byly identifikovány srovnáním retenčního času a absorpčního spektra s údaji standardů. Zajímavým jevem, který autoři sledovali, byla změna v obsahu kyseliny askorbové v průběhu zrání plodů, jak ukazuje obrázek 5.

**Obrázek 5** Změny obsahu kyseliny askorbové v průběhu zrání



Maximální koncentrace byla zjištěna v rajčatech, která byla žlutá, málo zralá. V průběhu zrání pak docházelo k poklesu obsahu, pravděpodobně v důsledku antioxidační činnosti kyseliny askorbové, kdy dozrávající buňky absorbovaly vysoké množství kyslíku jako výsledku rostoucí respirace buněk. Také bylo zjištěno, že obsah kyseliny askorbové závisel rovněž na odrůdě, přičemž nejvyšší hodnoty se pohybovaly okolo 36-48 mg/100 g vzorku [34].

Vzorek pro analýzu vitamínu C v rajčatech byl připraven rozetřením 10 g rajčat s mořským pískem v třecí misce. Homogenizát byl pomocí 50 ml MPA kvantitativně převeden do Erlenmayerovy baňky a 15 minut podroben třepání. Poté byla provedena filtrace. Takto připravený vzorek byl do doby analýzy uchováván při  $-20^{\circ}\text{C}$ . Důležitou látkou obsaženou v rajčatech jsou karotenoidy. K jejich stanovení byla podle použitého literárního zdroje uplatněna HPLC. Podmínky stanovení jsou rovněž uvedeny v tabulce (Tab.7).

**Tabulka 7 Podmínky HPLC separace antioxidantů z rajčat [34]**

Parametry	Podmínky	
	Karotenoidy	Organické kyseliny (vitamin C)
<b>Stacionární fáze</b>	Chromsil C-18 6 $\mu\text{m}$ , 4,6 mm $\times$ 250 mm	Lichrosorb C-18 10 $\mu\text{m}$ , 4,6 mm $\times$ 250 mm
<b>Mobilní fáze</b>	acetonitril-isopropanol- metanol-voda (39:52:5:4)	0,1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -metanol- TBAOH (97:3:0,05)
<b>Průtok</b>	0,9-1,2 ml.min <sup>-1</sup>	1 ml.min <sup>-1</sup>
<b>Detekce</b>	Viditelná 440 nm	UV 225 nm

GÓMEZ, GARBALLO a spol. metodou HPLC stanovili ve vodě rozpustné vitaminy (thiamin, riboflavin, niacin, kyselinu pantothenovou, pyridoxin, kyselina listová, kyanokobalamin a vitamin C) vedle sebe. Metoda redukovala čas kvantitativního stanovení, sestávala totiž pouze ze sražení vzorku a následného odstředění. V množství reagií byla HPLC srovnatelná s ostatními oficiálními metodami, se vzorkem bylo manipulováno minimálně. Chromatografické stanovení bylo provedeno pomocí kolony  $\text{C}_{18}$  s rezervní fází a

jednotlivé vitaminy byly detekovány při různých vlnových délkách pomocí fluorescenčního nebo UV/vis detektoru [35].

Srovnání HPLC (UV a fluorimetrické detekce) analýzou obsahu kyseliny askorbové v gonádách mořských ježků, které jsou oblíbenou lahůdkou, provedli RODRIGUEZ BERNALDO DE QUIROS a kolektiv. Přímé stanovení kyseliny askorbové UV detekcí (při vlnové délce 245 nm) vykazalo limit detekce 0,19  $\mu\text{g/ml}$  a reprodukovatelnost 6,35%. Fluorimetrická detekce ukázala limit detekce 0,082  $\mu\text{g/ml}$  a reprodukovatelnost 0,61%. Pro zjištění obsahu vitamínu C v gonádách mořských ježků byla proto vhodnější metoda fluorimetrická [36].

## 5.2 Metody HPLC pro stanovení vitamínu C v nápojích

NADAL-ROMEJ, MORERA-PONS a kolektiv požili metodu HPLC pro stanovení celkového vitamínu C v lidském mléce, kde se tento vitamin stanovuje především jako biologický ukazatel oxidační stability mléka. Normálně používanou metodou pro toto stanovení je metoda enzymatická. Ve srovnání s enzymatickou metodou měla HPLC řadu výhod. Poskytla lepší výsledky vzhledem k tomu, že metoda enzymatická při stanovení zjistila o 37% kyseliny askorbové méně. Dále enzymatická metoda nedokázala stanovit celkový vitamin C, protože nedokázala redukovat kyselinu dehydroaskorbovou na kyselinu askorbovou. Mimoto HPLC vyžadovala méně reagensů a materiálu, byla jednodušší a zkrátila dobu stanovení. Proto byla HPLC vhodná pro nahrazení metody enzymatické.

Postup při stanovení byl následující. Alikvotní podíl lidského mléka byl rozmrazen na teplotu asi 22°C ve vodní lázni, a poté mixován (vzorek musel být chráněn před světlem). Pro analýzu celkového obsahu vitamínu C byla DHAA redukována pomocí dithiothreitolu. Přesně 300  $\mu\text{l}$  takto upraveného mléka a 800  $\mu\text{l}$  dithiothreitolu (0,1  $\text{mol.l}^{-1}$ ) bylo dáno do speciální centrifugy a filtrační zkumavky. Směs byla mechanicky protřepávána po dobu 30 s a pak byla zkumavka 15 minut uchována v tmavé místnosti. Bylo přidáno 300  $\mu\text{l}$  0,56% roztoku kyseliny metafosforečné a poté 30 s protřepáno a odstředěno při 10°C (10 minut).

Pro analýzu kyseliny askorbové bylo 300  $\mu\text{l}$  mixovaného lidského mléka smícháno s 300  $\mu\text{l}$  0,56% roztoku kyseliny metafosforečné, směs byla přidána do speciální centrifugy a filtrační zkumavky, poté 30 s protřepána a odstředěna při 10°C (10 minut).

V obou případech bylo odebráno 50  $\mu\text{l}$  filtrátu a injekcí přímo vpraveno na HPLC systém. Pro izokratickou separaci byla použita mobilní fáze Milli-Q water s kyselinou octovou (0,1%) a metanolem v poměru 95:5. Pro stanovení byla použita kolona Tracer Spherisorb ODS2 C<sub>18</sub> (250×4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ). Rychlost průtoku byla 0,7 ml/ min a teplota kolony 25°C. Kyselina askorbová byla identifikována srovnáním retenčních časů píku vzorku se standardem při 254 nm [37]. Publikované metodiky stanovení vitamínu C v mléce jsou uvedeny v tabulce (Tab.8).

**Tabulka 8** Podmínky stanovení kyseliny askorbové metodou HPLC v mléce [32]

Materiál	Příprava vzorku	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce
<b>MLÉKO</b>	filtrace (Nucleopore Syrfil, 25 mm, 0,45 $\mu\text{m}$ filtr) zředění 1:5	LiChrospher RP-18 (5 $\mu\text{m}$ )	A: octylammonium-salicylat ( $c=0,005 \text{ mol.dm}^{-3}$ ) Průtok: 1 ml.min <sup>-1</sup>	UV, 254 nm
	přidání 12,5% CCl <sub>3</sub> COOH roztoku k vysrážení bílkovin odstředění filtrace Celková AA: přidání homocysteinu k redukci DHAA na AA úprava pH a 7 (15 min, pokojová teplota)	Nucleosil 7 C18	A: Bu <sub>4</sub> NOH ( $c=0,002 \text{ mol.dm}^{-3}$ ) v H <sub>2</sub> O (pH 2,92) Průtok: 1,5 ml. min <sup>-1</sup>	UV, 254 nm

Sledováním efektu chladírenského skladování na obsah vitamínu C se zabýval PLAZA a spol. Stanovení vitamínu C bylo provedeno pomocí HPLC. Cílem bylo takové ošetření čerstvých citrusových nápojů, které by s použitím netepelných technologií co nejvíce prodloužilo dobu jejich skladovatelnosti, zachovalo co nejvyšší obsah vitamínu C a jeho antioxidační aktivitu. Použili metodu vysokého tlaku (HP- high-pressure) a metodu pulsních elektrických polí (PEF- pulsed electric fields). Tyto metody a jejich vliv porovnávali

s metodou mírné pasterace (LPT- low pasteurization). Podmínky jednotlivých ošetření jsou zaznamenány v tabulce (Tab.9).

**Tabulka 9 Podmínky ošetření pomerančových džusů [38]**

<b>Metoda ošetření</b>	<b>Podmínky ošetření</b>
<b>HP</b>	400 MPa po dobu 60 s a teplotě 36°C
<b>PEF</b>	35 kV, 750 s
<b>LPT</b>	70°C, 30 s

Použité metody využívaly stejných principů dosažení delší skladovatelnosti jako metody klasické – inaktivaci enzymů a redukci mikroorganismů. Obsah kyseliny askorbové a antioxidační aktivitu zjišťovali ihned po ošetření a v průběhu skladování.

Stanovení vitamínu C bylo provedeno pomocí HPLC. Byla použita kolona o délce 25 cm a vnitřním průměru 4,6 mm, s rezervní fází C 18 Hypersil ODS, jako mobilní fáze byla použita kyselina sírová s izokratickým gradientem. Průtoková rychlost byla 1 ml/min. Detekce byla provedena DAD při vlnové délce 245 nm. Chromatografická data a UV-vis spektrum byly zaznamenávány, shromažďovány a ucelovány pomocí Hewlett-Packard Chem Station a příbuzného softwaru. Identifikace kyseliny askorbové byla provedena srovnáním retenčních času a absorpčního spektra se standardními údaji. Stanovení kapacity vychytávání volných radikálů bylo hodnoceno pomocí stabilního radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH). Pro měření absorbance byl použit spektrofotometr, který každých 0,25 s zaznamenával změny v absorbanci.

Na základě těchto změn byla vytvořena kalibrační křivka, z níž bylo možné vypočítat koncentraci DPPH v reakční směsi. Podle vzorce byl vypočítán procentuální úbytek DPPH. Při zjišťování efektu nových metod na extrakci vitamínu C z pomerančových džusů ihned po ošetření bylo zjištěno, že HP a PEF džusy zaznamenaly větší pokles obsahu než džusy neošetřené, přičemž u PEF džusů byla tato redukce významnějšího rozsahu. Ihned po ošetření pomerančových džusů metodou LPT nebyla zaznamenána význačnější změna obsahu. Dále byl zjišťován efekt nových technologií na obsah vitamínu C v průběhu a po

chladiřenském skladování. Nejvyšší obsah si v celém průběhu skladování zachovaly džusy neošetřené. Ihned za nimi byly džusy ošetřené metodami HP a LPT. Metoda PEF byla nejméně šetrná. Při zaměření se na dobu mezi 0-tým a 20-tým dnem HP džusy zachovaly vyšší obsah než džusy ošetřené pomocí LPT, které poklesu dané úrovně vitamínu C dosáhly již po 15 dnech. To mohlo být způsobeno tím, že HP ošetření způsobí zablokování iontů kovů, které mohou katalyzovat degradaci kyseliny askorbové a tím i zpomalit její degradaci. Navíc se musí vzít v úvahu rozdílná míra inaktivace enzymů degradujících vitamín C. Na konci chladiřenského skladování byly celkové ztráty vitamínu C u metod HP a LPT podobné, u PEF ošetření byly ztráty větší.

Pokud bychom vzali pomerančové džusy skladované při uvedených podmínkách a obvyklé konzumované množství (250 ml), bylo zjištěno, že LPT džusy pokryjí 99,67% DDD, HP džusy 105,17% DDD a PEF džusy 84,06% DDD u dospělého člověka. Posledním zjišťovaným faktorem byla aktivita volných radikálů DPPH. Antioxidační aktivita byla hodnocena pomocí tzv. antiradikální účinnosti (antiradical efficiency). Při sledování efektu nových metod ošetření na antioxidační aktivitu byla jako nejméně šetrná vyhodnocena metoda PEF. Nejvyšší antioxidační aktivitu vykazovaly HP džusy. Na závěr autoři hodnotí metody HP a PEF jako možnou alternativu LPT ošetření. Současně však z výzkumu vyplynula potřeba dalších studií pro prohloubení poznatků o těchto metodách, zejména účinky na kvalitu a stabilitu ošetřených výrobků.

Pro komerční úspěšnost, by měly být odstraněny nedostatky v kontinuitě vybavení a rychlosti, také by měla být nalezena méně nákladná zařízení pro provedení. Pokud by byly odstraněny tyto nedostatky, mají podle výzkumníků tyto nově vznikající metody slibnou budoucnost v potravinářském průmyslu [38].

Další metodiky stanovení vitamínu C pomocí HPLC v různých nápojích jsou uvedeny v tabulce (Tab.10).

**Tabulka 10** Podmínky stanovení kyseliny askorbové metodou HPLC ve vybraných nápojích [34]

Materiál	Příprava vzorku	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce
<b>Pivo</b>	odplynění filtrací přes papírový filtr zředění 1:20 pufrem (pH 9)	HPICE-ASI	A: CH <sub>3</sub> CN B: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (c=0,0045 mol.dm <sup>-3</sup> ) 4 : 96 Průtok: 0,8 ml.min <sup>-1</sup>	Pulsační amperometrický detektor, + 0,70 V
<b>Ovocné džusy</b>	homogenizace MPA ultraodstředění filtrace (Nucleophore Syrifil, 25 mm, 0,45 μm filtr)	LiChrospher RP-18 (5 μm)	A: octylammonium salicylat (c=0,005 mol.dm <sup>-3</sup> ) Průtok: 1 ml.min <sup>-1</sup>	UV, 254 nm
<b>Citrusové džusy</b>	smíchání ethanolem a MPA ostředění Celková AA: přidání Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (c=0,3mol.dm <sup>-3</sup> ) a NaSH (20 min, 35°C) smíchání s MPA filtrace (membr. filtr, 0,45 μm) Pro AA: smíchání s MPA filtrace (membr. filtr, 0,45 μm)	Cosmosil 5C <sub>18</sub>	A: MPA (c=0,025 mol.dm <sup>-3</sup> ) Průtok: 1 ml.min <sup>-1</sup>	UV, 243 nm



## ZÁVĚR

Vitamin C je velmi důležitým prvkem pro správné fungování lidského organismu. Přispívá velkou měrou k regeneraci organismu, figuruje v metabolismu steroidů a při kontrole vysokého tlaku. Je potřebný pro tvorbu kolagenu, zlepšuje odolnost organismu vůči infekcím. Doporučená denní dávka se pohybuje v rozmezí 60-200 mg/den/osobu, přičemž množství závisí na pohlaví, fyzické zátěži, stresových situacích atd. Při jeho nedostatečném příjmu dochází k mnoha potížím. Vitamin C si lidský organismus nedokáže vyrobit sám, proto je velmi důležité zajistit jeho dostatečný příjem potravinami a nápoji. Využívá se různých způsobů zachování co největšího původního obsahu vitamínu v potravinách a nápojích jako jsou např. omezení kontaktu se vzduchem, snížení přítomnosti  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ , či vytváření nepříznivých podmínek pro vznik komplexů těchto iontů s vitamínem C.

Pro kontrolu obsahu vitamínu v nápojích a potravinách lze využít mnoha metod, ať už je to enzymová metoda nebo titrace kyseliny L-askorbové 2,6-dichlorfenolindofenolem v kyselém prostředí a relativně nové metody - vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), která je podrobně rozebírána v předkládané bakalářské práci. Oproti ostatním metodám má HPLC mnohé výhody.

Vitamin C je skupina několika látek, z nichž fyziologicky aktivní je pouze kyselina askorbová (AA). Ta se při nevhodných podmínkách oxiduje na kyselinu dehydroaskorbovou (DHAA). Při stanovení celkové AA tuto oxidovanou formu nejsou klasické metody schopny stanovit, zde proto se uplatňuje HPLC. Největším problémem při vlastním stanovení je příprava vzorku. Pro extrakci ze vzorku využívá HPLC kyseliny šťavelové či metafosforečné, které při extrakci zároveň zabraňují oxidaci kyseliny askorbové na dehydroaskorbovou. Pro konverzi DHAA na redukovanou formu (AA) a její stabilizaci se využívá cysteinu, homocysteinu či dithiothreitolu (DTT). Pro udržení AA v redukované formě HPLC využívá redukčního činidla tris [2-karboxyethyl] fosfinu (TCEP). HPLC umožňuje stanovit AA a DHAA vedle sebe. Dále umožňuje stanovit vedle sebe vitamin C a další hydrofilní vitamíny, či stanovit vitamin C spolu s dalšími antioxidanty (vitamíny A a E). Nadto je HPLC rychlá, účinná, automatizovatelná a snadno lze kvantifikovat a reprodukovat výsledky. Literárním průzkumem byly v této bakalářské práci shromážděny a do tabulek či postupů zpracovány metody HPLC pro stanovení vitamínu C v různých potravinách a nápojích.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] Seznam: heslo vyziva [on-line]. [2007-19-04]. Dostupné z:  
<<http://encyklopedie.seznam.cz/heslo/110315-vyziva>>
- [2] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie* 3. 1. vyd. Praha: 1993. 192 s. ISBN 80-200-0471-8
- [3] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin* 2. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999. 328 s. ISBN 80-902391-4-5
- [4] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G. a POKORNÝ, J. *Chemie potravin*. 1. vyd. Praha: 1983. 629 s.
- [5] DAVÍDEK, J. *Chemie potravin*. 2. vyd. Praha: VŠCHT, 1991. 142 s. ISBN 80-7080-097-6
- [6] PÁNOVÁ, S., HEJLOVÁ, M. *Vitamin C-nejhorší nepřítel chorob*, Puls, č.12, 1998. 12 s.
- [7] Server Doktorka: vitamin C [on-line]. [2007-20-04]. Dostupné z:  
<<http://vitaminy.doktorka.cz/zajimavosti-vitaminu/>>
- [8] Server Vitalsupport: vitamin C [on-line]. [2007-20-04]. Dostupné z:  
<<http://www.vitalsupport.cz/clanky/40-antioxidant>>
- [9] Prevence osteoporózy pomocí vitaminů K, C a B<sub>6</sub>. *Potravinářské aktuality, výživa a legislativa*, 43, 200 č. 4. 123 s.
- [10] BRÁZDOVÁ, Z. *Výživa člověka*. 1. vyd. Vyškov: VVŠ PV, 1995. 75 s.
- [11] ROGINSKI, H. a kol. *Encyclopedia of Dairy Science* vol. 3. 557 s. ISBN 0-12-227235-2003
- [12] NOVÁK, V. *Ekonomika výživy*. 1. vyd. Vyškov: VVŠ PV, 1996. 35 s.
- [13] KLEINWÄCHTEROVÁ, H., BRÁZDOVÁ, Z. *Výživový stav člověka a způsoby jeho zjišťování*. 2. vyd. Brno: 2001. 102 s. ISBN 80-7013-336-8
- [14] Server Jak jíme [on-line]. [2007-20-04]. Dostupné z:  
<<http://jakjime.php5.cz/podpora/anone.htm>>
- [15] SEVEROVÁ, M., BŘEZINA, P. *Návody pro laboratorní cvičení z analýzy potravin* vyd.1 Vyškov: VVŠ PV. 1998. 88 s. ISBN 80-7231-022-4

- [16] Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 53/2002 Sb., kterou se stanoví chemické požadavky na zdravotní nezávadnost jednotlivých druhů potravin a potravinových surovin, podmínky použití látek přídatných, pomocných a potravních doplňků [on-line]. [2007-03-16]. Dostupné z: [http://abonent.lexdata.cz/lexdata/sb\\_free.nsf/0/C12571D20046A0B241256B60002F15BE](http://abonent.lexdata.cz/lexdata/sb_free.nsf/0/C12571D20046A0B241256B60002F15BE)
- [17] Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 298/1997 Sb., kterou se stanoví chemické požadavky na zdravotní nezávadnost jednotlivých druhů potravin a potravinových surovin, podmínky jejich použití, jejich označování na obalech, požadavky na čistotu a identitu přídatných látek a potravních doplňků a mikrobiologické požadavky na potravní doplňky a látky přídatné [on-line]., [cit. 2007-03-16]. Dostupné z: [http://abonent.lexdata.cz/lexdata/sb\\_free.nsf/0/C12571D20046A0B2C12566DA005D38CB](http://abonent.lexdata.cz/lexdata/sb_free.nsf/0/C12571D20046A0B2C12566DA005D38CB)
- [18] Server Moje dítě: [on-line]. [2007-20-04]. Dostupné z: [http://www.mojedite.cz/guide\\_detail.php?section=1&stage=4](http://www.mojedite.cz/guide_detail.php?section=1&stage=4)
- [19] FONTANNAZ, P., KILINC, T., HEUDI, O. Food chemistry , 2006. vol. 94. s. 626-631
- [20] Server 2theta: [on-line]. [2007-22-04]. Dostupné z: <http://www.2theta.cz/nabidka/Cvit.htm>
- [21] ZÝKA, J. A kol. *Analytická příručka*. díl I. vyd. 4. Praha: SNTL, 1988. 678 s.
- [22] Firma Waters, zabývající se výrobou zařízení pro HPLC [on-line]., [cit. 2007-16-03] Dostupné z: <http://www.waters.com/watersdivision/ContentD.asp?watersit=JDRS-55LTGBH#b1>
- [23] ŠTULÍK, K. a kol. *Analytické separační metody* vyd.1. Praha: Karolinum. 2004. 264 s. ISBN 80-246-0852-9
- [24] SANCHEZ, M., CAMARA HURTADA, M., *Comparison of HPLC and spectrofluorimetry for vitamin C analysis*. European Food Research and technology. 200. vol. 3. s. 220-225

- [25] RODRIGUEZ BERNALD DE QUIROS, A. a kol. *Determination of vitamin C in sea urchin: comparison of two methods*. Chromatografia. 2001 vol. 53. s. 246-249
- [26] SÝKORA, D., TESAŘOVÁ, E. VOSMANSKÁ, M. a ZVOLÁNKOVÁ, M. *Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC*. Chem. listy, 101. 2007. 190-199 s.
- [27] Server Sweb cz., HPLC [on-line]., [cit. 2007-03-16] Dostupné z:  
<<http://www.sweb.cz/hplc/index1.html>>
- [28] CHURÁČEK, J. JANDERA, P.: *Separace látek – Kapalinová vysokoúčinná chromatografie*, vyd. 2. Pardubice: SNTL, 1986. 140 s.
- [29] Server Webprostor: HPLC [on-line]., [cit. 2007-16-04] Dostupné z:  
<[http://www.webprostor.cz/veda\\_a\\_vyzkum/HPLC/TIP/temperature.htm](http://www.webprostor.cz/veda_a_vyzkum/HPLC/TIP/temperature.htm)>
- [30] Server Webprostor: HPLC [on-line]., [cit. 2007-16-04] Dostupné z:  
<[http://www.webprostor.cz/veda\\_a\\_vyzkum/HPLC/TIP/lenght\\_column.htm](http://www.webprostor.cz/veda_a_vyzkum/HPLC/TIP/lenght_column.htm)>
- [31] Server Webprostor: HPLC [on-line]., [cit. 2007-16-04] Dostupné z:  
<[http://www.webprostor.cz/veda\\_a\\_vyzkum/HPLC/TIP/mobile\\_phase.htm](http://www.webprostor.cz/veda_a_vyzkum/HPLC/TIP/mobile_phase.htm)>
- [32] POLESELLO, S., RIZZOLO, A. *Chromatographic determination of vitamins in food*  
*Rewiev*. In J. Chromatogr, 1992, sv. 624, 103 - 152 s.
- [33] NISHIYAMA, I., YAMASHITA, Y. a kolektiv *Varietal difference in vitamin C content in the fruit of kiwifruit and other Actinia species* J. Agric. Food Chem. 2004, vol.52. s. 5472-5475
- [34] ABUSHITA, A., HEBISHI, A., a kol. *Determination of antioxidant vitamins in tomatoes*. Food chemistry, vol. 60. 1997. s.207-212
- [35] ZAFRA-GÓMEZ, A., GARBALLO, A. a kolektiv *Simultaneous determination of eight water-soluble vitamins in supplemented foods by liquid chromatography*. J. Agric. Food Chem. 2006, vol. 54, 4531-4536
- [36] BERNALDO DE QUIROS, R., a kolektiv *Chromatografia* 2001. vol. 53, s. 246-249

- [37] NADAL, M., MORERA-PONS, S. *RP-liquid chromatografic method for vitamin C determination in human milk versus an enzymatic method.* Journal of Chromatography B. 2006 s. 41-46
- [38] PLAZA, L. a kol. *Effect of refrigerated storage on vitamin C and antioxidant activity of orange juice processed by high-pressure pulsed electric fields with regard to low pasteurization.* Eur Food Res Technol 2006. s. 487-493

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

AA	kyselina askorbová
DAD	diode array detector
DDD	doporučená denní dávka
DHAA	kyselina dehydroaskorbová
DPPH	2,2-difenyl-1-pykrylhydrazyl
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylendiamintetraacetát
GC	plynová chromatografie
HP	vysoký tlak
IR	infračervený
LPT	mírná pasterizace
MPA	kyselina metafosforečná
NMR	nukleárně magnetická resonance
PC	papírová chromatografie
PEF	pulsní elektrická pole
SIDS	syndrom náhlého úmrtí kojenců
TBAOH	tetrabutylamonium hydroxid
TCA	kyselina trichloroctová
TCEP	tris [2-karboxyethyl] fosfin
TLC	tenkovrstvá chromatografie

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1	Chemické vzorce forem vitamínu C.....	10
Obr. 2	Coulometrický analyzátor C-Vit.....	21
Obr. 3	Schéma HPLC.....	24
Obr. 4	Chromatogram HPLC analýzy kyseliny askorbové.....	31
Obr. 5	Změny obsahu kyseliny askorbové v průběhu zrání.....	34

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1. Doporučené denní dávky pro jednotlivé skupiny obyvatelstva.....	13
Tabulka 2. Obsah vitamínu C ve 100 g u některých potravin.....	16
Tabulka 3. Obsah vitamínu C v nápojích (volně dostupné v prodejnách).....	19
Tabulka 4. Rozsah použitelnosti ve srovnání s ostatními separačními metodami.....	23
Tabulka 5. Přehled používaných typů detektorů.....	28
Tabulka 6. Metody stanovení vitamínu C v ovoci a zelenině.....	32
Tabulka 7. Podmínky HPLC separace antioxidantů z rajčat.....	35
Tabulka 8. Podmínky stanovení kyseliny askorbové metodou HPLC v mléce.....	37
Tabulka 9. Podmínky ošetření pomerančových džusů.....	38
Tabulka 10. Podmínky stanovení kyseliny askorbové metodou HPLC ve vybraných nápojích.....	40