

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra fyzikální chemie**



**Stanovení kyseliny askorbové v roketě (*Eruca sativa*)  
průtokovou coulometrií**

**Bakalářská práce**

Autor práce: Eva Zoulová

Studijní obor: Management v chemii

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.

Olomouc 2012

## **Bibliografická identifikace**

<b>Jméno a příjmení:</b>	Eva Zoulová
<b>Název práce:</b>	Stanovení kyseliny askorbové v roketě ( <i>Eruca sativa</i> ) průtokovou coulometrií
<b>Typ práce:</b>	Bakalářská
<b>Pracoviště:</b>	Katedra analytické chemie
<b>Vedoucí práce:</b>	RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.
<b>Rok obhajoby práce:</b>	2012
<b>Abstrakt:</b>	Cílem práce bylo ověřit navržený analytický postup pro stanovení askorbové kyseliny v roketě seté ( <i>Eruca sativa</i> ) metodou průtokové coulometrie. V rámci práce byly hodnoceny vybrané validační parametry.
<b>Klíčová slova:</b>	askorbová kyselina, průtoková coulometrie, roseta setá, validace
<b>Počet stránek:</b>	37
<b>Počet příloh:</b>	1 x CD
<b>Jazyk:</b>	čeština

**Bibliographical identification**

<b>Autor`s first name and surname:</b>	Eva Zoulová
<b>Title:</b>	Determination of ascorbic acid in rocket ( <i>Eruca sativa</i> ) by flow-through coulometry
<b>Type of thesis:</b>	Bachelor
<b>Workplace:</b>	Department of Analytical Chemistry
<b>Supervisor:</b>	RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.
<b>The year of presentation:</b>	2012
<b>Abstract:</b>	The aim of my work was to check the change of analytical procedure for determination of ascorbic acid in rocket ( <i>Eruca Sativa</i> ) by flow – through coulometry. During the work selected validation parameters were evaluated.
<b>Keywords:</b>	ascorbic acid, rocket, flow – through coulometry, validation
<b>Number of pages:</b>	37
<b>Number of appendices:</b>	1 x CD
<b>Language:</b>	Czech

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Stanovení kyseliny askorbové v roketě (*Eruca sativa*) průtokovou coulometrií“ vypracovala samostatně a použila jsem pramenů, které uvádím v příloženém seznamu literatury.

V Olomouci dne .....

.....

podpis autora

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala RnDr. Janě Skopalové za odborné vedení mé bakalářské práce a pomoc při vypracování. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Pavlovi Banášovi za odborné rady týkající se statistického vyhodnocování. V neposlední řadě bych touto cestou chtěla poděkovat svým nejbližším za podporu během celého studia.

## Obsah

1. Úvod.....	8
2. Teoretická část.....	9
2.1. Roketa setá.....	9
2.1.1. Roketa setá.....	9
2.2.2. Látky obsažené v raketě.....	10
2.2.3. Rozložení kyseliny askorbové v raketě seté.....	10
2.2. Kyselina L - askorbová.....	11
2.2.1. Historie kyseliny askorbové.....	11
2.2.2. Charakteristika kyseliny askorbové.....	11
2.2.3. Využití kyseliny askorbové.....	13
2.2.4. Fyzikálně chemické vlastnosti.....	13
2.2.5. Dávkování.....	13
2.2.6. Stabilizace.....	14
2.2.7. Metody stanovení.....	14
2.3. Volumetrie.....	15
2.3.1. Charakteristika.....	15
2.3.2. Volumetrické stanovení askorbové kyseliny.....	15
2.4. Coulometrie.....	16
2.4.1. Historie.....	16
2.4.2. Charakteristika.....	16
2.6. Validace.....	18
2.6.1. Charakteristika.....	18
2.6.2. Kalibrace (pracovní rozsah).....	18
2.6.3. Mez detekce a mez stanovitelnosti.....	19
2.6.4. Opakovatelnost.....	19
2.6.5. Výtěžnost.....	19
3. Experimentální část.....	20
3.1. Použité chemikálie.....	20
3.2. Použité přístroje a pomůcky.....	20
3.3. Příprava roztoků.....	21
3.3.1. Základní elektrolyt pro coulometrii.....	21
3.3.2. Zásobní roztok askorbové kyseliny pro coulometrii.....	21
3.3.3. Kalibrační roztok askorbové kyseliny pro coulometrii.....	22
3.3.4. Standardní roztok askorbové kyseliny pro titraci.....	22
3.3.5. Titrační činidlo 2,6-dichlorfenolindofenol.....	22
3.3.6. Roztoky 1% HCl a 10% HCl.....	22
3.4. Příprava rostlinného materiálu.....	22
3.4.1. Podmínky pro pěstování analyzované rakety seté.....	22
3.4.2. Příprava rostlinného materiálu pro coulometrické stanovení.....	22
3.4.3. Příprava rostlinného materiálu pro titraci.....	23
3.5. Postup měření.....	24
3.5.1. Coulometrie.....	24
3.5.2. Volumetrie.....	24
4. Výsledky a diskuze.....	25
4.1. Kalibrace (pracovní rozsah).....	25
4.2. Mez detekce a mez stanovitelnosti.....	27
4.3. Opakovatelnost.....	27

4.4. Výtěžnost .....	29
4.5. Volumetrie .....	30
4.6. Porovnání coulometrie s volumetrií.....	31
5. Závěr .....	33
6. Summary.....	34
7. Literatura.....	35

# 1. Úvod

Člověk je složitý organismus. Každý den musí přijímat řadu pro tělo významných látek: bílkoviny, tuky, sacharidy a také vitaminy. Proto byly stanoveny doporučené denní dávky těchto látek.

Nelze říci, že jeden vitamín je pro tělo prospěšnější než druhý. Některé fungují jako prekurzory, jiné jsou nezbytné pro správnou výstavbu nových tkání a konkrétně vitamin C chrání tělo před nachlazením, stresem a jinými vlivy. Většinu těchto esenciálních látek si tělo neumí samo vyrobit, proto je dodáváme prostřednictvím stravy nebo vitamínových doplňků.

Hlavním tématem této bakalářské práce je testovat metodu průtokové coulometrie pro stanovení askorbové kyseliny v rosetě seté (*Eruca sativa*). Tradiční metody stanovení vitamínu C jsou volumetrie, kapalinová chromatografie, spektrofotometrie, polarografie. Elektrochemické metody, mezi něž průtoková coulometrie patří, mají výhody: rychlost, přesnost, spotřebu malého množství analyzované látky, nízkonákladovost.

Cílem práce bylo ověřit navržený analytický postup pro stanovení askorbové kyseliny v rosetě metodou průtokové coulometrie. Tato metoda by mohla být použita pro sledování obsahu askorbové kyseliny v rosetě, např. při sledování jeho variability v závislosti na různých podmínkách pěstování.

V rámci práce budou hodnoceny vybrané validační parametry: pracovní rozsah, mez detekce a mez stanovitelnosti, opakovatelnost a výtěžnost. Jako referenční metoda bude použita volumetrie, která je oficiální metodou pro stanovení vitamínu C v rostlinných vzorcích.



## 2. Teoretická část

### 2.1. Roketa setá

#### 2.1.1. Roketa setá

Roketa (*Eruca sativa*) je vyšší dvouděložná rostlina z čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*) [1].

Jedná se o jednoletou diploidní rostlinu, která dorůstá výšky 80 cm. Je tvořena listy (obr. 1), kterými je rostlina obrostlá po celý rok. Květy vykvétají mezi květnem a srpnem. Semena, která jsou bohatá na oleje, a to zejména na erukovou kyselinu, se objevují od července do září [2].

Jako oblast původu je udávána oblast Středoziemního moře a jihozápadní Asie. Ve formě plevelu, v porostech lnu a obilí byl rozšířen do dalších zemí jako je Afghánistán, severní Indie, Severní Amerika a Austrálie [3].

Je charakteristická svojí pikantní chutí, a proto stačí do jídel přidat malé množství [4]. Díky své výrazné chuti ji můžeme přidávat do polévek, smetanových omáček k těstovinám, k masu a především do salátů.



Obr. č. 1 Roketa setá

### 2.2.2. Látky obsažené v roketě

Při analýze roketky vysoko účinnou kapalinovou chromatografií byla zjištěna přítomnost:

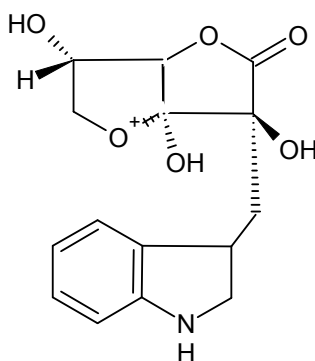
1. flavonoidů : kvercetin diglukosid, kaempferol diglukosid, kvercetin methyletherdiglucosid, kvercetin-3'-(6-sinapoyl-O-β-D-gluckopyranosyl)-3,4'-di-O-β-D-glukopyranosid, deriváty kaempferolu [5]
2. isothiokyanátů: butylisothiokyanát, 3-butenylisothiokyanát, 3-methylthiopropylisothiokyanát, 4-methylthiobutylisothiokyanát, 5-methylthiopentylisothiokyanát, hexylisothiokyanát, isohexylisothiokyanát [6]
3. nitrily: 5-methylhexanonitril, 4-methylthiobutanonitril, 2-pentanonitril, 6-methylthiohexanonitril, 5-methylthiopentanonitril [6]
4. těkavé aglykony: methyl-vanilát, fenylmethanol, benzylalkohol, eugenol, o-methoxyfenol [7].

### 2.2.3. Rozložení kyseliny askorbové v roketě seté

V brukvovitých rostlinách, mezi které řadíme roketu setou, najdeme kromě askorbové kyseliny také dehydroaskorbovou kyselinu a askorbigen.

Po prvních hodinách klíčení se v roketě seté začíná tvořit malé množství askorbové kyseliny, jejíž obsah roste až do rozkvětu a poté dochází k jejímu úbytku. Askorbová kyselina se nachází převážně v zelených částech rostliny [8]. Askorbigen (obr. 2) je vázaná forma askorbové kyseliny tj. přirozená forma jejího výskytu u rostlin brukvovitých [8]. Patří do skupiny glukosilátů [9].

Jedná se o látku neutrální, rozpustnou ve vodě a alkoholech. Naopak nezpustný je v chloroformu a benzenu [8].

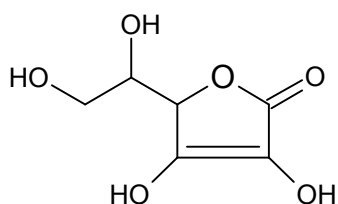


Obr. 2: Strukturální vzorec askorbigenu [10]

## 2.2. Kyselina L - askorbová

### 2.2.1. Historie kyseliny askorbové

Na začátku 20. století se badatelé Holst a Frölich ve svých studiích zabývali nově objevenou kyselinou, kterou pojmenovali hexuronová kyselina. Název vitamin C, pod kterým je tato kyselina známá pro širokou veřejnost, poprvé použil J. C. Drummond v roce 1920. Až v roce 1930, po první úspěšné izolaci, došlo k přejmenování hexuronové kyseliny na askorbovou (obr. 3).



Obr. 3: Strukturální vzorec askorbové kyseliny [11]

### 2.2.2. Charakteristika kyseliny askorbové

Askorbová kyselina (AA) patří mezi nejdůležitější vitaminy rozpustné ve vodě. Jedná se o organickou sloučeninu nutnou pro velké množství biochemických dějů [12].

Člověk, primáti a morčata si AA sami syntetizovat neumí, což je způsobeno mutací v genetickém kódu L-gulonolaktonoxidázy, enzymu nezbytného pro biosyntézu askorbové kyseliny [8]. Proto je nutné přijímat ji z potravy. Hlavními zdroji jsou převážně ovoce a zelenina (tab. 1) [13].

Tabulka 1: Obsah vitamínu C ve vybraných potravinách:

<b>Potravina</b>	<b>Obsah vitamínu C mg/1000 g jedl.pod.</b>	<b>Potravina</b>	<b>Obsah vitamínu C mg/1000 g jedl.pod.</b>
Paprika	1615	Mandarinky	346
Petržel – nať	1369	Maliny	225
Rybíz černý	1360	Rajčata	224
Brokolice	1130	Melouny, dýně	220
Křen	1125	Ananas žlutomasý	206
Jahody	618	Špenát zmrazený	205
Zelí červené	518	Zelí bílé kysané	134
Pomeranče	513	Brambory	126
Kedlubny bílé	448	Banány	99
Citrony	443	Salát hlávkový	81
Grapefruity	416	Cibule podzimní	69
Květák	383	Jablka	48
Ředkvičky	226	Broskve, blumy	36

Považením a dalšími kulinářskými úpravami potraviny rychle ztrácejí vitamin C. Nastává oxidace askorbové kyseliny na dehydroaskorbovou přenosem 2 elektronů [13]. Čas a světlo patří k dalším faktorům degradace AA [14].

Tato látka je nezbytná pro lidskou imunitu a psychiku, jelikož množství AA v těle se okamžitě snižuje během agrese, vzteku a rozčílení. Také v době nachlazení, v době chladu je potřeba zvýšit příjem vitamínu C. Pomocí pravidelného příjmu denní doporučené dávky vitamínu C lze dokonce nemocem předcházet [15].

Obecně platí, že vyšší příjem tohoto vitamínu mají mít kuřáci v jakémkoliv věku, protože i jedna cigareta dokáže zničit velké množství AA v těle, toto také platí pro období fyzické a psychické námahy, po úrazech, pro ženy v období těhotenství a při užívání antikoncepce [15].

### **2.2.3. Využití kyseliny askorbové**

Příjem kyseliny askorbové zvyšuje psychickou odolnost vůči stresu a zároveň posiluje imunitní systém, díky kterému se lidské tělo brání proti virům a mikroorganismům [15].

Ve formě askorbátu působí jako antioxidant, což znamená, že chrání tělo před nebezpečnými volnými radikály, které mohou způsobovat bujení rakovinových buněk. Dále vystupuje jako kofaktor enzymů při syntéze kolagenu a také se uplatňuje při přeměně dopaminu na noradrenalin [16].

Široké využití nachází AA v potravinářství (aditivum) a jako potravinový doplněk. V neposlední řadě dokáže zastoupit i kávu, osvěží a navíc prospěje našemu zdraví [15].

### **2.2.4. Fyzikálně chemické vlastnosti**

Jedná o bílou, krystalickou látku. Velmi dobře se rozpouští ve vodě, nižších alkoholech a dalších polárních rozpouštědlech [8].

L-askorbová kyselina, chemickým názvem  $\gamma$ -lakton kyseliny L-threo-hex-2-enové, je silnou redukující látkou, která se snadno oxiduje [11]. Její oxidovatelnost je ovlivňována koncentrací přítomného kyslíku a samotné AA, teploty a pH. Stálost roztoků AA klesá s poklesem koncentrace a zvýšením pH. Už při pH 3 - 4 a pH 4 - 5 existuje rozdíl v rychlosti oxidace AA a dále roste s hodnotou pH [8]. Oxidačním produktem je dehydroaskorbová kyselina a ve vázané formě se vyskytuje jako askorbigen. Oxidace AA je proces reversibilní, její oxidované formy lze vyredukovat zpět například pomocí plynného sirovodíku [8].

Ve vodě a vodných roztocích jsou disociační konstanty  $pK_1 = 4,17$  a  $pK_2 = 11,57$  [17].

V oblasti kyselého pH má kyselina askorbová optickou otáčivost:  $[\alpha]_D^{20} = +24^\circ$  [8].

### **2.2.5. Dávkování**

Na začátku tohoto tisíciletí proběhly epidemiologické studie, na jejichž základě byly stanoveny doporučené denní dávky vitamínu C. Tyto dávky se liší v různých zemích. Například doporučený denní příjem vitamínu C u mužů v USA činí 90 mg/den, v Německu, Rakousku a Švýcarsku 100 mg/den a v ČR byla stanovena tato dávka na hodnotu 75 mg/den [13]. Vhodnou dávku lze určit díky tomu, že lidský organismus nadbytečné množství vitamínu C vylučuje močí. Poté rozdíl mezi přijatým množstvím a

množstvím vyloučeným je doporučená denní dávka. Doporučené množství se zvyšuje v těhotenství, v době laktace až na 150 mg, u zřejmého skorbutu na 200 mg. Ke zvýšené potřebě dochází také při stresu a průjmech [8].

Nedostatek vitamínu C u dospělých jedinců způsobuje kurděje. Tato nemoc byla rozšířená mezi námořníky v době dlouhých plaveb a v době válek. U dětí je tato nemoc označována jako Möllerova – Barlowova [8].

### **2.2.6. Stabilizace**

Jelikož se askorbová kyselina snadno oxiduje, je třeba ji pro analýzy stabilizovat.

V minulosti bylo vyzkoušeno velké množství kyselin pro stabilizaci, například trichloroctová, octová, metafosforečná, šťavelová kyselina. Nejlepší vlastnosti pro stabilizaci vykazovala kyselina metafosforečná, která je ovšem drahá a obtížně získatelná. Proto byla hledána náhrada, kterou se stala šťavelová kyselina, jež poskytuje stabilní, snadno získatelný a levný extrakt. Obě tyto kyseliny díky své silné aciditě a také díky komplexotvorným i redukčním vlastnostem dobře stabilizují AA [18].

### **2.2.7. Metody stanovení**

Od objevení AA přibývají nové a nové metody, jak vitamin C stanovit. Mezi nejpoužívanější metody patří volumetrie, elektrochemické metody, vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a spektrofotometrie.

HPLC dnes patří mezi nejpoužívanější metody. Ale její hlavní nevýhodou je časová náročnost [12]. Jako stacionární fáze se používá C18 [19], slabý aniont NH<sub>2</sub> [20]. Mobilní fázi tvoří deionizovaná voda s přídavkem amoniové soli upravená na pH = 5 pomocí roztoku hydroxidu sodného nebo 1% mravenčí kyseliny [19], směs acetonitrilu s fosfátem a merkaptoetanolem popř. dithiotreitolu (poslední 2 látky se používají k potlačení oxidace askorbové kyseliny) [20]. K detekci se nejčastěji používají UV detektory [11] a elektrochemické detektory [21].

Spektrofotometrická metoda je založena na redukci iontů železitých na železnaté, pomocí 4-(2-pyridylazo)resorcinolu a následné extrakce *n*-butanolem. Měření absorbance probíhalo při vlnové délce 710 nm [22]. Další možnost představuje oxidace askorbové kyseliny bromem na dehydroaskorbovou kyselinu, která s 2,4-dinitrofenylhydrazinem tvoří barevný produkt [11].

Polarografie, která patří mezi elektrochemické metody, byla objevena Jaroslavem Heyrovským. Roku 1959 za ni získal Nobelovu cenu. Tato metoda je založena na elektrolýze mezi polarizovatelnou a nepolarizovatelnou elektrodou při plynulém zvyšování napětí [23]. Askorbová kyselina se chová jako endiol a poskytuje na rtuťové kapkové elektrodě ireversibilní dvouelektronovou anodickou vlnu [17]. Při stanovování AA se využívá měření výšky anodické vlny, která je přímo úměrná koncentraci AA v roztoku. Jinou metodu představuje kondenzace dehydroaskorbová kyselina v mírně kyselém prostředí s *o*-fenylendiaminem za vzniku derivátu chinoxalinu, který se redukuje na rtuťové kapkové elektrodě v jediné katodické vlně. V dalším podílu vzorku se stanoví AA po předchozí oxidaci roztokem 2,6-dichlorfenolindofenolu. Z rozdílu obou stanovení se vypočte množství AA [11].

Průtoková coulometrie je rychlá a nízkonákladová elektrochemická metoda. Ovšem během měření dochází k zanášení elektrody. U titrace se jedná o oficiální metodu [12]. Její podstatou je oxidace askorbové kyseliny na dehydroaskorbovou kyselinu [24]. Tyto dvě metody jsou podrobněji popsány v následujících odstavcích.

## **2.3. Volumetrie**

### **2.3.1. Charakteristika**

Volumetrie je analytická metoda, jejímž principem je stanovení množství určované látky z objemu spotřebovaného titračního činidla. Koncentraci analytu ve vzorku zjistíme z bodu ekvivalence.

Bod ekvivalence lze stanovit měřením potenciálu titrovaného roztoku nebo vizuálně, kdy dochází ke změně barvy roztoku v titrační baňce.

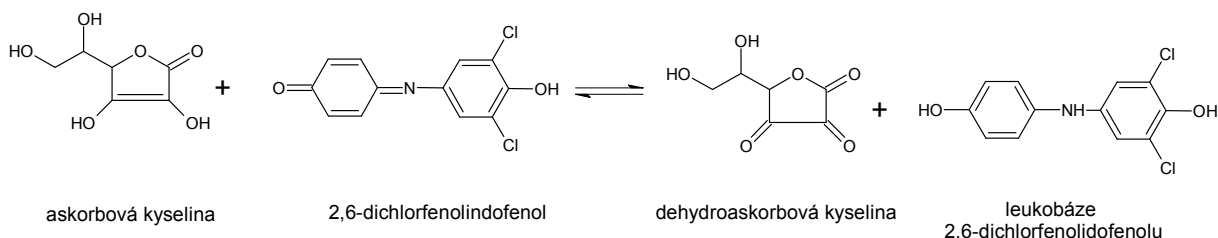
Dle probíhajících reakcí rozdělujeme titraci na neutralizační, oxidačně-redukční, srážecí a komplexotvorné [25].

### **2.3.2. Volumetrické stanovení askorbové kyseliny**

Při volumetrickém stanovování kyseliny askorbové se využívá oxidačně-redukční reakce, při níž dochází k oxidaci askorbové kyseliny na dehydroaskorbovou pomocí titračních činidel. Podstatou je výměna elektronů mezi titračním činidlem a

stanovovanou látkou. V tomto případě se jedná o oxidimetrii, kdy titrační činidlo analyt oxiduje [26].

Jako titrační činidlo se používá buď roztok 2,6-dichlorfenolindofenolu (obr. 4) a titruje se do slabě růžového zbarvení nebo se používá roztok jodu, kde se titruje na škorobový maz do modrofialového zbarvení [11].



Obr. 4: Oxidace kyseliny askorbové 2,6-dichlorfenolindofenolem [11]

## 2.4. Coulometrie

### 2.4.1. Historie

V Československu se tato metoda běžně používala ke stanovování organických látek mezi 50. a 80. léty minulého století. V 50. letech tuto metodu použili například F. Čůta se spolupracovníky pro stanovení vyšších mastných kyselin, fenolů, styrolu a methyloleátu.

Pospíšil, Kůta a Zutič byli jedni z mála, kteří se v 70. letech minulého století zabývali coulometrií. Studovali organické komplexy kobaltu chronocoulometricky.

V 80. letech tuto metodu používali J. Barek a A. Berka se spolupracovníky. Pomocí této metody stanovili např. hydrochinon, benzidin, azobenzenové deriváty a organická barviva [27].

### 2.4.2. Charakteristika

Coulometrii řadíme mezi elektrochemické metody. Jedná se o analytickou techniku, která je založena na elektrolýze [28].

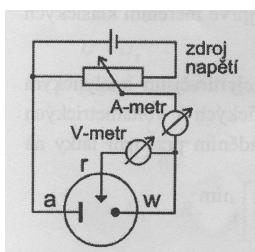
Při využití v anorganické stopové analýze nacházíme určité nevýhody, jako například složitější přípravu pevných vzorků, velký počet manuálních operací, spolehlivé stanovení jen pro určitou skupinu prvků a další. Pro tuto skupinu se upřednostňují jiné metody, jako například atomová absorbní spektrometrie (AAS).



Pokud tuto metodu ovšem použijeme pro stanovování organických látek, stává se z ní metoda rychlá a přesná. Při řádném měření můžeme považovat výsledky za přesné a správné. Navíc tato metoda umožňuje měřit malá látková množství a nízké koncentrace [28].

Podstatou coulometrie je kvantitativní přeměna stanovované látky, ke které dochází na pracovní elektrodě [29]. Sledujeme závislost proudu na čase. Z velikosti prošlého náboje je možné vypočítat množství stanovované látky za použití Faradayových zákonů [30].

Při přímé coulometrii udržujeme na pracovní elektrodě konstantní potenciál. Pracovní elektroda, na které dochází k oxidaci, je zapojena do tříelektrodového systému (obr. 5). Když je analyt odstraněn z roztoku, proud se sníží na nulu [31].



Obr. 5 Tříelektrodové uspořádání článku pro coulometrii za konstantního potenciálu:  $r$  - referenční elektroda,  $a$  - pomocnou elektroda,  $w$  - pracovní elektroda [29]

Pro výpočet se používá Faradayův zákon [28]:

$$n = \frac{Q}{zF} \quad (1)$$

kde  $z$  je počet vyměněných elektronů během elektrolýzy,  $Q$  - elektrický náboj spotřebovaný na elektrochemickou přeměnu látky,  $n$  - látkové množství,  $F$  - Faradayova konstanta, která je rovna  $96485,3415 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$ .

Náboj v čase  $t$  se určí z plochy pod  $i - t$  křivkou:

$$Q(t) = \int_0^t i(t) dt \quad (2)$$

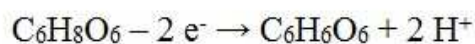
kde  $i(t)$  je proud v čase.

Existují způsoby jak urychlit elektrolýzu. Jednou z možností je zvětšit plochu elektrody, ovšem zvětší se nám také proudy pozadí. Existuje zde i možnost zmenšit

objem roztoku, ale tím pádem bude i nižší množství analytu a tím menší analytický využitelný signál [28].

Pokud jsou dodrženy všechny analytické postupy při odebrání vzorku, přípravě vzorku a samotném měření, získáváme dobře reprodukovatelné výsledky [28].

Jeden z možných postupů, jak stanovit coulometricky AA v tuhých vzorcích, je uveden v aplikačním listu firmy ISTRAN. Vytvoří se směs vzorku a 10 ml roztoku R-020T (0,1M-NaCl, 1ml/l TritonX100, 1g/l šťavelové kyseliny), která se dokonale rozmíchá. Poté se přidá 30 – 40 ml roztoku R-020T a roztok se přefiltruje nebo se podle potřeby odředí a proces se opakuje přidáním dalšího podílu roztoku R-020T. Nakonec se objem čirého roztoku doplní na 100 ml roztokem R-020T. Princip metody popisuje obr. 6. [32].



Obr. 6 Oxidace AA na dehydroaskorbovou kyselinu ztrátou 2 elektronů [32]

## **2.6. Validace**

### **2.6.1. Charakteristika**

Validace se definuje jako „proces, při němž se určuje vhodnost použití daného analytického systému pro získání relevantních dat.“ [33] Cílem validace analytického postupu je experimentálně ověřit předem definované analytické parametry a prokázat, že bylo dosaženo požadované úrovně těchto parametrů. Do validačních parametrů bývá zahrnut pracovní rozsah, mez detekce, mez stanovitelnosti, opakovatelnost, výtěžnost a robustnost [34]. Výsledkem validace analytického postupu je potvrzení, že daný postup splňuje požadavky na specifické zamýšlené použití [33].

### **2.6.2. Kalibrace (pracovní rozsah)**

Kalibrace je definována jako „soubor úkonů, kterými se stanoví za specifikovaných podmínek vztah mezi hodnotami veličin, které jsou indikovány měřicím přístrojem nebo měřicím systémem, hodnotami reprezentovanými ztělesněnou mírou nebo referenčním materiálem a odpovídajícími hodnotami, které jsou realizovány etalony.“ [33]

### **2.6.3. Mez detekce a mez stanovitelnosti**

Mez detekce bývá označována zkratkou LOD, pocházející z anglického názvu limit of detection. „Mezí detekce individuálního analytického postupu rozumíme obecně nejnižší množství analytu ve vzorku, které jsme schopni detekovat, ale které není nutně kvantifikovatelné jako exaktní hodnota.“ [33]

Mez stanovitelnosti (LOQ) z anglického názvu limit of quantification, chápeme jako „nejnižší množství analytu ve vzorku, které jsme schopni stanovit jako exaktní hodnotu se stanovenou přesností“. [33]

### **2.6.4. Opakovatelnost**

Jedná se o hodnocení preciznosti metody. Preciznost je definována jako „těsnost shody mezi naměřenými hodnotami veličiny získanými opakovanými měřeními na stejném objektu nebo na podobných objektech za specifikovaných podmínek“. [35]

### **2.6.5. Výtěžnost**

Pod pojmem výtěžnost se rozumí „schopnost měřicího postupu postihnout měřeným signálem veškerý analyt přítomný ve vzorku“. [33] Hodnoty výtěžnosti měření získané přidáním měřeného analytu ke vzorku měřeného materiálu kvantifikují vychýlení měření [34].

### 3. Experimentální část

#### 3.1. Použité chemikálie

Přehled použitých chemikálií je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2: Použité chemikálie

Název chemikálie	Vzorec	Mr	c [mol/l]	Čistota	Výrobce
Askorbová kyselina	$C_6H_{12}O_6$	176,12		p.a.	Penta
Šťavelová kyselina	$C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$	126,07		p.a.	Ing. Petr Lukeš
Kyselina chlorovodíková	HCl				
Chlorid sodný	NaCl	58,45		p.a.	Lachema
2,6-dichlorfenolindofenol	$C_{12}H_7O_2Cl_2N$	268		p.a.	Lachema
Hydroxid sodný	NaCl		0,2		
Ftalátový pufr $pH = 7 \pm 0,02^{při\ 20\ ^\circ C}$					Ústav sér a očkovacích látek
Ftalátový pufr $pH = 4 \pm 0,02^{při\ 20\ ^\circ C}$					Ústav sér a očkovacích látek
Kyselina metafosforečná	$HPO_3$	79,98		p.a.	Merck s.r.o.
Destilovaná voda					

#### 3.2. Použité přístroje a pomůcky

##### 1. pH metr

- WTW inboLab s kombinovanou skleněnou elektrodou SenTix 41
- WTW, Weilheim

##### 2. Coulometr (obr. 7)

- Elektrochemický analyzátor EcaFlow 120 GLP
- Istran, Bratislava
- Počítačový program: Ecaflow 2.3



Obr. 7: Coulometr

3. Centrifuga
  - Eppendorf, centrifuge 5702 (Hamburg, Německo)
4. Aparatura pro titrace
5. Analytické váhy
  - Mettler toledo, AB 204 (US)
6. Ultrazvuk
  - KRAINTEK 10 (Kraitek Czech s.r.o.)
7. Elektromagnetická míchačka
  - Laboratorní přístroje Praha, MM24
8. Běžné laboratorní sklo

### **3.3. Příprava roztoků**

#### **3.3.1. Základní elektrolyt pro coulometrii**

Připravila jsem si roztok o koncentraci  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  do litrové odměrné baňky. Tento roztok jsem poté upravila přidavkem koncentrované 35% HCl pomocí pH metru na  $\text{pH} = 3 (\pm 0,2)$ .

#### **3.3.2. Zásobní roztok askorbové kyseliny pro coulometrii**

Zásobní roztok AA o koncentraci 10 g/l jsem připravila navážením 0,250 g askorbové kyseliny, kvantitativním převedením do 25 ml odměrné baňky a doplněním destilovanou vodou po rysku. Takto připravený roztok byl během analýzy skladován v ledničce.

Pro kalibraci jsem tento roztok zředila 10krát na koncentraci 1 g/l: ze zásobního roztoku jsem pipetou odměřila 1 ml, převedla jej do 10 ml odměrné baňky a doplnila základním elektrolytem po rysku.

### **3.3.3. Kalibrační roztok askorbové kyseliny pro coulometrii**

Při přípravě kalibračního roztoku koncentrace 1 g/l jsem vždy odpipetovala 100  $\mu$ l zásobního roztoku do 100 ml odměrné baňky a doplnila základním elektrolytem po rysku.

### **3.3.4. Standardní roztok askorbové kyseliny pro titraci**

Byl připraven v koncentraci 0,0057 mol/l (1 g/l) navážením 0,0100 g krystalické AA, následným rozpuštěním v 10 ml odměrné baňce ve 2% roztoku metafosforečné kyseliny a doplněním po rysku destilovanou vodou.

### **3.3.5. Titrační činidlo 2,6-dichlorfenolindofenol**

Navázila jsem 0,1340 g 2,6-dichlorindofenolu a rozpustila ve 350 ml destilované vody. Následně jsem přidala 1 kapku hydroxidu draselného ( $c = 0,1$  mol/l). Takto připravený roztok jsem přefiltrovala přes skládaný papír a doplnila vodou do 500 ml odměrné baňky. Látková koncentrace odměrného roztoku byla přibližně  $4,53 \cdot 10^{-4}$  mol/l.

### **3.3.6. Roztoky 1% HCl a 10% HCl**

Tyto roztoky kyseliny jsem připravila zředěním z koncentrované 35% HCl.

Pro 1% HCl jsem odpipetovala 2,4 ml koncentrované HCl do 100 ml odměrné baňky.

Pro 10% HCl jsem odpipetovala 6,2 ml koncentrované HCl do 25 ml odměrné baňky.

## **3.4. Příprava rostlinného materiálu**

### **3.4.1. Podmínky pro pěstování analyzované rosety seté**

Roketa byla vypěstována ve Výzkumném ústavu zelinářském v Olomouci. Semena byla přepíchána do perlitu, po týdnu přesazeny do sadbovače s rašelinou Soběslav. Po zakořenění byly rostlinky přesazeny do kontejnerů, kde dorostly do dostatečné velikosti na analýzu.

### **3.4.2. Příprava rostlinného materiálu pro coulometrické stanovení**

Navázila jsem 1 g rosety seté s analytickou přesností. Tento rostlinný materiál jsem homogenizovala ve třecí misce, vždy po dobu 1 minuty, ke které jsem přidala

0,5 g pevné šťavelové kyseliny a 20 ml základního elektrolytu. Takto připravenou směs jsem převedla do kádinky (obr. 8) a doplnila 80 ml základního elektrolytu.



Obr. 8: Roztok roketky seté

Před analýzou jsem nechala roztok odstředit v centrifuze při 4400 ot/min na 10 minut (obr. 9 a 10). Zbytky listů ze supernatantu jsem oddělila přes vatou a získaný filtrát protlačila přes stříkačkový mikrofiltr do 100 ml odměrné baňky.



Obr. 9 a 10: Roztok obsahující roketku setou před odstředěním a po něm

U výtěžnosti jsem vzorek roketky připravila stejným postupem, pouze navíc jsem přidala 100  $\mu$ l zásobního roztoku (viz. kapitola 4.4.).

Pro zjištění, které pH je pro analýzu nejlepší, byl vzorek upraven stejným způsobem, pouze byl přidán základní elektrolyt o pH = 2 nebo pH = 4.

### 3.4.3. Příprava rostlinného materiálu pro titraci

Navážku 1,0033 g roketky jsem důkladně rozetřela se skleněnou vatou v porcelánové misce po dobu 1 minuty. K takto homogenizované směsi jsem přidala 10 ml 1% HCl a nechala 15 minut stát. Po uplynutí této doby jsem extrakt přefiltrovala přes skládaný

papírový filtr. Z filtrátu jsem odebrala 1 ml, převedla do titrační baňky, zředila 10 ml destilované vody a přidala 1 ml 10% HCl.

### **3.5. Postup měření**

#### **3.5.1. Coulometrie**

Před každým měřením jsem vyměnila filtr a odvzdušnila systém. Všechny přívodní hadičky jsem vsunula do nádoby se základním elektrolytem, jímž jsem provedla promytí celého systému. Dále jsem zvolila metodiku 36 (stanovení askorbové kyseliny) a zkontrolovala nastavení parametrů: napětí (počáteční 0 mV, konečné 800 mV), rozpouštěcí proud (50  $\mu$ A), objem odebíraného vzorku (3 ml), průtoková rychlost (5 ml), kalibrační mód a měření pozadí před každým novým vzorkem.

Žlutou přívodní hadičku pro vzorek jsem přemístila ze základního roztoku do odměrné baňky se standardním roztokem kyseliny askorbové o koncentraci 10 mg/l a následně spustila kalibraci přístroje. Po ukončení analýzy jsem vyhodnotila signál vhodným nastavením integračních mezí. Hadičku pro přívod vzorku jsem umístila do odměrné baňky s analytem a spustila měření vzorku. Po ukončení všech měření jsem nastavila integrační meze v chronopotenciogramu a vyhodnotila naměřené plochy píků daných vzorků.

Po ukončení všech měření jsem celý systém důkladně propláchla destilovanou vodou.

#### **3.5.2. Volumetrie**

Obsah titrační baňky z kapitoly 3.4.2. byl titrován odměrným roztokem a 2,6-dichlorfenolindofenolu do slabě růžového zbarvení, které bylo stálé nejméně po dobu 30 s.

Pro zjištění přesné koncentrace titračního činidla jsem odpipetovala 1 ml standardního roztoku kyseliny askorbové 0,0057 mol/l, ke kterému jsem přidala 10 ml destilované vody a 1 ml 10% HCl. Obsah baňky jsem titrovala do světle růžového zbarvení, které bylo stálé po dobu 30 s.



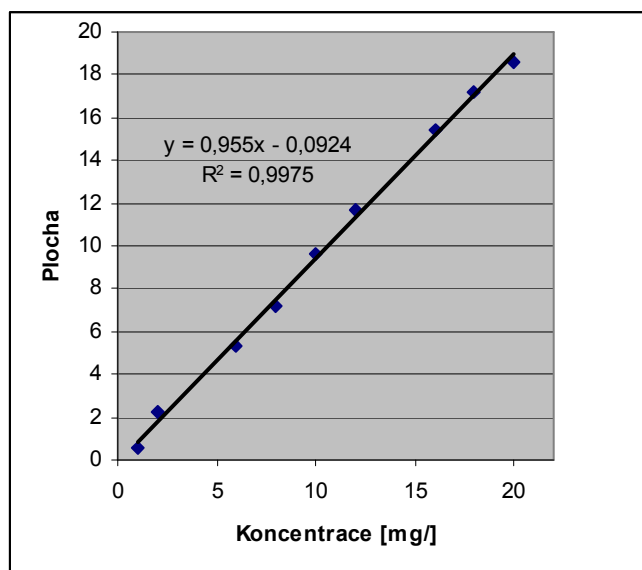
## 4. Výsledky a diskuze

### 4.1. Kalibrace (pracovní rozsah)

Kalibrační křivku jsem vytvořila pomocí softwaru MS Excel. Jedná se o závislost plochy chronopotenciometrického píku na koncentraci kalibračních roztoků. Kalibrace byla provedena v rozpětí 1 – 20 mg/l z jednoho zředěného zásobního roztoku standardu askorbové kyseliny. Plocha píku po integraci odpovídá vypočítané koncentraci v mg/l. Kalibrační data jsou uvedena v tabulce 3.

Tabulka 3: Data ke kalibrační křivce askorbové kyseliny

<b>Dávkované množství zásobního roztoku (1 g/l) do 50 ml</b>	<b>Koncentrace standardu AA [mg/l]</b>	<b>Plocha píku</b>	<b>Vypočítaná koncentrace [mg/l]</b>
1	20	18,642	19,6172
0,9	18	17,157	18,0622
0,8	16	15,456	16,2811
0,6	12	11,691	12,3386
0,5	10	9,668	10,2203
0,4	8	7,178	7,6130
0,3	6	5,359	5,7083
0,1	2	2,261	2,4643
0,05	1	0,5717	0,6954



Obr. 11: Kalibrační křivka kyseliny askorbové

Kalibrační model (viz. obr. 11) byl lineární s následujícími parametry: směrnice 0,9550 l/mg (směrodatná odchylka 0,0182 l/mg), absolutní člen -0,0924 (směrodatná odchylka 0,2212), korelační koeficient 0,9987. Tyto hodnoty byly vyhodnoceny pomocí aplikace QC Expert. Absolutní člen modelu je statisticky nevýznamný.

V rámci kalibrace byla otestována také homogenita rozptylů krajních bodů kalibrační přímky pomocí  $F$  - testu. Což je další podmínka linearity.

$$F = \frac{s_2^2}{s_1^2} \quad (3)$$

$s$  – směrodatné odchylky krajních bodů

Rovnici jsem zvolila dle velikosti hodnot. Do čitatele jsem dostadila větší hodnotu. Kritickou hodnotu  $F$  (0,05;  $n - 1$ ;  $n - 1$ ) jsem stanovila pomocí softwaru MS Excel.

Všechny proměřované koncentrace ležely v lineární oblasti.

Po odměření byla otestována homogenita rozptylů, pomocí  $F$  – testu. Byla splněna podmínka  $F \leq F_{krit}$  ( $1,0900 \leq 5,0503$ ) a tím je potvrzena hypotéza o rovnosti rozptylů.

## 4.2. Mez detekce a mez stanovitelnosti

Pro stanovení meze detekce (LOD) jsem použila kalibrační závislost (kapitola 4.1.). Z 9 naměřených kalibračních hodnot uvedených v tabulce 4 jsem stanovila směrnici kalibrační přímky a směrodatnou odchylku, pomocí nichž jsem dopočítala LOD a LOQ ze vztahů:

$$LOD = \frac{s_b}{a} \cdot 3 \quad (4)$$

$$LOQ = \frac{s_b}{a} \cdot 10 \quad (5)$$

$s_b$  – směrodatná odchylka úseku,  $a$  – směrnice kalibrační přímky

Tabulka 4: Data k určení meze detekce a meze stanovitelnosti

Koncentrace standardního roztoku [mg/l]	Plocha píku
20	18,642
18	17,157
16	15,456
12	11,691
10	9,668
8	7,178
6	5,359
2	2,261
1	0,5717

Pro vyhodnocení jsem použila software QC Expert. Přímou metodou signálu, IUPAC byly zjištěny hodnoty meze detekce 1,4 mg/l a mez stanovitelnosti 2,1 mg/l.

V případě výpočtu podle vzorců (4) a (5) je LOD rovno 0,7 mg/l a LOQ 2,2 mg/l.

## 4.3. Opakovatelnost

V rámci tohoto parametru byla sledována jednak opakovatelnost měření AA coulometrickou metodou se dvěma roztoky standardu AA o koncentracích 8 mg/l a 10 mg/l (tabulka 4), jednak opakovatelnost celého analytického postupu (tabulka 5) zahrnujícího přípravu rostlinného materiálu, jeho navážení, homogenizaci, extrakci,

dvojstupňovou filtraci a přípravu definovaného objemu analytického vzorku. Celý postup přípravy vzorku byl opakován celkem 5krát. Příprava vzorků i jejich měření bylo provedeno v jeden pracovní den.

Tabulka 5: Data z měření standardů

Číslo opakování	Plocha píků	
	8 mg/l	10 mg/l
<b>1</b>	7,189	9,668
<b>2</b>	7,202	9,723
<b>3</b>	7,182	9,756
<b>4</b>	7,184	9,754
<b>5</b>	7,213	9,753
<b>Průměr</b>	<b>7,194</b>	<b>9,7308</b>
<b>Směrodatná odchylka</b>	<b>13,17</b>	<b>37,65</b>
<b>Relativní směrodatná odchylka [%]</b>	<b>0,18</b>	<b>0,39</b>

Tabulka 6: Data z měření reálného vzorku

Hmotnost salátu	Plocha píku [mg/l]	AA [mg/g]
1,0385	8,3617	0,8052
0,9963	9,4516	0,9487
1,0479	7,6974	0,7346
0,9983	8,1170	0,8131
0,9902	9,0295	0,9119
1,0524	8,2711	0,7859
1,0335	8,8292	0,8543
1,0240	7,8440	0,7660
1,0335	8,8292	0,8543
1,0240	7,8434	0,7660
<b>Průměr</b>		<b>0,8240</b>
<b>Směrodatná odchylka</b>		<b>0,07</b>
<b>Relativní směrodatná odchylka [%]</b>		<b>8,27</b>

V rámci tohoto parametru jsem zjistila, že chyba v rámci měření je zanedbatelná, což vyplývá při porovnání tabulek 5 a 6. Při přípravě reálného vzorku nastává chyba při homogenizaci vzorku, kdy různé listy obsahují odlišné množství askorbové kyseliny.

#### **4.4. Výtěžnost**

Nejprve byly proměřeny 2 vzorky salátu bez přídavku zásobního roztoku (tabulka 7) a poté 3 vzorky salátu s přídavkem 100 µl zásobního roztoku (tabulka 8). Konkrétní navážky a obsahy AA jsou uvedeny v následujících tabulkách.

Tabulka 7: Data z měření nespikovaného vzorku

	<b>Koncentrace AA [µg/100 ml]</b>	<b>Obsah AA [µg/g]</b>
1,0034 g	791	788,3197
1,0034 g	801	798,2858
<b>Průměr</b>		<b>793,3028</b>
1,0045 g	830	826,2817
1,0045 g	808,2	804,5794
1,0045 g	816,2	812,5436
<b>Průměr</b>		<b>814,4683</b>
<b>Průměrný obsah AA</b>		<b>803,8855</b>
<b>STD</b>		<b>14,3900</b>

Tabulka 8: Data z měření spikovaného vzorku

	<b>Koncentrace AA</b> <b>[<math>\mu\text{g}/100\text{ ml}</math>]</b>	<b>Obsah AA</b> <b>[<math>\mu\text{g}/\text{g}</math>]</b>
1,0060 g	1716,9	1706,6600
1,0060 g	1864,1	1852,9821
<b>Průměr</b>	1790,5	<b>1779,8211</b>
1,0059 g	1810,5	1799,8807
<b>Průměr</b>	1810,5	<b>1799,8807</b>
1,0060 g	1681,7	1671,6700
1,0060 g	1615,5	1605,8648
<b>Průměr</b>	1716,9	<b>1638,7674</b>
<b>Průměrný obsah AA</b>		<b>1739,4897</b>
<b>STD</b>		<b>99,1604</b>

Tabulka 9: Data pro stanovení výtěžnosti

<b>Plocha nespikovaného</b> <b>vzorku [<math>\mu\text{g}/\text{g}</math>]</b>	<b>Plocha spikovaného</b> <b>vzorku [<math>\mu\text{g}/\text{g}</math>]</b>	<b>Rozdíl</b>	<b>Výtěžnost</b> <b>[%]</b>	<b>STD</b>
803,89	1739,49	935,6	<b>93,56</b>	10,02

U přídatku 100  $\mu\text{l}$  je výtěžnost 93,56 %. Tato hodnota byla zjištěna odečtením naměřených hodnot nespikovaného vzorku od spikovaného vzorku 100  $\mu\text{l}$  (tabulka 9) a podělením 1000  $\mu\text{g}$ , což byl přídatok AA. Hodnotu jsem přepočítala na procenta. Směrodatná odchylka činila 10,02 %.

#### **4.5. Volumetrie**

Před samotnou titrací vzorku jsem provedla standardizaci na standardní roztok askorbové kyseliny. Tabulka 10 obsahuje spotřebu titračního činidla nejprve na standardní roztok a následně na analyt.

Tabulka 10: Data pro vyhodnocení volumetrie

	<b>Objem DCFIF [ml] na standardní roztok</b>	<b>Objem DCFIF [ml] na analyt</b>
<b>1</b>	12,6	1,1
<b>2</b>	12,6	1,1
<b>3</b>	12,5	1,0
<b>Průměr</b>	<b>12,57</b>	<b>1,066</b>

Přesná koncentrace 2,6-DCFIF:

$$c_{AA} = \frac{m_{AA}}{M_{AA} \cdot V_{AA}} = \frac{0,01}{176,12 \cdot 0,01} = 0,0057 \text{ mol/l} \quad (6)$$

$$c_{DCFIF} = \frac{n_{AA}}{V_{DCFIF}} = \frac{0,0057}{12,57} = 4,5207 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l} \quad (7)$$

Hmotnost AA v 1 g salátu:

$$m = \frac{c_{DCFIF} \cdot V_{DCFIF} \cdot M_r \cdot 10}{1,033} = \frac{4,5207 \cdot 10^{-4} \cdot 1,066 \cdot 176,12 \cdot 10}{1,033} = 0,8221 \text{ mg/g} \quad (8)$$

Vzorek byl titrován do světle růžového zbarvení, které bylo stálé po dobu 30 sekund. Volumetricky byl stanoven obsah vitamínu C v roketě na 0,8221 mg v 1 g salátu.

#### **4.6. Porovnání coulometrie s volumetrií**

Coulometrie byla porovnána s běžně používanou titrací (tabulka 11), aby byla zjištěno, zda poskytuje odpovídající výsledky.

Pro porovnání je brán coulometrický výsledek zjištěný při výtěžnosti.

Tabulka 11: Data pro srovnání volumetrie a coulometrie

	$\bar{x}$	<i>s</i>	<i>n</i>
<b>Volumetrie</b>	0,8221	0,058	3
<b>Coulometrie</b>	0,8039	0,144	5

Nejprve byla zkontrolována homogenita rozptylů *F*-testu na hladině významnosti 5 % pomocí softwaru MS Excel. Jelikož  $F \leq F_{krit}$  ( $6,164 \leq 19,247$ ).

Za tohoto předpokladu jsem testovala hypotézu, že 2 nezávislé veličiny jsou shodné. Tato hypotéza platila, jelikož  $t < t_{krit}$  ( $0,204 < 2,447$ ). Pro výpočet jsem použila software QC Expert.

Coulometrii tedy můžeme považovat za spolehlivou metodu pro měření AA v rostlinném materiálu.



## 5. Závěr

V rámci této bakalářské práce jsem stanovila množství askorbové kyseliny v roketě seté (*Eruca Sativa*) průtokovou coulometrií, dále tuto metodu porovnávala s oficiální metodou pro stanovení vitamínu C (volumetrií) a stanovila některé validační parametry. Těmito parametry byly pracovní rozsah, mez detekce a mez stanovitelnosti, opakovatelnost a výtěžnost.

V rámci pracovního rozsahu byla pomocí softwaru MS Excel a statistického softwaru TriloByte QC.Expert 2.7 zjištěna linearita v koncentračním rozsahu 1 - 20 mg/l askorbové kyseliny. Z naměřených hodnot jsem pomocí softwaru QC Expert stanovila mez detekce na hodnotu 1,4 mg/l, mez stanovitelnosti 2,1 mg/l a dosazením do vzorců (4) a (5) bylo LOD 0,7 mg/l a LOQ 2,2 mg/l. Při měření opakovatelnosti standardního roztoku 10 mg/l činila relativní směrodatná odchylka 0,39 % a u 8 mg/l dokonce jen 0,18%, zatímco u reálného vzorku dosahovala 8,27 %. Z čehož vyplývá, že největší vliv na variabilitu výsledků má příprava analytického vzorku, který zahrnuje jeho homogenizaci, extrakci s dvoustupňovou filtrací. Výtěžnost metody byla  $93,56 \% \pm 10,02 \%$ .

Pro porovnání, zda coulometrie dává spolehlivé výsledky, byla použita volumetrie jako oficiální metoda, pomocí níž jsem stanovila množství vitamínu C na 0,8221 mg v 1 g salátu.

Při porovnání výsledků obou metod mohu potvrdit, že coulometrie je metoda vhodná a spolehlivá pro stanovení vitamínu C v roketě seté, jelikož splnila podmínku, že rozdíly výsledků dvou nezávislých stanovení jsou statisticky nevýznamné, což plyne z  $F$  - testu a toto tvrzení platilo po otestování Studentova  $t$ -rozdělení.

Roketa setá má vysoké množství vitamínu C, řadíme ji mezi křen (1,125 mg/g) a jahody (0,618 mg/g), jelikož obsahuje 0,8039 mg/g vitamínu C. A dokonce obsahuje téměř dvojnásobné množství askorbové kyseliny než citrón (0,443 mg/g).

## 6. Summary

In this thesis, I determined the amount of ascorbic acid in rocket (*Eruca sativa*) by flow – trough coulometry. For comparison, if coulometry gives reliable results, I used volumetry like the official method. I evaluated the selected validation parameters (linearity, limit of detection, limit of quantification, repeatability and bias).

Using the software TriloByte QC.Expert 2.7 linearity was determined in the concentration range 1 – 20 mg/l of AA. Using the software limit of determination was determined 1,4 mg/l, limit of quantification 2,1 mg/l, using formula (4) was LOD 0,7 mg/l and formula (5) was LOQ 2,2 mg/l. Repeatability of standard solution 10 mg/l was standard deviation 0,39 %, 8 mg/l even only 0,18 %, while the real sample amounted to 8,27 %. So preparation of analytical sample, including its homogenization and extraction with two-stage filtration, has the greatest influence on the variability. Yield of method was  $93,56 \% \pm 10,02 \%$ . For comparison, whether coulometry gives reliable results, volumetry was used as an official method. Using volumetry I determined the amount of vitamin C to 0,8221 mg in 1 g of rocket.

When comparing the results of the both methods, I can confirm that coulometry is a suitable and reliable method for the determination of vitamin C in rocket. Because coulometry provides the same results as volumetry on the significance level of 5 %.

Rocket has a high amount of vitamin C. It belongs between horseradish (1,125 mg/g) and strawberries (0,618 mg/g) because rocket contains 0,8039 mg/g of vitamin C. It is almost twice the amount of ascorbic acid than lemon (0,443 mg/g).

## 7. Literatura

1. <http://www.biolib.cz/cz/taxonposition/id39233/>, staženo 23. 8. 2011
2. Rani I., Akhund S., Suhail M. and Abro H.: Pakistan J Bot 42, 2949 – 2953, (2010).
3. [http://www2.zf.jcu.cz/~moudry/database/Roketa\\_seta.htm](http://www2.zf.jcu.cz/~moudry/database/Roketa_seta.htm), staženo 23.8. 2011
4. Jin J., Koroleva O. A., Gibbon T., Swanston J., Magan J., Zhang Y., Rolland I. R.: J Agr Food Chem 57, 5227 (2009).
5. HEIMLER D., ISOLANI L., VIGNOLINI P., TOMBELLI S., ROMANI A.: J Agr Food Chem 55, 1724 (2007).
6. Miyazawa M., Maehara T., Kurose K.: Compositon of the Essentials oil from the leaves of *Eruca sativa*, Flavour Fragr J 17, 187 – 190, (2002).
7. Blažević I., Mastelić J.: Free and bound volatiles of rocket (*Eruca sativa* Mill.), Flavor Fragr J 23, 278 – 285 (2008).
8. Šantavý F., Protiva M., Hebký J. a kolektiv: *Vitaminy, jejich chemie a biochemie*. Československá akademie věd, Praha 1961.
9. Wagner A. E., Rimbach G.: Ascorbigen: chemistry, occurrence, and biologic properties, Clin Dermatol 27, 217 – 224 (2009).
10. Hrnčirik K., Valusek J., Velisek J.: Investigation of ascorbigen as a breakdown produkt of glucobrassicin autolysis in Brassica vegetables, Eur Food Res Technol 212, 576 – 581, (2001).
11. Buriánek T., Hamerský S.: *Analýza potravin*. MZLU v Brně, Brno 2006.
12. Pénicaud C., Peyron S., Bohuon P., Gontard N., Guillard V.: Ascorbic acid in food: Development of a rapid analysis technique and application to diffusivity determination, Food Res Int 4, 838 - 847 (2010).
13. Hlúbik P., Oporová L.: *Vitaminy*. Grada Publishing, Praha 2004.
14. Antonelli M. L., D'Ascenzo G., Lagana` A., Pusceddu P.: Food analyses: a new calorimetric method for ascorbic acid (vitamin C) determination, Talanta 58, 961 - 967 (2002).
15. Jordán V., Hemzalová M.: *Antioxidanty zázračné zbraně, vitaminy, minerály, stopové prvky, aminokyseliny a jejich využití pro zdravý život*. JOTA, Brno 2001.

16. Štípek S. a kolektiv: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. Grada Publishing, Praha 2000.
17. Knobloch E.: *Fyzikálně chemické metody stanovení vitaminů*. Nakladatelství Československé akademie věd, Praha 1956.
18. Ponting J.D.: Extraction of Ascorbic Acid from Plant Materials, *Ind Eng Chem* 15, 389 – 391, (1943).
19. Sood, S. P., Sartori L. E., Wittmer D. P., Haney W. G.: High-Pressure Liquid chromatographic Determination of Ascorbic Acid in Selected Foods and Multivitamin Products, *Anal chem* 48, 796 – 798, (1976).
20. Vávrová J. a spolupracovníci: *Vitaminy a stopové prvky*, Česká společnost klinické biochemie, Pardubice, 2007.
21. Wilson Ch. W., Shaw P. E.: High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Ascorbic Acid in Aseptically Packaged Orange Juice Using Ultraviolet and Electrochemical Detectors, *J Agric Food Chem* 35, 329 – 331, (1987).
22. Arya S.P., Mahajan M., Jain P.: Spectrophotometric determination of vitamin C with iron (II)-4-(2-pyridylazo)resorcinol complex, *Anal chim acta* 427, 245 (2001).
23. Novotný V.: *Fyzikální chemie pro 3. ročník středních průmyslových škol chemický a s chemickým zaměřením*. SNTL, Praha 1984.
24. Novotný F.: *Metodiky chemických rozborů pro hodnocení kvality odrůd II*. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno 2006.
25. Voříšek J. a kol.: *Analytická chemie*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha 1965.
26. Garaj J., Bustín D., Hladký Z.: *Analytická chemia*. ALFA, Bratislava 1987.
27. Jindra J.: *Dějiny elektrochemie v českých zemích 1882 – 1989*. Libri, Praha 2009.
28. Čakrt M. a kolektiv: *Elektroanalytické metody, sborník přednášek z kurzu*. 2 THETA, Český Těšín 2001.
29. Barek J., Opekar F., Štulík K.: *Elektroanalytická chemie*. Karolinum, Praha 2005.
30. Bartušek M.: *Úvod do elektroanalytických metod*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1984.

31. Trojanowicz M.: *Flow injection analysis*, World Scientific Publishing, Singapore 2000.
32. Istran, s.r.o.: Aplikační list č. 36: Stanovenie kyseliny askorbovej. Istran, Bratislava 2011.
33. Suchánek M., Plzák Z., Šubrt P., Koruna I.: *Validace analytických metod*. EURACHEM-ČR, Praha 1997.
34. Friedecký B., Šprongl L., Kratochvíla J., Plzák Z.: Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích. *Klinická biochemie a metabolismus*, 2011, 36-44.
35. Plzák Z., Milde D.: Názvosloví v oblasti metrologie a zabezpečování kvality. *Chem. Listy* 106, 41-44, 2012.