

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie

**Porovnání metod stanovení askorbové kyseliny v rostlinném materiálu**

Olomouc 2012



## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce:

Simona Suparičová

Obor:

Management v chemii

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně a veškeré zdroje, ze kterých jsem čerpala, jsou uvedeny v seznamu literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry fyzikální chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne .....

.....

Simona Suparičová

Poděkování:

Tímto děkuji vedoucí práce paní RNDr. Janě Skopalové, Ph.D. za cenné rady a připomínky, které mi pomohly při tvorbě této práce. Dále pak děkuji RNDr. Robertu Pruckovi, Ph.D. který mi pomáhal při završení této práce. Velké poděkování patří mým rodičům, kteří mi umožnili studovat na vysoké škole, mému příteli a nejlepší kamarádce za jejich rady a psychickou podporu.

### **Bibliografická identifikace:**

|                          |                                                                                                                                       |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Jméno a příjmení autora: | Simona Suparičová                                                                                                                     |
| Název práce:             | Porovnání metod stanovení askorbové kyseliny<br>v rostlinném materiálu                                                                |
| Typ práce:               | Bakalářská                                                                                                                            |
| Pracoviště:              | Katedra fyzikální chemie                                                                                                              |
| Vedoucí práce:           | RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.                                                                                                           |
| Rok obhajoby práce:      | 2012                                                                                                                                  |
| Abstrakt:                | Cílem práce bylo stanovit askorbovou kyselinu<br>v salátu rožka setá ( <i>Eruca sativa</i> ) a porovnat<br>použité analytické metody. |
| Klíčová slova:           | rožka setá ( <i>Eruca sativa</i> ), askorbová kyselina                                                                                |
| Počet stran:             | 37                                                                                                                                    |
| Jazyk:                   | Čeština                                                                                                                               |

**Bibliographical identification:**

Author's first name and surname: Simona Suparičová  
Title: A comparison of methods for determination of ascorbic acid in plant material  
Department: Department of Analytical Chemistry  
Type of thesis: Bachelor  
Supervisor: RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.  
The year of presentation: 2012  
Abstract: The aim of this work was to determine ascorbic acid in rocket (*Eruca sativa*) and compare the analytical methods used.  
Keywords: rocket (*Eruca sativa*), ascorbic acid  
Number of pages: 37  
Language: Czech

# OBSAH

|                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| SEZNAM ZKRATEK .....                                                                           | 7  |
| 1. ÚVOD .....                                                                                  | 8  |
| 2. TEORETICKÁ ČÁST .....                                                                       | 9  |
| 2. 1. Brukvovité (Brassicaceae) .....                                                          | 9  |
| 2. 1. 1. Roketa setá ( <i>Eruca sativa</i> ) .....                                             | 9  |
| 2. 2. L-askorbová kyselina (vitamin C) .....                                                   | 11 |
| 2. 2. 1. Historie .....                                                                        | 11 |
| 2. 2. 2. Fyzikálně-chemické vlastnosti askorbové kyseliny .....                                | 11 |
| 2. 2. 3. Význam pro člověka .....                                                              | 12 |
| 2. 2. 4. Askorbová kyselina v potravě .....                                                    | 13 |
| 2. 3. Metody stanovení vitamínu C .....                                                        | 14 |
| 2. 3. 1. Odměrná analýza - volumetrie .....                                                    | 14 |
| 2. 3. 2. Průtoková coulometrie .....                                                           | 15 |
| 2. 3. 3. Polarografie .....                                                                    | 15 |
| 2. 3. 4. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie .....                                          | 16 |
| 2. 3. 5. Papírová chromatografie .....                                                         | 17 |
| 2. 3. 6. Spektrofotometrie .....                                                               | 17 |
| 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....                                                                   | 19 |
| 3. 1. Použité chemikálie a roztoky .....                                                       | 19 |
| 3. 1. 1. Chemikálie .....                                                                      | 19 |
| 3. 1. 2. Použité roztoky .....                                                                 | 20 |
| 3. 2. Pomůcky a přístroje .....                                                                | 21 |
| 3. 3. Popis vzorku .....                                                                       | 21 |
| 3. 4. Příprava a analýza vzorku roket seté ( <i>Eruca sativa</i> ) .....                       | 22 |
| 3. 4. 1. Stanovení AA v rostlinném materiálu metodou HPLC .....                                | 22 |
| 3. 4. 2. Elektrochemické stanovení AA v rostlinném materiálu .....                             | 24 |
| 3. 4. 3. Volumetrické stanovení AA v rostlinném materiálu s vizuální indikací .....            | 25 |
| 3. 4. 4. Volumetrické stanovení AA v rostlinném materiálu s potenciometrickou indikací .....   | 26 |
| 4. VÝSLEDKY .....                                                                              | 27 |
| 4. 1. Stanovení AA v roketě seté metodou HPLC .....                                            | 27 |
| 4. 2. Stanovení AA v roketě seté průtokovou coulometrií .....                                  | 29 |
| 4. 3. Volumetrické stanovení AA v roketě s vizuální a potenciometrickou indikací .....         | 29 |
| 4. 3. 1. Standardizace odměrného roztoku DFIF .....                                            | 29 |
| 4. 3. 2. Stanovení askorbové kyseliny ve vzorcích roket seté .....                             | 30 |
| 4. 4. Statistické porovnání výsledků .....                                                     | 31 |
| 4. 4. 1. Porovnání výsledků volumetrických metod s vizuální a potenciometrickou indikací ..... | 31 |
| 4. 4. 2. Porovnání volumetrie s vizuální indikací a průtokové coulometrie .....                | 32 |
| 5. ZÁVĚR .....                                                                                 | 33 |
| 6. SUMMARY .....                                                                               | 34 |
| 7. LITERATURA .....                                                                            | 35 |

## SEZNAM ZKRATEK

|      |   |                                        |
|------|---|----------------------------------------|
| HPLC | - | vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| DFIF | - | 2,6-dichlorfenolindofenol              |
| AA   | - | askorbová kyselina                     |
| DHAA | - | dehydroaskorbová kyselina              |
| PC   | - | osobní počítač                         |
| C18  | - | oktadecylsilikagelová stacionární fáze |
| CTAB | - | N-cetyl-N,N-trimethylamonium bromid    |

# 1. ÚVOD

Člověk už dávno nežije v harmonickém vztahu s přírodou. 21.století je dobou plnou moderních technologií, stresu a spěchu. Člověk neustále někam spěchá, ať už do práce, školy či na nákupy. Nejen manažeři velkých firem, ale i zaměstnanci, studenti vysokých a středních škol a žáci základních škol jsou v neustálém shonu a denně prožívají mnoho stresových situací.

Stres je jedním z hlavních faktorů ovlivňujících naše zdraví. Stále rezistentnější bakterie napadají náš imunitní systém a naše oslabené, unavené tělo se jen stěží brání. Potřebné vitaminy tělu dodáváme především chemickými preparáty. Ovšem jako hlavní zdroje vitaminů bychom měli zachovat ovoce a zeleninu. Abychom chemické preparáty mohli dostatečně nahradit přírodními vitaminy, jsou na hospodářské plodiny kladeny stále větší nároky. Převážně na jejich výživové vlastnosti, mezi ně patří i dostatečný obsah L-askorbové kyseliny (vitaminu C).

L-askorbová kyselina má bohaté antioxidační účinky, které chrání tělo před volnými radikály a posiluje jeho imunitní systém.[1] Její zvýšený příjem je vyžadován při stálém psychickém stresu.[2]

Cílem této práce bylo stanovit kyselinu askorbovou v rostlinném materiálu, konkrétně v roketě seté (*Eruca sativa*), jelikož rostliny z čeledi *Brassicaceae* jsou bohatým zdrojem askorbové kyseliny.[10] Stanovení byla prováděna za využití rozličných analytických metod v letních a podzimních odrůdách rockety seté. Dalším cílem bylo statistické porovnání výsledků získaných pomocí vybraných analytických metod s výsledky standardní metody používané pro stanovení askorbové kyseliny (volumetrie s vizuální indikací).



## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2. 1. Brukvovité (*Brassicaceae*)

Taxonomické rozdělení čeledi *Brassicaceae* je uvedeno v tabulce 1. Tato čeleď zahrnuje přes 350 rodů a 3500 druhů jednoletých bylin.[2] Relativně mladá čeleď vznikla nejspíše v třetihorách z blízkých čeledí Kaparovitých (*Capparaceae*) v mírném pásu severní polokoule.[4] Rostliny jsou přizpůsobivé a dají se pěstovat ve všech ročních obdobích.

Tabulka 1: Botanické zařazení

|           |                                    |
|-----------|------------------------------------|
| Říše:     | Rostliny                           |
| Podříše:  | Cévnaté rostliny                   |
| Oddělení: | Krytosemenné                       |
| Třída:    | Vyšší dvouděložné                  |
| Řád:      | Brukvotvaré ( <i>Brassicales</i> ) |
| Čeleď:    | Brukvovité ( <i>Brassicaceae</i> ) |

Mnohé druhy rostlin z čeledi *Brassicaceae* patří mezi významné zemědělské plodiny, které hrají podstatnou roli v lidské výživě. Řadí se k nim oblíbené druhy zeleniny jako brukev, ředkev, ředkvička, květák, kedlubna, zelí, dále pochutiny jako křen, česnek a olejová semena řepky a hořčice polní.[2]

Energetická hodnota rostlin se pohybuje mezi 24-34 kal/100 g, z toho 1,44-2,82 kal/100 g připadá na bílkoviny, 0,12-0,37 kal/100 g na tuky a asi 2,5 kal/100 g na vlákninu.[2] *Brassicaceae* jsou příznačné přítomností glukosinolátů (hořčičné glykosidy), sirných sloučenin a enzymu myrosinázy v idioblastech. Při porušení pletiv dochází ke styku těchto látek, uvolní se glukóza a hořčičné silice, charakteristické ostrou dráždivou až pálivě štiplavou vůní. Nejrozšířenějšími glukosinoláty jsou sinigrin, synalbin a glukokochlarin.[4] *Brassicaceae* jsou také bohaté na minerální látky (K, Ca, Mg, P), vitaminy (C, E, K) a karotenoidy ( $\beta$ -karoten, lutein, zeaxantin).[5]

#### 2. 1. 1. Roketa setá (*Eruca sativa*)

*Eruca sativa* známou jako roketa setá řadíme do čeledi *Brassicaceae*. Jedná se o jednoletou bylinu dorůstající výšky 20-100 cm. Listy jsou lyrovitě zaoblené, porostlé jednoduchými nebo větvenými trichomy, střídavě umístěné na stonku. Květ je 2-4 cm velký čtyřčetný s chocholičnatým květenstvím, krémově až světle žlutě zbarven

s hnědofialovými žilkami (obr. 1). Plodem je šešule, semena jsou drobné hnědě až načervenalé zbarvené kuličky uspořádané ve dvou řadách.



Obrázek 1: *Eruca sativa* [7]

Roketa pochází z oblasti Středozemního moře v jihozápadní Asii. Jako plevel se rozšířila do Evropy, centrální Asie a severní Indie, kde zdomácněla. Planě roste v jižní Africe, severní Americe, jihovýchodní Asii a Austrálii.[6]

Na českém trhu nalezneme především salát rukola, s kterým je roketa často zaměňována. Rukolu řadíme taktéž do čeledi *Brassicaceae*, avšak od rokety se liší silou charakteristické nahořklé chuti, která je mnohem výraznější než u rokety. Byliny se liší i tvarem listů.

Roketa setá by se měla objevit v našem jídelníčku, nejen pro svůj bohatý obsah živin a vitaminů, ale také pro své potenciální protirakovinotvorné vlastnosti, o kterých pojednávají ve svém článku Michael a kol. [8]. Zajímavá jsou také semena rokety seté. Vylisovaný olej je bohatý na erukovou a olejovou kyselinu, zastoupeny jsou také esenciální a neesenciální mastné kyseliny. Významné je zastoupení flavonoidů, alkaloidů, tríslovin, saponinů a askorbové kyseliny. Využití těchto sloučenin najdeme v tradiční medicíně. V článku [9] byly testovány inhibiční vlastnosti extraktů a oleje z *Eruca sativa* na grampozitivní a gramnegativní kmeny bakterií. Olej ze semen rokety inhiboval růst všech testovaných kmenů téměř ve stejném dávkování jako širokospektrální antibiotikum gentamicin. Kvalitní olej ze semen rokety seté tak nabízí možnost rozšíření léčby některých chorob „zdravou cestou“.

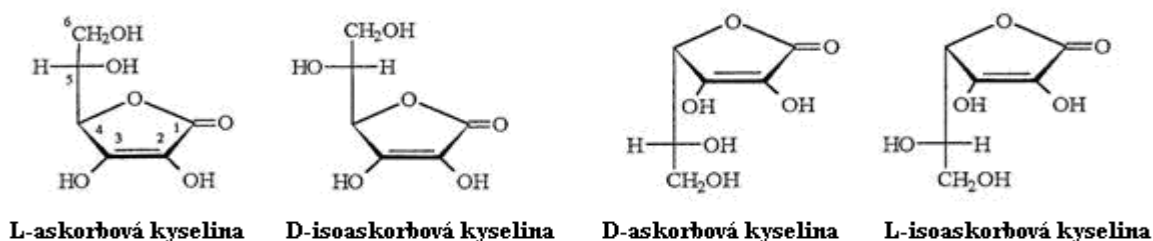
## 2. 2. L-askorbová kyselina (vitamin C)

### 2. 2. 1. Historie

Po I. světové válce zahájilo mnoho vědců výzkum askorbové kyseliny. V letech 1918-1923 poprvé Zilva a Hardena polemizovali nad možností izolace a vlastnostmi vitamínu C.[10] V roce 1928 v rámci studia rostlinných a živočišných oxido-redukčních systémů se Albertu Szent-Györgyimu podařilo izolovat kyselou látku s redukčními vlastnostmi, sumárního vzorce  $C_6H_8O_6$ . Tato látka se shodovala s „redukčním faktorem“ dříve popsáným Zilvou. Pojmenoval ji hexuronová kyselina.[10] V roce 1932 byla zjištěna shodnost askorbové kyseliny a vitamínu C. Později byl vědomě izolován čistý vitamin C z citronu pány Kingem a Waughtem. A. Szent-Györgyi byl za svůj objev oceněn v roce 1937 Nobelovou cenou za fyziologii. [10,12]

### 2. 2. 2. Fyzikálně-chemické vlastnosti askorbové kyseliny

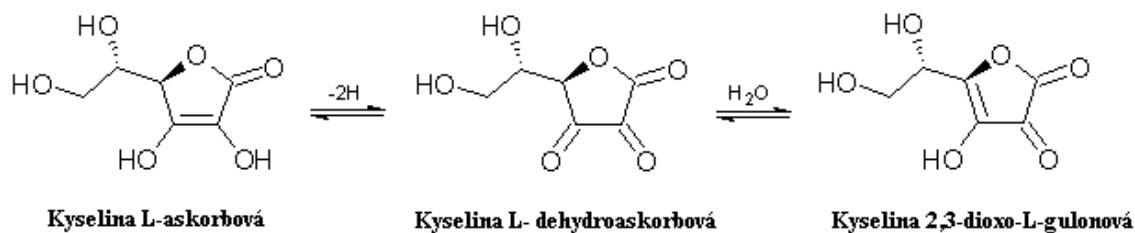
V přírodě najdeme askorbovou kyselinu v podobě čtyř izomerů (obr. 2), ze kterých pouze L-askorbová kyselina ( $\gamma$ -lakton 2-oxo-L-gulonové kyseliny) je fyziologicky aktivní.



Obrázek 2: Struktura askorbové kyseliny

Askorbová kyselina je bílá krystalická látka, dobře rozpustná v polárních rozpouštědlech, nerozpustná v benzenu a petroletheru. V roztocích se chová jako slabá kyselina ( $pK_1 = 4,17$  a  $pK_2 = 11,57$ ). Její bod tání je  $190\text{ }^{\circ}\text{C}$  -  $192\text{ }^{\circ}\text{C}$  a molární hmotnost  $176,1\text{ g/mol}$ .

L-askorbová kyselina je redukující látka, která podléhá oxidaci v přítomnosti kovových iontů ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ), samovolné oxidaci vzdušným kyslíkem (zejména v alkalickém prostředí), apod. Vzniklá L-dehydroaskorbová kyselina se ireverzibilně hydrolyzuje na fyziologicky neaktivní dioxogulonovou kyselinu (obr. 3).



*Obrázek 3: Schéma oxidace a hydrolýzy askorbové kyseliny*

V rostlinách čeledi *Brassicaceae* se nachází také derivát askorbové kyseliny, askorbigen. Poprvé byl izolován v r. 1954, čistý askorbigen pak izoloval Procházka a spol. z kapusty.[10] Askorbigen je látka dobře rozpustná ve vodě, alkoholech a octanu ethylnatém. Nerozpouští se v chloroformu, benzenu a dalších nepolárních rozpouštědlech. Askorbigen najdeme především v brukvovité zelenině, kde vzniká při reakci askorbové kyseliny s degradačními produkty indolových glukosinolátů.[13] Pomocí enzymu myrosinasy je glukosinolát glukobrassicin hydrolyzován na D-glukosu, hydrogensíranový anion a nestálý isothiokyanát. Thiokyanátový ion ve vzniklém meziproduktu je nahrazen aniontem tautomerní formy L-askorbátu a následně vzniká askorbigen. Askorbigen je stálejší vůči oxidaci než askorbová kyselina a vykazuje protirakovinné účinky. V lidském žaludku je askorbigen částečně přeměn na askorbovou kyselinu. V rostlinách bohatých na askorbovou kyselinu je cca 20-50% glukobrassicinu přeměněno na askorbigen. [13,14]

### 2. 2. 3. Význam pro člověka

L-askorbová kyselina je významným vitaminem rozpustným ve vodě. Její účast v biologických procesech je nenahraditelná. Podporuje tvorbu červených krvinek, srážení krve, kolagenu a mnohých protilátek, dále zvyšuje resorpci železa v trávicím traktu. Vykazuje důležité antioxidační vlastnosti, které pomáhají tělu lépe se bránit proti volným radikálům a virovým onemocněním. [2]

Nedostatek AA se může projevit sníženou odolností k infekcím, nechutenstvím, krvácením a zduřením dásní, vypadáváním zubů, celkovou slabostí organismu a depresi, může také ovlivnit růst kostí a chrupavek. V nejhorším stádiu avitaminózy pak kurdějemi (projevují se poruchou tvorby pojivových tkání, defektem tvorby kolagenu a špatným hojením ran). [2,10] Nevyužitý vitamin C je odváděn z těla ven močí. Nahromaděný vitamin C podporuje tvorbu ledvinových kamenů, způsobuje průjem a kožní vyrážku. [2,10]

Maximální tolerovaná hranice denního příjmu je 1000 mg. Dle Vyhlášky o označování výživové hodnoty potravin č. 450/2004 Sb. ve znění 330/2009 Sb. s účinností k 01.10.2009 je doporučený denní příjem vitamínu C 80 mg. [15] Člověk by měl příjem vitamínu C zvýšit v případě chirurgického zákroku, chronické infekce, aterosklerózy, AIDS atd. Vyšší dávky by měly přijímat také těhotné a kojící ženy, kuřáci, starší lidé a dívky užívající hormonální antikoncepci. [10]

## 2. 2. 4. Askorbová kyselina v potravě

Ztrátou schopnosti produkce askorbové kyseliny je lidské tělo nuceno ji přijímat z rostlinné a živočišné potravy. Bohatě je vitamin C zastoupen v ovoci a zelenině (tab. 2 a 3). Rostliny askorbovou kyselinu syntetizují během klíčení. Askorbová kyselina má pro vyšší rostliny nepostradatelný význam během růstu a před květem. Působí zde jako růstový faktor a její koncentrace je v této fázi nejvyšší.[10] V malém množství nalezneme vitamin C také v živočišné potravě, hlavním zdrojem je však rostlinná potrava.

*Tabulka. 2: Obsah vitamínu C ve vybraném ovoci a zelenině [10]*

| Potravina      | Obsah vitamínu C [mg/kg] | Potravina   | Obsah vitamínu C [mg/kg] |
|----------------|--------------------------|-------------|--------------------------|
| Paprika        | 1615                     | Jahody      | 618                      |
| Petrželová nať | 1369                     | Pomeranče   | 513                      |
| Černý rybíz    | 1360                     | Rajčata     | 224                      |
| Brokolice      | 1130                     | Grapefruity | 416                      |
| Křen           | 1125                     | Jablka      | 48                       |

V rostlinné čeledi brukvovitých se nachází askorbigen v průměrném obsahu 10-20 mg/100g. Askorbigen je účinný za předpokladu, že se v organismu štěpí na volnou L-askorbovou kyselinu. Zelenina z této čeledi je bohatým zdrojem vitamínu C (tab. 3).

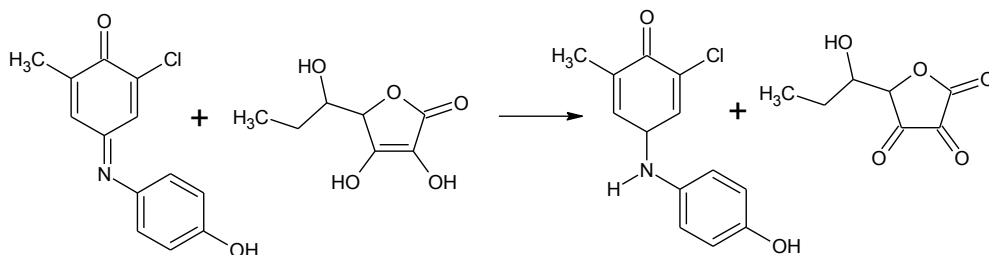
*Tabulka 3: Obsah vitamínu C v rostlinách rodu Brassicaceae [10]*

| Zelenina          | mg/100g | Zelenina     | mg/100g |
|-------------------|---------|--------------|---------|
| Kapusta hlávková  | 344     | Zelí bílé    | 329     |
| Kapusta růžičková | 787     | Zelí červené | 518     |
| Kedlubna bílá     | 448     | Ředkvičky    | 226     |
| Květák            | 383     |              |         |

## 2. 3. Metody stanovení vitamínu C

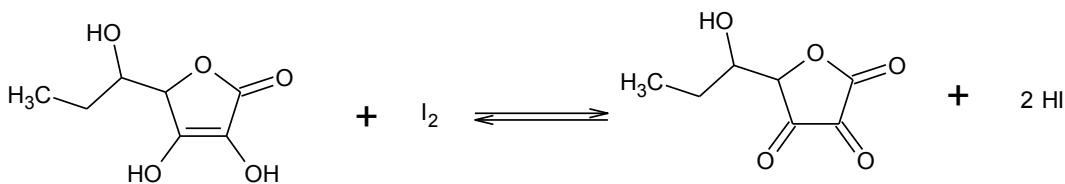
### 2. 3. 1. Odměrná analýza - volumetrie

Volumetrie patří mezi jednoduché metody kvantitativní chemické analýzy. Je založena na principu rychlé reakce stanovované složky s odměrným roztokem. V okamžiku rovnováhy (vyrovnání stechiometrie reakce mezi analytem a činidlem) nastává bod ekvivalence, který můžeme sledovat vizuálně (přídavkem vhodného indikátoru) nebo instrumentálně, např. spektrofotometricky, polarograficky, potenciometricky. Potenciometricky bod ekvivalence indikujeme vhodnými elektrodami na základě změn hodnot potenciálu. Stanovení askorbové kyseliny v rostlinném materiálu je založeno na její oxidaci na dehydroaskorbovou kyselinu. J.Tillmans poprvé použil pro stanovení askorbové kyseliny redoxní barvivo 2,6-dichlorfenolindofenol (DFIF).[16] Touto reakcí dochází k reverzibilní oxidaci askorbové kyseliny (rovnice 1).[17,18,19]



Rovnice 1: Reakce DFIF s askorbovou kyselinou

Askorbovou kyselinu můžeme také stanovit přímou titrací roztokem jodu na škrobový maz, kdy titrujeme do modrofialového zbarvení (rovnice 2). [17]



Rovnice 2: Oxidace AA jódem

Rostlinný materiál je potřeba zpracovávat pečlivě a rychle, aby nedošlo k oxidaci askorbové kyseliny vzdušným kyslíkem. Je nutné extrakt stabilizovat kyselinou metafosforečnou nebo šťavelovou kyselinou. Přídavkem stabilizačního roztoku omezíme množství interferujících látek, které by mohly ovlivnit vlastní stanovení askorbové kyseliny.[18]

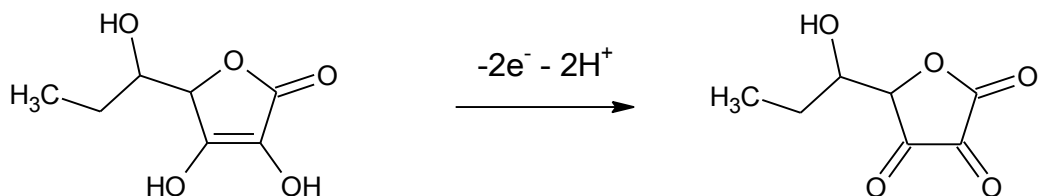
### 2. 3. 2. Průtoková coulometrie

Možnou elektrochemickou metodou pro stanovení askorbové kyseliny je průtoková coulometrie. Obecně je tato metoda založena na měření spotřebovaného elektrického náboje při oxidaci či redukci analytu. Dle Faradayova zákona je látkové množství (hmotnost) analytu přímo úměrné prošlému elektrickému náboji  $Q$ , který je funkcí prošlého proudu  $I$  a času  $t$ . [21]

$$m = Q \cdot \frac{M}{zF} = I \cdot t \cdot \frac{M}{zF} \quad (1)$$

|     |                                                  |
|-----|--------------------------------------------------|
| $Q$ | elektrický náboj [C]                             |
| $I$ | elektrický proud [A]                             |
| $t$ | doba elektrolýzy (přechodový čas) [s]            |
| $z$ | počet elektronů účastnících se reakce            |
| $F$ | Faradayova konstanta [ $\text{C mol}^{-1}$ ]     |
| $M$ | molární hmotnost analytu [ $\text{g mol}^{-1}$ ] |

Coulometrické stanovení askorbové kyseliny v přírodním materiálu vychází z oxidace askorbové kyseliny na dehydroaskorbovou kyselinu (rovnice 3).



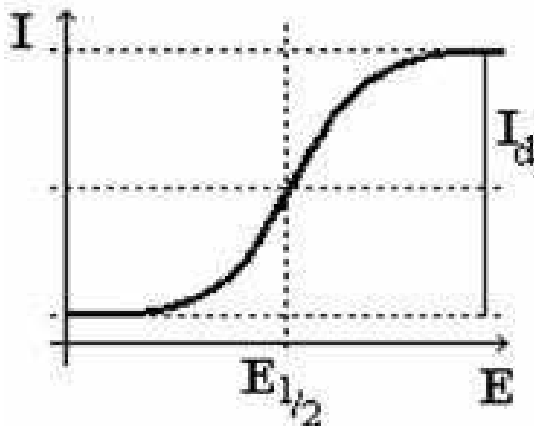
Rovnice 3: oxidace AA na DHAA

V průtokové coulometrii tato reakce probíhá uvnitř porézní uhlíkové elektrody za konstantního proudu. Na porézní pracovní elektrodě zároveň měříme změnu potenciálu způsobeného probíhající oxidací.

### 2. 3. 3. Polarografie

Tato elektrochemická analytická metoda byla vynalezena roku 1922 Jaroslavem Heyrovským a v roce 1959 oceněna Nobelovou cenou za chemii. [22] Vychází z elektrolýzy vzorku v elektrochemickém článku s polarizovatelnou pracovní elektrodou a nepolarizovatelnou referenční elektrodou. Pracovní elektrodou je rtuťová

kapková elektroda, referentní elektrodou může být např. rtuťové dno. Mezi elektrody se vkládá stejnosměrné napětí, které se s časem mění. Měří se závislost proudu  $I$ , procházejícího elektrochemickým článkem, na potenciálu pracovní elektrody  $E$ . V přítomnosti elektroaktivní látky má tato závislost tvar polarografické vlny (obr. 4).



Obrázek 4. Polarografická vlna [23]

Kvalitativně lze polarografickou vlnu vyhodnotit z hodnot půlvlnového potenciálu  $E_{1/2}$  (obr. 4). Tyto hodnoty jsou tabelovány. Kvantitativní vyhodnocení je založeno na určení limitního difúzního proudu  $I_d$ , resp. výšky polarografické vlny, která je přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku.[24]

Podle literatury [10] podléhá endiolová skupina askorbové kyseliny anodické dvouelektrodové ireverzibilní oxidaci. Vzniklou polarografickou vlnu lze kvantitativně vyhodnotit. [16,20,23]

## 2. 3. 4. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Metoda HPLC je hojně využívanou instrumentální separační metodou. K separaci jednotlivých složek vzorku dochází na základě jejich různé afinity k mobilní a stacionární fázi. Vzorek je unášen proudem mobilní fáze do kolony, kde jsou jednotlivé složky vzorku různě zadržovány na stacionární fázi. Rozdělené složky jsou pak vhodnou metodou detegovány. Stanovení askorbové kyseliny v rostlinném materiálu je založeno na extrakci kyselinou metafosforečnou a následné redukci DHAA na AA. Askorbovou kyselinu detekujeme při vlnové délce 265 nm UV/VIS detektorem.

Kvalitativní vyhodnocení provedeme na základě hodnoty retenčního času, pomocí které identifikujeme pík askorbové kyseliny mezi ostatními píky. Integrací plochy píku získáme kvantitativní údaj.[1,8,25,26]



### 2. 3. 5. Papírová chromatografie

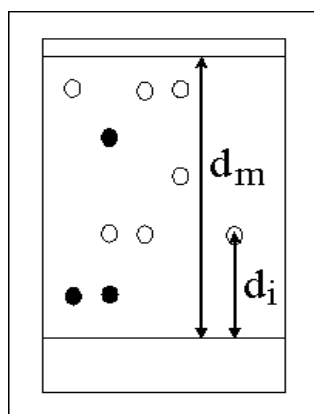
Papírovou chromatografií řadíme k instrumentálním separačním metodám. Látky jsou separovány na základě odlišné rozpustnosti ve vyvíjecím roztoku/směsi. Vzorek je adsorbován na stacionární fázi a po ní unášen fází mobilní.

Kvalitativně lze askorbovou kyselinu detegovat pomocí standardů, které nanese na start společně se vzorkem (obr. 5). Roztokem DFIF identifikujeme skvrnu AA. Pomocí retardačního faktoru (vztah 2) a porovnáním skvrny se standardem AA se přesvědčíme o přítomnosti AA ve vzorku.

$$R_f = \frac{d_i}{d_m} \quad (2)$$

$d_i$  vzdálenost středu skvrny od startu

$d_m$  vzdálenost čela mobilní fáze od startu



Obrázek 5: Výpočet retardačního faktoru[27]

Kvantitativní údaj vyhodnotíme např. z obvodu skvrny (je úměrný koncentraci) nebo denzitometrem (ze stupně ztmavnutí skvrny), jehož odezvu lze snadno vyhodnotit pomocí vhodného počítačového programu.

### 2. 3. 6. Spektrofotometrie

Absorpční spektrofotometrie patří k optickým metodám. Lze stanovit látky, které jsou schopny absorbovat elektromagnetické záření o určité vlnové délce. Měření se provádí při konstantní vlnové délce, která odpovídá maximu absorpce stanovované látky. Průchod monochromatického záření vzorkem je charakterizován propustností (transmitací T) dle vzorce:

$$T = \frac{\Phi}{\Phi_0} \quad (3)$$

$\Phi$  prošlý zářivý tok

$\Phi_0$  dopadající zářivý tok

Záporný dekadický logaritmus  $T$  vyjadřuje absorbance  $A$ :

$$A = -\log T = \log \frac{\Phi_0}{\Phi} \quad (4)$$

Kvantitativně lze analýzu vyhodnotit pomocí Lambert-Beerova zákona dle vzorce:

$$A = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot l \quad (5)$$

$\varepsilon_\lambda$  molární absorpční koeficient měřené látky [ $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]

$c$  látková koncentrace [ $\text{mol dm}^{-3}$ ]

$l$  tloušťka absorbující vrstvy [cm] [20]

Spektrofotometrické stanovení askorbové kyseliny v rostlinném materiálu vychází ze sledování postupného odbarvení oxidačního činidla DFIF. Standardní roztok askorbové kyseliny odbarví roztok činidla okamžitě, extrahovaný vzorek ho odbarvuje pomaleji. Stanovení lze založit na sledování rychlosti odbarvení činidla, kdy se srovnává pokles absorbance směsi činidla se standardem a činidla se vzorkem v závislosti na čase. Deteguje se spektrofotometrem při vlnové délce 520 nm. [18]

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem této práce bylo porovnat metody stanovení AA. Askorbová kyselina byla stanovena těmito metodami: volumetricky s vizuální a potenciometrickou indikací, průtokovou coulometrií a HPLC s UV/Vis detekcí. Jako vzorek byl vybrán salát rožka setá (*Eruca sativa*), protože rostliny čeledi *Brassicaceae* jsou bohatým zdrojem AA.[10] Množství AA zjištěné v podzimním salátu bylo porovnáno se salátem letním. Naměřená data jsem statisticky porovnala s oficiální metodou pro stanovení AA (volumetrie s vizuální indikací). [29]

#### 3. 1. Použité chemikálie a roztoky

##### 3. 1. 1. Chemikálie

Veškeré použité chemikálie jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4: Použité chemikálie

| Název chemikálie                    | Výrobce                                  | Čistota        |
|-------------------------------------|------------------------------------------|----------------|
| 2,6-dichlorfenolindofenol           | Lachema, Brno                            | p.a.           |
| Kyselina citrónová                  | Lachema, Neratovice                      | p.a.           |
| NaOH                                | Lach-Ner, Neratovice                     | p.a.           |
| Kyselina metafosforečná             | MERCK, Darmstadt, Německo                | p.a.           |
| Uhličitan sodný                     | Lachema, Brno                            | p.a.           |
| Askorbová kyselina                  | Penta, Chrudim                           | p.a.           |
| L-cystein                           | SIGMA-Aldrich Chemie, Steinheim, Německo | p.a.           |
| Dihydrogenfosforečnan draselný      | Lachema, Neratovice                      | p.a.           |
| Methanol                            | Penta, Chrudim                           | p.a.           |
| Pufr pH 4                           | WTW, Weilheim, Německo                   | technický pufr |
| Pufr pH 7                           | WTW, Weilheim, Německo                   | technický pufr |
| Kyselina štavelová, dihydrát        | Lachema, Neratovice                      | p.a.           |
| H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>      | Lachema, Neratovice                      | p.a.           |
| NaCl                                | Lachema, Neratovice                      | p.a.           |
| 35% HCl                             | Penta, Chrudim                           | p.a.           |
| N-cetyl-N,N-trimethylamonium bromid | MERCK, Darmstadt, Německo                | p.a.           |

### 3. 1. 2. Použité roztoky

#### Stanovení askorbové kyseliny v rostlinném materiálu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

- **Standardní roztok askorbové kyseliny 10 g l<sup>-1</sup>** – byl připraven z navážky 0,010 mg askorbové kyseliny, kvantitativně převedené do odměrné baňky 10 ml a doplněné rysku destilovanou vodou.
- **2 % kyselina metafosforečná** - byla připravena z navážky 5,0013 g pevné kyseliny metafosforečné, kvantitativně převedeno do odměrné baňky 250 ml a doplněno po rysku destilovanou vodou.
- **Mobilní fáze** – byla připravena ze dvou roztoků A a B. Roztok A byl připraven z navážky 6,8031 g dihydrogenfosforečnanu draselného rozpuštěného v 450 ml redestilované vody. Roztok B byl připraven z navážky 0,9109 g N-cetyl-N,N,N-trimetylamonium bromid rozpuštěném v 50 ml methanolu. Roztoky byly smíchány, filtrovány a odplyněny.
- **Fosforečnan trisodný** – byl připraven z navážky 10,0140 g kvantitativně převedené do odměrné baňky 50 ml a doplněné destilovanou vodou po rysku.
- **L-cystein** - byl připraven z navážky 2,0246 g kvantitativně převedené do odměrné baňky 50 ml a doplněné destilovanou vodou na požadovaný objem.

#### Stanovení askorbové kyseliny v rostlinném materiálu průtokovou coulometrií

- **Základní elektrolyt: 0,1 M NaCl** - byl připraven z navážky 5,8448 g NaCl kvantitativně převedené do odměrné baňky 1000 ml, okyselený 35% HCl na pH = 3,0.
- **Zásobní roztok askorbové kyseliny 10 g l<sup>-1</sup>** – byl připraven z navážky 0,0100 mg askorbové kyseliny o koncentraci 10 g/l. Navážka byla kvantitativně převedena do 10 ml odměrné baňky a doplněna destilovanou vodou na požadovaný objem.
- **Standardní roztok askorbové kyseliny 20 mg l<sup>-1</sup>** – byl připraven zředěním zásobního roztoku základním elektrolytem.

#### Volumetrické stanovení askorbové kyseliny v rostlinném materiálu titrací 2,6-dichlorfenolindofenolem s vizuální a potenciometrickou indikací

- **Standardní roztok askorbové kyseliny 1 g/l** – byl připraven z navážky 0,0100 g rozpuštěné v malém množství 2% kyseliny metafosforečné, kvantitativně převedené do odměrné baňky 10 ml. Baňka byla doplněna na požadovaný objem 2% kyselinou metafosforečnou.
- **2% kyselina metafosforečná** - 2% roztok kyseliny metafosforečné byl připraven z navážky 10,0112 g, kvantitativně převedené do odměrné baňky 500 ml a doplněné po rysku destilovanou vodou.
- **0,001 mol/l 2,6-dichlorfenolindofenol** - byl připraven z navážky 0,1409 g pevné látky, rozpuštěné ve 125 ml horké vody a filtrované přes skládaný filtr do odměrné baňky 250 ml.

### **3. 2. Pomůcky a přístroje**

- pH metr InoLab WTW level-1 (WTW GmbH & Co. K, Weilheim, Německo)
- HPLC: Waters 600S Controller, Waters 486 Tunable Absorbance Detector, Waters 616 Pump (Waters Corporation, Massachusetts, USA)
- Centrifuge 5702 (Eppendorf, Hamburk, Německo)
- Analytické váhy AB 204 (Mettler-Toledo, Praha)
- Coulometr EcaFlow, model 120 GLP, s autosamplerem ALS 254 (Istran, Bratislava)
- Ultrazvuk (KRAINTEK 10), Kraittek czech s. r. o.
- Potenciometr (MULTIMETR M1T 242), Metra Blansko
- Míchačka MM24 (Laboratorní přístroje, Praha)
- Filtrační aparatura
- Titrační aparatura
- Mikrofiltr 0,45 µm
- Běžné laboratorní sklo a vybavení

### **3. 3. Popis vzorku**

Rostliny byly vypěstovány a dodány Výzkumným ústavem rostlinné výroby, obor genetiky a šlechtění produkce, Centrem aplikovaného výzkumu zeleniny a speciálních rostlin Olomouc. Semena byla nejprve vysazena do perlitu. Po vyrašení (cca týden) byly rostlinky přepíchány do sadbovačů s univerzálním substrátem B (Rašelina Soběslav). Jakmile sazeničky zakořenily, byly přesazeny do truhlíků, pro analýzu byly

odebrány po 9. týdnu. Reprezentativní vzorek (tabulka 5) ze salátu roket setá (*Eruca sativa*) byl připraven vybráním středně velkých lístků a jejich natrháním na menší kousky.

Tabulka 5: Vzorky *Eruca sativa*

| Datum zpracování vzorku | Popis vzorku                                                                              | Metoda                               |
|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| 28. 6. 2011             | Zdravá rostlina, velké zelené listy, výrazně štiplavá a ostrá chuť, vypěstovaná v létě    | HPLC                                 |
| 21. 10. 2011            | Zdravá rostlina, velké zelené listy, výrazně štiplavá a ostrá chuť, vypěstovaná na podzim | Průtoková coulometrie                |
| 21. 10. 2011            | Zdravá rostlina, velké zelené listy, výrazně štiplavá a ostrá chuť, vypěstovaná na podzim | Titrace s vizuální indikací          |
| 21. 10. 2011            | Zdravá rostlina, velké zelené listy, výrazně štiplavá a ostrá chuť, vypěstovaná na podzim | Titrace s potenciometrickou indikací |

### 3. 4. Příprava a analýza vzorku roket seté (*Eruca sativa*)

#### 3. 4. 1. Stanovení AA v rostlinném materiálu metodou HPLC

Použitý pracovní postup byl převzat z literatury [19] a upraven dle potřeby.

Ze standardního roztoku askorbové kyseliny ( $10 \text{ g l}^{-1}$ ) byly připraveny kalibrační roztoky o koncentraci 0,005-0,03 mg/ml: Standardní roztok byl nejprve 10 krát zředěn vodou na koncentraci  $1 \text{ g l}^{-1}$  a z tohoto roztoku bylo pipetováno 0,05 ml až 0,3 ml do odměrných baněk 10 ml společně s 1 ml 2% kyseliny metafosforečné a naředěno na požadovaný objem.

Z připraveného reprezentativního vzorku bylo odebráno 0,5084 g. Navážka byla homogenizována v třecí misce společně s 10 ml 2% kyseliny metafosforečné přibližně 1 minutu. Homogenizovaný vzorek byl kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky a doplněn po rysku redestilovanou vodou. Asi 40 ml bylo přelito do 4 plastových zkumavek a odstředováno 10 minut při rychlosti 4400 otáček/minutu. Obsah zkumavek byl filtrován přes vat a mikrofiltr  $0,45 \mu\text{m}$ . Do 50 ml kádinky bylo pipetováno 20 ml extraktu společně s 10 ml roztoku L-cysteinu. Za stálého míchání směsi na

elektromagnetické míchačce byla provedena redukce dehydroaskorbové kyseliny v přítomnosti fosforečnanu trisodného, jehož roztokem bylo upraveno pH na hodnotu 7,0-7,2. Po 5 minutách bylo pH upraveno zpět na hodnotu 2,5-2,8 přidavkem kyseliny trihydrogenfosforečné. Roztok byl převeden do odměrné baňky 50 ml a doplněn po rysku destilovanou vodou. Takto upravený vzorek byl použit k nástřiku. [19]

Před začátkem každé analýzy bylo nutné chromatografický systém promýt 30 minut destilovanou vodou a 30 minut mobilní fází. Detekce byla prováděna při vlnové délce 265 nm (tato hodnota odpovídá maximu kyseliny askorbové). Pro separaci byla použita kolona 205 x 4 I.D. 5 µm Tessek Seladon C18. Parametry měření:

- Průtok mobilní fáze: 0,45 ml/min
- Tlak: 2300 Pa
- Teplota: 17-20° C
- Nástřik: 20 µl
- Detekce: 265 nm

Porovnáním chromatogramu standardního roztoku AA s chromatogramem vzorku byl rozpoznán pík askorbové kyseliny. Kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno metodou kalibrační křivky. Nastavením integračních mezí byla provedena integrace a určena plocha píku v programu CLARTY LITE.

Z ploch píků kalibračních roztoků AA byly vypočítány parametry regresní přímky (vzorec 6):

$$y = ax + b \quad (6)$$

|     |                                  |
|-----|----------------------------------|
| $y$ | plocha píku                      |
| $x$ | koncentrace standardního roztoku |
| $a$ | směrnice kalibrační přímky       |
| $b$ | úsek kalibrační přímky           |

Dle vzorce 7 byla vypočítána koncentrace askorbové kyseliny ve vzorku:

$$c = \frac{(P_{VZ} - b) \cdot F \cdot 100}{a \cdot m_{VZ}} \quad (7)$$

|          |                                          |
|----------|------------------------------------------|
| $P_{VZ}$ | plocha píku askorbové kyseliny ve vzorku |
|----------|------------------------------------------|

|          |                            |
|----------|----------------------------|
| $m_{vz}$ | navážka vzorku             |
| $a$      | směrnice kalibrační přímky |
| $b$      | úsek kalibrační přímky     |
| $F$      | faktor zředění             |

### 3. 4. 2. Elektrochemické stanovení AA v rostlinném materiálu

Použitý pracovní postup byl převzat z literatury [28] a upraven dle potřeby.

Z připraveného reprezentativního vzorku byl odebrán 1 g s analytickou přesností. Navážka salátu rožka setá byla v třecí misce rozetřena společně s 0,5 g kyseliny šťavelové a 20 ml základního elektrolytu cca 1 minutu. Homogenizovaný vzorek byl kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky a doplněn po značku základním elektrolytem. Asi 40 ml vzorku bylo odstředěno 10 minut při rychlosti 4400 otáček/minutu a následně zfiltrováno přes vat a mikrofiltr 0,45  $\mu\text{m}$ .

Před analýzou byl promyt průtokový systém elektrochemického analyzátoru a ověřena průtoková rychlost. Dále byla nastavena metoda č. 36 (analýza askorbové kyseliny) a parametry podle tabulky 6. Přívodní hadičky byly ponořeny do roztoku základního elektrolytu a naplněny.

Tabulka 6: Parametry nastavené na přístroji EcaFlow 2. 3 [28]

|                               |                                           |                           |
|-------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------|
| <b>Potenciál [mV]</b>         | <b>Delay at [s]</b>                       | <b>Volume [ml]</b>        |
| Depos: 0                      | Quiesc: 10                                | Sample: 3                 |
| From: 0                       | Regen: 10                                 | Bckgr: 3                  |
| To: 800                       | <b>Current [<math>\mu\text{A}</math>]</b> | Rinze: 0                  |
| Regen: 0                      | Timeout: 60                               | <b>Flow rate [ml/min]</b> |
| Stndby: 0                     | I-strip: 50                               | Flow: 5                   |
| Pump at stripping: <b>OFF</b> | Pump at Standby: <b>OFF</b>               |                           |

Po nastavení parametrů měření byla hadička přivádějící vzorek do systému ponořena do odměrné baňky s roztokem standardu a tlačítkem START byla spuštěna kalibrace přístroje na standardní roztok AA. Naměřené signály standardu byly integrovány v nastavených mezích. Následně byla přívodní hadička ponořena do roztoku vzorku a opětovným stisknutím tlačítka START byla zahájena analýza vzorku. Plocha píků odpovídající přechodovému času, který je přímo úměrný koncentraci askorbové kyseliny ve vzorku, byla zjištěna integrací naměřených chronopotenciogramů



v programu EcaFlow 2.3 Zjištěná koncentrace analytu ve vzorku (v  $\mu\text{g/l}$ ) byla přepočítána na navážku čerstvého salátu a vyjádřena v  $\text{mg g}^{-1}$ .

### 3. 4. 3. Volumetrické stanovení AA v rostlinném materiálu s vizuální indikací

Použitý pracovní postup byl převzat z literatury [19].

Z připraveného reprezentativního vzorku bylo odebráno 5 g s analytickou přesností. Do třecí misky se salátem roketa setá bylo odpipetováno 20 ml 2% kyseliny metafosforečné a třeno cca 1 minutu.

Homogenizovaný vzorek byl kvantitativně převeden do odměrné baňky 100 ml a naředěn kyselinou metafosforečnou na požadovaný objem, následně byl filtrován přes složenou gázu. K analýze bylo odebráno 10 ml filtrátu a 10 ml kyseliny metafosforečné. Připravená směs byla titrována 0,001 mol/l roztokem 2,6-dichlorfenolindofenolu do růžového zbarvení, stálého nejméně půl minuty.

Koncentrace askorbové kyseliny byla vypočtena ze vzorce 8:

$$x = \frac{V_2 \cdot f \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot V_1} \quad (8)$$

$V_2$  objem spotřebovaného roztoku DFIF [ml]

$m$  hmotnost vzorku [g]

$V_1$  objem extraktu použitého k titraci [ml]

$f$  titr odměrného roztoku (mg kyseliny askorbové na 1 ml DFIF)

Byla provedena standardizace roztoku DFIF na standardního roztok askorbové kyseliny. Do vysoké kádinky byl pipetován 1 ml standardního roztoku AA a 9 ml 2% kyseliny metafosforečné. Směs byla titrována 0,001 mol/l DFIF do růžového zbarvení, stálého 30 s. Titr byl vypočten dle vzorce (9).

Titř udávající mg askorbové kyseliny na 1 ml DFIF:

$$f = \frac{V_{AA}}{V_i} \quad (9)$$

$V_{AA}$  1 ml standardního roztoku askorbové kyseliny

$V_i$  spotřeba roztoku DFIF [ml]

### 3. 4. 4. Volumetrické stanovení AA v rostlinném materiálu s potenciometrickou indikací

Použitý pracovní postup byl převzat z literatury [19] a modifikován dle potřeby.

Z připraveného reprezentativního vzorku bylo odebráno 5 g s analytickou přesností. Do třetí misky se salátem roketa setá bylo odpipetováno 20 ml 2% kyseliny metafosforečné a třeno cca 1 minutu.

Homogenizovaný vzorek byl kvantitativně převeden do odměrné baňky 100 ml, naředěn kyselinou metafosforečnou na požadovaný objem a filtrován přes složenou gázu. Do kádinky bylo pipetováno 5 ml čirého extraktu, 5 ml kyseliny metafosforečné a 20 ml destilované vody. Soustava elektrod platinové a argentchloridové byla upevněna do elektrodového stojanu a ponořena do roztoku.

Míchaný roztok byl titrován 0,001 mol/l roztokem 2,6-dichlorfenolindofenolu zpočátku po 1 ml, před bodem ekvivalence po 0,1 ml. Po každém přidavku titračního činidla byla zaznamenána hodnota napětí elektrochemického článku.

Ze závislosti napětí článku na objemu odměrného roztoku byl určen bod ekvivalence  $V_x$  dle vzorce 10:

$$V_x = V^+ + \Delta V \frac{\Delta^2 U^+}{\Delta^2 U^+ + \Delta^2 U^-} \quad (10)$$

$V^+$  spotřeba odměrného roztoku [ml]

$\Delta V$  konstantní přidavek odměrného roztoku [ml]

$\Delta^2 U^+$  poslední kladná hodnota druhé difference napětí [V]

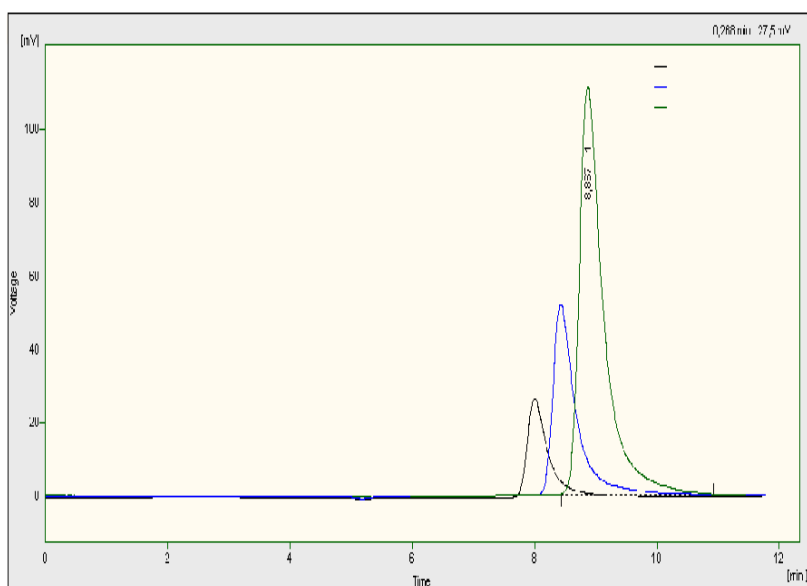
$\Delta^2 U^-$  první záporná hodnota druhé difference potenciálu [V]

Pro výpočet koncentrace AA byl použit vzorec (11) a standardizace roztoku AA byla provedena stejně jako v kapitole 3. 4. 3. Titr byl vypočten dle vzorce (9). [19]

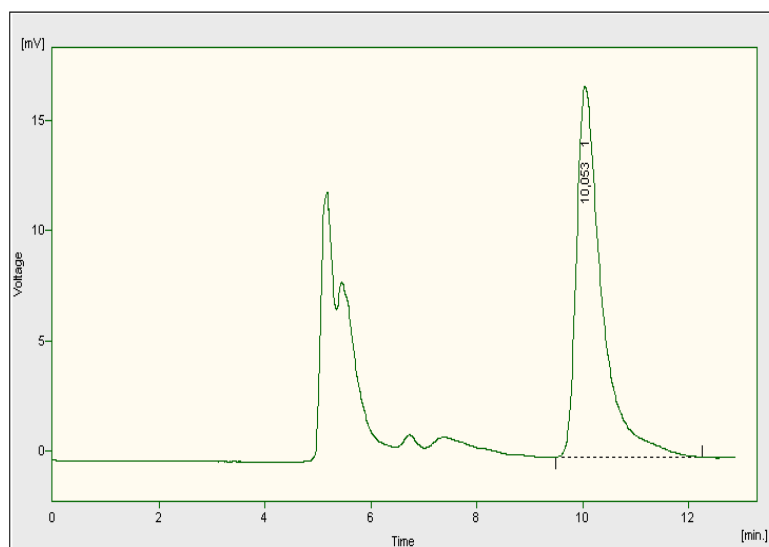
## 4. VÝSLEDKY

### 4. 1. Stanovení AA v roketě seté metodou HPLC

Askorbová kyselina byla kvalitativně vyhodnocena na základě porovnání retenčních časů píků AA změřených pro kalibrační roztoky (obr. 6) a pro vzorek (obr. 7). Plochy píků byly vyhodnoceny integrací v programu CLARTY LITE. Z ploch píků kalibračních roztoků (tabulka 7) byla sestrojena kalibrační závislost, kterou byla proložena regresní přímka (obr. 8). Z rovnice regresní přímky byla po dosažení plochy píku AA naměřené pro vzorek vypočtena koncentrace askorbové kyseliny a vyjádřena v mg/g salátu (tab. 8).



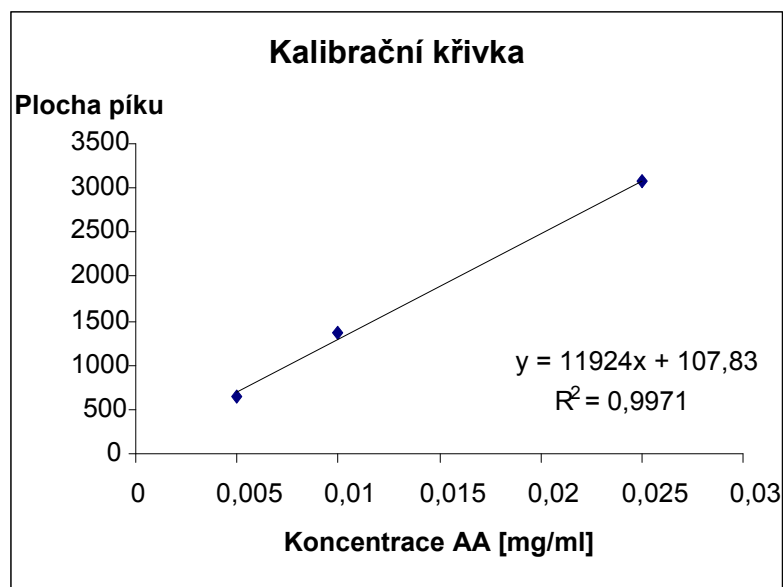
Obrázek 6: Chromatogramy kalibračních roztoků AA



Obrázek 7: Chromatogram vzorku salátu Eruca sativa

Tabulka 7: HPLC měření kalibračních roztoků

| Koncentrace AA [mg/ml] | Plocha píku |
|------------------------|-------------|
| 0,005                  | 648,163     |
| 0,01                   | 1374,692    |
| 0,025                  | 3070,169    |



Obrázek 8: Kalibrační křivka standardu AA

Tabulka 8: Výsledky HPLC stanovení AA v roketě seté

| Měření                             | Plocha píku | Obsah AA [mg/g] |
|------------------------------------|-------------|-----------------|
| 1.                                 | 552,938     | 1,8356          |
| 2.                                 | 532,003     | 1,7493          |
| 3.                                 | 557,534     | 1,8546          |
| 4.                                 | 557,96      | 1,8563          |
| 5.                                 | 560,124     | 1,8653          |
| 6.                                 | 544,545     | 1,8010          |
| 7.                                 | 543,451     | 1,7965          |
| 8.                                 | 546,17      | 1,8077          |
| 9.                                 | 547,292     | 1,8123          |
| 10.                                | 562,851     | 1,8765          |
| Průměrný obsah AA ve vzorku [mg/g] |             | 1,8255          |
| Směrodatná odchylka                |             | 0,0392          |

Reprezentativní vzorek byl připraven z letního salátu. V tomto vzorku bylo metodou HPLC stanoveno  $(1,83 \pm 0,04)$  mg/g AA. Jak uvádí literatura [31], je

množství AA ovlivněno způsobem pěstování a termínem sklizně.

Separační metody jsou vysoce selektivní a vhodné především pro analýzu komplexních vzorků se složitou maticí.[26] V použitém postupu stanovení AA je problematický tenzid CTAB v mobilní fázi, který má tendenci modifikovat oktadecylsilikagelovou stacionární fázi kolony. Tyto průběžné změny ve složení separační soustavy mají za následek postupný posun retenčních časů složek vzorku (obr. 6).

#### **4. 2. Stanovení AA v roketě seté průtokovou coulometrií**

Koncentrace askorbové kyseliny v podzimním salátu byla vyhodnocena v aplikaci EcaFlow 2.3 a následně přepočtena a vyjádřena v mg/g salátu (tab. 9). Výsledky měření jsem převzala od kolegyně Evy Zoulové, která toto měření provedla. [29]

*Tabulka 9 : Výsledky stanovení AA v roketě seté průtokovou coulometrií*

| Měření                             | Obsah AA [mg/g] |
|------------------------------------|-----------------|
| 1.                                 | 0,7883          |
| 2.                                 | 0,7983          |
| 3.                                 | 0,8263          |
| 4.                                 | 0,8046          |
| 5.                                 | 0,8125          |
| Průměrný obsah AA ve vzorku [mg/g] | 0,8060          |
| Směrodatná odchylka                | 0,0144          |

Průměrný obsah askorbové kyseliny zjištěný v podzimní roketě je  $(0,81 \pm 0,01)$  mg/g. Tento obsah AA je srovnatelný s růžičkovou kapustou (tabulka 3) která obsahuje 0,787 mg/g. [11]

#### **4. 3. Volumetrické stanovení AA v roketě s vizuální a potenciometrickou indikací**

##### **4. 3. 1. Standardizace odměrného roztoku DFIF**

Titř odměrného roztoku 2,6-dichlorfenolindofenolu byl vypočten dle vzorce 7, ze spotřeb DFIF na standardní roztok AA (tabulka 10).

Tabulka 10: Standardizace roztoku 2,6-dichlorfenolindofenolu na AA

| Vizuální indikace          |                                 | Potenciometrická indikace  |                                 |
|----------------------------|---------------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| Titrace kyseliny askorbové | Spotřeba odměrného roztoku [ml] | Titrace kyseliny askorbové | Spotřeba odměrného roztoku [ml] |
| 1.                         | 9,6                             | 1.                         | 9,4                             |
| 2.                         | 9,6                             | 2.                         | 9,3                             |
| 3.                         | 9,7                             | 3.                         | 9,3                             |
| Průměr ( $V_i$ )           | 9,63                            | Průměr ( $V_i$ )           | 9,33                            |
| Směrodatná odchylka        | 0,06                            | Směrodatná odchylka        | 0,06                            |

Výpočet titru DFIF:  
(vizuální indikace)

$$f = \frac{V_{KA}}{V_i}$$

$$f = \frac{1}{9,6333}$$

$$f = 0,1038$$

Výpočet titru DFIF:  
(potenciometrická indikace)

$$f = \frac{V_{KA}}{V_i}$$

$$f = \frac{1}{9,3333}$$

$$f = 0,1071$$

Bod ekvivalence byl indikován vizuálně a potenciometricky. Průměrná spotřeba DFIF na standardní roztok činila  $(9,63 \pm 0,06)$  ml s vizuální indikací a  $(9,33 \pm 0,06)$  ml s indikací potenciometrickou.

#### 4. 3. 2. Stanovení askorbové kyseliny ve vzorcích rakety seté

Vzorek podzimního salátu byl titrován 2,6-dichlorfenolindofenolem do růžového zbarvení stálého 30 vteřin. Spotřeby činidla při jednotlivých titracích jsou uvedeny v tabulce 11. Průměrný obsah AA v podzimním salátu je 0,81 mg/g (titrací s vizuální indikací) a 0,81 mg/g (titrací s potenciometrickou indikací).

Tabulka 11: Výsledky volumetrického stanovení AA v raketě seté

| Vizuální indikace        |                                 | Potenciometrická indikace |                                 |
|--------------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| Titrace                  | Spotřeba odměrného roztoku [ml] | Titrace                   | Spotřeba odměrného roztoku [ml] |
| 1.                       | 8,6                             | 1.                        | 8,2978                          |
| 2.                       | 8,6                             | 2.                        | 8,5596                          |
| 3.                       | 8,7                             | 3.                        | 8,2506                          |
| Průměr ( $V_i$ )         | 8,63                            | Průměr ( $V_i$ )          | 8,37                            |
| Průměrný obsah AA [mg/g] | 0,8137                          | Průměrný obsah AA [mg/g]  | 0,8132                          |
| Směrodatná odchylka      | 0,0057                          | Směrodatná odchylka       | 0,0162                          |

Průměrný obsah AA v 1 g salátu stanovený titrací s vizuální indikací činí  $(0,81 \pm 0,01)$  mg. Titrací s potenciometrickou indikací bylo stanoveno  $(0,81 \pm 0,02)$  mg/g AA.

#### 4. 4. Statistické porovnání výsledků

Vzhledem k tomu, že je volumetrie uznána jako oficiální metoda pro stanovení vitamínu C [30], byly s ní porovnány výsledky z dalších použitých metod. Statistická analýza byla provedena v programu TriloBite QC.Expert 2.7.

Tabulka 12: Výsledky použité pro statistické hodnocení

| Metoda                                  | Průměrný obsah AA [mg/g] | Směrodatná odchylka [mg/g] | Počet měření |
|-----------------------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------|
| Volumetrie s potenciometrickou indikací | 0,8132                   | 0,0162                     | 3            |
| Volumetrie s vizuální indikací          | 0,8137                   | 0,0057                     | 3            |
| Průtoková coulometrie [29]              | 0,8060                   | 0,0144                     | 5            |

##### 4. 4. 1. Porovnání výsledků volumetrických metod s vizuální a potenciometrickou indikací

Nejprve byl v TriloBite QC.Expert 2.7. proveden  $F$ -test, kterým byla testována shoda rozptylů obou výběrů. Měření poskytlo hodnotu poměru směrodatných odchylek 9,01, kritická hodnota je větší ( $F = 19$ ). Testováním shody průměrů obou výběrů byla zjištěna hodnota parametru  $t = 2,21$ , která je menší než kritická hodnota  $t$ -testu 2,77. Rozptyly i průměry obou výběrů jsou statisticky shodné na hladině významnosti 5 %.

Dvouvýběrovým jednostranným  $t$ -testem byla otestována správnost výsledku volumetrických stanovení. Vzhledem k tomu, že vypočtená hodnota parametru  $t = 0,01$  je menší než kritická hodnota 2,77, poskytuje volumetrie s potenciometrickou indikací shodné výsledky jako volumetrie s vizuální indikací na hladině významnosti 5 %.

#### **4. 4. 2. Porovnání volumetrie s vizuální indikací a průtokové coulometrie**

Nejprve byl v programu Microsoft Office Excel 2003 proveden  $F$ -test, kterým byla testována shoda rozptylů obou výběrů. Hodnoty průměru a směrodatné odchylky byly převzaty z [29]. Rozptyly obou výběrů jsou statisticky shodné na hladině významnosti 5 %.

Dvouvýběrovým jednostranným  $t$ -testem byla otestována správnost výsledku průtokové coulometrie. Vzhledem k tomu, že  $t$ -statistika 0,11 je menší než kritická hodnota 2,77, poskytuje průtoková coulometrie shodné výsledky jako volumetrie s vizuální indikací na hladině významnosti 5 %.



## 5. ZÁVĚR

21. století je stoletím biopotravin a zdravé výživy. Lidé si více potrpí na kvalitní suroviny zemědělské výroby, obsahující důležité nutriční složky. Zvýšený obsah antioxidantů v potravinách je důležitým parametrem pro výběr ovoce a zeleniny. Na českém trhu se objevily již zapomenuté rostliny čeledi *Brassicaceae*, populární salát rukola charakteristický silnou hořkou až štiplavou chutí který a méně známá roketa (*Eruca sativa*) jejíž specifická nahořklá chuť je mnohem slabší.

V letním salátu bylo metodou HPLC stanoveno 1,83 mg/g AA. Tato hodnota se liší od hodnoty stanovené v podzimním salátu cca o 1 mg/g. Volumetricky s vizuální indikací bylo v podzimním salátu stanoveno 0,81 mg/g AA a stejný obsah byl nalezen volumetrií s potenciometrickou indikací. Metodou průtokové coulometrie bylo stanoveno 0,80 mg/g AA.

Statistickým porovnáním metod jsem dospěla k závěru, že metoda průtokové coulometrie a volumetrie s potenciometrickou indikací poskytuje na hladině významnosti 5 % shodné výsledky jako volumetrie s vizuální indikací.

## 6. SUMMARY

21<sup>st</sup> century is a century of organic food and healthy diet. People are more seeking after high-quality organic ingredients that contain important nutritive components. High content of antioxidants in foodstuffs is one of the important parameters for a choice of buying fruit and vegetable. Again there are plants of *Brassicaceae* family that were already forgotten on the Czech market, popular wild rocket salad that is characteristic of its strong bitter and spicy taste and less known „roketa salad“ (*Eruca sativa*), whose specific slightly bitter taste is weaker.

Ascorbic acid was analyzed by selected analytical methods. In fresh summer salad was determined 1,83 mg/g AA by HPLC. Content of ascorbic acid in summer salad is more than two times higher than concentration in autumnal salad. In autumnal salad was determined amount of ascorbic acid equal to 0,80 mg/g (flow coulometry), 0,81 mg/g (titration with visual indication), and 0,81 mg/g (potential measurement indication) respectively.

The data achieved by different analytical methods were compared by statistical program QC. Expert 2.7 and by Microsoft Office Excel by F-test and t-test. Statistical evaluation of the collected data implies that the methods give identical results.

## 7. LITERATURA

1. Koyuncu M. A., Dilmacunal T.: *Determination of Vitamin C and Organic Acid Changes in Strawberry by HPLC During Cold Storage*. Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj **38**, 95-98, 2010.
2. Hlúbik P., Oporová L.: *Vitamíny*. Grada Publishing, Praha 2004.
3. Heimler D., Vignolini P., Dini M.G., Vincieri F. F., Romani A.: *Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties*. Food Chemistry, **99**, 464-469 (2006).
4. Novák J., Skalický M.: *Botanika: cytologie, histologie, organologie a systematika*. Powerprint, Praha 2008.
5. Hussain I., Khan L., Marwat G. A.: *Analysis of Vitamin C in Selected Medicinal Plants*. J. Chem. Soc. Pak., **33**, 260-262 (2011).
6. Doležalová I., Smékalová K., Dušek K.: *Roketa setá – opomíjená listová zelenina*. Zahradnictví. 26-28, 5/2011.
7. [http://donaldsgarden.blogspot.com/2011\\_03\\_01\\_archive.html](http://donaldsgarden.blogspot.com/2011_03_01_archive.html) (20. 11. 2011).
8. Michael N. H., Shafik E. R., Rasmy E.G.: *Studies on the chemical constituents of leaf of Eruca sativa extract and its biological activity as anticancer agent in vitro*. JMPR, **5**, 1184-1191 (2011).
9. Gulfranz M., Sadiq A., Tariq H., Imran M., Qureshi R. a Zeenat A.: *Phytochemical analysis and antibacterial activity of Eruca sativa seed*. Pak. J. Bot., **43**, 1351-1359 (2011).
10. Fragner J. a kol.: *Vitamíny jejich chemie a biochemie 2*. Československá akademie věd, Praha 1961.
11. Vávrová J., Pechová A., Wilhelm Z., Kazda A., Friedecký B., Jambor A.: *Vitamíny a stopové prvky 2007*. Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP a SEKK, Pardubice 2007.
12. Sedláčková K., Klečková Z. a Zahradník V.: *Vitamíny, jejich význam pro zdraví*. Naše vojsko, Praha 1953.
13. Velíšek J., Hajšlová J.: *Chemie potravin I*. Osis, Tábor 2009.

14. Velíšek J., Hajšlová J.: *Chemie potravin II*. Osis, Tábor 2009.
15. Vyhláška 450/2004 Sb., o označování výživové hodnoty potravin ze dne 24. července 2004 (10. 4. 2012).
16. Knobloch E.: *Fyzikálně chemické metody stanovení vitamínů*. Nakladatelství Československé akademie věd, Praha 1956.
17. Buriánek T., Hamerský S.: *Analýza potravin*. Střední průmyslová škola chemická. Brno 2006.
18. Buriánek T.: *Metody analýzy potravin*. Střední průmyslová škola chemická. Brno 2008.
19. Novotný F.: *Metody chemických rozborů pro hodnocení kvality odrůd II*. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno 2006.
20. Janečková J., Jančář L.: *Analytická chemie*. MZLU, Brno 2003.
21. Berčík J.: *Fyzikální a fyzikálně-chemické analytické metody 1*. Alfa, Bratislava 1977.
22. Jindra J.: *Dějiny elektrochemie v českých zemích 1882-1989*. Nakladatelství Libri, Praha 2009.
23. <http://www.fpv.umb.sk/kat/kch/elektrochem/Elektrochemia/Teoria/5.3.html> (20. 11. 2012).
24. Sommer I.: *Základy analytické chemie 1*. Vysoké učení technické v Brně, Vutium, Brno 2000.
25. Volf F. a kol.: *Zemědělská botanika*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha 1988.
26. Churáček J., a kol.: *Analytická separace látek*. Nakladatelství technické literatury, Praha 1990.
27. <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/tlcpc.html> (10. 4. 2012).
28. <http://ach.upol.cz/user-files/files/pac-01-2012.pdf> (10. 4. 2012).
29. Zoulová E.: *Stanovení kyseliny askorbové v roketě seté (Eruca sativa) průtokovou coulometrií*. Bakalářská práce, UP Olomouc 2012.

30. Pénicaud C., Peron S., Bohuon P., Gontard V.: *Ascorbic acid in food: Development of a rapid analysis technique and application to diffusivity determination*. Food Research International **43**, 838–847 (2010).
31. Vrábková J., Neugebauerová J.: *Vliv způsobu pěstování na vnitřní kvalitu Anethum Graveolens L.* Úroda, vědecká příloha, 647 – 651 (2011).