

Bakalářská práce

**Metody stanovení  
vybraných vitaminů  
(rešeršní práce)**

Lucie Štěpánková



Katedra analytické chemie  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Univerzita Karlova v Praze  
2007

Poděkování školiteli  
Doc. RNDr. Miroslavu Poláškoví, CSc.  
za trpělivost a vstřícnost při konzultacích  
a za cenné připomínky při psaní této práce.

# OBSAH

<b>OBSAH .....</b>	<b>2</b>
<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>3</b>
<b>2. POUŽITÉ METODY .....</b>	<b>3</b>
<b>3. TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>4</b>
VÝSKYT .....	4
FARMAKOLOGICKÉ VLASTNOSTI.....	5
<i>Farmakodynamické vlastnosti</i> .....	5
<i>Farmakokinetické vlastnosti</i> .....	5
<i>Předklinické údaje vztahující se k bezpečnosti přípravku</i> .....	6
POTŘEBA .....	6
<i>Hyhovitaminoza</i> .....	6
BIOSYNTÉZA .....	8
FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI.....	9
CHEMICKÉ VLASTNOSTI.....	9
<i>Antioxidační účinek</i> .....	10
<i>Stereochemie</i> .....	12
<b>4. VÝSLEDKY REŠERŠE .....</b>	<b>13</b>
ELEKTROCHEMICKÉ METODY .....	13
SPEKTROFOTOMETRICKÉ METODY .....	15
FLUORIMETRICKÉ METODY .....	16
PRŮTOKOVÁ INJEKČNÍ ANALÝZA .....	17
SEPARAČNÍ METODY .....	18
<i>Elektroforetické metody</i> .....	18
<i>HPLC metody</i> .....	18
<b>5. HODNOCENÍ .....</b>	<b>19</b>
<b>6. ZÁVĚR .....</b>	<b>20</b>
<b>7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>21</b>

# 1. ÚVOD

Cílem této práce je shromáždit informace o současných metodách, které slouží ke stanovení vitamínu C v různých vzorcích, například v biologickém materiálu, farmaceutických přípravcích, potravinách atd. Dále jejich rozdělení podle principu metody a jejich porovnání, na základě vyhledaných informací.

## 2. POUŽITÉ METODY

Zdrojem informací pro teoretickou část byly internetové stránky [de.wikipedia.org](http://de.wikipedia.org), kde pro vyhledávání byla použita slova Ascorbinsäure a Vitamin C. Dalším zdrojem byly stránky státního ústavu pro kontrolu léčiv [www.sukl.cz](http://www.sukl.cz), kde byla vyhledávána slova acidum ascorbicum.

Pro vytvoření teoretické části byl využíván především internetový zdroj Web of Science. K vyhledání příslušných odkazů byla využita slova determination, acid ascorbic, vitamin C. Jednotlivé odkazy byly vyhledány pro období 2004 – 2007.

### 3. TEORETICKÁ ČÁST

Kyselina askorbová je organická kyselina, která je snadno oxidovatelná a proto působí antioxidačně. Je velmi dobře rozpustná ve vodě a krystalizuje ve formě bezbarvého prášku. Její důležitou vlastností je fyziologický účinek jako vitamin C. Je to souhrnný název pro stereoisomer L-(+)-askorbové kyseliny a její deriváty.

Kyselina askorbová je citlivá na světlo a na kyselé prostředí.

Vitamin C zasahuje do oxidačně-redukčních dějů v organismu, účastní se na celkovém metabolismu jako regulátor, zesiluje účinky některých hormonů, případně se podílí na jejich biosyntéze. Ovlivňuje imunitní systém. Je důležitý pro růst a udržování zdravých kostí, zubů, dásní, vaziva a cév a je důležitou součástí všech tkání organismu. Při jeho nedostatku dochází k degenerativním změnám kapilár, kostí a pojivových tkání. Projevem mírného deficitu vitamínu C je gingivitida (zánět dásní), krvácení z dásní, poruchy vývoje zubů a kostí. Těžký nedostatek vyvolává skorbut (kurděje). Zvýšený přívod kyseliny askorbové vyžadují osoby s horečnatým a chronickým onemocněním, nedonošené a předčasně narozené děti, pacienti s popáleninami, dlouhodobě se hojícími ranami a zlomeninami, případně i s hematologickými (krevními) chorobami. [48]

#### Výskyt

V potravinách se vitamin C vyskytuje především v ovoci, zelenině a zeleném čaji. Množství vitamínu C kolísá v závislosti na odrůdě, klimatu, způsobu sklizně, skladování a způsobu zpracování surovin (vaření, sušení nebo při máčení). Ze živočišných zdrojů obsahují vitamin C především játra a ledviny, ale jeho množství je v živočišných zdrojích ve srovnání s rostlinnými velice malé. Citrusové plody jako pomeranče, citrony a grapefruity obsahují – ve zralém stavu těsně před sklizní – mnoho vitamínu C. Zelí červené, bílé a kyselé je rovněž zdrojem vitamínu C a mělo dlouhou dobu velký význam při mořeplavbách, protože sloužilo jako prevence před kurdějemi. [48]

Potravina	Obsah vitamínu C mg/100g	Potravina	Obsah vitamínu C mg/100g
Camu-camu	2000	Kedluben	105-150
Acerola třešeň	1300-1700	Růžičková kapusta	90-150
Šípek	1250	Paprika	100
Černý rybíz	189	Špenát	50-90
Jeřabiny	98	Bílé zelí	45

## **Farmakologické vlastnosti**

### **Farmakodynamické vlastnosti**

Kyselina askorbová se účastní oxidačně-redukčních, hydroxylačných, amidačních a jiných reakcí v organismu. Vychytává reaktivní formy kyslíku, které hrají úlohu v patogenezi aterosklerózy a ischemicko-reperfuzních poškození tkání. Kyselina askorbová způsobuje pokles adheze leukocytů a trombocytů na cévní endotel, inhibuje katabolický enzym arylsulfatázu B, inhibuje peroxidaci lipidů, chrání před oxidanty přítomnými v cigaretovém dýmu, regeneruje  $\alpha$ -tokoferol. Antioxidační vlastnosti kyseliny askorbové se podílejí i na hojení replantátů, fraktur a ran a také na radioprotektivním účinku. Účastní se katabolické přeměny cholesterolu na žlučové kyseliny. Je důležitá v metabolismu kostí a pojivových tkání, protože se podílí na syntéze kolagenu a na inkorporaci sulfátu do mukopolysacharidů. Má cytotoxické účinky na rakovinné buňky, přičemž pravděpodobným mechanismem účinku je aktivace DNA-ázy a destrukce DNA případně prooxidační účinek v těchto rakovinných buňkách deficientních na katalázu. Zvyšuje imunitní reakce organismu. [49]

### **Farmakokinetické vlastnosti**

Tělesné zásoby kyseliny askorbové jsou u zdravých osob okolo 1 500 mg, což při doporučeném denním příjmu 60 mg vitamínu C znamená plazmatickou koncentraci kolem 0,8 mg/dl, tj. 45  $\mu$ mol/l. Koncentrace kyseliny askorbové je vyšší v leukocytech a trombocytech než v erytrocytech. Koncentrace v leukocytech odpovídá koncentraci v tkáních. Bílé krvinky zdravých dospělých osob mají koncentraci okolo 27  $\mu$ g na  $10^8$  buněk. Renální práh kyseliny askorbové je okolo 1,5 mg/dl plazmy (85  $\mu$ mol/l), pak

dochází k její eliminaci. V lidských i zvířecích tkáních existují více nebo méně specifické transportní systémy pro kyselinu askorbovou. Přesto, že většina tkání preferuje redukovaný askorbát před oxidovanou formou - kyselinou dehydro-askorbovou a mají pro ni vysoce afinitní transportéry, existují i příklady opačné, např. glukózové transportéry (GLUT-1) a na sodíku závislé transportní systémy. Vitamin C je transportován v lidských B lymfocytech dvěma složkami: vysokoafinitní, jež je koncentračně a teplotně závislá, satureovatelná a inhibovatelná ouabainem. Druhá složka nebyla kineticky determinována. Více než 90 % intracelulární kyseliny askorbové je v cytosolu B lymfocytů.

Nejdůležitější metabolickou cestou vitamínu C je proměna na oxalát, jenž se vylučuje močí, přičemž hlavním meziproduktem je dehydroaskorbát. Dalším metabolitem vitamínu C, nacházejícím se v lidské moči, je neaktivní 2-sulfát kyseliny askorbové. Mimo něj byl z lidské moči izolován i další metabolit kyseliny askorbové, a to konjugát askorbové a beta-D-glukuronové kyseliny.

Kyselina askorbová prochází placentou a distribuuje se do mateřského mléka. Odstraňovaná je hemodialýzou. [50]

### **Předklinické údaje vztahující se k bezpečnosti přípravku**

Kyselina askorbová nemá embryotoxické, cytotoxické, teratogenní ani karcinogenní účinky. [50]

### **Potřeba**

Denní potřeba u dospělých činí podle doporučení 100 mg. Ale i množství kolem 5000 mg podávané krátkodobě je nezávadné. Přebytky množství je z těla vyloučeno močí. [48]

### **Hyhovitaminoza**

Jen málo obratlovců, mezi nimi i primáti, někteří ptáci a mořská prasátka, nejsou schopni biosyntézy askorbové kyseliny z glukuronové kyseliny, protože jim chybí L-glukonolaktonoxidáza. Pro tyto živočichy je kyselina askorbová tedy součástí potravy. Proto musí svoji potřebu pokrýt z potravy. Dlouhodobý nedostatek vede ke kurdějím. Toto onemocnění se může vyskytnout i při chybějící nebo nedostatečné výživě, nesprávných dietách a alkoholismu případně u zvýšené potřeby (těhotenství, kouření),

Plný účinek vitamínu C se rozvíjí ale jen v přítomnosti flavanolu, který je označován jako vitamin C2. K léčbě kurdějí však musí být přítomny obě látky, kdy k léčbě stačí již malé množství. [48]

## **Hypervitaminóza**

Pro vitamin C je hypervitaminóza velmi vzácná, tělo totiž přebytek vyloučí ledvinami.

Při příjmu asi 1 g denně stoupá koncentrace oxalátu a sekundárně i kyseliny močové v krevní plasmě. Zde se část kyseliny askorbové přeměňuje při látkové výměně na oxalát. U člověka je pak zvýšeno riziko vzniku ledvinových kamenů (kalciumoxalát). Již při normálním příjmu prochází asi 30 – 50 % plasmatického oxalátu z odbouraného vitamínu C.

Bylo také zjištěno, vitamin C ve velmi vysokých dávkách může poškodit vitamin B12.

Vysoké (perorální) dávky (5-10g) mohou vyvolat převážně osmoticky podmíněný průjem nebo dočasnou nespavost (podobně jako kofein). Také byla zveřejněna zpráva, že po intravenózním podání asi 80 g L-askorbové kyseliny starému pacientovi došlo po dvou dnech k úmrtí na insuficienci ledvin.

U lidí s nedostatkem glukoso-6-fosfátdehydrogenázy, zvláště rozšířené v Africe, mohou vysoké dávky vitamínu C vést k hemolýze. Toto onemocnění je dědičné.

Při dlouhodobém podávání vysokých dávek (asi 2-3 g/den) může vznikat nevolnost, osmotický průjem, nadýmání, žaludeční křeče. Také je možný vznik osmotické diurézy.

Také bylo zjištěno, že dlouhodobě podávané vysoké dávky (přes 20g denně) mohou způsobit kalcifikaci srdce a smrt.

Kojenecký skorbit se vyskytuje, jestliže během těhotenství byly podávány vysoké dávky vitamínu C. Vylučování přebytečné kyseliny askorbové je prováděno přes proteinové kanály v ledvinách. U vysokých koncentrací dochází i ke zvýšenému vylučování také v embryu. Po porodu tudíž kojeneček vylučuje zvýšené množství vitamínu C a to vede k rozvoji skorbutu.

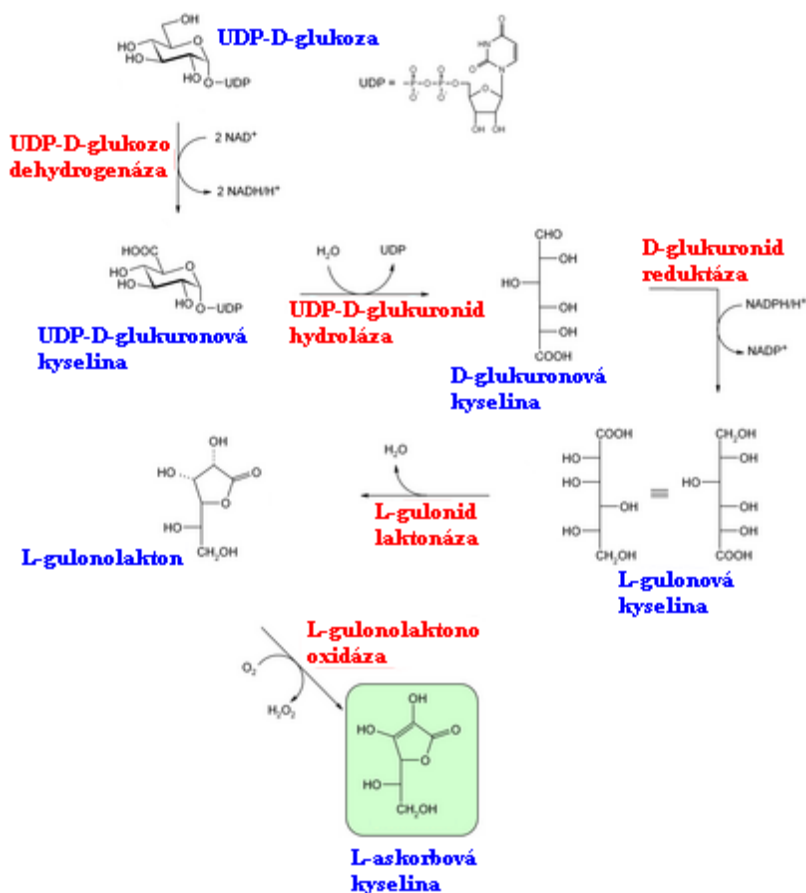
LD50 pro perorální podání je u myši asi 3,3 g/kg tělesné hmotnosti, při infuzním podání je u myši LD50 518 mg/kg tělesné hmotnosti. [48]



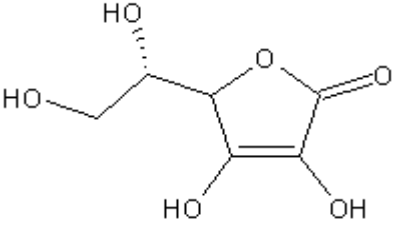
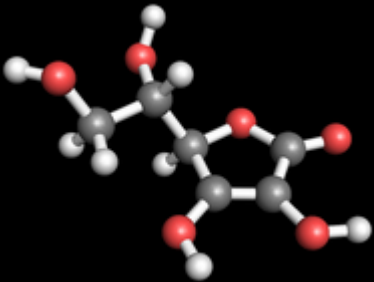
## Biosyntéza

Tvorba kyseliny askorbové v organismu začíná oxidací UDP-D-glukózy na UDP-D-glukuronovou kyselinu přes enzym UDP-D-glukozodehydrogenázu. Oxidační látkou je při tom  $\text{NAD}^+$ .

Po hydrolytickém odštěpení UDP se tvoří D-glukuronová kyselina, která se regioselektivní redukcí za účasti glukuronidreduktázy a  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  mění na L-gulonovou kyselinu. Účinkem gulonid-laktonázy vzniká L-gulonolakton, následuje selektivní oxidace kyslíkem za přítomnosti gulonolaktonoxidázy a vzniká askorbová kyselina. [48]



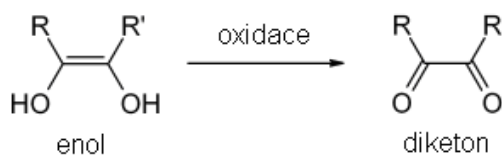
## Fyzikální vlastnosti

Struktura			
			
Obecně		Vlastnosti	
IUPAC-název	(R)-5-[(S)-1,2-Dihydroxyethyl]-3,4-dihydroxy- 5H-furan-2-on	Molekulová hmotnost	176,13 g/mol
Triviální název	L-(+)-Askorbová kyselina Ascorbat Vitamin C	Skupenství	pevné
Synonyma	3-Keto-L-gulofuranolacton 2,3-Endiol-L-gulonsäure-γ-lacton	Hustota	1,65 g/cm <sup>3</sup>
Sumární vzorec	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	Bod tání	190 °C
E-číslo	300	Bod varu	(termický rozklad > 192 °C)
CAS-číslo	50-81-7	pKs	pK <sub>s</sub> 1: 4,17; pK <sub>s</sub> 2: 11,57
Zkrácený popis	Bezbarvý krystalický prášek	Specifická otáčivost	+48° (c=1 in Methanol, 25 °C, 589,3 nm)
		Rozpustnost	Ve vodě rozpustný, 330 g/l

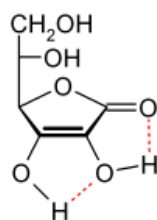
## Chemické vlastnosti

Kyselina askorbová obsahuje jen málo strukturních elementů, které by přispívaly jejím chemickým vlastnostem: lakton, dvě enolické OH skupiny a primární a sekundární OH skupinu.

Dvě enolické skupiny podmiňují její antioxidační vlastnosti. Tyto enolické skupiny jsou snadno oxidovatelné na diketon:



Kyselina askorbová vytváří dva intramolekulární vodíkové můstky, ty jsou rozhodující pro stabilitu a chemické vlastnosti enolické struktury. [48]



## Kyselost

Ačkoliv kyselina askorbová nemá „klasické“ kyselé funkční skupiny, vykazuje značnou kyselost;  $pK_a = 4,2$

Její kyselost odvozujeme z enolické struktury. Enol je zřetelně kyselejší než alkohol. Kyselost vyplývající z enolické struktury je ještě zesílena sousední karbonylovou skupinou.

Po odštěpení protonu je odpovídající enolátový aniont stabilizován keto-enol tautomerií. Vzniká příslušný negativní náboj na kyslíku a přitom dochází k delokalizaci dvojné vazby a rozložení náboje – struktura je stabilizována.

Další OH skupiny mají jen slabé kyselé vlastnosti ( $pK_a = 11,8$ ). [48]

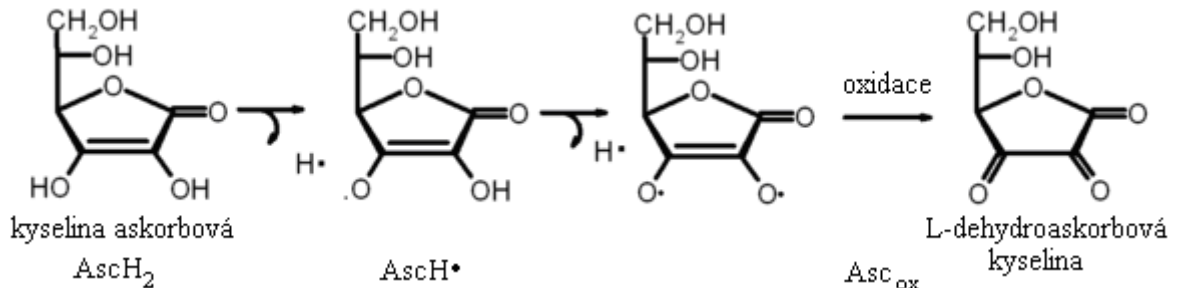
## Antioxidační účinek

Důležitou funkcí kyseliny askorbové v lidském organismu jsou její redukční vlastnosti. Velice důležité pro tuto vlastnost jsou elektrony v její molekule.

Můžeme rozlišit dva základní úkoly:

### Kyselina askorbová jako lapač radikálů

Kyselina askorbová slouží v těle jako lapač radikálů, což je schematicky zachyceno na následujícím obrázku, kde kyselina askorbová při přeměně na kyselinu dehydroaskorbovou ztrácí dva elektrony:



Při látkové výměně kyslíku v buňce dochází ke vzniku superoxidradikálu, když molekula kyslíku při vnitřní reakci v dýchacím systému obdrží jen jeden elektron. Superoxidradikál je na základě nedostatku elektronů extrémně reaktivní a poškozuje buňky. Reakcí s kyselinou askorbovou se mění na peroxid vodíku:



Peroxid vodíku je poté rozložen enzymem katalázou.

### Kyselina askorbová jako kofaktor při redoxních reakcích

Jak už bylo zmíněno vytváří kyselina askorbová stabilní anionenolátovou strukturu, označovanou jako hydridanion.

Již výše uvedené schéma ukazuje přeměnu kyselina askorbové na L-dydroaskorbovou. Tato její vlastnost je důležitá pro syntézu kolagenu v lidském metabolismu. Pro výstavbu tohoto strukturního proteinu však musí být přítomna aminokyselina prolin ve své oxidované formě (hydroxyprolin). Kyselina askorbová zde slouží k regeneraci hydroxyprolinu. Pokud dojde k nedostatku kyseliny askorbové, netvoří se hydroxyprolin potřebný k syntéze kolagenu a vznikají typické symptomy skorbutu – krvácení z dásní, vypadávání zubů a poškození kůže.

## Stereochemie

Kyselina askorbová existuje ve 4 různých stereoizomerních formách, které vykazují optickou aktivitu. Podle odlišností na 4 a 5 atomu C rozlišujeme: L-askorbovou kyselinu

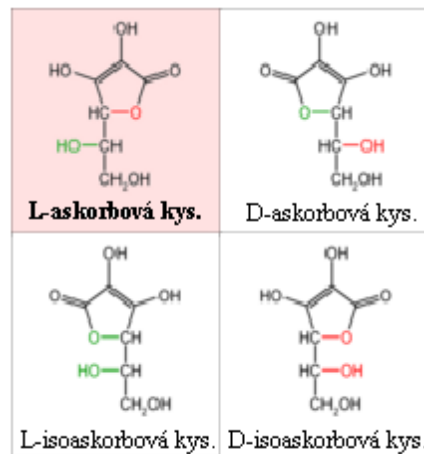
D-askorbovou kyselinu

L-isoaskorbovou kyselinu

D-isoaskorbovou kyselinu

Molekuly L- a D-askorbové kyseliny se chovají jako enantiomery, na rozdíl od L- a D-isoaskorbové kyseliny.

L-askorbová kyselina s D-isoaskorbová kyselina a D-askorbová kyselina s L-isoaskorbová kyselina jsou epimery, které může rozlišit díky konfiguraci na atomech C. V těle je účinná L-askorbová kyselina, které je rozeznávána určitými enzymy látkové výměny. Malý účinek má také D-isoaskorbová kyselina. [48]



## 4. VÝSLEDKY REŠERŠE

V této části jsou uvedeny všechny nalezené metody sloužící ke stanovení vitamínu C v různých materiálech.

Metody jsou rozčleněny podle svého principu do několika následujících skupin.

### Elektrochemické metody

Tabulka číslo 1

<i>metoda</i>	<i>matrice</i>	<i>Elektroda / elektrolyt / E<sub>p</sub></i>	<i>Rozsah kalibrace</i>	<i>Limit detekce</i>	<i>Odkaz</i>
Amperometrie	nápoje, farm. produkty	GCE modif. poly-1-naftylaminem / fosfátový pufr (pH=3)	$5,0 \times 10^{-5} - 1,5 \times 10^{-3}$ mol/l	1 ppm (S/N=3)	1
Diferenční pulsní voltametrie		GCE modif. poly(p-toluensulfonovou kys.) / 192 mV		$6,0 \times 10^{-7}$ mol/l	2
	tablety	GCE modif. polyhydrochinonem	$3,3 \times 10^{-5} - 1,7 \times 10^{-2}$ a $1,7 \times 10^{-2} - 1,2 \times 10^{-1}$ mol/l	$3,3 \times 10^{-6}$ mol/l	3
Diferenční pulsní voltametrie	krevní sérum, moč	uhlíková iontová kapalná elektroda / 60 mV	$5,5 \times 10^{-5} - 7,4 \times 10^{-3}$ mol/l		4
Diferenční pulsní voltametrie	moč	Au elektroda modif. ferrocenium-thioglykolátem / fosfátový pufr (pH=7)	$1,0 \times 10^{-6} - 5,0 \times 10^{-4}$ mol/l	$2,0 \times 10^{-7}$ mol/l	5
Diferenční pulsní voltametrie		GCE modif. poly mangan (III)-5-[o-(1-imidazolyl)butoxy]fenyl-10,15,20-trifenylnorfyrylchloridem / 24 mV	$2,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$ mol/l	$1,0 \times 10^{-6}$ mol/l	6

	moč	GCE modif. 5-hydroxytryptofanem / 340 mV	$5,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$ mol/l	$4,2 \times 10^{-6}$ mol/l	7
Cyklická voltametrie	komerční vzorky	elektroda modif. hexakynoželeznanem kobaltnatým	$5,52 \times 10^{-5} - 3,23 \times 10^{-2}$ mol/l	$3,33 \times 10^{-5}$ mol/l	8
	farm. vzorky	Au elektroda modif. cystaminem s imobilizovaným $[\text{Fe(II/III)(CN)}_6]^{x-}$ / TRIS pufr (0,01 mol/l) pH=7 / 280 mV	$1 \times 10^{-6} - 0,91 \times 10^{-3}$ mol/l	$0,65 \times 10^{-6}$ mol/l	9
Cyklická voltametrie	farm. přípravky	C pastová elektroda modif. 2,7-bis(ferrocenylethyl)fluoren 9-onem / pH=7 / 300 mV	$8,0 \times 10^{-5} - 2,0 \times 10^{-3}$ mol/l	$2,9 \times 10^{-5}$ mol/l	10
Diferenční pulsní voltametrie	farm. přípravky	C pastová elektroda modif. 2,7-bis(ferrocenylethyl)fluoren 9-onem / pH=7 / 300 mV	$3,1 \times 10^{-5} - 3,3 \times 10^{-3}$ mol/l	$9,0 \times 10^{-6}$ mol/l	10
Potenciometrie	skutečné vzorky	Grafitová elektroda modif. polypyrolovým nanovláknem	$5,0 \times 10^{-4} - 2,0 \times 10^{-2}$ mol/l		11
Voltametrie	skutečné vzorky	pyrolytická grafitová elektroda	$0,1 \times 10^{-6} - 0,1 \times 10^{-4}$ mol/l	$0,12 \times 10^{-6}$ mol/l	12
		GCE modif. kobalt(II)tetrakisfenylporfyrinem	$9,0 \times 10^{-6} - 2,0 \times 10^{-3}$ mol/l	$5,0 \times 10^{-6}$ mol/l	13
		Au elektroda modif. 3-amino-5-mercapto-1,2,4-triazolem / BR pufr (pH=2)	$9,98 \times 10^{-6} - 4,54 \times 10^{-4}$ mol/l		14
Diferenční pulsní voltametrie	lékové vzorky	C pastová elektroda modif. kobalt ftalocyaninovými nanočásticemi	$5,0 \times 10^{-6} - 3,0 \times 10^{-4}$ mol/l		15
Cyklická voltametrie		grafitová-vosková elektroda modif. mangan(II) $[\text{Fe(CN)}_6]^{x-}$ / pH 2 – 10 / -400 – +800 mV	$5,52 \times 10^{-5} - 1,44 \times 10^{-3}$ mol/l	$2,22 \times 10^{-5}$ mol/l (S/N=3)	16
Cyklická voltametrie a amperometrie	ovoce	GCE modif. vanadium oxid polypropylen uhličitanem / BR roztok pH=8,06 / 220 mV	$4,0 \times 10^{-1} - 1,0 \times 10^{-1}$ mol/l	$1,5 \times 10^{-8}$ mol/l (S/N=3)	17
SWAS voltametrie		Au elektroda modif. thiazolem / boritan sodný (0,1 mol/l) pH=4,4 / 200 +/- 10 mV	$1,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-5} - 6,0 \times 10^{-4}$ mol/l	$1,0 \times 10^{-8}$ mol/l	18

Cyklická voltametrie		GCE modif. poly(kávovou kyselinou)	$2,0 \times 10^{-5} - 1,0 \times 10^{-3}$ mol/l	$7,0 \times 10^{-6}$ mol/l	19
		GCE modif. Fe <sup>X</sup> karboxylovou kyselinou imobilizovanou v dutině beta-cyklodextrin polymeru / 490 mV	$6,2 \times 10^{-6}$ a $5,0 \times 10^{-3}$ mol/l	$1,0 \times 10^{-6}$ mol/l (S/N=3)	20
Potenciometrie	skutečné vzorky	GCE modif. kobalt ftalocyanin nanočásticemi	$5.5 \times 10^{-7} - 5.5 \times 10^{-2}$ mol/l	$1.0 \times 10^{-7}$ mol/l	21

## Spektrofotometrické metody

Tabulka číslo 2

<i>metoda</i>	<i>matrice</i>	<i>čínidlo</i>	<i>čas</i>	<i>Vlnová délka</i>	<i>Rozsah kalibrace</i>	<i>Limit detekce</i>	<i>odkaz</i>
Kinetická	farm. produkty	redukováný Fe(II) a 2,2'-bipyridinin	3 min	522nm	0,1 – 15 mg/ml a 20 – 45 mg/ml	0,032 pg/ml	22
	plody, nápoje, léky	redukováný Cu <sup>+</sup> 2,9-dimethyl-1,10-fenantrolin			$0.1 \times 10^{-6}$ - $4.0 \times 10^{-6}$ g/ml	$4 \times 10^{-5}$ g/l	23
Kinetická	tablety	vanad (V)		555 nm	0 – 7.0 µg/ml	$2.5 \times 10^{-7}$ g/ml	24
Diferenciální kinetická	farm. produkty	Fe(III) a 1,10-fenantrolin	každé 2 s od 10 až 190 s	510 nm	2.00-11.82 ppm		25



## Fluorimetrické metody

Tabulka číslo 3

<i>matrice</i>	<i>čínidlo</i>	<i>Exitační / emisní vlnová délka</i>	<i>Rozsah kalibrace</i>	<i>Limit detekce</i>	<i>odkaz</i>
Léčiva, zelenina, různé druhy ovoce a nealkoholické nápoje	Inhibiční efekt kyseliny askorbové na oxidaci pyroninu Y dusitanem		0.02-0.36 µg/ml	0.012 µg/ml	26
Tablety vitamínu C	metylenová modř	664 / 682 nm	$3,0 \times 10^{-7}$ – $6,0 \times 10^{-6}$ mol/l	$2,5 \times 10^{-7}$ mol/l	27
Skutečné vzorky	mono-[6-N4-carboxyfenyl]-beta-cyklodextrin (ACD)	270 / 352 nm	0.05-8.0 µg/ml	0.012 µg/ml	28
	Tb/acetyl-aceton / nanočástice kyseliny poly(akrylové)		0.05 - 10 µg/ml	0.008 µg/ml	29
Skutečné vzorky a tablety	cer (IV)	303 / 340 nm	$1.0 \times 10^{-7}$ - $8.0 \times 10^{-6}$ mol/l,	$1.6 \times 10^{-8}$ mol/l (S/N = 3)	30
Reálné vzorky	mono [6-(4-aminofenylacetát)-6-deoxy]-beta-cyklodextrin (AACD)		0.05 až 5.0 mg/l	0.015 mg/l	31

## Průtoková injekční analýza

Tabulka číslo 4

<i>matrice</i>	<i>detekce</i>	<i>Frekvence dávkování</i>	<i>rozsah kalibrace</i>	<i>Limit detekce</i>	<i>odkaz</i>
Farm. produkty	amperometrie / methylenová modř imobilizovaná na fosforečnanu titanitím / fosfátový pufr pH=7 + 0,5 M KCl		$1,0 \times 10^{-6}$ – $2,5 \times 10^{-5}$ mol/l		32
Skutečné vzorky	fluorescence / Tl (III)	16 vzorků/hod	$1 \times 10^{-6}$ – $5,0 \times 10^{-5}$ mol/l	$8 \times 10^{-7}$ mol/l (S/N=3)	33
Farm. produkty, moč	chemiluminiscence / Fe <sup>3+</sup>		0.06 ≈ 6 µg/ml		34
Farm. produkty	spektrofotometrie (510 nm) / Fe(III)-1,10-fenantrolin peroxodisulfátový systém / acetátový pufr (0.2 mol/l, pH 4.5)			15 mg/l	35
Farm. produkty	elektrochemie / hydrochinon	25 vzorků/hod	$12 \times 10^{-9}$ mol/l – $3.5 \times 10^{-6}$ mol/l	$6 \times 10^{-9}$ mol/l	36
Džusy, léky, sladkosti a konzervované kapaliny	spektrofotometrie (720nm) / Berlínská modř		$5.1 \times 10^{-6}$ – $6.8 \times 10^{-5}$ mol/l	$4.5 \times 10^{-7}$ mol/l	37
	AAS / oxid manganičitý (30% m/m suspendovaný na silikagelu)	95 vzorků/hod	až do 30 mg/l	0.2 mg/l	38
Tablety, injekce	chemiluminiscence / formaldehyd		$6.0 \times 10^{-8}$ do $2.0 \times 10^{-5}$ mol/l	$2 \times 10^{-8}$ mol/l	39
Ovocné šťávy	chemiluminiscence / luminol	100 vzorků/hod	až asi 0,011 mol/l	0.00017 mol/l	40
Farm. produkty, jídlo	spektrofotometrie (462 nm) / [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-</sup>		až 100 µg/ml	0.36 µg/ml	41

## Separční metody

### Elektroforetické metody

Tabulka číslo 6

<i>matrice</i>	<i>Elektrolyt</i>	<i>Detekce</i>	<i>Rozsah kalibrace</i>	<i>Limit detekce</i>	<i>Odkaz</i>
Grapefruitová slupka a šťáva	boritanový pufr pH=9	elektrochemie		$11,4 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-6}$ g/ml	42
Kosmetika	0,01 mol/l boritan (pH 9.5) obsahující 0,05 mol/l dodecylsírany sodného (SDS 150,0 – 1000,0 $\mu$ mol/l) v 20 kV	UV-detekce (265 nm)		$0,5 \times 10^{-4}$ mol/l	43
Džus	0,08 mol/l kyselina boritá – 0,005 mol/l borax (pH = 8.0)	UV-detekce (270nm)	2.54-352.00 mg/l	1.70 mg/l	44

### HPLC metody

Tabulka číslo 6

<i>matrice</i>	<i>Kolona / MF</i>	<i>detekce</i>	<i>rozsah kalibrace</i>	<i>Limit detekce</i>	<i>odkaz</i>
Různé druhy vín	polymerní PLRP – S 100 A (5 $\mu$ m) 150mm x 4,6 mm / voda/trifluoroctová kyselina (99/1, v/v)	UV - detekce	1 – 200 mg		45
Potravinářské výrobky	C18 / octan sodný (pH=5,4) obsahující TRIS (2-karboxyetyl)fosfát a decylamin	UV-detekce		0,1 mg/100g	46
Lidská plasma	LiChrospher 100 RP-18 kolona (125 x 4 mm I.D.; rozměr částic, 5 $\mu$ m) / methylalkohol-acetonitril- tetrahydrofuran (75: 20: 5, v/v/v)	UV-detekce s fotodiodovým polem	0,1 až 5,0 mg/ml		47

## 5. HODNOCENÍ

Jak vyplývá z výše uvedených tabulek, v dnešní době jsou nejužívanější metody elektrochemické, které nejčastěji využívají modifikovanou elektrodu ze skelného uhlíku. Jedná se zejména o diferenční pulsní voltametrii, cyklickou voltametrii, amperometrii a potenciometrii. Tyto metody jsou poměrně citlivé a lze jimi stanovovat kyselinu askorbovou až do koncentrací  $10^{-8}$  mol/l.

Dalšími využívanými metodami jsou spektrofotometrie, fluorimetrie a průtoková injekční analýza, tyto metody nejsou tak frekventované, ale i tak se svou citlivostí vyrovnají metodám elektrochemickým. Spektrofotometrické metody jsou nejčastěji kinetické.

HPLC metody a elektroforéza jsou separační techniky, které často pro detekci využívají již zmíněných technik a to hlavně UV-detekci. Citlivost stanovení je závislá na metodě detekce.

## 6. ZÁVĚR

V této práci byly popsány a vzájemně porovnány metody, které se v dnešní době nejvíce používají ke stanovení vitamínu C.

Rešerše byla provedena z literatury publikované v letech 2004 - 2007 v různých chemických časopisech. Bylo nalezeno celkem 47 prací, z nichž většina využívá ke stanovení elektrochemii.

Většina metod pro stanovení vitamínu C vyniká svou jednoduchostí a v mnoha případech také svou citlivostí. Snadno jimi lze stanovit vitamin C i v přítomnosti řady dalších látek, aniž by došlo k interferenci.

Z těchto důvodů našly tyto metody uplatnění jak ve zdravotnickém tak potravinářském průmyslu, ale i v řadě dalších odvětví.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1 D'Eramo F., Sereno L.E., Arevalo A.H.: Electrocatalytic properties of a novel poly-1-naphthylamine-modified electrode using ascorbic acid as molecule probe. *Electroanalysis* 19(1), s. 96 - 102 (2007).
- 2 Huang P.F., Wang L., Bai J.Y., Wang H.J., Zhao Y.Q., Di Fan S.: Simultaneous electrochemical detection of dopamine and ascorbic acid at a poly(p-toluene sulfonic acid) modified electrode. *Microchim. Acta* 157(1-2), s. 41 - 47 (2007).
- 3 Chen X.G., Ren W., Zhao G.F., Zou X.Y.: Electrocatalytic oxidation and determination of ascorbic acid on polymer hydroquinone modified electrode. *Chin. J. Anal. Chem.* 34(8), s. 1063 - 1067 (2006).
- 4 Safavi A., Maleki N., Moradlou O., Tajabadi F.: Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid, and uric acid using carbon ionic liquid electrode. *Anal. Biochem.* 359(2), s. 224 - 229 (2006).
- 5 Fang B., Jiao S.F., Li M.G., Tao H.S.: Simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid at a ferrocenium-thioglycollate modified electrode. *Anal. Bioanal. Chem.* 386(7-8), s. 2117 - 2122 (2006).
- 6 Deng X.R., Wang L.S., Zhang S.F., Liu X.X., Mo J.Y.: Simultaneous determination of ascorbic acid and dopamine at electro polymerized manganese (III)-5-[o-(1-imidazolyl)butoxy]phenyl-10,15,20-triphenyl porphrine chloride film modified glassy carbon electrode. *Chin. J. Anal. Chem.* 34(5), s. 637 - 641 (2006).
- 7 Lin X.Q., Li Y.X.: Monolayer covalent modification of 5-hydroxytryptophan on glassy carbon electrodes for simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid. *Electrochim. Acta* 51(26), s. 5794 - 5801 (2006).
- 8 Kumar S.S., Narayanan S.S.: Amperometric sensor for the determination of ascorbic acid based on cobalt hexacyanoferrate modified electrode fabricated through a new route. *Chem. Pharm. Bull.* 54(7), s. 963 - 967 (2006).

- 9 Ribeiro E.S., Kubota L.T.: Immobilization of hexacyanoferrate on a gold self-assembled monolayer, and its application as a sensor for ascorbic acid. *Microchim. Acta* 154(3-4), s. 303 - 308 (2006).
- 10 Raouf J.B., Ojani R., Beitollahi H., Hossienzadeh R.: Electrocatalytic determination of ascorbic acid at the surface of 2,7-bis(ferrocenyl ethyl)fluoren-9-one modified carbon paste electrode. *Electroanalysis* 18(12), s. 1193 - 1201 (2006).
- 11 Wang J.S., Wang J.X., Wang Z., Wang S.C.: Electrocatalytic oxidation of ascorbic acid at polypyrrole nanowire modified electrode. *Synthetic metals* 156(7-8), s. 610 - 613 (2006).
- 12 Kachoosangi R.T., Banks C.E., Compton R.G.: Simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid using edge plane pyrolytic graphite electrodes. *Electroanalysis* 18(8), s. 741 - 747 (2006).
- 13 Li C.X., Zeng Y.L., Liu Y.J., Tang C.R.: Simultaneous electrochemical determination of uric acid and ascorbic acid on a glassy carbon electrode modified with cobalt(II) tetrakisphenylporphyrin. *Anal. Sci.* 22(3), s. 393 - 397 (2006).
- 14 Sun Y.X., Wang S.F.: Simultaneous determination of dopamine and ascorbic acid at a triazole self-assembled monolayer-modified gold electrode. *Microchim. Acta* 154(1-2), s. 115 - 121 (2006).
- 15 Yang G.J., Xu J.J., Wang K, Chen H.Y.: Electrocatalytic oxidation of dopamine and ascorbic acid on carbon paste electrode modified with nanosized cobalt phthalocyanine particles: Simultaneous determination in the presence of CTAB. *Electroanalysis* 18(3), s. 282 - 290 (2006).
- 16 Jayasri D., Narayanan S.S.: Electrocatalytic oxidation of ascorbic acid by a manganese(II) hexacyanoferrate-modified graphite-wax composite electrode. *Bull. Electrochem.* 21(12), s. 537 - 545 (2005).

- 17 Li T.A., Chen L., Liu L., Lu N., Song W.B., Xu H.D.: Electrochemical determination of ascorbic acid in fruits on a vanadium oxide polypropylene carbonate modified electrode. *Sens. Actuators, B* 113(1), s. 150 - 155 (2006).
- 18 Sun Y.X., Wang S.F., Zhang X.H., Huang Y.F.: Simultaneous determination of epinephrine and ascorbic acid at the electrochemical sensor of triazole SAM modified gold electrode. *Sens. Actuators, B* 113(1), s. 156 - 161 (2006).
- 19 Ren W., Luo H.Q., Li N.B.: Simultaneous voltammetric measurement of ascorbic acid, epinephrine and uric acid at a glassy carbon electrode modified with caffeic acid. *Biosens. Bioelectron* 21(7), s. 1086 - 1092 (2006).
- 20 Kan X.W., Zhang W.Z., Deng X.H., Tao H.S., Li M.G., Fang B.: Electrochemical behavior and determination of ascorbic acid at beta-cyclodextrin/ferrocene carboxylic acid modified electrode using fresh albumen as crosslinking agent. *Chin. J. Anal. Chem.* 33(11), s. 1573 - 1576 (2005).
- 21 Wang K., Xu J.J., Tang K.S., Chen H.Y.: Solid-contact potentiometric sensor for ascorbic acid based on cobalt phthalocyanine nanoparticles as ionophore. *Talanta* 67(4), s. 798 - 805 (2005).
- 22 Fathi M.R., Elahi R., Hashemi P.: Kinetic spectrophotometric determination of ascorbic acid in pharmaceutical formulations. *Chem. Anal.* 50(6), s. 1069 - 1076 (2005).
- 23 Shrivastava K., Agrawal K., Patel D.K.: A spectrophotometric determination of ascorbic acid. *J. Chin. Chem. Soc.* 52(3), s. 503 - 506 (2005).
- 24 Zhang Z.X., Sun D.M., Rong Z.H.: Catalytic kinetic spectrophotometric determination of trace ascorbic acid. *Spectroscopy and spectral analysis* 24(7), s. 873 - 875 (2004).



- 25 Ghasemi J., Seraji H.R., Noroozi M., Hashemi M., Jabbari A.: Differential kinetic spectrophotometric determinations of ascorbic acid and L-cysteine by partial least squares method. *Anal. Lett.* 37(4), s. 725 - 737 (2004).
- 26 Feng S.L., Wang J., Chen X.G., Fan J.: Kinetic spectrofluorimetric determination of trace ascorbic acid based on its inhibition on the oxidation of pyronine Y by nitrite. *Spectrochim. Acta, Part A* 61(5), s. 841 - 844 (2005).
- 27 Dilgin Y., Nisli G.: Fluorimetric determination of Ascorbic Acid in Vitamin C tablets using methylene blue. *Chem. Pharm. Bull.* 53(10), s. 1251 - 1254 (2005).
- 28 Wang L., Zhang L., She S.K., Gao F.: Direct fluorimetric determination of ascorbic acid by the supramolecular system of AA with beta-cyclodextrin derivative. *Spectrochim. Acta, Part A* 61(11-12), s. 2737 - 2740 (2005).
- 29 Wang L., Bian G.R., Dong L., Xia Y.T., Hong S.: Preparation of a novel fluorescence probe of terbium composite nanoparticles and its application in the determination of ascorbic acid. *Microchim. Acta* 150(3-4), s. 291 - 296 (2005).
- 30 Tong C.L., Xiang G.H., Liu W.P.: Determination of ascorbic acid by indirect fluorimetry. *Spectroscopy and spectral analysis* 25(4), s. 598 - 600 (2005).
- 31 Zhang L., She S.K., Gao F., Wang L.: Synthesis of a novel beta-cyclodextrin derivative and its application in the determination of ascorbic acid. *Chin. J. Anal. Chem.* 33(11), s. 1583 - 1586 (2005).
- 32 Dilgin Y., Nisli G.: Flow injection photoamperometric investigation of ascorbic acid using methylene blue immobilized on titanium phosphate. *Anal. Lett.* 39(3), s. 451 - 465 (2006).
- 33 Rezaei B., Ensafi A.A., Nouroozi S.: Flow-injection determination of ascorbic acid and cysteine simultaneously with spectrofluorometric detection. *Anal. Sci.* 21(9), s. 1067 - 1071 (2005).

- 34 Li B.X., Wang D.M., Xu C.L., Zhang Z.J. Flow-injection simultaneous chemiluminescence determination of ascorbic acid and L-cysteine with partial least squares calibration. *Microchim. Acta* 149(3-4), s. 205 - 212 (2005).
- 35 Zenki M., Tanishita A., Yokoyama T.: Repetitive determination of ascorbic acid using iron(III)-1,10-phenanthroline-peroxodisulfate system in a circulatory flow injection method. *Talanta* 64(5), s.1273 - 1277 (2004).
- 36 Messina G.A., Torriero A.A.J., De Vito I.E., Raba J.: Continuous-flow/stopped-flow system for determination of ascorbic acid using an enzymatic rotating bioreactor. *Talanta* 64(4), s. 1009 - 1017 (2004).
- 37 Rama M.J.R., Medina A.R., Diaz A.M.: A Prussian blue-based flow-through renewable surface optosensor for analysis of ascorbic acid. *Microchem. J.* 78(2), s. 157 - 162 (2004).
- 38 Noroozifar M., Khorasani-Motlagh M., Akhavan K.: Atomic absorption spectrometry for the automatic indirect determination of ascorbic acid based on the reduction of manganese dioxide. *Anal. Sci.* 21(6), s. 655 - 659 (2005).
- 39 Zhu X.H., He Y.H., Liu M., Du J.X., Lu J.R.: Chemiluminescence determination of trace ascorbic acid with soluble manganese (IV)-formaldehyde system. *Chin. J. Anal. Chem.* 32(6), s. 752 - 754 (2004).
- 40 Pires C.K., Lavorante A.F., Marconi L.M.T., Meneses S.R.P., Zagatto E.A.G.: A multi-pumping flow system for chemiluminometric determination of ascorbic acid in powdered materials for preparation of fruit juices. *Microchem. J.* 83(2), s. 70 - 74 (2006).
- 41 Noroozifar M., Khorasani-Motlagh M., Farahmand A.R.: Automatic spectrophotometric procedure for determination of L-ascorbic acid based on reduction of iron(III)-thiocyanate complex. *Acta Chim. Slov.* 51(4), s.717 - 727 (2004).

- 42 Wu T., Guan Y.Q., Ye J.N.: Determination of flavonoids and ascorbic acid in grapefruit peel and juice by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chem.* 100(4), s. 1573 - 1579 (2007).
- 43 Wang C.C., Wu S.M.: Simultaneous determination of L-ascorbic acid, ascorbic acid-2-phosphate magnesium salt, and ascorbic acid-6-palmitate in commercial cosmetics by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *Anal. Chim. Acta* 576(1), s. 124 - 129 (2006).
- 44 Tang Y.J., Wu M.J.: A quick method for the simultaneous determination of ascorbic acid and sorbic acid in fruit juices by capillary zone electrophoresis. *Talanta* 65(3), s. 794 - 798 (2005).
- 45 Lopes P., Drinkine J., Saucier C., Glories Y.: Determination of L-ascorbic acid in wines by direct injection liquid chromatography using a polymeric column. *Anal. Chim. Acta* 555(2), s. 242 - 245 (2006).
- 46 Fontannaz P., Kilinc T., Heudi O.: HPLC-UV determination of total vitamin C in a wide range of fortified food products. *Food Chem.* 94(4), s. 626 - 631 (2006).
- 47 Zhao B., Tham S.Y., Lu J., Lai M.H., Lee L.K.H., Moochhala S.M.: Simultaneous determination of vitamins C, E and beta-carotene in human plasma by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J. Pharm. Pharmac. Sci.* 7(2), s. 200 - 204 (2004).
- 48 [http://de.wikipedia.org/wiki/Vitamin\\_C](http://de.wikipedia.org/wiki/Vitamin_C) citace 7.2. 2007
- 49 [http://www.sukl.cz/\\_download/pil/PI67133.doc](http://www.sukl.cz/_download/pil/PI67133.doc) citace 20. 2. 2007
- 50 [http://www.sukl.cz/\\_download/spc/SPC67134.doc](http://www.sukl.cz/_download/spc/SPC67134.doc) citace 20. 2. 2007