

Antioxidanty v nápojích

Vojtěch Hanák, Dis

Bakalářská práce
2011

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie a mikrobiologie potravin
akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Vojtěch HANÁK, DiS.**
Osobní číslo: **T080053**
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie a řízení v gastronomii**

Téma práce: **Antioxidanty v nápojích**

Zásady pro vypracování:

1. Význam a rozdělení antioxidantů
2. Nejvýznamnější antioxidanty
3. Způsoby analýzy antioxidantů v nápojích
4. Kyselina L-askorbová – významný antioxidant v nápojářství
5. Možnosti stanovení kyseliny L-askorbové v nápojích
6. Použití metody HPLC pro stanovení kyseliny L-askorbové

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] Velišek, J. *Chemie potravin 2*, OSSIS, Tábor 1999.

[2] Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích po úpravě zákonem č.306/200 Sb. s komentářem , GROSPOJ s.r.o., Praha 2001.

[3] Pánek, J., Pokorný, J., Dostálová, J., Kohout, P. *Základy výživy*, 1. vydání, SVOBODA SERVIS, Praha 2002.

[4] Daněček, F. *Chemické kontrolní metody II*, 1.vydání, SNTL, Praha 1990.

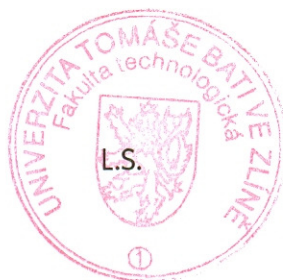
Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Marie Rumíšková**
Bzenec

Datum zadání bakalářské práce: **11. února 2011**

Termín odevzdání bakalářské práce: **30. května 2011**

Ve Zlíně dne 12. dubna 2011

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



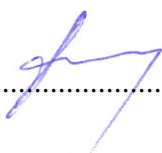
doc. Ing. Jan Hrabě, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně: 17.5.2011

.....


¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá antioxidanty, principem jejich fungování a stanovení. Dále zhodnocuje možnosti využití antioxidantů v nápojářském průmyslu. Zaměřuje se na používání kyseliny askorbové jako stabilizátoru při výrobě nápojů. Uvádí její využívání při výrobě ovocných a zeleninových šťáv, piva a vína. Dále popisuje některé používané metody stanovení kyseliny askorbové.

Klíčová slova: antioxidanty, kyselina askorbová, výroba nápojů, HPLC

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the antioxidants, the principle of their operation and determination, describes use of antioxidants in the beverage industry. Thesis focuses on the use of ascorbic acid as a stabilizer in the beverages production, indicates its use in production of fruit and vegetable juices, beer and wine. It also describes some techniques used for determination of ascorbic acid.

Keywords: antioxidants, ascorbic acid, beverage, HPLC

Děkuji Ing. Marii Rumíškové za odbornou pomoc a vedení při tvorbě práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Ve Zlíně,

Vojtěch HANÁK

OBSAH

ÚVOD	10
1 ANTIOXIDANTY	11
1.1 VOLNÉ RADIKÁLY	11
1.1.1 Vznik volných radikálů	11
1.1.2 Příčiny vzniku volných radikálů.....	12
1.1.3 Nemoci způsobené volnými radikály	13
1.2 ROZDĚLENÍ ANTIOXIDANTŮ	13
1.2.1 Podle původu.....	13
1.2.1.1 Přírodní antioxidanty	13
1.2.1.2 Syntetické antioxidanty.....	14
1.2.2 Podle chemické struktury	15
2 ANTIOXIDANTY V NÁPOJÍCH	17
2.1 OVOCNÉ ŠŤÁVY	17
2.2 PIVO	17
2.3 VÍNO	18
2.4 ČAJ	19
3 KYSELINA L-ASKORBOVÁ VÝZNAMNÝ ANTIOXIDANT V NÁPOJÁŘSTVÍ	21
3.1 VITAMIN C	21
3.2 VÝZNAM VITAMINU C JAKO ANTIOXIDANTU	22
3.3 VYUŽITÍ ANTIOXIDAČNÍCH SCHOPNOSTÍ VITAMINU C V NÁPOJÁŘSTVÍ.....	23
3.3.1 Askorbová kyselina jako stabilizátor ovocných a zeleninových šťáv	23
3.3.1.1 Konkrétní využití	24
3.3.1.2 Jablečná a hrušková šťáva	24
3.3.1.3 Šťávy z peckovin	25
3.3.1.4 Šťáva z hroznů	25
3.3.1.5 Zeleninové šťávy.....	25
3.3.2 Ovocné limonády, limonády s příchutí	26
3.3.3 Stabilizace piva kyselinou askorbovou	26
3.3.4 Přidávání kyseliny askorbové do vína.....	27
4 ZPŮSOBY ANALÝZY ANTIOXIDANTŮ V NÁPOJÍCH	28
4.1 ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA.....	28
4.2 METODY PRO STANOVOVÁNÍ JEDNOTLIVÝCH ANTIOXIDANTŮ.....	28
4.2.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)	29
4.2.2 Plynová chromatografie (GC)	30
4.2.2.1 Základní součásti plynového chromatografu	30
4.2.2.2 Pracovní techniky plynové chromatografie.....	33
4.2.3 Spektrofotometrie.....	34
5 MOŽNOSTI STANOVENÍ KYSELINY L-ASKORBOVÉ V NÁPOJÍCH	35

5.1	CHEMICKÉ METODY	35
5.1.1	Titrační stanovení 2,6-dichlorfenolindofenolem.....	35
5.1.2	Jodometrické stanovení	35
5.2	FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ METODY	36
5.2.1	Stanovení metdou HPLC.....	36
5.2.1.1	Obecné schéma a součásti kapalinového chromatografu.....	36
5.2.1.2	Průběh stanovení.....	37
5.2.2	Polarografické stanovení	38
5.2.3	Stanovení pomocí Analytických testovacích proužků - Merckoquant.....	38
5.2.4	Stanovení pomocí přístroje RQflex.....	39
	ZÁVĚR	41
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	43
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	47
	SEZNAM OBRÁZKŮ	48
	SEZNAM TABULEK.....	49

ÚVOD

Antioxidanty jsou důležité látky, které náš organismus chrání před účinkem tzv. volných radikálů. Některé antioxidanty si naše tělo samo vyrábí pomocí minerálních látek, vitamínů a dalších. Tyto antioxidanty nazýváme endogenní (např. antioxidační enzymy). Ty, které si lidský organismus nedokáže syntetizovat, nazýváme exogenní antioxidanty. Řadíme sem některé vitamíny (C, A, E), dále β -karoten a karotenoidy, flavonoidy a některé minerální látky. Exogenní antioxidanty tedy získáváme potravou.

Antioxidačního účinku lze využít také při výrobě potravin, kdy přidavkem těchto látek můžeme docílit zvýšení údržnosti. Zabráníme tím nežádoucím oxidačním změnám (změna barvy, vůně, chutě). V práci se zaměřuji na nápojářský průmysl.

Často používanou látkou, která se využívá, díky svým antioxidačním účinkům ke stabilizaci nápojů je kyselina l-askorbová. Kyselinu l-askorbovou přidáváme například do ovocných šťáv, piva i vína.

Stanovení kyseliny l-askorbové je možné provést řadou různých metod. Mezi nejpoužívanější metody patří chemická redoxní titrace 2,6-dichlorfenolindofenolem a fyzikálně-chemická separační metoda HPLC s různými způsoby indikace bodu ekvivalence.

1 ANTIOXIDANTY

Antioxidanty jsou látky nacházející se v potravinách, jež mají schopnost zpomalit, oddálit nebo zabránit oxidačním procesům. Ochraňují buňky tkání a orgánů proti molekulám volných radikálů, které jsou tvořeny při běžné přeměně látek. Podílejí se na deaktivaci volných radikálů a odstraňují je z tělních buněk, čímž chrání nejen buňky samotné, ale také celý organismus. V podstatě chrání různé sloučeniny, jež jsou součástí tělesných tkání a různých biochemických procesů v těle před škodlivým působením kyslíku [1, 2, 3, 4].

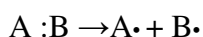
1.1 Volné radikály

Volné radikály vznikají v těle jako vedlejší produkty látkové výměny, kde zastávají spoustu fyziologicky podstatných funkcí, jestliže se jich ovšem z nějaké příčiny tvoří nadměrné množství nebo pokud nejsou rychle likvidovány stávají se nebezpečnými. Můžou poškozovat všechny látky a tkáně v těle, narušovat buněčné membrány. Ničí stavební látky nukleových kyselin, poškozují tedy DNA. Poškozená DNA vede k reprodukci špatné biologické informace. Jsou důvodem vzniku vážných onemocnění. Působením volných radikálů je zrychlen proces degenerace a stárnutí buněk, dochází ke snížení obranyschopnosti organismu. Volné radikály způsobují poškození genetického materiálu v buňce, což je příčinou počátku rakovinného bujení. Nejčastěji a nejnáději napadají volné radikály tělesné tuky, protože tuky jsou velice náchylné k oxidaci, potom mluvíme o lipidové peroxidaci [1, 2, 5].

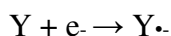
1.1.1 Vznik volných radikálů

Volné radikály vznikají z molekul trojím způsobem:

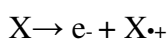
1. homolytickým štěpením kovalentní (dvouelektronové) chemické vazby, kdy každý fragment získá jeden nepárový elektron. K homolytickému štěpení je zapotřebí velké množství energie, získané například vysokou teplotou, ultrafialovým nebo ionizujícím zářením.



2. redukcí - přidáním jednoho elektronu k molekule.



3. oxidací - naopak ztrátou jednoho elektronu.



V přírodě vznikají volné radikály nejčastěji energeticky méně náročným způsobem – odevzdáním nebo přijmutím elektronu [5].

1.1.2 Příčiny vzniku volných radikálů

Volné radikály se do organismu dostávají zvenčí, velké množství však vzniká i v těle v průběhu metabolických procesů. Z toho důvodu rozdělujeme příčiny vzniku volných radikálů na exogenní a endogenní [6].

Exogenní příčiny:

- Ionizující záření (gama a rentgenové záření)
- UV záření
- Škodliviny v ovzduší (tepelné elektrárny, doprava, průmysl)
- Kouření
- Intoxikace (PCB, tetrachlormetan, chloroform, alkohol..)
- Potrava

Endogenní příčiny

- Vznik kyseliny močové - při úrazech, nekrózách, pooperačních stavech
- Rozpad fagocytů a mikrofágů (záněty, popáleniny, septický stav)
- Vznik methemoglobinu
- Syntéza prostaglandinů
- Zvýšený metabolismus estrogenů
- Autooxidace thiolů
- Hyperglykemie
- Reperfúze po předchozí ischemii včetně svalového výkonu na “kyslíkový dluh“

Volné radikály mohou napadnout prakticky kteroukoliv molekulu organismu a způsobit tak její oxidační poškození. Nejzávažnější je poškození fosfolipidů buněčných membrán vedoucí k poruše nukleových kyselin (mutageneze, karcinogeneze, zánik buňky) a bílkovin (inaktivace enzymů a jiných bílkovin s různým biologickým významem) [6].

1.1.3 Nemoci způsobené volnými radikály

Volné radikály hrají důležitou roli v rozvoji závažných nemocí, jako je ateroskleróza, cukrovka, vysoký krevní tlak, chronické střevní záněty, některé typy rakoviny, ischemicko-reperfuční poškození srdce a jiných orgánů, mozkové ischemie, Parkinsonova nemoc, Alzheimerova nemoc atd. Volné radikály jsou také pravděpodobně příčinou předčasného stárnutí [7].

Oxidace cholesterolových částic v krvi může způsobit ukládání oxidovaných tukových látek ve stěnách tepen, což může postupně vést k srdečnímu infarktu a cévní mozkové příhodě. Jestliže volné radikály oxidují DNA v buněčném jádru, vyvolávají buněčné mutace, které mohou být počátkem nádorového onemocnění [1].

1.2 Rozdělení antioxidantů

1.2.1 Podle původu

1.2.1.1 Přírodní antioxidanty

Přírodní antioxidanty jsou antioxidanty, které se do naší stravy dostávají z přírodních zdrojů. Bohaté na přírodní antioxidanty je zejména koření (jako je například rozmarýna, tymián, majoránka, šalvěj), obiloviny a olejniny (zejména řepka, pšenice, rýže, žito, arašidy) nebo zelenina a ovoce (olivy nebo cibule a paprika, citrusové ovoce). Přírodní antioxidanty do značné míry ovlivňují chuť vůni i barvu těchto potravin. Nevýhodou přírodních antioxidantů je jejich nízká odolnost proti kyslíku, a to zejména v rámci expozice světlu, vysoké teplotě a sušení. Mezi nejběžnější přírodní antioxidanty patří [8]:

a) Jednoduché fenoly, fenolové kyseliny a jejich deriváty: Fenoly jsou běžnou součástí koření, například v tymiánu se vyskytuje thymol a karvakrol. Některé jednoduché fenoly, jako jsou například hydrochinon nebo guajakol disponují kromě antioxidačních účinků také antimikrobním účinkem. K jejich využití spolu s fenolovými kyselinami patří uzení potravin, a to jako složky kouře. Mezi nejběžnější estery fenolových kyselin patří depsidy. Zástupcem depsidů je velmi rozšířená kyselina chlorogenová vyskytující se hlavně v kávě a v syrových bramborách [8,9].

b) *Flavonoidy*: Flavonoidní látky patří mezi primární antioxidanty. Některé z nich (např. 5-hydroxysubstituované flakony) vážou kovy do neúčinných komplexů. Pro antioxidační aktivitu flavonoidů je důležitý počet hydroxylových skupin a jejich poloha. Flavonoidy chrání vitamin C před předčasným poškozením a zvyšují jeho účinnost až dvacetinásobně. Vyskytují se především v zelenině (rajčatech, paprice, brokolici) a ovoci, především v bílé dužině citrusových plodů [8,1].

c) *Lignany*: Řadí se mezi fytoestrogeny. Jsou to vícesytné fenoly podobné strukturou steroidním hormonům. Mezi nejznámější a nejčastější patří NDGA (kyselina nordihydroguajaretová), která se původně požívala jako přidávaný antioxidant, ale byl prokázán její možný toxický účinek na organismus, proto se dnes již nepoužívá. Ligandy najdeme zejména v obilovinách (ovesných vločkách, lněných semínkách, ječmeni či žitě) [1].

d) *Diterpeny a chinony*: K neaktivnějším patří tzv. fenolové diterpeny karnosové kyseliny, které se vyskytují nejčastěji v extraktech z rozmarýnu a šalvěje. Významnou skupinou diterpenů jsou chinony neboli deriváty fenanthrenchinonů (s jiným biochemickým významem). Kromě antioxidačních účinků mají i sedativní, antimikrobní nebo protizánětlivý účinek [8].

1.2.1.2 Syntetické antioxidanty

Tyto látky záměrně přidáváme do potravin během výroby. Nejpodstatnější syntetické antioxidanty jsou galláty. Přidávají se například do rostlinných olejů a margarínů, kde zabraňují žluknutí a přispívají k zachování chuti. Mezi další podstatné syntetické antioxidanty patří monofenolové antioxidanty BHA (terc. butylhydroxyanisol), BHT (3,5-di-terc-butyl-4-hydroxytoluen) a difenol TBHQ (terc. butylhydrochinon) [8,2].

a) *BHA*: Butylhydroxyanisol je tvořen z 90% 3-terc. butyl-4-hydroxyanisolem a 10 % 2-terc. butyl-4-hydroxyanisolem. Uplatňuje se zejména k ochraně tuků (např. u olejů kokosových nebo palmojádrových – tedy u mastných kyselin, které mají kratší řetězce) [8].

b) *BHT*: Butylhydroxytoluen, ve starší literatuře také označovaný jako Ionol, je ve srovnání s BHA podstatně účinnější, a to zejména u živočišných tuků, ale je vhodný i pro rostlinné tuky [8,4].

c) *TBHQ*: jedná se o 2-terc. Butylhydrochinon, který patří jako jediný antioxidant mezi difenoly. Je možné jej kombinovat s chelatačními činidly (např. kys. citrónovou), čímž

dojde ke zvýšení antioxidační kapacity. Toto je využíváno zejména pro ochranu rostlinných olejů. TBHQ patří k nejlepším antioxidantům tuků, uplatňuje se zejména při smažení [8].

d) *Galláty*: neboli estery kyseliny gallové, vyskytují se v rostlinných surovinách, z toho důvodu byly dříve zařazovány mezi přírodní antioxidanty. V současné době je ale zařazujeme pouze mezi syntetické antioxidanty. Spolu s BHA a BHT vykazují synergismus, avšak v kombinaci s TBHQ je jejich využívání zakázáno [8].

1.2.2 Podle chemické struktury

Dle struktury antioxidanty dělíme do tří hlavních skupin: *polyfenoly* (jako jsou flavonoidy, anthokyany, fenolkarboxylové kyseliny, kumariny), *karotenoidy* (karoteny - prekursor vitamínu A nebo xanthofyly) a *tokoferoly* (vitamin E). Vitamin E byl nazván „úžasnou molekulou“ pro svou mnohotvárnost, ovšem pouze ve své přírodní podobě, syntetický je tzv. mrtvá látka. V dnešní době rozeznáváme 8 různých forem vitamínu E. Při nedostatku vitamínu E v lidské stravě, tuk v lidském těle „zežlukne“, což se projeví například skvrnami na rukách. Má velký význam při léčbě neplodnosti žen, zabraňuje tvorbě křečových žil, srdečním a mozkovým mrtvicím, rakovině a mnoha jiným onemocněním. Vyskytuje se v ořechách, celozrnných obilných výrobcích, zelené listové zelenině, luštěninách nebo vaječném žloutku [9,1].

Tabulka 1: Použití, dávkování a zdroje antioxidantů [10]

Antioxidant	Účinná dávka pro dospělého člověka (70 kg) / den	Zdroj v potravě
Vitamin C	250 – 1000 mg dlouhodobě v závislosti na rizikových faktorech	ovoce (černý rybíz, citrusové plody), zelenina (papriky, brambory), šípek
β – karoten	10 – 30 mg, dlouhodobě ale jen okolo 10 mg	kiwi, citrusy, mrkev, rajčata, špenát, kukuřice, okurka, sojové klíčky
Vitamin E	100 – 400 mg dlouhodobě nebo v „kúrách“ v závislosti na riziku	ořechy, čerstvé pšeničné klíčky, zelená listová zelenina, luštěniny

Selen	50 – 150 mg dlouhodobě	celozrnná mouka, plody moře, játra, ledviny, para ořechy, ovesné vločky
Mangan	1 mg dlouhodobě	celozrnné obiloviny, ořechy, avokádo, hrách, řepa
Zinek	10 – 30 mg dlouhodobě	maso (telecí, skopové), vaječný žloutek, mléčné výrobky, cereálie
Bioflavonoidy	1000 – 2000 mg dlouhodobě	rajčata, bílá dužina citrusových plodů

2 ANTIOXIDANTY V NÁPOJÍCH

2.1 Ovocné šťávy

Mezi typické antioxidanty ovocných a zeleninových šťáv patří flavonoidy a fenolické kyseliny, tokoferoly, karotenoidy, fosfatidy, polyfunkční organické kyseliny, kyselina askorbová, některé stopové prvky a enzymy [11].

Velké množství ovocných, zeleninových šťáv, ovocných limonád a podobných produktů obsahuje různé množství antioxidantů čistě přírodního původu pocházejících z ovocné (zeleninové) suroviny. Ovšem významnou kapitolou týkající se antioxidantů v souvislosti s potravinářskou, respektive nápojářskou produkcí je přidávání antioxidantů do výrobků z čistě technologického hlediska za účelem zabránění nežádoucích oxidačních procesů ve výrobku a tím zvýšení údržnosti a zlepšení sensorických vlastností výrobku. Mezi nejvýznamnější antioxidanty využívanými k tomuto účelu patří kyselina L-askorbová. Touto problematikou se budu zabývat podrobněji v kapitole 3.

2.2 Pivo

Antioxidační schopnost patří mezi důležité vlastnosti piva. V pivu jsou antioxidanty zastoupeny širokým spektrem látek od různých prvků, např. selenu, přes vitaminy (např. vitamin C nebo E) až po fenolické sloučeniny, jako jsou např. polyfenoly nebo flavonoidy. Z tohoto pohledu velmi důležitou skupinu představují polyfenoly. Polyfenolům v pivu jsou přisuzovány účinky antioxidační, antimutagenní, antikarcinogenní, antimikrobiální, antitrombotické a další, dále regulují krevní tlak a krevní glukózu. Polyfenolové antioxidanty chrání před aterosklerózou, mají vazorelaxační a antikoagulační účinek. Pivo obsahuje široké spektrum polyfenolů a fenolických kyselin, které pocházejí ze sladu a chmele. Jedná se například o katechin a epikatechin. Jedním z nejdůležitějších je xanthohumol, který má silné antikarcinogenní účinky. Jeho koncentrace se pohybují mezi 0,2 až 1,1 %. Tyto účinky vykazují i některé a- a p-hořké kyseliny, např. kolupulon a humulon. Humulon by mohl díky svým vlastnostem být vhodný pro terapii leukémie. V kombinaci s aktivní formou vitamínu D je dokonce ještě účinnější než vitamin D samotný. Humulon je vhodný jako prevence proti osteoporóze [12].

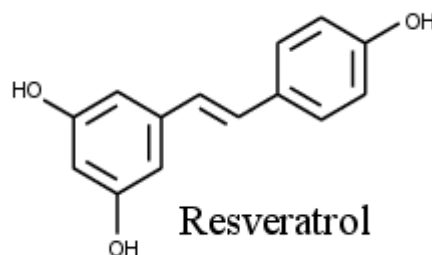
Jedním z nejběžnějších antioxidantů v pivu je kyselina ferulová – je zde obsažena v množství až 7 mg/l (pro zajímavost je to přibližně 10x menší množství než se nachází v rajčatech, ale v pivu je mnohem lépe biologicky využitelná).

2.3 Víno

Víno obsahuje velké množství antioxidantů, které chrání náš organismus před degenerativními procesy v buňkách a celkovým stárnutím organismu. Najdeme je jak v červeném, tak bílém víně a jejich účinky jsou mnohostranné. Přítomné antioxidanty chrání zdraví našeho kardiovaskulárního systému, dalším velkým přínosem je preventivní působení proti mozkovým příhodám, stařecké demenci a Alzheimerově chorobě. Ve všech těchto oblastech stále probíhají vědecké výzkumy pro co nejefektivnější využití vína v léčbě a prevenci zmíněných zdravotních potíží.

Víno je ale také prevencí některých typů rakoviny, např. rakoviny prostaty a vaječníků. Přisuzuje se mu působení brzdící rozvoj nemocí, spojených s hormonálními změnami ve vyšším věku (přechod), včetně nebezpečné osteoporózy - řídnutí kostí. Podle některých zahraničních studií víno dokonce podporuje plodnost u žen [14].

Nejdůležitějším antioxidantem ve víně je resveratrol, který patří do skupiny polyfenolů nazvané flavonoidy. Resveratrol je obsažen ve slupkách bobulí hroznu. Při zpracování modrých hroznů na víno se při kvašení červeného vína vyluhují alkoholem flavonoidy do vznikajícího červeného vína nejlépe v průběhu 6-8 dnů při fermentační teplotě 28 °C. Zatím bylo zjištěno, že jich nejvíce obsahují slupky odrůdy Pinot noir (Burgundské modré) pěstované v severnějších vinařských oblastech. V jižních oblastech je jich nejvíce ve slupkách odrůd Merlot, Xarello, Macabeu. Při následných manipulacích s vínem, zvláště v dřevěných sudech a při použití některých čířidel nebo ostré filtrace, se jich značná část ztrácí. Drť hroznů pro výrobu bílého vína se nenakvašuje, ale hned lisuje, a protože neobsahuje žádný alkohol, vyluhuje se do bílého vína jen menší množství flavonoidů, které jsou i ve slupkách bílých hroznů, zvláště ve slupkách Ryzlinku rýnského, kde patří mezi prekurzory jeho typických aromatických látek.



Obrázek 1: Resveratrol [13].

Ve víně mezi důležité antioxidanty patří také například vitaminy C, E a beta-karoten, dále flavonoidy katechin a epikatechin.

Dalším z důležitých antioxidantů obsažených ve víně je flavonoid quercetin, který je hydrofobní a tělo ho pravděpodobně lépe přijímá rozpuštěný v alkoholu. Vytváří se hlavně v teplých oblastech a ve slupkách bobulí hroznů plně osvětlených sluncem. Vyluhuje se během kvasného procesu do červeného vína nejprve v neaktivní formě a teprve činností kvasinek se mění na formu aktivní. Pokud je neaktivní forma přijata stravou, pak se při zažívání přemění na aktivní až v tlustém střevě činností bakterií. Na rozdíl od resveratrolu, který při stárnutí vína zcela zmizí, zůstává quercetin i ve vínech starších. Většina fenolových látek je citlivá na některá čířidla, která je rozkládají. Proto vína vyráběná tradiční technologií a málo upravovaná obsahují flavonoidů nejvíce. Také quercetin působí příznivě proti rakovinným onemocněním [13].

2.4 Čaj

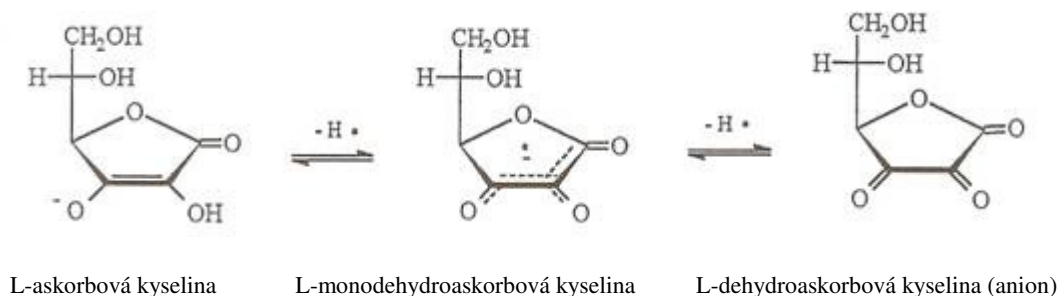
V čajových lístcích nalezneme poměrně velké množství různých látek s antioxidačními účinky. Z toho důvodu předpokládáme, že nápoj připravený vyluhováním těchto lístků a to buď doma, či průmyslově, jako výrobek nápojářského průmyslu, bude také obsahovat tyto, pro lidský organismus prospěšné látky. V praxi ovšem zjistíme, že v některých druzích čaje je množství antioxidantů podstatně nižší. To je způsobeno tím, že kromě čaje zeleného se všechny ostatní druhy čaje (černý čaj, oolong, žlutý čaj, bílý čaj) zpracovávají fermentací lístků na různém stupni (černý čaj je zcela fermentován, bílý čaj je fermentován velmi slabě), což je proces, při kterém se antioxidanty z čaje ztrácejí. Z toho důvodu nejvíce antioxidantů nalezneme v zeleném čaji.

Významný je obsah polyfenolů epikatechinu, epikatechingalátu, epigalokatechinu, epigalokatechingalátu a katechinu. Obsah polyfenolů se podle druhů zeleného čaje může lišit. Právě díky těmto látkám má zelený čaj výborné účinky na zdraví člověka. Zelený čaj působí preventivně proti vzniku rakoviny, kardiovaskulárních onemocnění, infekce, bojuje proti zubnímu kazu a spoustě dalších zdravotních potíží.

3 KYSELINA L-ASKORBOVÁ VÝZNAMNÝ ANTIOXIDANT V NÁPOJÁŘSTVÍ

3.1 Vitamin C

L-askorbová kyselina je ve spoustě zdrojů označena jako Vitamin C, lépe řečeno, složení vitamínu C bývá uváděno jako L-askorbová kyselina. Je tomu pravda pouze částečně. Vitaminové přípravky, multivitamíny, čistý vitamin C pro technologické účely jsou skutečně složením kyselina L-askorbová. Přesněji ovšem jako vitamin C musíme označovat celý reversibilní redoxní systém kyseliny L-askorbové. Ten zahrnuje L-askorbovou kyselinu, produkt její jednoelektronové oxidace, který se nazývá L-askorbylradikálem nebo také L-monodehydroaskorbovou čili L-semidehydroaskorbovou kyselinou a produkt dvouelektronové oxidace, tj. L-dehydroaskorbovou kyselinu [8,15].



Obrázek 2: Oxidace askorbové kyseliny [15].

Tabulka 2: Obsah vitamínu C v některých potravinách

Potravina	Obsah vit. C (mg/kg)	Potravina	Obsah vit. C (mg/kg)
Maso	10-20	Mrkev	50-100
Vnitřnosti	50-340	Kořenová petržel	230
Mléko	5-20	Kadeřavá petržel	1500-2700
Jablka	15-50	Pažitka	430
Hrušky	20-40	Pórek	150-300
Švestky	25-45	Cibule	90-100
Broskve	70-100	Česnek	150-160
Višně, Třešně	60-300	Křen	450-1200
Angrešty	330-480	Zelí	170-700
Červený rybíz	200-500	Kapusta	700-1400
Černý rybíz	1100-3000	Růžičková kapusta	1000-1030
Hrozny	20-50	Brokolice	1100-1130
Jahody	400-700	Květák	47-1610
Borůvky	90	Kedlubny	280-700

Meloun	130-590	Hlávkový salát	60-300
Pomeranče	300-600	Špenát	350-840
Citrony	300-640	Rajská jablka	80-380
Grapefruity	240-700	Fazolové lusky	90-300
Ananas	150-250	Paprika	620-3000
Banány	90-320	Okurky	65-110
Kiwi	700-1270	Chřest	150-400
Mango	100-350	Hrášek	80-410
Papája	620-980	Červená řepa	65
Šípky	2500-10000	Brambory	80-400

Většina živočichů je schopna syntetizovat svůj vlastní vitamin C, pouze lidé, lidoopové a morčata jsou odkázáni na potravinové zdroje. Má důležitou úlohu jako antioxidant, dále při tvorbě kolagenu a účastní se resorpce železa .

3.2 Význam vitaminu C jako antioxidantu

Vitamin C je důležitý a efektivní antioxidant. Působí přímo v reakci s peroxyl radikály nebo nepřímo, obnovením antioxidantních vlastností tokoferolů. Funguje coby ve vodě rozpustný „chytač“ volných radikálů čímž efektivně ochraňuje ostatní, k oxidaci náchylné látky, před poškozením oxidací [16,17].

Kyselina L-askorbová má nižší redukční potenciál než peroxylové radikály a tím s těmito radikály může reagovat za vzniku četných oxidačních produktů. Dále se uplatňuje při obnovování tokoferolů. Zde se uplatňuje nižší redukční potenciál kyseliny askorbové, než mají tokoferoly a tím může obnovit jejich oxidovanou formu. Ve výsledku těchto vlastností dochází k ochraně buněčných membrán a membránových organel proti peroxidaci tuků [16,18].

Produktem oxidace vitaminu C je tzv. askorbylový radikál, který se vyznačuje vysokou stabilitou a nízkou reaktivitou. Dvouelektronový oxidační produkt askorbátu, kyselina dehydroaskorbová, může být glutationem redukována zpět na askorbát a jeho enzymy nebo je hned hydrolyzována na kyselinu 2,3-diketogulonovou [17].

Vitamin C je součástí komplexního antioxidantního systému. Tento několikastupňový antioxidantní systém je tvořen vitaminem C, vitaminem E, ubichinony, deriváty selenu a proteiny obsahující síru. Organismus chrání před škodlivým vlivem kyslíkových radikálů, jako jsou peroxidy či superoxidy. Jedná se o velice komplikovaný a komplexní systém, jehož ne

všechny pochody a účinky jsou dobře známy. Kyselina askorbová je považována za jednu z nejdůležitějších složek tohoto systému [16].

Další významné uplatnění vitamínu C a jeho antioxidačních vlastností v lidském těle dále nacházíme v krevní plazmě, jejíž je významnou antioxidační složkou. Stejně tak i extracelulární tekutiny obklopující plíce, oční čočku a sítnici [18].

3.3 Využití antioxidačních schopností vitamínu C v nápojářství

3.3.1 Askorbová kyselina jako stabilizátor ovocných a zeleninových šťáv

Ovoce a zelenina patří k nejdůležitějším zdrojům vitamínu C v každodenní stravě. Z výživového hlediska jsou proto velmi cennou složkou potravy a to jak v syrovém nezpracovaném stavu, tak ve stavu zpracovaném. Při průmyslové produkci ovocných a zeleninových šťáv je ale značná část vitamínu C ztracena, což s sebou přináší i nechtěné a nepříznivé změny v barvě a chuti výsledného produktu.

Druhy ovoce, které nejsou příliš bohaté na obsah vitamínu C, jako jsou jablka, hrušky, meruňky, bývají shodou okolností zároveň bohaté na oxidační enzymy. Z toho důvodu jsou produkty z těchto druhů více náchylné ke ztrátě vitamínu C a zároveň k nepříznivým změnám s tím spojeným. Naopak ovoce s vysokým obsahem vitamínu C, jako jsou citrusové plody nebo černý rybíz, obsahují pouze malé množství oxidačních enzymů. Proto je obsažený vitamin C stabilnější a tím i produkty získané z těchto surovin [19].

Nežádoucí změny při zpracování ovoce a zeleniny jsou aktivovány, jakmile rozrušíme buněčné struktury v surovině mechanickým zpracováním (strouhání, drcení, lisování...). K enzymům přirozeně se vyskytujícím v surovině (fenolázy, fenoloxidázy, tyrosinázy...) se dostane vzdušný kyslík, což spustí reakce, které nazýváme enzymatické hnědnutí. Látky původně bezbarvé, zejména fenolické povahy při styku se vzdušným kyslíkem změny barvu na hnědou [19].

V prvotní fázi mají meziproducty enzymového hnědnutí žlutou barvu. Tento stav je do jisté míry reversibilní a dá se zvrátit přidávkem kyseliny askorbové.

V nepřítomnosti kyseliny askorbové, případně pouze malého množství a v případě neexistence jiných antioxidantů pokračuje reakce polymerací produktů v ještě tmavší hnědé látky,

které již nelze zvrátit do jejich původní bezbarvé formy ani následným přidavkem kyseliny askorbové.

Ani při dnešních moderních postupech v nápojářství nejsme schopni zabránit v přístupu vzduchu k surovině. Tím pádem musíme počítat s určitou ztrátou kyseliny askorbové a zvýšením zbarvení šťávy. Teoreticky 2 moly kyseliny askorbové oxidují 1 mol kyslíku, to znamená, že 12 mg kyseliny askorbové inaktivuje 1 mg kyslíku. V závislosti na technologii výroby může šťáva obsahovat až 6mg kyslíku v jednom litru. Předpokládáme-li, že se všechen obsažený kyslík spotřebuje na oxidaci kyseliny askorbové, tak dojde ke zničení až 66mg kyseliny askorbové v 1 litru šťávy [19].

Z těchto důvodů přidavek kyseliny askorbové do ovocných a zeleninových šťáv pomáhá zachovat kvalitu produktu a můžeme se pomocí ní do jisté míry vyhnout nežádoucím změnám v chuti, barvě a vůni – antioxidační účinek.

3.3.1.1 Konkrétní využití

Stabilizaci kyselinou askorbovou volíme zejména u ovocných šťáv ze světlých druhů ovoce, které mají zpravidla nízký obsah kyseliny askorbové a jsou zároveň bohaté na enzymy způsobující enzymatické hnědnutí. Tyto enzymy začínají svou činnost ihned po přístupu vzduchu při prvotních technologických operacích (drcení, srouhání, lisování....) a nízký obsah vitamínu C je rychle spotřebováván. Oxidaci kyseliny askorbové také katalyzují již stopová množství některých látek, zejména kovů, jako je železo, nebo měď. Snažíme se jim proto během technologického procesu vyhnout.

Množství přidané kyseliny askorbové obecně bývají mezi 50 a 300 mg/l, v závislosti na druhu ovoce [19].

3.3.1.2 Jablečná a hrušková šťáva

Hrušky a jablka se vyznačují poměrně nízkým obsahem vitamínu C a mají vysoký obsah enzymu polyfenoloxidázy, mají tedy tendenci poměrně rychle hnědnout. Proto je přidavek kyseliny askorbové během zpracování na místě a zlepšuje kvalitu těchto šťáv [19].

Dobrych stabilizačních výsledků je dosaženo, pokud přidáme 50-100 mg kyseliny askorbové na litr bezprostředně na začátku výrobního procesu, přímo do drtě před lisováním, případně ihned po vylisování. Dalších 50 mg/l by mělo být přidáno do šťávy skladované

v tancích před lahvováním, nebo dalším zpracováním. V některých případech přidáváme až 300 mg/l k vyloučení nežádoucího hnědnutí do šťáv určených k dalšímu skladování. S tím souvisí zajímavé zjištění, že šťávy s přídatkem 500 mg/l kyseliny askorbové, na rozdíl od šťáv zpracovaných zcela bez kyseliny askorbové nedochází k plesnivění ani po masivní kontaminaci [19].

3.3.1.3 Šťávy z peckovin

Světlé šťávy z peckovin jako je třeba šťáva meruňková nebo broskvová je vhodné stabilizovat přidáním 100-150 mg/l kyseliny askorbové, aby se zabránilo enzymatickému hnědnutí spolu s oxidačními změnami aroma.

Oproti tomu u šťáv z tmavých peckovin (višně, třešně) nedosáhneme kyselinou askorbovou žádných ochranných účinků. Zejména kvůli vysokému obsahu antokyanových barviv [19].

3.3.1.4 Šťáva z hroznů

Při výrobě a skladování prochází hroznová šťáva enzymatickým oxidačním změnám, které nepříznivě ovlivňují chuť a celkové aroma. Můžeme proto přidávat 100 mg kyseliny askorbové na litr šťávy. Je také výhodné rozdělit přídatek na dvě části. První přidat ihned při zpracování a druhou až těsně před plněním [19].

3.3.1.5 Zeleninové šťávy

Zeleninové šťávy jako je mrkvová nebo rajčatová procházejí enzymovým hnědnutím také. Dochází k němu při výrobním procesu. Má velmi negativní dopad na kvalitu těchto produktů, zejména na chuť a barvu [19].

Oxidační poškození je třeba očekávat zejména při konzervování nebo plnění. Karotenová barviva, jako třeba β – karoten, v těchto produktech obsažena, jsou k enzymatické oxidaci obzvláště citlivá. Nicméně k tomu přispívá značnou měrou i světlo [19].

Praktické pokusy potvrdily, že tyto nežádoucí změny můžeme oddálit přídatkem 100-200mg/l kyselin askorbové, zcela je zastavit (obzvláště u rajčatové šťávy) ovšem nelze [19].

3.3.2 Ovocné limonády, limonády s příchutí

Blednutí limonád, zejména limonád založených na šťávě z citrusových plodů až téměř na bezbarvou kapalinu je spojena i s nepříznivou změnou chuti. Je to oxidační proces vyvolaný působením kyslíku. Na tento proces také působí světlo, rozdílná teplota během přepravy a skladování (zejména v letním období), stopy chloru z vody a stopový obsah kovových iontů. Přírodní obsah vitamínu C je tímto procesem samozřejmě spotřebován nejdříve. Při snaze zabránit těmto nepříznivým oxidačním změnám se tedy nejprve snažíme vyhnout působení světla a ostatních výše uvedených katalyzátorů. V neposlední řadě zvyšujeme obsah vitamínu C – přidávkem kyseliny askorbové [39].

Kyslík se k limonádě dostává při sycení oxidem uhličitým a také je obsažen ve vzduchové kapse u hrdla lahve. Předpokládáme-li, že obsah vzduchu obsaženého v litrovém balení limonády může být až 10 ml, spotřebuje se k inaktivaci obsaženého kyslíku až 35mg kyseliny askorbové [39].

3.3.3 Stabilizace piva kyselinou askorbovou

Stabilizace piva se provádí pasterací a přidávkem různých stabilizačních látek za účelem prodloužení trvanlivosti. Používají se stabilizátory srážecí (tanin), adsorpční (silikagel, polyvinylpolypyrrolidon), enzymové (papain) a antioxidační (kyselina askorbová). Použití stabilizátorů je v některých zemích omezeno zákonnými předpisy. Stabilizátory se do piva přidávají nejčastěji před koncem dokvašování, aby se případně vyloučené látky odstranily při filtraci [20].

Kyselinu askorbovou přidáváme jako antioxidant přímo reagující s kyslíkem. Z toho důvodu obsah přidávané kyseliny askorbové v podstatě závisí na obsahu kyslíku, technologických a kvalitativních požadavcích. Bereme v úvahu, že asi 12 mg kyseliny askorbové inaktivuje 1 mg kyslíku. V praxi přidáváme takové množství kyseliny askorbové, aby v pivu zůstalo jisté zbytkové množství. Průměrně přidáváme 2 až 4 g kyseliny askorbové na hektolitr [21].

3.3.4 Přidávání kyseliny askorbové do vína

Použití kyseliny askorbové ve vinařství umožňuje snížit množství použitého oxidu siřičitého k síření. Vinný zákon stanovuje maximální množství 250 mg/l. V praxi se osvědčilo dávkování mezi 50 – 150 mg/l. Kyselina L- askorbová přidaná během produkce vína zmizí během kvašení. Nicméně se záměrně do vína přidává, a to zejména v průběhu výroby bílého vína, aby se zabránilo oxidaci. Zejména se přidává do bílých vín před plněním. Kde by vlivem oxidace mohlo dojít ke kažení bílých vín, což by mělo za následek změnu chuti a barvy bílého vína [22,23].

4 ZPŮSOBY ANALÝZY ANTIOXIDANTŮ V NÁPOJÍCH

Stanovení antioxidantů obsažených v nápojích můžeme pojmut dvěma základními způsoby:

- a) Stanovením celkové antioxidační aktivity vzorku
- b) Stanovováním jednotlivých antioxidantů

4.1 Antioxidační aktivita

Většinu antioxidantů přijímáme jako součást složitých směsí, jejich složky mohou reagovat s různými radikály různými mechanismy. Proto se snažíme charakterizovat antioxidační aktivitu směsných vzorků jako celku. Pro vzájemné porovnávání antioxidačních účinků různých směsí byl zaveden pojem celková antioxidační aktivita (total antioxidant activity, TAA). Existuje velké množství metod pro stanovení TAA, přičemž nejčastěji používanou metodou je TEAC1 (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Tato metoda určuje antioxidační aktivitu vzorku ekvivalentní určitému množství standardu.

Antioxidační aktivitu látek lze měřit metodami chemickými a fyzikálními. Chemické metody spočívají v použití činidel poskytujících s volnými kyslíkovými radikály barevné produkty, jejich vzniku brání ve vzorku obsažené antioxidanty. Nejčastěji se využívají metody založené na eliminaci kyslíkových (Oxygen Radical Absorbance Capacity) nebo syntetických stabilních (ABTS, DPPH) radikálů.

Fyzikální metody stanovení antioxidační aktivity nesledují bezprostředně chemickou reakci nebo změny obsahů jednotlivých látek, ale změnu fyzikálních vlastností, které tyto procesy doprovází. Příkladem je elektronová spinová rezonance, stanovení redoxního potenciálu či chemiluminiscence [24].

4.2 Metody pro stanovování jednotlivých antioxidantů

Vzhledem k tomu, že antioxidanty jsou širokou skupinou poměrně různorodých látek, tak i množství metod, které můžeme využít k jejich stanovení je velké. Můžeme k nim řadit klasické chemické metody (například titrační stanovení kyseliny askorbové 2,6-dichlorfenolindofenolem). V současné době jsou nejpoužívanější metody fyzikální. Uvedu tedy podrobněji 3 nejrozšířenější metody: spektrofotometrii, HPLC a GC.

4.2.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Chromatografické metody obecně řadíme mezi fyzikálně-chemické separační metody. Jejich podstatou je dělení složek směsi mezi dvěma fázemi: nepohyblivou (stacionární) a pohyblivou (mobilní). Samotná separace je důsledkem rozdílné afinity jednotlivých složek k těmto dvěma fázím. Stacionární a mobilní fáze se od sebe liší některou základní fyzikálně-chemickou vlastností, např. polaritou [25].

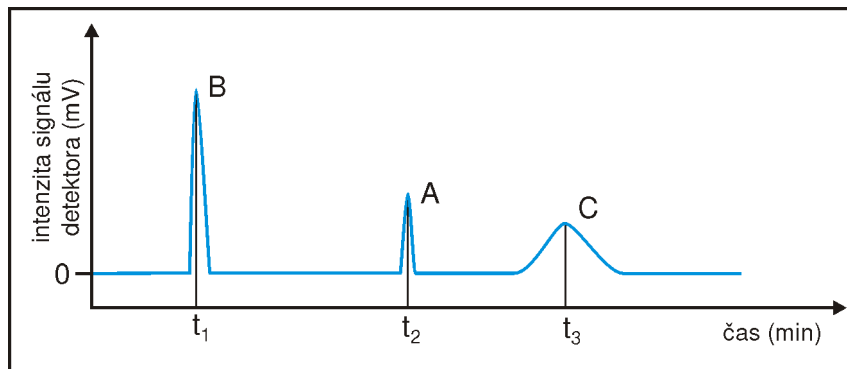
Metoda HPLC je v analytické chemii v dnešní době jednou z nejvíce užívaných. Vlastní separace probíhá v separační koloně, která obsahuje stacionární (nepohyblivou) fázi = sorbent a mobilní (pohyblivou) fázi = eluent. Tato kolona se vyznačuje vysokou hustotou a homogenitou náplně stacionární fáze a tedy i velkým hydrodynamickým odporem. Kapalinová chromatografie je vhodná pro separaci nepolárních až iontových, tepelně nestálých a méně těkavých organických látek, neboť je možné pracovat za laboratorní teploty bez nutnosti zplyňování vzorku. Její hlavní výhodou je, že k dělení látek je možné využít všech vratných dvoufázových separačních mechanismů, jako je adsorpce, iontová výměna či rozdělování mezi dvě nemísitelné látky [28,38].

V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. Na rozdíl od plynové chromatografie rozhodují o separaci složek vzorku nejen jejich interakce se stacionární fází, ale rovněž velmi výrazně použitá mobilní fáze. Jsou využitelné všechny možné mechanismy separace – adsorpce, rozdělování na základě rozdílné rozpustnosti, iontová výměna, molekulově síťový efekt nebo specifické interakce v afinitní chromatografii [26].

Kapalinový chromatograf může obsahovat ve srovnání s plynovým chromatogramem zásobníky více kapalin a je možné naprogramovat gradientové zařízení pro řízení změn ve složení výsledné mobilní fáze. Zůstává-li složení mobilní fáze stálé, hovoříme o izokratické eluci. Kapalina se do kolony čerpá pístovými nebo membránovými čerpadly. Membránové čerpadlo má prostor s pístem naplněný hydraulickou pracovní kapalinou. Ten je oddělen od pracovního prostoru pro mobilní fázi membránou. Obvykle pracují dvě čerpadla tak, aby na sebe navazovali fáze výtlačku a fáze sání. Řízení mikroprocesorem zaručuje vyhlazení tlakových pulsů. Dávkování injekční stříkačkou přes pryžové septum proti vysokému tlaku je možné z hlediska těsnosti do tlaků 10 MPa. Výhodnější je dávkování obtokovým dávkovacím kohoutem [26].

Vyhodnocování

Výstupem chromatografu je chromatogram.



Obrázek 3: Ukázka chromatogramu.

kvalitativní hodnocení = identifikace složek ve vzorku - stejné látky mají za stejných podmínek dělení shodné retenční časy. Porovnáním s retenčními časy standardních roztoků lze určit kvalitativní složení vzorku. Podmínkou je dokonalé oddělení eluční vlny látky (píku) od ostatních píků nalezených v chromatogramu. Pro dosažení vhodného oddělení stanovované látky (složky vzorku) lze upravit podmínky analýzy:

- výběr vhodné kolony (velikost, náplň)
- výběr vhodné mobilní fáze
- nastavení optimální rychlosti toku mobilní fáze kolonou

kvantitativní hodnocení = množství složky ve vzorku - sestavení kalibrační křivky ze známých koncentrací standardů téže látky jako závislost výšky nebo plochy píku na koncentraci. Zjištění výšky nebo plochy píku stanovované látky a odečtení odpovídající koncentrace z kalibrační křivky.

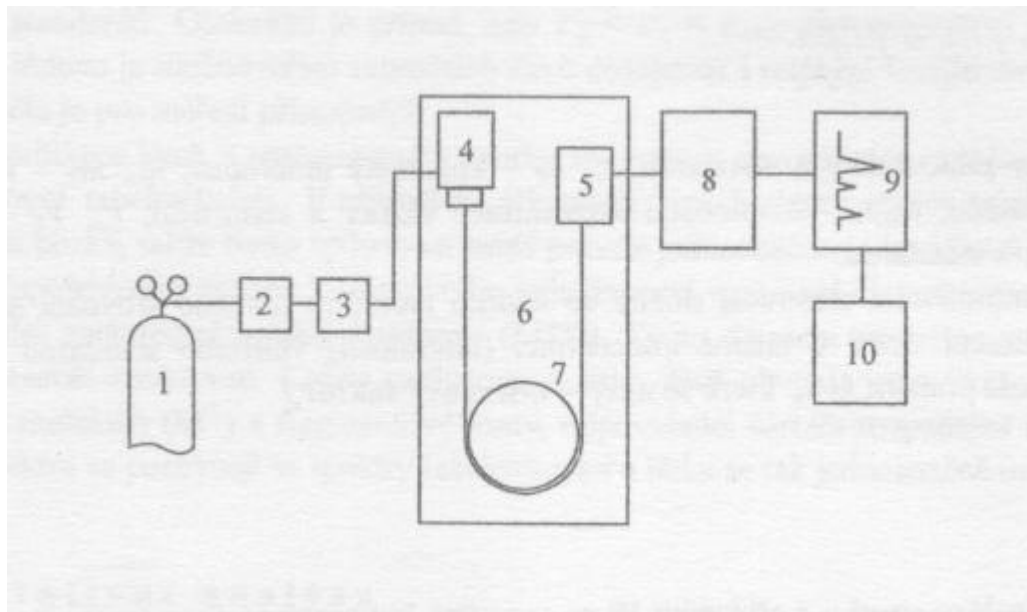
Metodou HPLC je dále popsána v kapitole 5.2.1.

4.2.2 Plynová chromatografie (GC)

Tato separační analytická metoda umožňuje kvalitativní a kvantitativní analýzu plynů i kapalin, které lze před separací převést na páry. Mobilní fází je vždy vhodný nosný plyn, stacionární fází je buď zakotvená kapalná fáze, nebo tuhý sorbent umístěný v koloně [29].

4.2.2.1 Základní součásti plynového chromatografu

- a) *Zásobník s nosným plynem* – obvykle tlakové láhve s plynem, který transportuje jednotlivé složky vzorku kolonou. Nejčastěji se používají plyny, které jsou inertní k náplni kolony i k analyzovanému vzorku (např. vodík, dusík, helium) [27]
- b) *Zařízení na dávkování vzorku* – dávkování se provádí do nástřikové hlavy opatřené septem, která je vyhřívána na zvolenou teplotu a proplachována nosným plynem. Plyný vzorek se dávákuje injekční stříkačkou o objemu 0,001 až 0,1 ml, kapalné 0,1 až 1 μ l a tuhý vzorek se nejprve rozpustí ve vhodném rozpouštědle. Dávkování se provádí pomocí děliče toku (*split injection*), které se používá u kapilárních kolon (na kolonu se přivádí jen část nastřikovaného vzorku). Nebo se dávákuje bez děliče toku (*splitless injection*). Zde se využívá zakoncentrování vzorku v kapalině tvořící film v hlavě kolony. Zvýšením teploty se pak složky vzorku odpaří a převedou na kolonu [29].
- c) *Chromatografická kolona* – zde dochází k separaci látek. Kolony se vyrábí buď kovové, nebo skleněné o průměru cca 0,1 – 0,5 mm a dosahují délky cca 25 – 100 m. Rozdělují se na náplňové nebo kapilární [29].
- d) *Termostat* - jednou z kritických veličin v plynové chromatografii je teplota, na ní závisí přesnost a reprodukovatelnost měřených údajů. Je nutno udržovat zvolený konstantní teplotní režim nástřiku, kolony, detektoru a regulátoru tlaku a průtoku [29].
- e) *Detektor* – neboli čidlo, které reaguje na přítomnost separovaných látek. Umisťuje se na výstupu z kolony v termostátovém prostoru. Ideální detektor pro všechny typy dělených látek, vysoce citlivý pro nízké koncentrace, avšak málo citlivý na změnu teploty v praxi neexistuje. K nejběžnějším detektorům patří: 19
- plamenový ionizační detektor, FID - selektivní, destruktivní
 - detektor elektronového záchytu, ECD - selektivní, nedestruktivní
 - tepelně vodivostí detektor, TCD – univerzální, nedestruktivní
 - hmotnostně spektrometrický detektor, MS – univerzální, velmi citlivý
 - elektrochemické detektory – selektivní, velmi citlivé



Obrázek 4: Schéma plynového chromatografu [30]. 1 - tlaková láhev s nosným plynem; 2, 3 - regulátory tlaku a průtoku; 4 - injektor; 5 - detektor; 6 - termostat; 7 - kolona; 8 - zesilovač; 9+10 – datastanice s monitorem.



Obrázek 5: Plynový chromatograf

4.2.2.2 Pracovní techniky plynové chromatografie

Praktická měření lze provádět několika pracovními technikami, které se liší v postupu, jímž se uskutečňuje transport analyzované směsi kolonou.

- *Eluční metoda:* je založena na vymývání jednorázově dávkovaného vzorku nosným plynem. Vzorek se dávkuje najednou do proudu nosného plynu před vstupem do kolony. Z kolony vychází nejdříve ta složka, která se nejméně zachycuje na stacionární fázi. Čas, za který složka vyjde z kolony ven je pro ni za daných, experimentálních podmínek charakteristický. Proto se tento časový údaj používá k její identifikaci. Vzniklý chromatogram je tvořen sérií elučních křivek neboli píků. Zaznamenává se signál z detektoru v závislosti na čase nebo proteklém objemu nosného plynu. Kvantitativní zastoupení určuje plocha uzavřená jejím píkem [26].

Tato metoda je dnes nejběžnější. Provádění za stálých podmínek je vhodné pro směsi, jejichž složky se příliš neliší svými fyzikálními charakteristikami. Při velkých odlišnostech mohou některé složky opustit kolonu rychle, jiné se v ní zdržovat příliš dlouho. Pro tyto případy se používá plynová chromatografie, kdy se během separace mění teplota nebo průtok nosného plynu podle určitého programu [26].

- *Frontální metoda:* je založena na kontinuálním vzorku do kolony. První z kolony začne vycházet nejméně zachycovaná (sorbovaná) látka. Postupně se k ní přidávají další až po nejvíce sorbovanou. Nakonec z kolony vychází směs vzorku s nosným plynem o původním složení. Metoda lze použít pro kontrolu technických procesů [26].
- *Vytěšňovací metoda:* je opět založena na jednorázovém dávkování vzorku do proudu nosného plynu před vstupem do kolony. Nosný plyn je syčen vytěšňujícím činidlem, což jsou páry látky, která se v koloně sorbuje silněji než kterákoliv složka vzorku. Vytěšňující činidlo úspěšně konkuruje složkám vzorku při sorpci na stacionární fázi a „tlačí“ tyto složky před sebou. V koloně se uspořádají za sebou zóny od nejméně se sorbující složky po vytěšňovací činidlo. Šířka zóny roste s koncentrací dané složky. První složka je někdy rychlejší, oddělí se od putujících zón a dostává se k detektoru samostatně (vytvoří samostatný pík) [26].

4.2.3 Spektrofotometrie

Jde o optickou metodu stanovení látek absorbujících elektromagnetické záření (především z oblasti ultrafialové a viditelné, někdy z oblasti infračervené). Množství absorbovaného záření o určité vlnové délce závisí na charakteru a množství absorbující látky - vzorku. Měření se provádí při konstantní vlnové délce, která odpovídá maximu absorpce stanovenou látkou. Pokud se neměří jen při jedné vlnové délce, ale hodnotí se určitý úsek spektra, jde o spektrofotometrii. Nejvíce využívaný vztah ve spektrofotometrii je Lambert-Beerův zákon:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

A ... absorbance

l ... délka kyvety [cm]

c ... koncentrace [mol.dm⁻³]

ε ... molární absorpční koeficient [dm³.mol⁻¹.cm⁻¹]

Z tohoto vztahu vyplívá, že absorbance je přímo úměrná koncentraci absorbující látky.[28]



Obrázek 6: Spektrofotometr

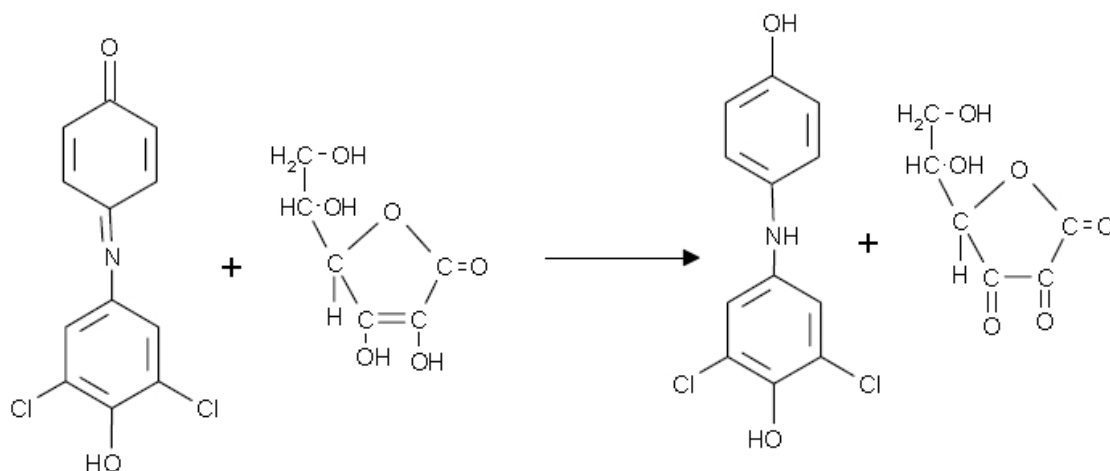
5 MOŽNOSTI STANOVENÍ KYSELINY L-ASKORBOVÉ V NÁPOJÍCH

Metody stanovení můžeme rozdělit do dvou skupin. Jedná se o metody chemické (např. titrační stanovení na 2,6-dichlorfenolindofenol), nebo metody fyzikálně-chemické (HPLC, spektrofotometrie).

5.1 Chemické metody

5.1.1 Titrační stanovení 2,6-dichlorfenolindofenolem

Chemické titrační stanovení kyseliny askorbové je založeno na její snadné oxidovatelnosti. Titruje se roztokem 2,6-dichlorfenolindofenolu, přičemž se kyselina askorbová oxiduje na kyselinu dehydroaskorbovou a 2,6-dichlorfenolindofenol přechází v bezbarvou leukobazi viz. obrázek číslo 7 [31,37].

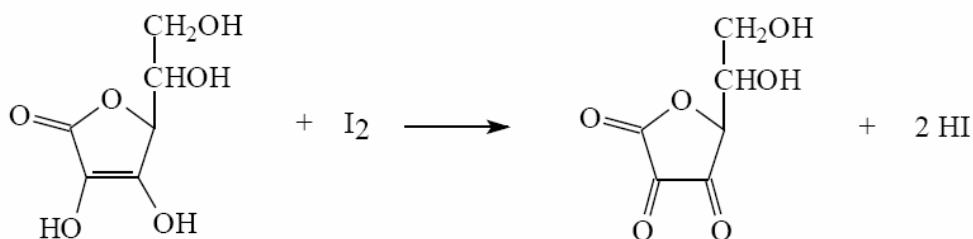


Obrázek 7: reakce l-askorbové kyseliny s 2,6-dichlofenolindofenolem [31].

Bod ekvivalence lze určit vizuálně, fotometricky, potenciometricky i polarimetricky.

5.1.2 Jodometrické stanovení

Askorbová kyselina je mírným redukčním činidlem a může velmi rychle reagovat s jodem a redukovat jej na jodidy. Reakce probíhající během titrace lze vyjádřit následující rovnicí:



Obrázek 8: Reakce kyseliny askorbové během jodometrické titrace

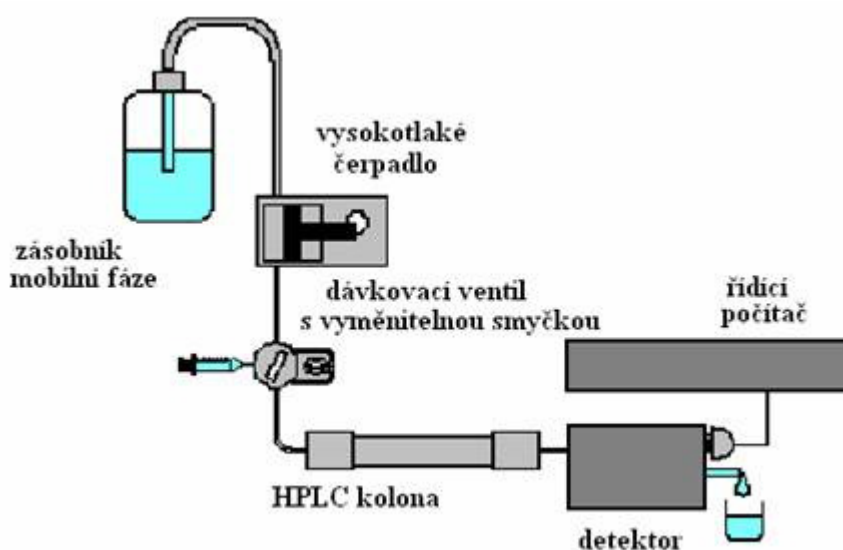
Produktem oxidace kyseliny askorbové je opět dehydroaskorbová kyselina. Jako indikátor se při této jodometrické titraci používá roztok škrobu, který svým modrým či hnědým zabarvením indikuje konec titrace [32].

5.2 Fyzikálně-chemické metody

5.2.1 Stanovení metodou HPLC

Metoda vysoko účinné kapalinové chromatografie patří v současné době mezi nejrozšířenější a nejspolehlivější metody stanovení askorbové kyseliny. Princip HPLC je uveden v kapitole 4.2.1.

5.2.1.1 Obecné schéma a součásti kapalinového chromatografu



Obrázek 9: schéma HPLC [33].

Zásobník mobilní fáze – využívají se skleněné nebo nerezové nádoby. Je třeba, aby byl zásobník dobře utěsněný, aby kapalina dobře odtékala a netěkala do okolí [29].

Vysokotlaké čerpadlo – pracuje s tlakem až do 60 MPa, aby byl zajištěn dostatečný průtok mobilní fáze (0,1 – 20 ml/min). Nejpoužívanější jsou membránová a pístová čerpadla [29].

Dávkovač vzorku – Vzorek je dávkujeme do proudu mobilní fáze přímým nástřikem stříkačkou, pomocí dávkovací smyčky nebo dávkování provádí automatický dávkovač.

Separační kolona – Chromatografická kolona je silná kapilára naplněná stacionární fází. HPLC kolony jsou nerezové. Obvyklý vnitřní průměr kolony je asi 4 mm a délka 5-25 cm. Schopnost kolony separovat určité směsi na jednotlivé látky je dána typem stacionární fáze, která je na silikagelovém nosiči

Detektor – Detektor je zařízení, přeměňující analytický signál (eluci složek směsi) na elektrický signál, který se dále zpracovává. Volba detektoru je závislá na povaze separované směsi i od druhu použité mobilní fáze. Nejčastěji používané jsou absorpční fotometrický detektor, fluorimetrický detektor, refraktometrický detektor, amperometrický detektor, vodivostní detektor, detektor s diodovým polem (DAD) nebo hmotnostní spektrometr jako detektor [29].

5.2.1.2 Průběh stanovení

Mobilní fáze proudí pomocí čerpadla systémem přes tlumič pulzů, kde se stabilizuje. Po nadávkování (nastříknutí) vzorku postupuje vzorek unášen mobilní fází do kolony. V koloně nastává separace složek v důsledku jejich různé afinity k stacionární fázi. Separované složky opouštějí kolonu v různém čase (retenční čas) nastává eluce. Vycházející složky jsou zaznamenávány detektorem a jeho signál je zpracováván integrátorem (počítač) [31].



Obrázek 10: HPLC chromatograf.

5.2.2 Polarografické stanovení

Tato metoda využívá ke stanovení kyseliny askorbové její oxidace na rtuťové kapkové elektrodě a redukce chinoxalinového derivátu, který vzniká kondenzací kyseliny dehydroaskorbové s o-fenylendiaminem. Jako pomocné elektrolyty při tomto stanovení používáme acetát a citrát (pH 4,5-4,6) fosfát a univerzální pufr (pH 2,2-7). Provádíme předběžnou úpravu vzorku za použití formaldehydu, aby bylo zabráněno interferenci s reduktony [34,36].

5.2.3 Stanovení pomocí Analytických testovacích proužků - Merckoquant (výrobce – MERCK s.r.o.)

Princip stanovení – testovací proužek ponoříme na jednu sekundu do testovaného roztoku, po deseti sekundách porovnáme reakční zónu s barevnou stupnicí. Stanovení touto metodou je však pouze orientační, protože naměřené hodnoty jsou značně nepřesné.

Metoda stanovení – barevná reakce je založena na redukci žlutě zbarveného fosfomolybdenového komplexu vlivem kyseliny askorbové s následným vznikem molybdenové modři.

Tuto metodu stanovení kyseliny askorbové lze použít pro rychlé stanovení hladiny přírodní kyseliny askorbové v potravinách, jako jsou ovocné a zeleninové džusy, nealkoholické nápoje, ale také pro kontrolu množství kyseliny askorbové, která je přidávána do jistých druhů jídla jako konzervační nebo antioxidační prostředek [40].



Obrázek 11: Testovací proužky Meckoquant [40].

5.2.4 Stanovení pomocí přístroje RQflex

(výrobce – MERCK s.r.o.)

Princip stanovení – testovací proužky se namočí do testovaného roztoku, vloží do přístroje a vyhodnotí kvantitativně pomocí čárkového kódu. Výsledná hodnota se po několika sekundách objeví na displeji. Stanovení je založeno na reakci kyseliny askorbové s kyselinou molybdenofosforečnou, kterou jsou reagenční proužky napuštěny. Tato metoda se doporučuje pro stanovení obsahu kyseliny askorbové v nápojích, v ovoci a zelenině. Přístroj RQflex je univerzální, kromě vitamínu C jej lze použít ke stanovení asi 30 dalších analytů (např. amoniak, dusitany, dusičnany, a další) [41].



Obrázek 12: přístroj RQflex [41].

ZÁVĚR

Ve své práci jsem se zabýval antioxidanty, jejich působením na lidský organismus a jejich využitím v potravinářském průmyslu. Cílem mé práce bylo zhodnocení účinku a možností využití antioxidantů při výrobě nápojů. Konkrétněji jsem se zabýval využitím kyseliny l-askorbové. Kyselina l-askorbová s celým svým reversibilním redoxním komplexem je známá jako vitamin C. Při výrobě je jí hojně využíváno jako stabilizačního prvku, právě pro její antioxidační účinky.

Při výrobě nápojů je velmi častým problémem možná oxidace složek výrobku a to buď během technologického procesu, nebo v průběhu skladování hotového výrobku, kdy přídavek vhodného antioxidantu může prodloužit trvanlivost, právě oddálením nežádoucích oxidačních procesů. Během výroby dochází při některých technologických krocích k výraznému provzdušnění suroviny. Obzvláště při rozmělnění ovocných surovin za účelem získání šťávy, jako je například drcení a lisování ovoce, se surovina výrazně provzdušní a nastartují oxidační procesy, které mají neblahý vliv na zejména sensorické vlastnosti meziprojektu, potažmo celého výrobku. Jedná se o proces enzymového hnědnutí, kdy šťáva změní v první řadě barvu a později i vůni a chuť. Nejmarkantnějším příkladem je jablečná šťáva, kdy z ovoce, jehož dužnina je většinou sněhově bílá dostaneme během několika okamžiků po vylisování nahnědlou a do několika minut až tmavě hnědou šťávu. Právě abychom při výrobě zastavili či alespoň zpomalili tento proces, využíváme antioxidantů.

Kyselina l-askorbová je hojně využívána pro stabilizaci ovocných šťáv, jako je jablečná či hrušková šťáva. S přidáváním tohoto antioxidantu se setkáme i při výrobě vína. Také zde jde o odvrácení negativních oxidačních změn během výroby. Navíc přídavkem kyseliny askorbové snížíme nutné množství škodlivého oxidu siřičitého, který se při výrobě vína využívá.

U Zeleninových šťáv dochází k oxidačním ztrátám také. Přídavkem askorbové kyseliny ochráníme některé důležité složky zeleninové šťávy, jako je třeba

U piva je přídavek kyseliny askorbové uskutečňován za účelem prodloužení trvanlivosti. Pozitivní účinek se projeví delší dobou trvanlivosti, oddálíme vznik zákalu. Proto se s přidáváním askorbové kyseliny do piva setkáme především u exportních značek, kde je delší doba použitelnosti podstatná vlastnost.

V závěru práce jsem uvedl možnosti stanovení kyseliny l-askorbové. Uvedl jsem principy nejpoužívanějších metod, jako je klasické titrační stanovení na 2,6-dichlorfenolindofenol i moderní separační metodu HPLC, která je v současné době asi nejpoužívanější metodou pro toto stanovení.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] JORDÁN, V., HEMZALOVÁ, M. *Antioxidanty, zázračné zbraně, vitamíny aminokyseliny-stopové prvky-minerály a jejich využití pro zdravý život*. 1. vyd. Brno: Jota, 2001. 145 s. ISBN 80-7271-156.
- [2] PASSWATER, R. A. *O antioxidantech*. 1. vyd. Praha: Pragma, 2002. 94 s., ISBN 80-7205-897-5.
- [3] POKORNÝ, J., YANISHLIEVA, N., GORDON, M. *Antioxidants in food particular applications*. 1. vyd. Cambridge: Woodhead Publishing, 2001. 380 s. ISBN 978-1-59124-331-1.
- [4] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J. *Chemie potravin*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1983. 632 s. ISBN 04-815-83.
- [5] ŠTÍPEK, S. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. 1. vyd. Praha: Grada publishing s.r.o., 2000. 320 s. ISBN 80-7169-704-4.
- [6] RACEK, J. *Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění*. 1. vyd., Praha: Galen, 2003. 7 s. 66 s. ISBN 80-7262-231-5.
- [7] PLÁTENÍK, J. *Volné radikály, antioxidanty a stárnutí* [online]. Dostupný z WWW: <<http://www.solen.cz/pdfs/int/2009/01/06.pdf>>.
- [8] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2*. 1. vyd. Tábor: Osis, 1999. s. 29-41, 304 s. ISBN 80-902391-4-5
- [9] LACHMAN, J., HAMOUN, K., ORSÁK, M. Červeně a modře zbarvené brambory - významný zdroj antioxidantů v lidské výživě. *Chemické listy*. 2005. č. 99. s. 474.
- [10] FOŘT, P. *Zdraví a potravní doplňky*. 1. vyd. Praha: Ikar, 2005. 400 s. ISBN 80-249-0612-0
- [11] FIEDLEROVÁ, V., HOLASOVÁ, M., GABROVSKÁ, D. *Antioxidační aktivita zeleninových a ovocných šťáv* [online]. Dostupný z WWW: <<http://www.vupp.cz/czvupp/publik/10poster/10fiedlerovaANTIOXIDACNI....pdf>>.
- [12] KELLNER, V. *Pivo, vitamíny a další důležité látky pro výživu a zdraví člověka* [online]. Dostupný z WWW: <<http://www.beers.cz/dokumenty/7.pdf>>.

- [13] KRAUS, V. a kol. *Poznávání mechanismů působení vína* [online]. Dostupný na WWW: <<http://www.trhvin.cz/pruvodce-vinem/241-poznavani-mechanismu-pusobeni-vina>>.
- [14] VORLOVÁ, M. *Víno vás ochrání nejen před infarktem* [online]. Dostupný na WWW: <<http://www.bylinky.eu/vino-vas-ochrani-nejen-pred-infarktem.html>>.
- [15] AONYM. Vitamin C: *askorbová kyselina* [online]. Dostupný z WWW: <<http://www.ped.muni.cz/WCHEM/comenius2000/vitaminc/struktura.htm>>.
- [16] MEYERS, A. R. *Encyklopedia of Physical Science and Technology*. 3.vyd. California, 2001. 528 s. ISBN 978-0-12-22-7410-7.
- [17] HLÚBIK, P., OPLTOVÁ, L. *Vitaminy*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2004. 232 s. ISBN 80-247-0373-4.
- [18] BENDICH, A., MACHLIN, L.J., SCANDURRA, O., BURTON, G.W., WAYNER, D.D.M. *The antioxidant role of vitamin C. Advances in free radical biology a medicine*. 1986, 2. vyd. s. 419-444.
- [19] ANONYM. *L-Ascorbic acid as a stabilizer in fruit and vegetable juices* [online]. Dostupný na WWW: <<http://www.ascorbicacid.info/24ascorbicacidastabilizerinfruitandvegetablejuices.html>>.
- [20] ROP, O., HRABĚ, J. *Nealkoholické a alkoholické nápoje*. 1. vyd. Zlín: UTB, 2009. 57 s. ISBN 978-80-7318-748-4.
- [21] ANONYM. *L-Ascorbic acid as an antioxidant in beer* [online]. Dostupný na WWW: <<http://www.ascorbicacid.info/25ascorbicacidasanantioxidantinbeer.html>>.
- [22] Nařízení komise (ES) č. 606/2009 ze dne 10.7.2009, kterým se stanoví některá prováděcí pravidla k nařízení Rady (ES) č. 479/2008, pokud jde o druhy výrobků z révy vinné, enologické postupy a omezení, která se na ně použijí [online]. Dostupný z WWW: <<http://eur-lex.europa.eu>>.
- [23] LOPES, P.; DRIKINE, J.; SAUCIER, C.; GLORIES, Y. Determination of L-ascorbic acid in wines by direct injection liquid chromatography using a polymeric column. *Analytica chimica acta* 555. 2006. s. 242-245.

- [24] FIDLER, M., KOLÁŘOVÁ, L. Analýza antioxidantů v chmelu a pivu. *Chemické listy*. 2009. č. 103. s. 232-235.
- [25] PACÁKOVÁ, K., ŠTULÍK, K. *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie*. UK Praha. SPN, Praha 1986.
- [26] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 1. vydání. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 1996. 22 s. 40s. 41 s. ISBN 80-902155-0-5.
- [27] RENGER, F., KALOUS, J. *Analytická chemie I*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 1991.
- [28] VOLKA, K. *Analytická chemie II*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 1995.
- [29] ŠTULÍK, K., ŠEVČÍK, J., PACÁKOVÁ, V., JELÍNEK, I., COUFAL, P., BOSÁKOVÁ, Z. *Analytické separační metody*. Praha: nakladatelství Karolinum, 2005, dotisk 1. vydání
- [30] ZACHAŘ, P., SÝKORA, D. *PLYNOVÁ CHROMATOGRRAFIE* [online]. Dostupný na WWW: <www.vscht.cz/anl/lach2/GC.pdf>.
- [31] KÁŠ, J., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vydání. Praha: VŠCHT, 2006. 164 s. ISBN 80-70 80-58 6- 2.
- [32] KUČKOVÁ, Š. *Laboratoře z analytické chemie* [online]. Dostupné z WWW: <<http://userweb.pedf.cuni.cz/wp/kch/files/2010/10/navody.pdf>>.
- [33] HPLC: Schéma [online]. Dostupné z WWW: <http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separa.htm>.
- [34] HÁLKOVÁ, J., RUMÍŠKOVÁ, M., RIEGLOVÁ, J. *Analýza potravin – laboratorní cvičení*. 1. vydání. Újezd u Brna: RNDr. Ivan Straka, 2000. 160 s. ISBN 80-902775-4-3.
- [35] MINDELL, E. *Vitaminová bible pro 21. století*. 1. vydání. Praha: Knižní klub, 2000. s. 66-67. ISBN 80-242-0406-1.
- [36] POSPÍŠIL, J. *Antioxidanty*. 1. vydání. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 1968. 252 s.

- [37] KNOBLOCH, E. *Fyzikálně chemické metody stanovení vitamínů*. 1. vydání. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 1956. 320 s.
- [38] CHURÁČEK, J., a kol. *Analytická separace látek*. 1. vydání. Praha: SNTL n.p., 1990. 202 s. ISBN 80-03-00569-8.
- [39] ANONYM. *L-Ascorbic acid as a stabilizer in fruit and vegetable juices* [online]. Dostupný na WWW: <<http://www.ascorbicacid.info/28ascorbicacidastabilizerinrefreshingdrinks.html>>.
- [40] ANONYM. Test stanovení kyseliny askorbové [online]. Dostupný na WWW: <http://www.merck-chemicals.com/czech-republic/test-pro-stanoveni-kyseliny-askorbove/MDA_CHEM-110023/p_29.b.s1LRy4AAAEWl.IfVhTl>.
- [41] ANONYM. Test stanovení kyseliny askorbové testovacími přístrojem RQflex [online]. Dostupný na WWW: <http://www.merck-chemicals.com/czech-republic/reflektometr-rqflex/MDA_CHEM-116970/p_uuid>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HPLC	High performance liquid chromatography – vysokoúčinná kapalinová chromatografie.
GC	Gas Chromatography – plynová chromatografie.
AA	Ascorbic acid – kyselina askorbová.
TAA	Total antioxidant activity – celková antioxidační aktivita.

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obrázek 1: Resveratrol
- Obrázek 2: Oxidace askorbové kyseliny
- Obrázek 3: Ukázka chromatogramu
- Obrázek 4: Schéma plynového chromatografu
- Obrázek 5: Plynový chromatograf
- Obrázek 6: Spektrofotometr
- Obrázek 7: Reakce l-askorbové kyseliny s 2,6-dichlofenolindofenolem
- Obrázek 8: Reakce kyseliny askorbové během jodometrické titrace
- Obrázek 9: Schéma HPLC
- Obrázek 10: HPLC chromatograf
- Obrázek 11: Testovací proužky Meckoquant
- Obrázek 12: Přístroj RQflex

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Použití, dávkování a zdroje antioxidantů

Tabulka 2: Obsah vitamínu C v některých potravinách