

# **Elektrochemické stanovení celkové antioxidační kapacity u vybraných nápojů**

Edita Vavrečková

---

Bakalářská práce  
2017



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie potravin  
akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Edita Vavrečková**  
Osobní číslo: **T14927**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Elektrochemické stanovení celkové antioxidační kapacity u vybraných nápojů**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Antioxidační kapacita a její význam v analýze potravin
2. Metody stanovení celkové antioxidační kapacity
3. Využití elektrochemických metod pro stanovení celkové antioxidační kapacity

### II. Praktická část

1. Elektrochemické stanovení antioxidační kapacity vybraných skupin nápojů
2. Vyhodnocení experimentálně získaných výsledků

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] SAMEC, Zdeněk. Elektrochemie. Praha : Karolinum, 1999. 99 s. ISBN. 80-7184-948-0

[2] ZOSKI, Cynthia G., Handbook of electrochemistry Elsevier 2007, 890 s. ISBN 0-444-51958-0

[3] ZÝKA, Jaroslav a kol., Analytická příručka, 2.díl, SNTL. Praha. 1988.

[4] WANG, Joseph. Analytical electrochemistry. 3rd ed. Hoboken, N.J.: Wiley-VCH, 2006, xvi, 250 s. ISBN 0-471-67879-1

[5] Relevantní primární literatura na Web of Science.

Vedoucí bakalářské práce:

**Mgr. Vladimír Halouzka, Ph.D.**

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

**3. února 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**5. května 2017**

Ve Zlíně dne 3. února 2017



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.  
*děkan*



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: VAVREČKOVÁ EDITA

Obor: CHTP

## 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<sup>1)</sup>;
- 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<sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60<sup>3)</sup> 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<sup>3)</sup> 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 12.5.2014

Edita Vavrečková

---

<sup>1)</sup> 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.

<sup>2)</sup> 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 vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> 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). Odpírá-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 vynaložil, 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**

Předkládaná bakalářská práce se zabývá volnými radikály, jejich vznikem a působením a zvláště pak látkami působícími proti volným radikálům a chránícím organismus před účinky volných radikálů – antioxidanty. Část práce je věnována přirozenému výskytu a zastoupení antioxidantů v potravinách a dále pak popisu nejčastějších metod stanovení antioxidantů.

Cílem práce bylo otestovat zařízení pro stanovení celkové antioxidační kapacity nápojů a zautomatizovat měření pomocí vyrobeného (homemade) autosampleru.

Dalším cílem bylo stanovit celkovou antioxidační kapacitu u vybraných vzorků nápojů, kdy jako velice zajímavé a poměrně složité matrice byly vybrány vzorky pív.

**Klíčová slova:** volné radikály, antioxidanty, pivo, celková antioxidační kapacita

## **ABSTRACT**

The presented bachelor thesis deals with free radicals, their formation, effects, and substances that act against free radicals and protective organisms from free radicals - antioxidants. Part of the work is devoted to the natural occurrence and representation of antioxidants in food and to the description of the most common methods of antioxidant determination.

The aim of the thesis was to test equipment for determination of total antioxidant capacity of beverages and to make measurements automatic using a manufactured domestic autosampler.

Another objective was to determine the total antioxidant capacity in selected beverage samples and selected samples of beers were very interesting and relatively complex.

**Keywords:** free radicals, antioxidants, beer, total antioxidant capacity

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce panu Mgr. Vladimíru Halouzkovi, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce, cenné rady, velikou trpělivost a čas, který mi věnoval při zpracovávání a za pomoc v experimentech měření této práce. Dále bych poděkovala mé rodině a přátelům za podporu po celou dobu studia.

Prohlašuji, že bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně, veškerá použitá literatura je citována. Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Ve Zlíně

.....

Podpis studenta

## OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 VOLNÉ RADIKÁLY</b> .....	<b>12</b>
1.1 REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU .....	12
1.1.1 Vznik hydroxilového radikálu.....	13
1.2 REAKTIVNÍ FORMY DUSÍKU .....	13
<b>2 ANTIOXIDANTY</b> .....	<b>14</b>
2.1 DĚLENÍ ANTIOXIDANTŮ.....	14
2.2 ANTIOXIDANTY PŘIJÍMANÉ POTRAVOU.....	15
2.2.1 Vitamín C – kyselina askorbová .....	15
2.2.2 Vitamín E - tokoferol .....	15
2.2.3 Polyfenoly .....	16
2.2.3.1 Fenolové kyseliny .....	16
2.2.3.2 Flavonoidy .....	17
2.2.3.3 Lignany .....	19
2.2.3.4 Stlibeny .....	19
2.3 ANTIOXIDAČNÍ KAPACITA .....	20
<b>3 METODY STANOVENÍ CELKOVÉ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITY</b> .....	<b>21</b>
3.1 STANOVENÍ TAC CHEMICKÝMI METODAMI.....	21
3.1.1 Metoda ORAC (oxygen radical absorbance capacity).....	21
3.1.2 Metoda TEAC (TroloxEquivalent Antioxidant Capacity).....	21
3.1.3 Metoda FRAP (FerricReducing Antioxidant Power).....	21
3.1.4 Metoda DPPH (difenyl pikrylhydrazyl).....	21
3.2 STANOVENÍ TAC ELEKTRONOVOU PARAMAGNETICKOU REZONANCÍ (EPR) .....	22
3.3 STANOVENÍ TAC ELEKTROCHEMICKÝMI METODAMI .....	22
3.3.1 HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)s elektrochemickou detekcí .....	22
<b>4 PIVO</b> .....	<b>23</b>
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>24</b>
<b>5 CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ</b> .....	<b>25</b>
5.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	25
5.2 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ .....	26
<b>6 VÝROBA A AKTIVACE MIKROELEKTROD – SENZORŮ</b> .....	<b>27</b>
6.1 PŘÍPRAVA MIKROELEKTRODY .....	27
6.2 PŘEDÚPRAVA ELEKTRODY – OČIŠTĚNÍ A AKTIVACE ELEKTRODY.....	28
<b>7 MĚŘÍCÍ SYSTÉM</b> .....	<b>32</b>
7.1 POPIS SYSTÉMU .....	32
7.2 REGENERACE SONDY .....	34
7.3 MĚŘENÍ S MIKROELEKTRODAMI .....	35
7.4 KALIBRACE NA KYSELINU ASKORBOVOU A GALLOVOU NA MIKROELEKTRODĚ.....	35
<b>8 VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>36</b>



8.1	KALIBRACE NA KYSELINU ASKORBOVOU A GALLOVOU.....	36
8.2	TAC VZORKŮ PIV .....	37
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>41</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>42</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>45</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ A GRAFŮ .....</b>	<b>46</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>47</b>

## ÚVOD

V životním prostředí dnes vlivem lidské činnosti stále více přibývá látek radikálové povahy, čímž může docházet k nepoměru, mezi volnými radikály a látkami chránící tělo, antioxidanty. Lidé jsou také více ohroženi zvyšující se mírou oxidačního stresu v organismu, která má za následek vznik, případně podporu vzniku různých nemocí – především civilizačních. K nárůstu počtu a intenzity působení volných radikálů v těle dochází také běžnými fyziologickými procesy během stárnutí. Řadu volných radikálů si do organismu vnášíme sami, například kouřením, nadbytkem konzumovaných tuků a nízkou konzumací potravin obsahujících látky s antioxidačními účinky. Právě dostatečný přísun potravin bohatých na látky eliminující radikály napomáhá chránit organismus před působením volných radikálů. Látky obsažené v těchto potravinách, mající schopnost snižovat výskyt volných radikálů v těle, nazýváme antioxidanty. Mezi tyto látky s antioxidačními účinky patří vitamíny a minerály obsažené v ovoci a zelenině, polyfenolické látky různé povahy nacházející se v obilovinách či ořechách. K důležitým zdrojům příjmu antioxidantů patří i nápoje, jak nealkoholické mezi kterými jsou cennými zdroji ovocné a zeleninové šťávy, zelený nebo černý čaj, tak i nápoje s nižším obsahem alkoholu, jako jsou pivo a víno, do kterých se dostávají antioxidanty z výchozích surovin při zpracování. Látky s antioxidačním účinkem nejsou jen prospěšné pro organismus konzumentů, ale také chrání potraviny před vnějšími vlivy, prodlužují stabilitu a trvanlivost výrobků.

Potraviny s antioxidačními účinky v sobě neobsahují nikdy jen jeden antioxidant, ale soubor více látek navzájem se doplňujících. Z tohoto důvodu byly zavedeny různé metody stanovení tzv. celkové antioxidační kapacity. Mezi nejznámější a nejpoužívanější metody řadíme metody ORAC, FRAP, TEAC, metody elektrochemické či EPR.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 VOLNÉ RADIKÁLY

Volnými radikály jsou označovány atomy, ionty nebo molekuly obsahující jeden nebo více nepárových elektronů. Volné radikály vznikají přijetím nebo ztrátou elektronů, například při oxidativním stresu v živých organismech, kde působí negativně na biologicky významné sloučeniny, především na lipidy, bílkoviny a nukleové kyseliny, kdy pozměňují jejich strukturu a tím dochází k jejich destrukci či modifikaci jejich funkce. Radikály jsou nestálé, velmi reaktivní a mají tendenci vytvářet další volné radikály a tím zahajovat řetězovou reakci sestávající ze třech fází. První z nich je iniciace, další propagace a poslední terminace. Principem vzniku řetězové reakce je, že volné iniciační radikály reagují s jinými volnými radikály nebo s intaktními molekulami a rozbíjí je na volné radikály a další elektrony, které vedou ke vzniku následných radikálů. [1]

Pro organismus jsou nejdůležitější volné radikály kyslíku a dusíku, z nichž dalšími přeměnami mohou vznikat jiné reaktivní látky, které již ale nemají nepárový elektron (peroxid vodíku, kyselina chlorná). Tyto látky se spolu s volnými radikály označují názvem reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species, ROS), reaktivní formy dusíku (RSN).[2]

Volné radikály vznikají z molekul třemi způsoby:

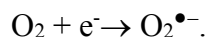
- homolytickým štěpením kovalentní chemické vazby, přičemž každý fragment získá jeden nepárový elektron,
- redukcí – přijímání elektronu molekulou,
- oxidací – ztrátou jednoho elektronu.

### 1.1 Reaktivní formy kyslíku

Mezi nejčastěji se vyskytujícími radikály reaktivních forem kyslíku jsou: peroxidový radikál ( $O_2\cdot^-$ ), hydroperoxylový radikál (HO), peroxylový radikál ( $ROO\cdot$ ), hydroxylový radikál ( $OH\cdot$ ) a alkoxylové radikály ( $RO\cdot$ ). Poměrně časté jsou i reaktivní formy kyslíku neradikálové povahy, jako singletový kyslík ( $^1O_2$ ), ozon ( $O_3$ ), peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) a kyselina chlorná (HClO). [3]

### 1.1.1 Vznik hydroxilového radikálu

Superoxid vzniká přijetím jednoho elektronu molekulou kyslíku:

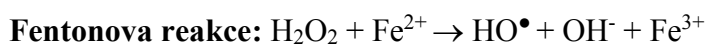


Po přijmutí dalšího elektronu dojde k redukci superoxidu na peroxid vodíku:



Takto vzniklý peroxid vodíku se přijmutím dalšího elektronu rozpadne na vodu a hydroxylový radikál ( $\text{HO}^\bullet$ ).

Fentonova reakce – při této reakci vzniká z peroxidu vodíku v reakci s železnatým kationtem  $\text{Fe}^{2+}$  vysoce toxický hydroxylový radikál  $\text{HO}^\bullet$ , který v živé hmotě okamžitě reaguje s okolními molekulami. Jako silné oxidační činidlo vytrhuje z nenasycených mastných kyselin elektron a atakuje báze nukleových kyselin. [4]



## 1.2 Reaktivní formy dusíku

Reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species, RNS) jsou odvozeny od dusíku a dělí se do skupin radikálových a neradikálových.

Do radikálové skupiny se řadí oxid dusnatý ( $\text{NO}^\bullet$ ) a dusičitý ( $\text{NO}_2^\bullet$ ), mezi neradikálové RNS řadíme nitrosylový kation ( $\text{NO}^+$ ), nitroxyl ( $\text{NO}^-$ ), kyselinu dusitou ( $\text{HNO}_2$ ), oxid dusitý ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), oxid dusičitý ( $\text{N}_2\text{O}_4$ ), peroxonitritový anion (peroxodusitan,  $\text{ONOO}^-$ ) a alkylperoxynitrit ( $\text{ROONO}$ ). [5]

Každý organismus má svoji antioxidační ochranu a při správném fungování je v rovnováze se vznikajícími radikály. Pokud ale dojde k porušení rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním volných radikálů, dochází k oxidačnímu stresu. Porušení rovnováhy je způsobeno, nahromaděním volných radikálů v organismu, jak radikálů v organismu přirozeně vzniklých, tak radikálů dostávajících se do těla zvenčí (např: kouřem, zářením aj.). Oxidační stres je tedy stav, kdy je organismus v těžké nerovnováze a přispívá tím k tvorbě především civilizačních chorob (např: infarktu myokardu, diabetes aj.). K zabránění nerovnováhy a tím i vzniku oxidačního stresu je kladen velký důraz na příjem antioxidantů. [6]

## 2 ANTIOXIDANTY

Antioxidanty jsou látky (molekuly) chránící organismus před působením volných radikálů tím, že zabraňují jejich oxidaci. Chrání organismus jak před vlivem exogenních tak i endogenních volných radikálů a zapojují se do metabolismu, ve kterém vznikly nebo do kterého byly dopraveny. [2,6]

Po chemické stránce mohou být antioxidanty například látky polyfenolického charakteru, jako jsou kumariny, flavonoidy aj., ale i vitamíny a to vitamín C, E a karotenoidy.[7]

Již v dřívějších dobách začaly být antioxidanty aplikovány zejména v oblastech průmyslové výroby či v potravinářství pro konzervaci potravin a uchovávání snadno degradovatelných látek. V současné době jsou využívány jako látky s širokým uplatněním v medicíně, dále pak v chemickém a potravinářském průmyslu, především pro eliminaci působení volných radikálů uvolňujících se při oxidativních procesech v organismu, ale také například zabraňují projevům působení volných radikálů v potravinách, jako je žluknutí tuků.[8,9]

Přírodní antioxidanty se nacházejí v zelenině, ovoci, koření, čaji a bylinkách. Jako jejich zdroje mohou také posloužit olejnatá semena, ořechy, obiloviny, luštěniny a živočišné produkty. Konzumace potravin obsahujících cenné antioxidanty ve větším množství je prospěšná a nepostradatelná, snižuje riziko rakoviny a kardiovaskulárních onemocnění, chrání strukturu buněčné a cytoplasmatické membrány aj.[9]

### 2.1 Dělení antioxidantů

Antioxidanty tvoří sourodou skupinu látek, tudíž je obtížné je rozdělit do specifických skupin. Většinou se dělí podle různých kritérií, nejčastěji však podle mechanismu účinku na katalyzátory, chelatační látky, inhibitory enzymů, a dále dle rozpustnosti na látky hydrofilní, lipofilní, podle velikosti jejich molekul na vysokomolekulární, nízkomolekulární, či dle původu na endogenní, exogenní, přirozené, umělé. [2,10]

Antioxidanty mohou být získávány syntézou jako látky identické nebo jako látky částečně identické s antioxidanty, které se přirozeně vyskytují v přírodě, nebo jako látky zcela specifické. [10]

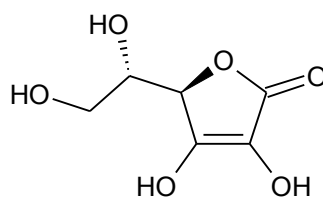
## 2.2 Antioxidanty přijímané potravou

Antioxidanty jsou obsaženy v nejrůznějších potravinách, nicméně pokud bychom se pokusili o zobecnění skupiny potravin, obsahujících největší množství antioxidantů, jednalo by se o potraviny, které neobsahují cholesterol, obsahují minimum tuků a sodíku, lidskému tělu dodávají dostatek vitamínů, esenciálních látek, minerálních látek, rostlinných bílkovin a vlákniny (luštěniny, ořechy, ovesné vločky). Nejčastějšími přírodními antioxidanty obsaženými v potravinách jsou vitaminy skupiny B, vitamin C, tokoferoly, polyfenoly a minerální látky.[9,10,12]

### 2.2.1 Vitamin C – kyselina askorbová

Vitamin C, neboli kyselina askorbová je ve vodě rozpustná látka, přispívající k udržení tělesného zdraví. Vitamin C je vitamínem esenciálním, tělo si jej neumí samo vytvořit, tak jej musíme získávat z potravy. Denní dávka je v rozmezí mezi 60-200 mg/den. Nachází se jak v ovoci, tak v zelenině, ale liší se svým množstvím v jednotlivých druzích potravin. Nejvíce vitamínu C můžeme nalézt v citrusových plodech, v šípku, černém rybíze, paprice, bramborách. Vitamin C je velmi důležitým a nezastupitelným antioxidantem. Působí jako kofaktor řady enzymů, sehrává důležitou roli při oxidoredukčních dějích v organismu. Antioxidační účinek spočívá v redukci anorganických i organických radikálů, mezi které řadíme kyslíkový, hydroxylový, peroxidový aj.[11,12,13]

Kyselina L-askorbová bývá používána jako potravinářské aditivum, jak v konzervářské technologii, tak i v technologii masa, tuků.

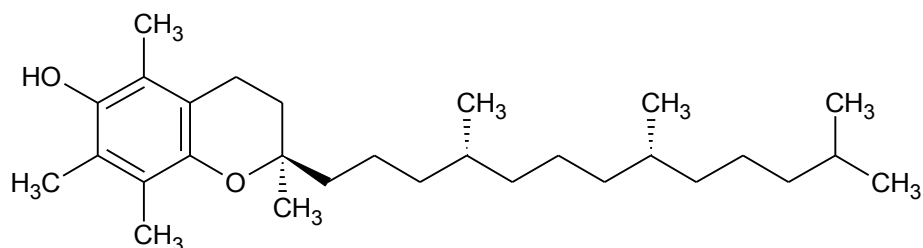


Obr. 1: struktura vitamínu C

### 2.2.2 Vitamin E - tokoferol

Lipofilní vitamin zahrnující skupinu osmi izomerů, z nichž nejvíce zastoupenou a neúčinnější formou vyskytující se v přírodě je  $\alpha$ -tokoferol. Vitamin E je typický membránový antioxidant, uplatňující se v antioxidační ochraně lipidů biologických membrán a lipoproteinových částic plazmy. Vitamin E jako antioxidant má aktivní hydroxylovou skupinu na aromatickém jádře. Při reakci s volnými radikály ztrácí vitamin E svou aktivní

skupinu a tím dochází k jeho inaktivaci. Důležitým krokem k obnově je tzv. regenerace vitamínu, kterou u vitamínu E zaujímá kyselina askorbová a poté následuje aktivace kyseliny dehydroaskorbové pomocí glutationu. Mezi potraviny obsahující vitamin E jsou řazeny obilné klíčky, ořechy a listová zelenina.[11,14]



Obr.2:strukturavitamínu E

### 2.2.3 Polyfenoly

Polyfenoly jsou látky, které mají ve své molekule dvě a více hydroxylových skupin navázaných na aromatickém jádře. Nacházejí se téměř ve všech rostlinách a mají různé funkce. Chrání rostliny jak před oxidativním stresem, tak i před UV zářením a působením patogenů. Polyfenoly jsou rozsáhlou skupinou látek. V dnešní době je známo více než 8000 druhů polyfenolů, rozdělujících se do 4 skupin v závislosti na počtu aromatických kruhů a způsobu vazby mezi jednotlivými aromatickými kruhy, nebo do deseti tříd na základě jejich chemické struktury.[15,16]

v závislosti na počtu aromatických kruhů a způsobu vazby mezi jednotlivými aromatickými kruhy se dělí na:

1. Fenolové kyseliny
2. Flavonoidy
3. Lignany
4. Stilbeny

#### 2.2.3.1 Fenolové kyseliny

Fenolové kyseliny rozdělujeme do dvou tříd na deriváty kyseliny benzoové a deriváty kyseliny skořicové.

Mezi deriváty kyseliny benzoové se řadí kyselina ellagová, gallová a hydrolyzované tanniny, nacházejících se převážně v bobulovitém ovoci (maliny, rybíz, jahody, ostružiny), ale také ve skořápkových plodech a cibuli.



K derivátům kyseliny skořicové se řadí kyselina p-kumarová, kyselina kávová, kyselina chlorogenová, kyselina nerulová a kyselina sinapová, vyskytující se převážně v obilovinách, kávě ale i v ovoci (kiwi, jablka, třešně).[15]

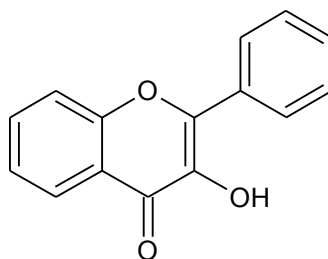
### 2.2.3.2 Flavonoidy

Výskyt flavonoidů je nejčastější ve formě glykosidů. Glykosidová forma umožňuje vyšší rozpustnost v běžných fyziologických podmínkách, snižuje a zabezpečuje lepší stabilitu. Glykosidovou částí flavonoidů bývá obvykle glukóza, galaktóza, xylóza a arabinóza. Flavonoidy jsou přítomné přibližně v 80 % vyšších rostlin. [16]

Mezi hlavní skupiny flavonoidů ke vztahu k člověku a dle stupně oxidace kyslíkového heterocyklu patří:

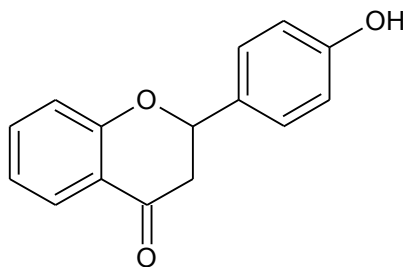
- Flavonoly - zástupci kvercetin, kemferol a myricetin
- Flavanony – hesperetin, naringenin, eriodictyol
- Flavanoly – katechiny( epikatechiny), proanthokyanidiny
- Flavony - glykosidy apigenin a luteolin
- Isoflavony – daidzein, glycitein, genistein
- Anthokyanidiny - kyanidin, pelargonidin, peonidin, delphinidin, petunidin, malvidin

Flavonoly jsou hlavními zástupci flavonoidů. Jejich obsah se v rostlinách odhaduje až na desítky  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Nejvíce se vyskytují v česneku, brokolici, jablkách, bobulovitém ovoci, listové a kořenové zelenině, v čaji a ve víně, kde přispívají k jejich trpké chuti. [17,18]



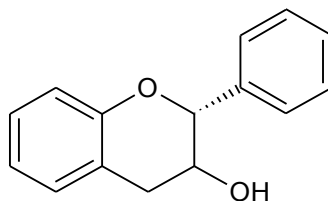
Obr. 3: struktura flavonolu

Flavanony jsou v největší koncentraci obsaženy v citrusových plodech (pomeranč, grep, citrón), v menší koncentraci v rajčatech. Nacházejí se i v aromatických rostlinách jako lékořice či skořice. [17]



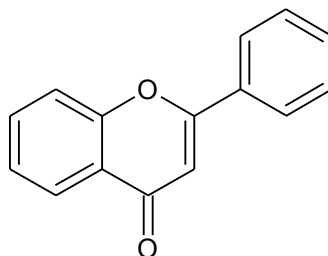
Obr. 4: struktura flavanonu

Flavanoly - mezi největší skupinu patřící pod flavanoly patří katechiny. Jejich největší zastoupení je v zeleném čaji a čokoládě. Nacházejí se i v mnoha druzích ovoce a vinné révě. Do druhé skupiny flavonolů patří proanthokyanidiny, také známé jako kondenzované tanniny. Ty jsou odpovědné za svíravou chuť ovoce a nápojů a také za hořkost čokolády, kterou způsobují díky tvorbě komplexů se silnými proteiny. Postupem zrání svíravost mizí. [17,18]



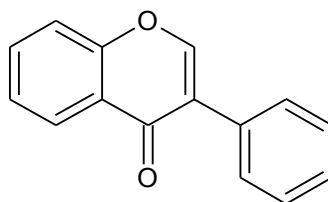
Obr. 5: struktura flavanolu

Flavony jsou méně běžné než flavanoly. Flavony ve větších koncentracích přispívají k zabarvení rostlinných tkání a společně s flavanoly jsou žlutými pigmenty rostlin. Nejvíce jsou zastoupené v kořenové zelenině a citrusových plodech.



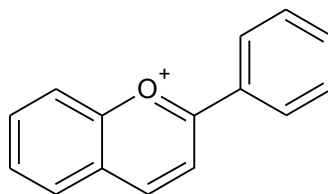
Obr. 6: struktura flavonu

Isoflavony, neboli fytoestrogeny, jsou schopné vázat se k estrogenovým receptorům. Nejvíce zastoupené jsou v sóji a luštěninách. [17,18]



Obr. 7: struktura isoflavonu

Anthokyanidiny patří do skupiny rostlinných barviv (růžová, červená, modrá) nacházejících se jak ve slupkách, tak i v dužině. Vytvářejí komplexy se silnými proteiny jako flavanoly a tím mají za následek trpkou chuť ovoce a nápojů. Jsou nejvíce zastoupeny v ovoci, bobulích hroznového vína, v pivě, zeleném čaji, červeném zelí, cibuli. [18]



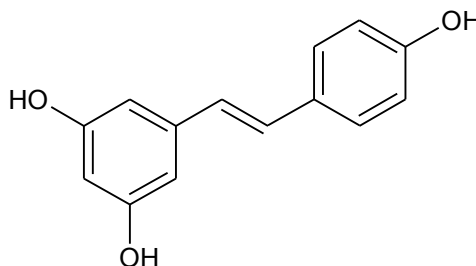
Obr. 8: struktura anthokyanidinu

### 2.2.3.3 Lignany

Někdy též fytoestrogeny se nacházejí především ve slupkách v různých druzích semen, v celých zrnech, luscích zeleniny a také v ovoci. Nejvíce zastoupeny jsou v lněném oleji, lněném semínku a celozrnném žitném pečivu. [19]

### 2.2.3.4 Stlibeny

Nejvýznamnějšími zástupci jsou resveratrol a jeho glukosidpiceol, nacházející se v bobulích hroznového vína a v červeném víně. Resveratrol může sloužit jako ochranný faktor před vznikem škodlivého peroxidu, oxidů dusíku a ROS. [19]



Obr. 9: struktura stibenu

Jak vyplývá z výše uvedených skutečností, většina antioxidantů se nachází v ovoci, zelenině, skořápkových plodech, olejninách. Největší množství polyfenolických látek lze potom nalézt v pivu, čaji, víně, kávě, čokoládě s vysokým obsahem kakaa, v ovoci a některých druzích zeleniny, převážně kořenové.

Jako antioxidanty působí také mikroelementy a stopové prvky, které patří mezi esenciální, stejně jako esenciální aminokyseliny, musíme je tedy do těla dodávat potravou. Mezi takovéto prvky řadíme selen, zinek, měď, železo, jod aj.

### 2.3 Antioxidační kapacita

Antioxidační kapacita je vlastnost či schopnost látky (tkání) vychytávat a eliminovat volné radikály, a tím odolávat oxidačnímu stresu a chránit organismus před škodlivými procesy způsobenými volnými radikály. Jelikož existuje velké množství antioxidantů s rozdílnými mechanismy účinku, byl zaveden pojem tzv. celková antioxidační kapacita (total antioxidant capacity – TAC), popisující celkové množství všech antioxidantů ve zkoumaném prostředí (vzorku). TAC slouží k rychlému a přehlednému srovnání antioxidačních účinků různých vzorků. Celková antioxidační kapacita se nejčastěji určuje na základě porovnání TAC vzorku se známým množstvím antioxidantů ve standardu. Mezi látky s vysokou antioxidační kapacitou řadíme vitamíny, flavonoidy, karotenoidy, stopové prvky a koenzym A. Metody stanovení TAC jsou rozdílné, jde například o přímou reakci s radikály nebo reakci s přechodnými kovy. Pro stanovení se nejčastěji v praxi využívá metod TEAC (ABTS), FRAP, ORAC, DPPH, TRAP. [2,20]

### 3 METODY STANOVENÍ CELKOVÉ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITY

#### 3.1 Stanovení TAC chemickými metodami

##### 3.1.1 Metoda ORAC (oxygen radical absorbance capacity)

Metoda ORAC je fluorescenční metoda založená na eliminaci kyslíkových radikálů antioxidanty a úbytek fluorescence  $\beta$ - fykoerytrinu. Při této metodě se v systému generují pomocí činidla ABAP (2,2'- azobis-2-methyl- propionamidinu) kyslíkové radikály a sleduje se schopnost antioxidantů ve vzorku tyto radikály vychytávat a tím zpomalit nebo zastavit radikálovou reakci. [2,21]

##### 3.1.2 Metoda TEAC (TroloxEquivalent Antioxidant Capacity)

Metoda TEAC je spektrofotometrická metoda. Je jednou ze základních a nejpoužívanějších metod pro stanovení TAA. Principem metody je zhášení uměle připraveného radikálu (2,2.-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát) (ABTS•+) antioxidanty obsaženými ve vzorku. Metoda se dá využít dvěma způsoby. Prvním způsobem je, že se k již připravenému radikálu (ABTS•+) přidává antioxidant. Při druhém způsobu se antioxidant přidává přímo do reakční směsi, která slouží pro generaci radikálu. V průběhu experimentu se porovnává zpomalování tvorby radikálu a pomocí spektrofotometrie se sleduje zhášení radikálu antioxidační látkou. U této metody se využívá troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2- karboxylová kyselina) s jehož antioxidační kapacitou je poté srovnávána výsledná antioxidační kapacita daného vzorku. [20,22]

##### 3.1.3 Metoda FRAP (FerricReducing Antioxidant Power)

Jedná se o spektrofotometrickou metodu založenou na schopnosti antioxidantů obsažených ve vzorku redukovat železité komplexy na železnaté, za vzniku komplexu modro-fialového zbarvení. Intenzita změny zbarvení reakční směsi, stanovovaná spektrofotometricky, je poté úměrná obsahu antioxidantů ve vzorku. [2,23]

##### 3.1.4 Metoda DPPH (difenyl pikrylhydrazyl)

Metoda je založena na reakci sledované antioxidační látky s difenylpikrylhydrazylem. Při této metodě se reaktivní radikál redukuje za vzniku difenylpikrylhydrazinu. Nejčastěji je tato reakce sledována spektrofotometricky. [20]

### 3.2 Stanovení TAC elektronovou paramagnetickou rezonancí (EPR)

Metoda je založena na absorpci mikrovlnného záření nepárovými elektrony a radikály v silném magnetickém poli. Touto metodou je možné studovat jak volné radikály různého typu, tak i paramagnetické komplexy nebo excitované stavy. Do zkoumaného vzorku je přidán značený radikál a je sledován jeho úbytek vlivem působení antioxidantů obsažených ve vzorku. [24]

### 3.3 Stanovení TAC elektrochemickými metodami

Elektrochemické metody jsou vhodnou alternativou pro stanovení nejrůznějších antioxidantů s redoxními vlastnostmi. Principem metody je sledování proudové odezvy redoxních reakcí antioxidantů v závislosti na vkládaném napětí na pracovní elektrodu (senzor). Proudová odezva senzoru je potom úměrná úhrnné koncentraci antioxidantů ve vzorku.

Dříve byly pro elektrochemické stanovení zaváděny nejrůznější polarografické metody. V dnešní době jsou metody založené především na cyklické voltametii nebo amperometrii. Těmito metodami mohou být stanovovány antioxidanty obsažené v ovoci, zelenině, v pivu a vínu, v ovocných šťávách, extraktech rostlin apod.[2,25]

#### 3.3.1 HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)s elektrochemickou detekcí

Metoda sestává ze dvou základních fází. První fází je separace jednotlivých antioxidantů a jiných látek pomocí HPLC na koloně. Druhou fází je nenásledná postupná detekce (kvantifikace) látek s využitím elektrochemické detekce.

Elektrochemická detekce je založena na oxidaci/redukci látky pod určitým potenciálem, který je vložen na pracovní elektrodu detektoru. Pokud je látka při tomto potenciálu oxidována či redukována projeví se to změnou proudové odezvy. Při použití metody HPLC s amperometrickým nebo coulometrickým detektorem, lze elektroaktivní látky, v našem případě antioxidanty, přesně a citlivě detekovat. [2,25]

## 4 PIVO

Pro účely vyhlášky je pivo definováno jako pěnivý nápoj, vyrobený zkvašením mladiny připravené ze sladu, vody, neupraveného chmele, upraveného chmele nebo chmelových produktů, kdy při kvasném procesu v pivu vzniká alkohol (etylalkohol) a oxid uhličitý, tvořící rozsáhlou a významnou skupinou alkoholických nápojů. Nalézt tu můžeme pivo stolní, výčepní, typu ležák, speciální aj., řazené do skupin podle obsahu alkoholu. [26]

Pivo je velmi oblíbeným nápojem již mnohá staletí, obsahuje látky důležité pro tělo : vodu, bílkoviny, sacharidy, biogenní prvky , ionty a vitamíny. Z řady vitamínů tu můžeme nalézt niacin, pyridoxin, kyselinu pantotenovou, riboflavin aj. Tyto prospěšné látky obsahuje pivo z použitých surovin, mezi které patří sladovnický ječmen, chmel, voda, pivovarské kvasinky a doplňující látky (surogáty).

Sladovnický ječmen je ve sladovnách zpracováván na slad. Patří k nejdůležitější surovině pro výrobu piva. Získá se naklícením a hvozděním sladovnického ječmene. Získaný ječný slad je zdrojem největšího podílu polyfenolických látek obsažených v pivu (přibližně 80%).

Chmel je další nepostradatelnou složkou pro výrobu piva, používaný buď v granulované formě, nebo ve formě listové. Chmel obsahuje cenné složky, mezi které patří pryskyřice ( $\alpha$  – hořké kyseliny,  $\beta$  – hořké kyseliny), silice a polyfenolické látky dodávající pivu charakteristickou hořkou chuť a zaujímají zbylých 20% obsahu polyfenolických látek.

Voda je nejvíce zastoupenou surovinou při výrobě piva. Její obsah v pivu je přibližně 85 - 90% . Pro tak vysoký obsah vody, nezpůsobuje pití piva dehydrataci, jako jiné alkoholické nápoje.

Zmíněné polyfenolické látky obsažené v pivu z ječmene a chmele mají pro konzumenty jak antioxidační, antimikrobiální, antikarcinogenní účinky ale dokáží regulovat krevní tlak a krevní glukózu. Z potravinářského hlediska přispívají k stabilitě a trvanlivost piva a podílejí se i na jeho sensorických vlastnostech - hořká chuť, která je způsobena převážně tříslovinami, zaujímající až 30% všech polyfenolů obsažených v pivu.

Přes všechny tyto kladné účinky piva musíme mít na paměti, že všeho moc škodí, ale v rozumné míře je konzumace více než prospěšná. [27,28,29]

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**



## 5 CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

### 5.1 Použité chemikálie

- Chlorid sodný - NaCl - - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Německo
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát) - Pentachemicals s.r.o
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  (hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát) - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Německo
- Kyselina gallová - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Německo
- Kyselina askorbová - Lach-Ners.r.o.
- Etanol–Verkon.s.r.o
- Dichlormethan– Pentachemicals s.r.o.
- Vzorky pív – obchodní síť
- Epoxid Havel Composites– HavelComposites
- Stříbrné vodivé epoxidové lepidlo – Epotek H20E, EpoxyTechnology– Epoteks.r.o
- Uhlíková vlákna– Fiberpreg CZ a.s.

Tabulka 1: Vzorčky použitých piv

Značka piva	Stupňovitost piva	Obsah alkoholu	pH
BudweiserBudvar	12	5,0%	4,8
Gambrinus	10	4,3%	4,9
Heineken	12	5,0%	4,7
Holba	12	5,2%	4,9
Krušovice	10	4,2%	5,1
Litovel	10	4,2%	4,8
PilsnerUrquell	12	4,4%	5,1
Radegast	12	5,0%	4,7
Starobrno	11	4,7%	4,7
Svijany	11	4,8%	4,8
Velkopopovický kozel	11	4,6%	4,6
Vyškov	12	5,5%	4,9
Zubr	10	4,1%	5,1

## 5.2 Přístrojové vybavení

- Potenciostat Lchem
- Potenciostat CHI instruments
- Infúzní dávkovač –HPLC pumpa Agilent
- Home made autosampler – námi vyrobený automatický dávkovač

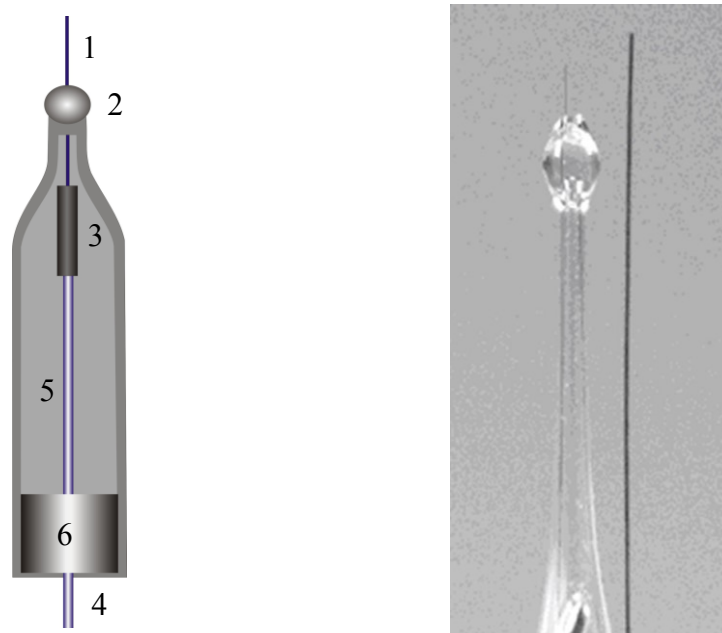
## 6 VÝROBA A AKTIVACE MIKROELEKTROD – SENZORŮ

### 6.1 Příprava mikroelektrody

Mikroelektroda je elektroda, jejíž aktivní část je velmi malých rozměrů v řádech jednotek až desítek  $\mu\text{m}$ . Mikrosenzor je tvořen uhlíkovým vláknem nalepeným pomocí vodivého stříbrného lepidla na měděném vodiči, kdy celá tato část je vložena do skleněné kapiláry a následně zatěsněna epoxidem.

Pro získání co nejlepšího vodivého povrchu a tím dobrého spojení měděného drátku s uhlíkovým vláknem je důležitým krokem správné očištění drátku. Při čištění drátku dochází k redukci oxidů mědi na nulamocnou měď. Takového očištění bylo dosaženo rozžhavením měďného drátku nad kahanem a ponořením do etanolu. Očištěný měděný drátek a uhlíkové vlákno o požadované délce bylo k sobě přilepeno stříbrným vodivým epoxidovým lepidlem. Pro ztuhnutí a vytvrzení lepidla byl drátek s vláknem ponechán v sušárně po dobu 40 - 45 minut při teplotě přibližně  $135^{\circ}\text{C}$ . Po vytvrzení stříbrného epoxidu a vychladnutí na pokojovou teplotu byl drátek vložen do skleněné kapiláry, ze které vyčnívala asi desetimilimetrová část uhlíkového vlákna. Skleněná kapilára byla poté utěsněna pomocí epoxidové pryskyřice z obou stran. Na spodní stranu, ze které vyčnívalo vlákno, bylo zapotřebí velké opatrnosti a to z důvodu, aby nebylo uhlíkové vlákno potřísněno epoxidem a tím nedošlo ke znehodnocení elektroaktivní plochy.

Na obrázku č.10. a) je schéma uhlíkové mikroelektrody, kdy 1 je uhlíkové vlákno o tloušťce  $8\ \mu\text{m}$ , 2 – kapka epoxidu utěsňující skleněnou kapiláru (5) na straně vlákna, 3 – stříbrný vodivý epoxid – spoj uhlíkového vlákna s měděným vodičem (4), 6 – epoxid utěsňující skleněnou kapiláru. Na obrázku č.10. b) je ukázáno srovnání uhlíkové mikroelektrody (vlevo) s lidským vlasem (vpravo). Ze snímku je patrná malá tloušťka uhlíkového vlákna.



Obr. 10: a) schéma uhlíkové mikroelektrody, b) srovnání uhlíkové mikroelektrody s lidským vlasem. [31]

## 6.2 Předúprava elektrody – očištění a aktivace elektrody

Před samotným měřením je důležité elektrodu očistit, zlepšit vodivost měděného drátku a elektrodu aktivovat. Nejdříve byla elektroda povrchově očištěna pomocí sonifikace v dichlormethanu po dobu asi půl minuty. Pro zlepšení vodivosti povrchu měděného drátku vyčnívajícího z elektrody, byla pomocí ostrého kovového předmětu (nůžky, skalpel, špachtle) z drátku odškrábnuta povrchová vrstva oxidu. Takto očištěná elektroda byla ponořena do roztoku elektrolytu – 1% roztoku NaCl.

Celý proces aktivace elektrody probíhal v tříelektrodovém zapojení. Čištěná elektroda s uhlíkovým vláknem byla použita jako pracovní elektroda, referentní elektrodou byla v tomto případě Ag/AgCl elektroda (Ag/AgCl – nasycený roztok KCl) a platinový drátek byl elektrodou pomocnou. Pracovní mikroelektroda byla k systému připojena až po 5-ti minutovém namočení v roztoku elektrolytu (roztoku NaCl), a to z důvodu mírné polarizace. Celková aktivace elektrody zahrnovala 3 kroky. V prvním kroku byl na elektrodu vklá-

dán po dobu 20-ti sekund proměnný potenciál se sinusovým průběhem o frekvenci 50 Hz od 0 do 2,9 V, druhý krok zahrnoval elektro redukci po dobu 5-ti sekund při konstantním potenciálu  $-0,8$  V a nakonec byla elektroda vystavena po dobu 5-ti sekund konstantním potenciálu 1,5 V. Po skončení byla elektroda odpojena od zdroje, aby nedošlo k její polarizaci a byla opláchnuta destilovanou vodou. [31]

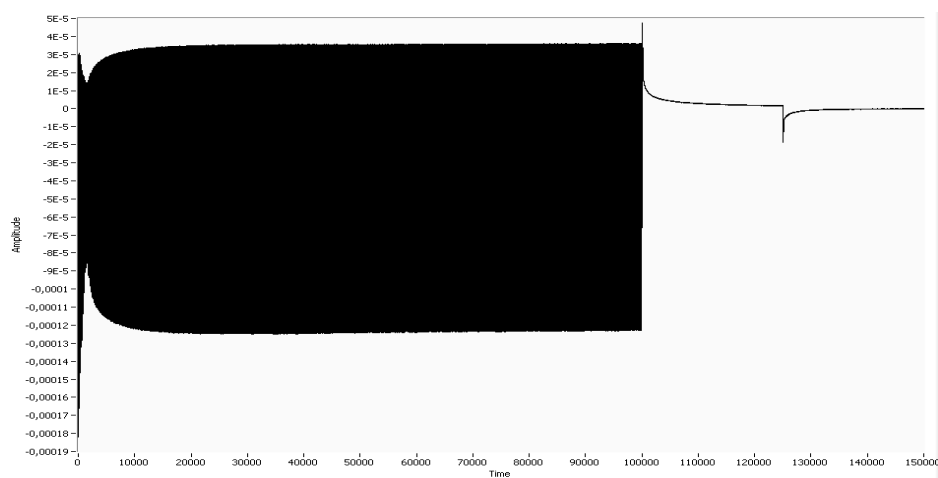


Obr. 11: Potenciostat L-chem s tříelektrodovým zapojením pro aktivaci mikrosenzoru.

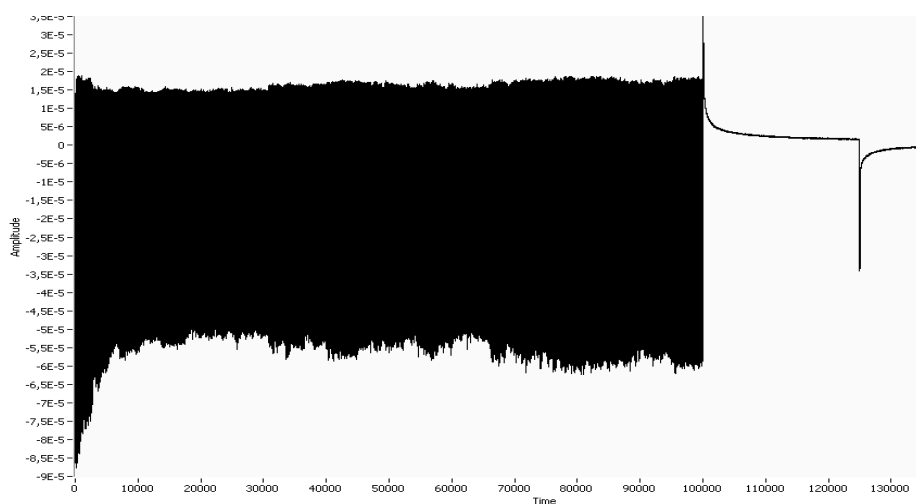
Během procesu očištění a aktivace dochází k tvorbě uhlíkových a kyslíkových funkčních skupin na povrchu elektrody, ale i k odstranění svrchní části vlákna vlivem vysokého anodického potenciálu.

Samotný proces neslouží pouze k očištění a aktivaci mikroelektrody, ale má zároveň diagnostickou funkci. Z proudového záznamu aktivace je zjištěno, jestli byla elektroda správně očištěna a aktivována a zda je vůbec funkční. Pokud došlo ke správné aktivaci mikrosenzoru a elektroda se může použít, má proudový záznam typický tvar, jak je ukázáno na obr. 12 a). Tudíž dle tvaru proudového záznamu lze rozhodnout, zda bude elektroda použita pro další měření.

Pokud by elektroda nebyla správně očištěna a aktivována, byl by povrch vlákna oxidován vlivem vzdušného kyslíku a byl by méně aktivní či plně inaktivní. Aktivační proces odhalí i elektrody se špatným kontaktem či elektrody neutěsněné. Příklad aktivačního záznamu nefunkční elektrody je na obr. 12 b).

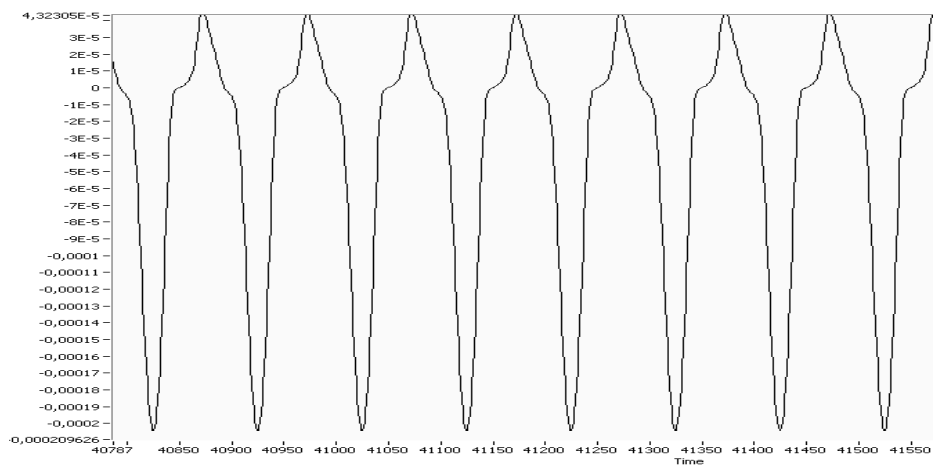


Obr.12: a) Proudový záznam aktivace funkční elektrody



Obr. 12: b) Proudový záznam aktivace elektrody nevhodné pro další použití

Proudový záznam aktivace elektrody je tvořen mnoha slitými křivkami průběhu proudu při aktivaci – vliv vysoké frekvence napětí při aktivaci, jak je ukázáno na obrázku 12 c).

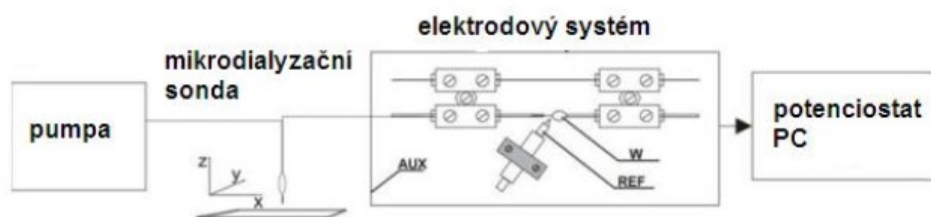


Obr. 12 c): Zvětšené křivky z obrázku 12 a) ve kterém jsou křivky slity dohromady a tvoří černou plochu.

## 7 MĚŘÍCÍ SYSTÉM

### 7.1 Popis systému

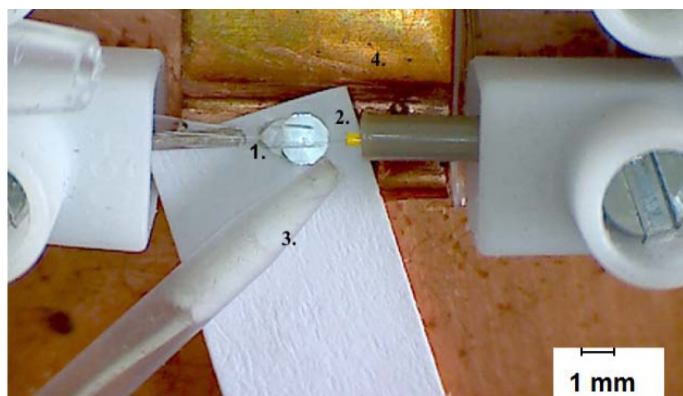
Měřicí systém je založen na kombinaci mikrodialýzy a elektrochemického detekčního systému. Pomocí vysokotlaké pumpy, v našem případě starší HPLC pumpy, je pumpována přes mikrodialyzační sondu mobilní fáze, za kterou byl zvolen PBS pufr o  $\text{pH}=7,4$ . Membrána mikrodialyzační sondy je polopropustná pro nízkomolekulární látky obsažené ve vzorku (pivo) a ty jsou vedené přes elektrodový systém k potenciostatu. Elektrochemický detektor, s pracovní elektrodou tvořenou výše popsanou mikroelektrodou (mikrosenzorem), je připojen na výstupu z mikrodialyzační sondy. Potenciostat připojený k detektoru, zajišťuje elektrodě potřebné konstantní napětí a snímá proud. Velikost proudu je přímo úměrná koncentraci snadno oxidovatelných látek v okolí aktivní části elektrody – uhlíkové vlákno. K řízení chodu systému slouží počítač s vyhodnocovacím programem založeným na platformě LabView. Na obrázku 13 je schéma uspořádání systému.



Obr. 13: Schéma uspořádání mikrodialyzačního systému s elektrochemickým detektorem.

Samotný detektor je ukázán na obrázku 14. Číslem 1 je označena pracovní elektroda (výše popisovaná mikroelektroda), číslem 2 peeková kapilára, do které je vloženo vlákno elektrody (aktivní plocha mikrosenzoru) ze strany jedné, ze strany druhé je přiveden vývod mikrodialyzační sondy. Číslem 3 je označena referenční elektroda ( $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ), měděná deska sloužící jako podklad a zároveň jako elektroda pomocná je označena číslem 4.





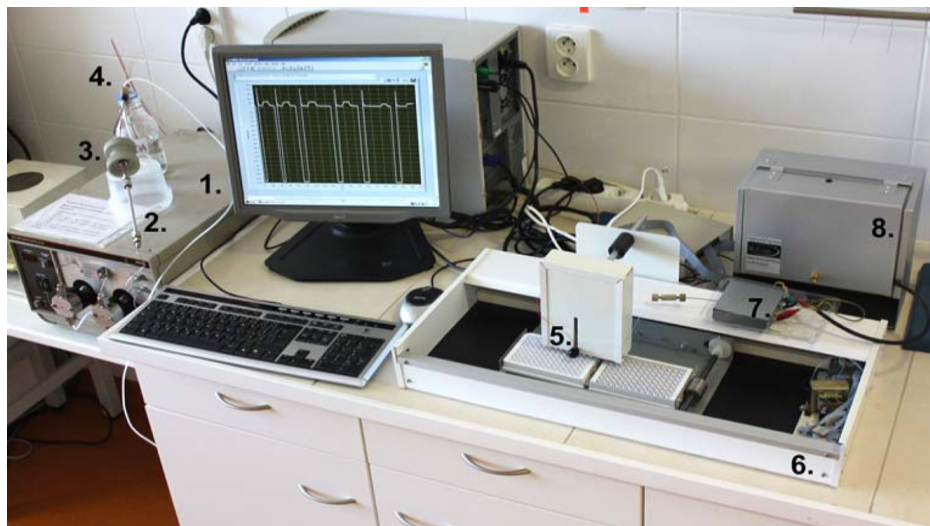
Obr. 14.: Otevřený systém elektrochemického detektoru

Před začátkem každého měření byl systém promyt pomocí roztoku etanolu a následně zavodněn mobilní fází. Během zavodňování byla k systému připojena sonda s mikrodialyzační membránou, ta byla ponořena do roztoku PBS. Průtok mobilní fáze a tím i zavodňování a hydratace mikrodialyzační sondy byl nastaven na 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  a trval přibližně dvacet až třicet minut. Experimenty bylo zjištěno, že předem hydratovaná sonda zaručuje přesnější, reprodukovatelnější a stabilnější výsledky, proto byla hydratace sondy prováděna po dobu minimálně dvacet minut až půl hodiny v roztoku PBS pufru o pH 7,4.

Za nejvhodnější pracovní potenciál byl vybrán na základě zkušeností z literatury konstantní potenciál o hodnotě 800 mV, 1000 mV a 1200 mV vs. Ag/AgCl.

Součástí celého zařízení je i home-made autosampler se dvěma mikrotitračními destičkami, který zajišťoval automatické měření v rozsahu až 184 vzorků během jednoho experimentu. Autosampler byl ovládán, pro tento účel naprogramovaným softwarem na platformě LabView. Celé uspořádání systému je na obrázku 15. Pod číslem 1 je HPLC pumpa, 2 a 3 – membránový tlumič pulsů, 4 – zásobní lahev s pufrům, 5 – mikrodialyzační sonda, 6 – autosampler, 7 – detektor v kovové krabici (krabice funguje jako Faradayova klec), 8 – potenciostat.

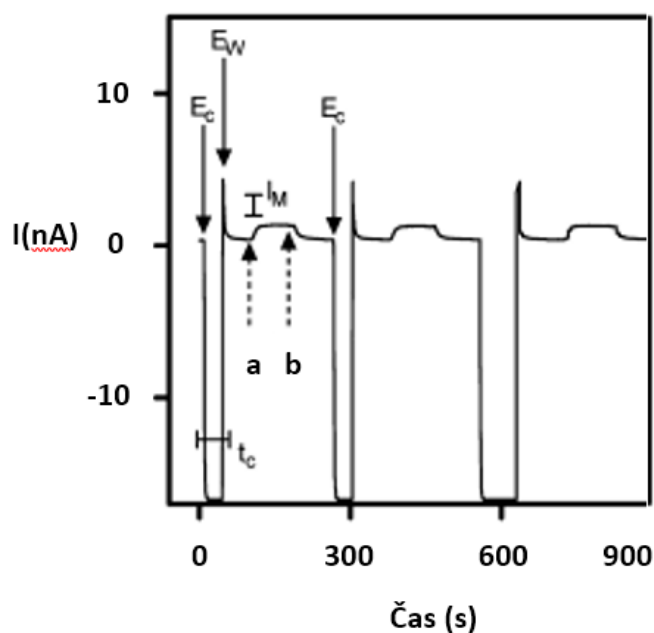
Po skončení měření byl celý systém promyt mobilní fází po dobu půl hodiny a poté 10 min vodným roztokem etanolu (40% v/v).



Obr. 15: Uspořádání použitého měřicího systému. 1. HPLC pumpa, 2., 3. Membránový tlumič pulsů, 4. Zásobní lahev s pufrem, 5. Mikrodialyzační sonda, 6. Autosampler, 7. Detektor v kovové krabici (krabička funguje jako Faradayova klec), 8. Potenciostat

## 7.2 Regenerace sondy

Z literatury je známo, že látky obsažené v pivě se během měření nanášejí na povrch pracovní elektrody, kde vytvářejí vrstvu nánosů a tím dochází k inaktivaci (částečné či úplné) elektrody. Vhodným způsobem jak zabránit inaktivaci je regenerace elektrody. Pro regeneraci stačí využít krátkodobého potenciálového pulzu, který je identický s druhým krokem očištění a aktivace elektrody. Na obrázku č.16 je ukázka záznamu experimentu, který sestává z čistícího pulsu, ustálení základní proudové linie, měření analytu, opětovného ustálení základní proudové linie a čistícího pulsu, to vše pro tři vzorky piva. Měření analytu předchází ponoření mikrodialyzační sondy do jamky mikrotitrační destičky, kde je napipetován zkoumaný vzorek piva (ponoření sondy do jamky je provedeno v čase odpovídajícím několika sekund před bodem *a* v grafu – před samotnou odezvou na analyt, analyt musí doputovat k senzoru vlivem proudu pufru).



Obr. 16.: Záznam experimentu:  $E_c$  -vložení čistícího pulzu,  $t_c$ - čas čistícího pulzu,  $E_w$  - začátek vložení pracovního potenciálu 800 mV vs. Ag/AgCl a zasunutí mikrodialyzační sondy do jamky.

### 7.3 Měření s mikroelektrodami

Do mikrotitrační destičky o objemu jedné jamky 350  $\mu\text{l}$  byly nepipetovány jednotlivé vzorky standardů případně vzorků. Vstupní mikrodialyzační sondou ponořenou v analyzovaném vzorku proudil PBS pufr, přes polopropustnou membránu byly do pufru vnášeny nízkomolekulární látky působící TAC a spolu s PBS pufrem byly unášeny až k detekčnímu systému. Po určitém čase začaly membránou sondy pronikat nízkomolekulární látky, které byly unášeny až k detektoru.

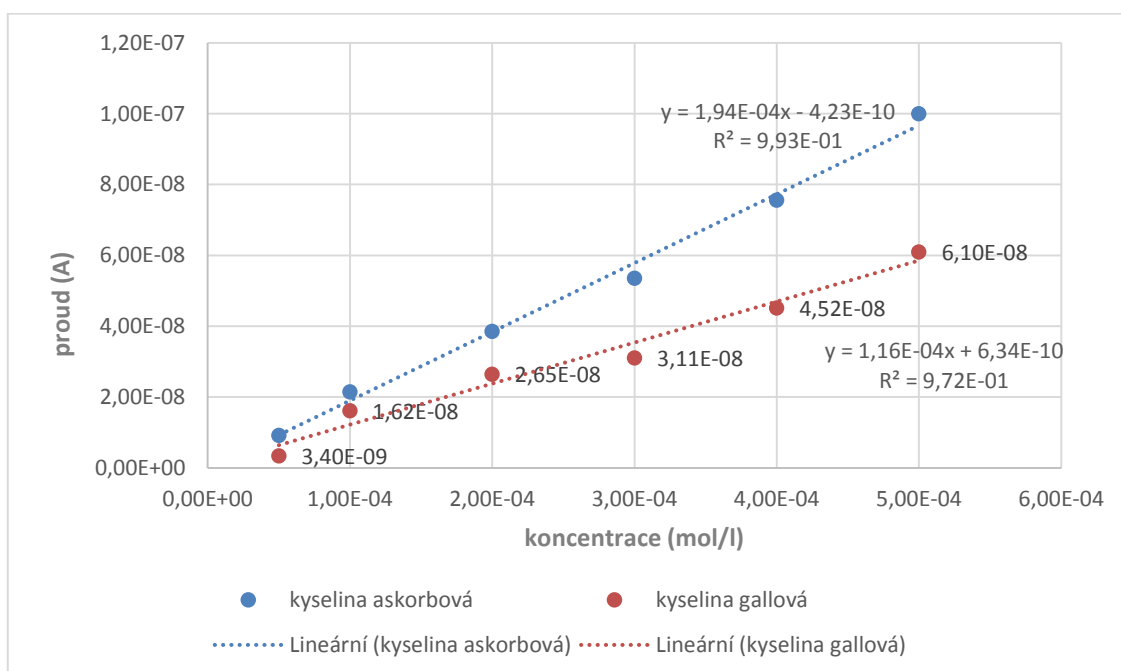
### 7.4 Kalibrace na kyselinu askorbovou a gallovou na mikroelektrodě

Aby bylo možno z proudové odezvy analytu stanovit jeho koncentraci, byla proměřena kalibrační křivka u kyseliny askorbové a gallové v rozmezí  $5 \cdot 10^{-5}$  -  $5 \cdot 10^{-4}$  mmol/l (u dvou běžných vzorových a dostupných antioxidantů). Jednotlivé body v grafu č. 1. jsou průměrné hodnoty 15-ti měření pro každou koncentraci. Z rovnice regrese křivky kalibrace na kyselinu askorbovou resp. gallovou a proudové odezvy analytu byla poté vypočítána koncentrace látek, majících majoritní podíl na celkové antioxidační kapacitě vzorku, tedy celková antioxidační kapacita. Kalibrační křivky byly naměřeny při konstantním vložení potenciálu 1000 mV vs. Ag/AgCl.

## 8 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 8.1 Kalibrace na kyselinu askorbovou a gallovou

Kalibrační křivky pro kyselinu askorbovou a gallovou byly naměřeny dle popisu v kapitole 7.4. Kalibrační křivky a příslušné rovnice regrese nezbytné pro výpočet TAC vzorků piv jsou uvedeny v grafu č.1.



Graf č.1.: Kalibrační křivka TAC na kyselinu askorbovou a gallovou

Rovnice regrese pro kyselinu askorbovou:  $y = 1,94 \cdot 10^{-4} x - 4,23 \cdot 10^{-10}$

Rovnice regrese pro kyselinu gallovou:  $y = 1,16 \cdot 10^{-4} x + 6,34 \cdot 10^{-10}$

Kalibrační křivka TAC na kyselinu askorbovou a gallovou je díky využití autosampleru (každý bod byl vytvořen jako aritmetický průměr minimálně 15-ti naměřených hodnot, čímž došlo ke značné eliminaci náhodné chyby) dostatečně přesná a rovnice regrese může být využita pro přepočet TAC měřených vzorků, neboť koncentrační závislost je téměř lineární v celém měřeném rozsahu.

## 8.2 TAC vzorků piv

Vzorky piv o různé stupňovitosti byly naředěny pomocí fosfátového pufru (PBS) v poměru 1:4 a nepipetovány do mikrotitračních jamiček o objemu 350 $\mu$ l.

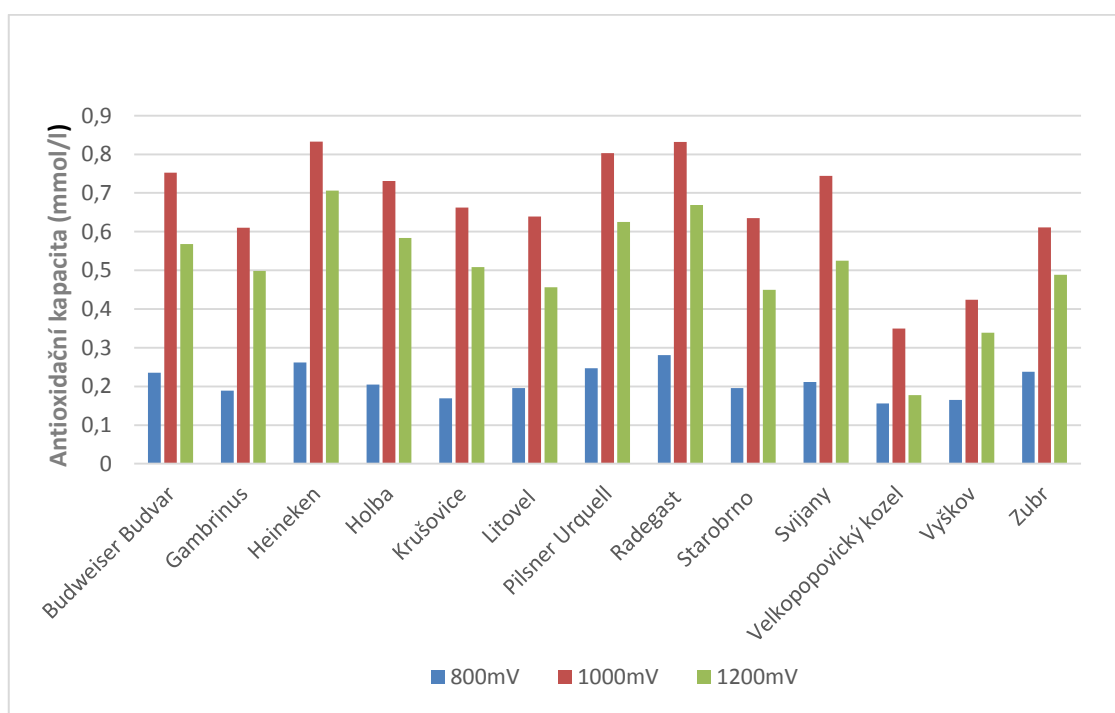
Každý vzorek piva byl na přístroji změřen minimálně 15x pro každou hodnotu konstantního potenciálu, celkově pro tři konstantní potenciály. Hodnoty naměřeného proudu byly poté přepočítány na celkovou koncentraci antioxidantů ve vzorku (TAC, TAA) na kalibrační křivku pro kyselinu askorbovou a kyselinu gallovou a hodnota všech 15 výsledků byla poté zprůměrována. Získané zprůměrované výsledky z měření jsou uvedeny v tabulce 2 a 3, graficky je závislost TAC na typu vzorku piva znázorněna v grafu č. 2 a č. 3.

Tabulka č.2.: TAC vybraných vzorků piv – kalibrace na kyselinu askorbovou

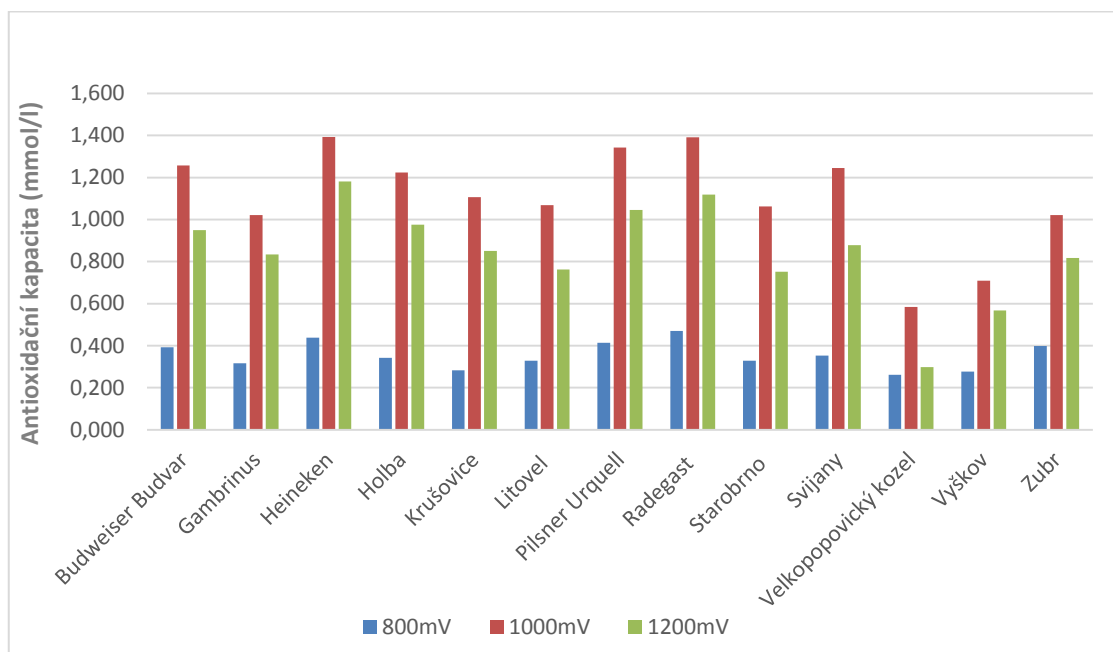
Pivo	stupňů	pH	Celková antioxidační kapacita [mmol/l]		
			800mV	1000mV	1200mV
Budweiser Budvar	12	4,8	0,235	0,752	0,568
Gambrinus	10	4,9	0,189	0,610	0,499
Heineken	12	4,7	0,262	0,833	0,706
Holba	12	4,9	0,205	0,731	0,583
Krušovice	10	5,1	0,169	0,662	0,509
Litovel	10	4,8	0,196	0,639	0,456
PilsnerUrquell	12	5,1	0,247	0,803	0,625
Radegast	12	4,7	0,281	0,832	0,669
Starobrno	11	4,7	0,196	0,635	0,450
Svijany	11	4,8	0,211	0,744	0,525
Velkopopov. kozel	11	4,6	0,156	0,350	0,178
Vyškov	12	4,9	0,165	0,424	0,339
Zubr	10	5,1	0,238	0,611	0,489

Tabulka č.3.: TAC vybraných vzorků piv – kalibrace na kyselinu gallovou

Pivo	stupňů	pH	Celková antioxidační kapacita [mmol/l]		
			800mV	1000mV	1200mV
BudweiserBudvar	12	4,8	0,393	1,258	0,950
Gambrinus	10	4,9	0,316	1,021	0,834
Heineken	12	4,7	0,438	1,392	1,181
Holba	12	4,9	0,343	1,223	0,976
Krušovice	10	5,1	0,283	1,107	0,851
Litovel	10	4,8	0,328	1,069	0,763
PilsnerUrquell	12	5,1	0,413	1,343	1,045
Radegast	12	4,7	0,470	1,392	1,119
Starobrno	11	4,7	0,328	1,062	0,752
Svijany	11	4,8	0,353	1,245	0,878
Velkopopov. kozel	11	4,6	0,261	0,585	0,297
Vyškov	12	4,9	0,276	0,708	0,567
Zubr	10	5,1	0,398	1,022	0,818



Graf č.2: Závíslost TAC na typu vzorku piva - kalibrace na kyselinu askorbovou



Graf č. 3: Závislost TAC na typu vzorku piva - kalibrace na kyselinu gallovou

Z prezentovaných výsledků je patrný rozdíl závislosti TAC na vloženém konstantním potenciálu při elektrochemické detekci. Největší proudovou odezvu snadno oxidovatelné látky tvořící TAC vykazují při potenciálu 1000mV, což potvrzují nejen zkušenosti z literatury, ale také samotné cyklické voltamogramy látek podílejících se na TAC, kdy maximální intenzita voltametrické křivky (nejvyšší proudová odezva) je právě při 1000 mV vs. Ag/AgCl. Rozdílné hodnoty TAC pro stejné vzorky vycházejí z rozdílné proudové odezvy a použití rovnice regrese měřené pro standardy (kyselina askorbová a gallová) pouze při konstantním potenciálu 1000 mV vs. Ag/AgCl. Experimentem bylo prokázáno, že i při použití kalibrace při jiném potenciálu zůstávají poměry TAC shodné.

Dále byla srovnávána i TAC v závislosti na množství alkoholu ve vzorcích piv. Experimenty a srovnáním naměřených hodnot bylo prokázáno, že obsah alkoholu u vzorků o stupňovitosti 10°, 11°, 12° nemá významný vliv na antioxidační kapacitu. Což opět potvrdilo poznatky z literatury.

Námi získané výsledky měření pomocí mikrodialýzy kombinované s amperometricou detekcí byly porovnávány s výsledky publikovanými v literatuře získanými s běžně používanými metodami (ORAC, TRAP, EPR, aj.). Naměřené hodnoty odpovídaly hodnotám získaným běžně používanými metodami (ORAC, TRAP, EPR, aj.).

Při srovnání celkové antioxidační kapacity mezi jednotlivými druhy pív je patrné, že jednotlivé výrobky se příliš, z pohledu TAC, neliší, s výjimkou vzorku Vyškov a Velkopopovický kozel, nicméně i v případě těchto dvou vzorků není rozdíl nikterak velký.

Vzhledem k faktu, že výrobci neuvádí TAC na výrobcích a ani nejsou tyto informace veřejně dostupné, nebylo možno provést porovnání a korelaci výsledků u konkrétního výrobku, nicméně jak již bylo výše zmíněno, výsledky námi získané korespondují s výsledky z literatury pro obdobné vzorky nápojů.

Výsledky TAC získané pro výše uvedené vzorky pív byly porovnány s v literatuře dostupnými výsledky TAC pro jiné nápoje – víno, džusy, ovocné limonády, kávu a čaj. Z porovnání bylo prokázáno, že pivo patří mezi nápoje s nejvyšším obsahem antioxidantů vůbec, společně s červeným vínem.

Naměřené výsledky ověřili funkčnost námi zkonstruovaného systému a ověřili i užitečnost, funkčnost a časovou úsporu při použití autosampleru.



## ZÁVĚR

Volné radikály působí negativně na lidský organismus a zdraví člověka obecně, způsobují nebo se podílejí na mnoha civilizačních chorobách. Volné radikály také působí na naše životní prostředí a na lidské potraviny, ve kterých mají za následek vznik či urychlení degradačních procesů. Řada volných radikálů je v organismu i v přírodě produkována samovolně, ale na velké části produkce se aktivně podílejí lidé sami. Například do organismu si volné radikály vnášíme sami kouřením, nadbytkem konzumovaných tuků, stresem apod.. Je tedy potřeba se před účinky volných radikálů chránit. První možností je eliminovat kontakt se zdroji volných radikálů, což ovšem není vždy absolutně možné. Druhou možností je využití látek chránících nás před působením volných radikálů, tzv. antioxidantů. Mezi tyto látky s antioxidačními účinky patří vitamíny a minerály obsažené v ovoci a zelenině, polyfenolické látky různé povahy nacházející se v obilovinách či skořápkových plodech. K důležitým zdrojům příjmu antioxidantů patří nápoje, cennými zdroji jsou ovocné a zeleninové šťávy, zelený nebo černý čaj, ale i nápoje s nižším obsahem alkoholu, jako jsou pivo a víno, do kterých se dostávají antioxidanty z výchozích surovin při zpracování. Látky s antioxidačním účinkem nejsou jen prospěšné pro organismus konzumentů, ale také mohou chránit potraviny před vnějšími vlivy, prodlužují stabilitu a trvanlivost výrobků.

Jak již bylo výše uvedeno, potraviny s antioxidačními účinky v sobě neobsahují nikdy jen jeden antioxidant, ale soubor více látek navzájem se doplňujících. Pro porovnání obsahu těchto pozitivních látek v potravinách byl zaveden pojem celková antioxidační kapacita (aktivita)

Cílem předkládané práce bylo otestovat zařízení pro elektrochemické stanovení celkové antioxidační kapacity nápojů a zautomatizovat měření pomocí vyrobeného (homemade) autosampleru. Testování zařízení mělo být provedeno na vybrané skupině nápojů, kdy jako velice zajímavé a poměrně složité matrice byly vybrány vzorky pív.

Naměřené výsledky ověřili funkčnost námi zkonstruovaného systému a ověřili i užitečnost, funkčnost a časovou úsporu při použití autosampleru. Získané výsledky TAC pro vzorky pív byly porovnány s v literatuře dostupnými výsledky TAC pro jiné vzorky pív, ale i jiné nápoje – víno, džusy, ovocné limonády, kávu a čaj. Z porovnání bylo prokázáno, že výsledky námi získané velice dobře korespondují s výsledky v literatuře a že pivo patří mezi nápoje s nejvyšším obsahem antioxidantů vůbec.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] KOPPENOL, W. H. Names for inorganic radicals (IUPAC Recommendations 2000), *Pure Appl. Chem.*, vol. 72, 2000, no. 3, 437–446.
- [2] PAULOVÁ, H. BOCHOŘAKOVA, H. TÁBORSKÁ, E.: Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro, *Chemické listy*, 2004, 98, 174–179.
- [3] VALKO, M. LEIBFRITZ, J. MONCOL, M. T. T. CRONIN, M. MAZUR, M. and TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 39, Jan. 2007, no. 1, pp. 44–84.
- [4] BARBUSINSKI, K.: Fenton reaction – controversy concerning the chemistry. *Ecological Chemistry and Engineering*, Vol. 16, 2009.No.3, 347-357.
- [5] PATEL, R. P. MCANDREW, J. SELLA, H. WHITE, CR. et al. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1999, 1411(2-3), 385-400, ISSN 0005 - 2728.
- [6] VALAVANIDIS, A. VLAHOGIANNI, T. DASSENAKIS, M. SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2006, 64(2), 178-189, ISSN 0147 - 6513.
- [7] MILLER, J.K. BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E. a MADSEN, F.C. Oxidative Stress, Antioxidants and Animal Function. *Journal of Dairy Science*, 1993, 76(9), 2812-2823, ISSN 0022 - 0302.
- [8] ANISHLIEVA, N.V. MARINOVA, E. a POKORNÝ, J. Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2006, 108(9), 776-793, ISSN 1438-7697.
- [9] PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 2007, 40(1), 1-11, ISSN 0023 - 6438.
- [10] LE ROUX, A. KUZMANOVSKI, I. HABRANT, D. et al. Design and Synthesis of New Antioxidants Predicted by the Model Developed on a Set of Pulvinic Acid Derivatives. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2011, 51(12), 3050-3059, ISSN 1549-9596.

- [11] RACEK, J. Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění. Galén, Praha 2003, 90 s.
- [12] HERTOGE, M.G.L. FESKENS, E.J.M. KROMHOUT, D. HOLLMAN, P.C.H. a KATAN, M.B. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet*, 1993, 342(8878), 1007-1011, ISSN 0140-6736.
- [13] PADAYATTY, S. KATZ, J.A. WANG, Y. et al. Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *Journal of the American College of Nutrition*, 2003, 22(1), 18-35, ISSN 0731-5724.
- [14] BEYER, R.E. The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: Interaction with vitamin E and coenzyme Q. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 1994, 26(4), 349-358, ISSN 0145-479.
- [15] BALASUNDRAM, N. SUNDARAM, K. a SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food Chemistry*. 2006, 99(1), 191-203, ISSN 0308-8146.
- [16] VINSON, A. DABBAGH, A. SERRY, M. M. a JANG, J.. Plant Flavonoids, Especially Tea Flavonols are Powerful Antioxidants Using an In Vitro Oxidation Model for Heart Disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, 43(11), 2800-2802, ISSN 0021-8561.
- [17] GIBSON, G. R. 2000: *Functional foods : Concept to Product*. 1. vyd. Cambridge: Woodhead Publishing, 17 s, ISBN 1-85573-503-2.
- [18] SLANINA, J. TÁBORSKÁ, E. Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka, *Chemické listy*, 2004, 98, 239 – 245.
- [19] HARMATHA, J. Strukturní bohatství a biologický význam lignanů a jim příbuzných rostlinných propanoidů, *Chemické listy*, 2005, 9, 622 - 632.
- [20] DUDONNÉ, S. VITRAC, X. COUTIÈRE, P. WOILLET, M. MÉRILLON, J. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(5), 1768-1774, ISSN 0021-8561.

- [21] HAMPSCH-WOODILL, B. a PRIOR, R. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(10), 4619-4626, ISSN 0021 - 8561.
- [22] PELLEGRINI, N. PROTEGGENTE, A. PANNALA, A. YANG, M. a RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* . 1999, 26(9-10), 1231-1237, ISSN 0891 - 5849.
- [23] BENZIE, Iris F.F. a STRAIN, J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 1996, 239(1), 70-76, ISSN 0003 - 2697.
- [24] ZEMAN, M. STOPKA, P. VECKA, M. ŽÁK, A. et.al. Stanovení hydroxylových a nitroxydových radikálů u deprese a hyperlipidémie elektronovou paramagnetickou rezonancí. *Chemické listy*, 2009, 103, 667 – 671.
- [25] WANG, Joseph. *Analytical electrochemistry*. 3rd ed. Hoboken, N.J.: Wiley-VCH, 2006, xvi, 250 s. ISBN 0-471-67879-1
- [26] <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1997-335#oddil3>
- [27] Mikyška, A. Hartman, I. Hašková, D.: Polyfenolové látky a antioxidační vlastnosti odrůd ječmene doporučených pro České pivo. *Kvasný průmysl*. 57, 2011, č. 7–8, s. 182–189.
- [28] TANIGUCHI, Y. YAMADA, M. TANIGUCHI, H. MATSUKURA, Y. SHINDO, K. Chemical Characterization of Beer Aging Products Derived from Hard Resin Components in Hops (*Humulus lupulus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 2015, 63(46), 10181-10191, ISSN 0021-8561.
- [29] <https://kvasnyprumysl.cz/pdfs/kpr/1998/03/02.pdf>
- [30] JAKUBEC, P. BANCIROVA, M. HALOUZKA, V. et al. Electrochemical Sensing of Total Antioxidant Capacity and Polyphenol Content in Wine Samples Using Amperometry Online-Coupled with Microdialysis , 2012. 7836 – 7843.
- [31] BARTOSOVA, Z. RIMAN, D. JAKUBEC, P. HALOUZKA, V. HRBAC. J. a JIROVSKY, D. Electrochemically Pretreated Carbon Microfiber Electrodes as Sensitive HPLC-EC Detectors. *Scientific World Journal*, 2012, 2012.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

DPPH	Difenyl pikrylhydrazyl.
EPR	Electron paramagnetic resonance.
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power.
HPLC	High Performace Liquid Chromatography.
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity.
PBS	Phosphate Buffered Saline.
ROC	Reactive oxygen species.
RSN	Reactive nitrogen species.
TAC	Total antioxidant capacity.
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity.
VR	Volné radikály.

**SEZNAM OBRÁZKŮ A GRAFŮ**

Obrázek č. 1: struktura vitamínu C.....	14
Obrázekč. 2: struktura vitamínu E.....	15
Obrázekč. 3: struktura flavonolu.....	16
Obrázekč. 4: struktura flavanonu.....	17
Obrázek č. 5: struktura flavanolu.....	17
Obrázek č. 6: struktura flavonu.....	17
Obrázek č. 7: struktura isoflavonu.....	18
Obrázek č. 8: struktura anthokyanidinu.....	18
Obrázek č. 9: struktura stibenu.....	18
Obrázek č. 10: schéma uhlíkové mikroelektrody.....	27
Obrázek č. 11: Potenciostat L-chem.....	28
Obrázek č. 12 a) b): proudový záznam.....	29
Obrázek č. 12 c): křivky z proudového záznamu.....	30
Obrázek č. 13: schéma uspořádání mikrodyalizačního systému.....	31
Obrázek č. 14: systém elektrochemického detektoru.....	32
Obrázek č. 15: měřicí systém.....	33
Obrázek č. 16: záznam z experimentu.....	34
Graf č.1: Kalibrační křivka TAC na kyselinu askorbovou a gallovou.....	35
Graf č.2: Závislost TAC na typu vzorku piva - kalibrace na kyselinu askorbovou.....	37
Grafč.3: Závislost TAC na typu vzorku piva - kalibrace na kyselinu gallovou.....	38

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka č.1: vzorky použitých piv.....	25
Tabulka č.2: TAC vybraných vzorků piv – kalibrace na kys. askorbovou.....	36
Tabulka č.3: TAC vybraných vzorků piv – kalibrace na kys. gallovou.....	37