

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2016

Barbora Hnízdová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA POTRAVINOVÉHO DOPLŇKU CHLORELLA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce:

Barbora Hnízdová

Studijní obor:

Chemie

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Pavlína Baizová, Ph. D.

Olomouc 2016

SOUHRN

Tato bakalářská práce se zabývá antioxidační aktivitou potravinového doplňku Chlorella se zaměřením na její ovlivňování vnějšími faktory.

V teoretické části jsou popsány antioxidanty, co to je celková antioxidační aktivita, jak ji lze analytickými postupy stanovit a které faktory způsobují její zvýšení či snížení. Dále jsou popsány druhy volných radikálů a kyselina askorbová jako použitý standard.

Experimentální část porovnává u použití průtokové coulometrie výsledky měření při aplikaci různých vnějších podmínek. Zároveň je srovnávaná elektrochemická průtoková coulometrie s UV/Vis spektrometrií. Dále jsou popsány možné důsledky zjištění různých koncentrací antioxidantů ve vzorcích.

SUMMARY

This bachelor thesis deals with antioxidant activity of the food supplement Chlorella with focus on how it is influenced by outer factors.

In the theoretical part of the thesis there is a description of antioxidants, description of total antioxidant activity, how it can be detected by usage of analytical methods and which factors contribute on its increase or decrease. Afterwards, the kinds of free radicals are described with ascorbic acid used as a standard.

Experimental part of the thesis compares the results of the method using the flow-through coulometry in various outer factors. The electromechanical flow-through coulometry with UV/Vis spectrometry is compared as well. Then, there are described the possible consequences of the presence of different concentration of the antioxidants in the samples.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Barbora Hnízdová
Název práce:	Antioxidační aktivita potravinového doplňku Chlorella
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce:	RNDr. Pavlína Baizová, Ph.D.
Rok obhajoby:	2016
Abstrakt:	Práce se zaměřila na zjišťování celkové antioxidační aktivity potravinového doplňku Chlorella s důrazem na její ovlivňování vnějšími faktory. Použité metody byly průtoková coulometrie a spektrofotometrická UV/Vis metoda s barevným indikátorem.
Klíčová slova:	Chlorella, antioxidanty, volné radikály, celková antioxidační aktivita, elektrochemické metody, spektrofotometrie.
Počet stran:	39
Jazyk:	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Barbora Hnízdová

Title: Antioxidant activity of the supplement
Chlorella

Department: Department of Analytical Chemistry

Type of thesis: Bachelor

Supervisor: RNDr. Pavlína Baizová, Ph. D.

The year of presentation: 2016

Abstract: This bachelor thesis deals with the detection of the total antioxidant activity of the food supplement Chlorella with a special focus on how it is influenced by the outer factors. The methods used were flow-through coulometry and UV/Vis spectrometry with colour indicator.

Keywords: Chlorella, antioxidants, free radicals, total antioxidant activity, elektrochemical methods, spectrophotometry.

Number of pages: 39

Language: Czech

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Pavlíny Baizové, Ph. D. a že veškeré informace a literární zdroje, které jsem využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce bude prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

Podpis

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat paní RNDr. Pavlíně Baizové, Ph. D. za odborné vedení mé bakalářské práce. Obzvláště pak za cenné rady a připomínky jak při práci v laboratoři, tak při sepisování samotné bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat celé své rodině, která mi pomáhala svým pochopením a trpělivostí.

Obsah

1	Úvod	- 1 -
2	Teoretická část	- 2 -
2.1	Chlorella.....	- 2 -
2.2	Kyselina askorbová – vitamin C	- 2 -
2.3	Volné radikály.....	- 3 -
2.3.1	Reaktivní formy kyslíku	- 3 -
2.3.2	Reaktivní formy dusíku	- 4 -
2.4	Antioxidanty	- 4 -
2.4.1	Dělení podle původu.....	- 5 -
2.4.2	Dělení podle struktury	- 6 -
2.5	Antioxidační aktivita.....	- 6 -
2.5.1	Metody eliminující volné radikály	- 7 -
2.5.2	Metody sledující redoxní vlastnosti látky.....	- 9 -
2.5.3	Vnější faktory ovlivňující antioxidační aktivitu	- 11 -
3	Experimentální část	- 13 -
3.1	Přístrojové vybavení	- 13 -
3.2	Chemikálie	- 14 -
3.3	Průtoková coulometrie	- 14 -
3.3.1	Příprava roztoků a vzorků.....	- 14 -
3.3.2	Postupy při měření.....	- 16 -
3.4	Metoda DPPH	- 17 -
3.4.1	Příprava roztoků a vzorků.....	- 17 -
3.4.2	Postupy při měření.....	- 18 -
4	Výsledky a diskuze.....	- 20 -
4.1	Průtoková coulometrie	- 20 -

4.2	Metoda DPPH	- 24 -
4.3	Srovnání průtokové coulometrie a metody DPPH.....	- 26 -
5	Závěr.....	- 27 -
6	Seznam použitých zkratek	- 28 -
7	Seznam literatury	- 29 -

1 Úvod

Je známo, že jednou z příčin vzniku kardiovaskulárních a neurologických problémů je negativní působení volných radikálů. Svou velkou reaktivitou jsou schopny vytvářet další volné radikály a tím narušit mnoho důležitých biologických procesů, které mohou vést k nenávratným destruktivním změnám tkání a celých orgánů. Předejit takovému poškození napomáhají antioxidanty, což jsou molekuly zabraňující oxidační destrukci látek. Zdrojem antioxidantů může být ovoce, zelenina, ale také víno, čaj a léčivé rostliny. Vlastnosti antioxidantů mohou mít i některé vitaminy.^{1,2}

V současné době, kdy se zvyšuje poptávka po potravinových doplňcích, se jako příhodným zdrojem minerálů, vitamínů, antioxidantů a dalších nezbytných látek pro život jeví řasa Chlorella. Pro její nutriční hodnoty a detoxikační vlastnosti je nazývána super potravinou. Chlorella patří mezi jednobuněčné zelené sladkovodní řasy a svým složením je pro lidský organismus přínosná jako prevence a lék, neboť obsahuje látky, které si tělo samo nemůže vytvořit.^{3,4}

Teoretická část se zaměřuje na obecnou definici a rozdělení antioxidantů, rozdělení volných radikálů a možné obecné analytické postupy pro zjišťování celkové antioxidační aktivity.

Cílem práce je zjistit jakou vykazuje sladkovodní řasa Chlorella (výrobce Green Ways) antioxidační aktivitu v porovnání s kyselinou askorbovou, která patří k nejvýznamnějším antioxidantům, a jak se její celková antioxidační aktivita mění při použití zásobního elektrolytu o různé teplotě a v závislosti na čase při použití průtokové coulometrie s pracovní porézní uhlíkovou elektrodou. Pro stanovení celkové antioxidační aktivity byla také použita spektrofotometrická metoda DPPH, při které se sleduje úbytek absorbance během zhašení stabilního barevného radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl.

2 Teoretická část

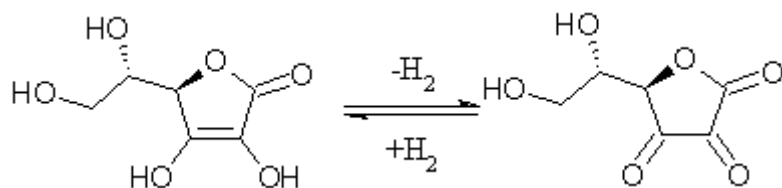
2.1 Chlorella

Chlorella patří mezi jednobuněčné sladkovodní řasy. Obsahuje širokou škálu minerálních látek, které jsou životně důležité pro výstavbu tkání. Vzhledem k neschopnosti lidského těla vytvořit si všechny látky potřebné pro život se rostlinná strava stala nedílnou součástí jídelníčku.⁴

Chlorella je jedna z látek bohatých na obsah chlorofylu, tedy zeleného barviva. Ten má velmi příznivý vliv na lidský organismus. Mezi možné účinky chlorofylu patří protizánětlivé vlastnosti, desinfekční působení, podporuje funkci hemoglobinu a má výrazný pozitivní vliv na střevní mikroflóru. Dalšími složkami chlorelly jsou např. karoteny, tiamin, riboflavin, kyselina listová, feoforbidy. Mnohé mají antioxidační účinky, ale některé se řadí mezi alergizující látky. Právě feoforbidy v malém množství nemají vliv na organismus, ale ve větším množství mohou způsobit alergie. Jsou odpadním produktem chlorofylu a vznikají záměnou hořčíkového atomu za atom vodíku při působení vyšších teplot, světla nebo kyselého prostředí. Vzhledem k této citlivosti může být přítomnost většího množství feoforbidů mnohdy způsobena například špatným skladováním. Povolené množství je 60 mg feoforbidů na 100 g potravin.⁵⁻⁹

2.2 Kyselina askorbová – vitamin C

Kyselina askorbová (Ascorbic acid - AA) má důležitý význam pro lidský organismus a je nedílnou součástí pestrého jídelníčku. Experimentálně byly prokázány její protinádorové a protizánětlivé vlastnosti. Významně ovlivňuje mnoho biologických pochodů. V kombinaci s jinými vitamíny může vykazovat příznivější účinky. Tyto účinky ale nebyly klinicky jednoznačně prokázány. Někteří živočichové si ji umí syntetizovat, člověku však tato schopnost chybí. Sama bývá zařazena mezi vitamíny s antioxidačními účinky. Přímo reaguje s hydroxylovým radikálem, superoxidovým radikálem nebo singletový kyslíkem za vzniku kyseliny dehydroaskorbové.^{11, 12}



Obrázek č. 1 – Redoxní reakce kyseliny askorbové (vlevo) na kyselinu dehydroaskorbovou (vpravo)

Jde o vitamin rozpustný ve vodě. Jeho nadbytek je vyloučen močí a nemělo by tak dojít k předávkování. Naopak jeho nedostatek může způsobit pocit únavy, bolesti svalů a větší náchylnost organismu k infekčním nemocem. Extrémní nedostatek pak způsobuje kurděje. Největší koncentrace vitamínu C se nachází v ovoci a v zelenině. ^{11, 13}

2.3 Volné radikály

Volné radikály jsou atomy, molekuly nebo ionty, které obsahují jeden či více nepárových elektronů ve svém elektronovém obalu. Kvůli neúplnému obsazení jsou velmi reaktivní a nestabilní, proto se snaží spárovat elektron do stabilní konfigurace. Získávání elektronů může probíhat formou řetězové reakce i mezi jednotlivými volnými radikály. Volné radikály v těle mohou být produkovány při užívání některých léků, xenobiotik, vlivem životního prostředí, vlivem životního stylu, konzumací alkoholu, ale také při zvýšené fyzické aktivitě. ^{1, 11}

Volné radikály mohou vznikat jednak homolytickým štěpením dvouelektronové vazby, ale také oxidací či redukcí molekuly. Energeticky méně náročné jsou ovšem pouze redukce a oxidace, proto se uplatňují v biologických systémech pro vznik volných radikálů, na rozdíl od mnohem energeticky náročnějšího homolytického štěpení. Pro lidský organismus jsou nejzásadnější reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species – ROS) a dusíku (reactive nitrogen species – RNS). Pouze některé reaktivní formy jsou volné radikály. Ty se vzhledem k možnému toxickému působení staly předmětem intenzivního výzkumu, jelikož mohou atakovat většinu biomolekul. ^{1, 11}

2.3.1 Reaktivní formy kyslíku

Volné radikály kyslíku (ROS) mohou existovat ve formě superoxidu ($O_2^{\cdot-}$), hydroxylového radikálu (OH^{\cdot}), nejaktivnější formě kyslíku, peroxyly (ROO^{\cdot}), alkoxyly (RO^{\cdot})

a hydroperoxyly (HO_2^\cdot). Napomáhají při ničení fagocytovaných mikroorganismů při ovulaci a oplodnění vajíčka. Na druhou stranu mohou organismus vážně poškodit a způsobit rozvoj arterosklerózy, diabetes či různých zánětů. Mezi nepříznivé účinky volných radikálů patří poškození buněčných membrán. Dochází rovněž ke změnám, které způsobují autoimunní onemocnění. ^{1, 10, 11}

Mezi ROS patří také látky, které nejsou volnými radikály, jako je peroxid vodíku (H_2O_2), který je důležitou složkou při vzniku radikálů, kyselina chlorná (HOCl), ozon (O_3) a singletový kyslík ($^1\text{O}_2$). ¹¹

2.3.2 Reaktivní formy dusíku

Volné radikály patřící mezi reaktivní formy dusíku (RNS) se vyskytují ve formě oxidu dusnatého (NO^\cdot) a oxidu dusičitého (NO_2^\cdot). Radikál oxidu dusnatého reaguje s hemovým železem a způsobuje relaxaci hladkého svalstva a gastrointestinálního traktu. Jeho doba života je krátká, rychle reaguje s kyslíkem za vzniku NO_2 nebo se superoxidem, za vzniku ONOO^- . Obě sloučeniny poškozují buňky a jsou reaktivní. ^{14, 15}

Také mezi RNS patří látky, které nejsou volné radikály. Například nitrosyl (NO^+), nitroxid (NO), kyselina dusitá (HNO_2), oxid dusitý (N_2O_3) a další jsou látky patřící mezi metabolity oxidu dusnatého. ¹¹

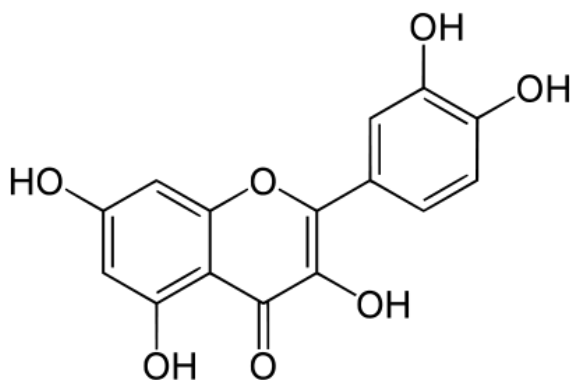
2.4 Antioxidanty

Antioxidanty jsou látky, které zabraňují negativnímu působení volných radikálů tím, že jim dodávají chybějící elektrony do stabilní elektronové konfigurace. Jedná se o molekuly zabraňující či omezující oxidační destrukci látek. Působení volných radikálů může mít za následek rozvoj některých chorob. Antioxidanty je možné rozdělit například podle jejich původu na přírodní a syntetické nebo podle struktury na fenolové a endioly. ^{15, 23}

2.4.1 Dělení podle původu

2.4.1.1 Přírodní antioxidanty

Přirozeně se vyskytují v rostlinách a mají mnoho nepostradatelných funkcí, mezi které patří například ochrana před pojidání živočichy (mohou způsobit hořkou chuť rostliny) nebo naopak vábení živočichů svou barevností nebo vůní kvůli opylení. Nejznámějšími přírodními antioxidanty jsou vitamín C, α -tokoferol (vitamín E), což je nejvýznamnější lipofilní antioxidant, dále pak koenzym Q10 a rovněž také flavonoidy nebo antioxidanty na bázi aminokyselin (např. tryptofan a methionin). Flavonoidy se vyskytují v přírodě v různém uspořádání. Nachází se například v rajských jablcích, brokolici, cibuli nebo špenátu. Nejzajímavějším flavonoidem je kvercetin (Obrázek č. 2)¹⁹, který má protizánětlivé a protinádorové účinky. Jeho množství se stejně jako u ostatních flavonoidů mění s podnebím konkrétního výskytu. Flavonoidy patří do skupiny polyfenolů, které se v těle přeměňují na metabolity se srovnatelnou antiradikálovou aktivitou původních polyfenolů. Spousta přírodních antioxidantů se také nachází v olejích, tucích a koření (rozmarýna – diterpeny, tymián – jednoduché fenoly).^{15 - 18}



Obrázek č. 2 – Kvercetin

2.4.1.2 Syntetické antioxidanty

Syntetické antioxidanty jsou antioxidanty, které musí být do potravy přidávány uměle, a to pro zlepšení vlastností některých potravin. Příkladem jsou margaríny, které jsou obohaceny o antioxidanty jako ochrana před žluknutím. Do této skupiny patří galláty, kyselina fumarová, BHA (butylhydroxyanisol), což je směs izomerů 3-terc. butyl-4-hydroxyanisol a 2-terc. butyl-4-hydroxyanisol, TBHQ (terc-butylhydrochinon) a BHT (3,5-di-terc-butyl-4-hydroxytoluen). Galláty bývají zmiňované v souvislosti s jejich

protinádorovým účinkem, který může ovlivnit stereochemii sloučeniny a tím ochránit napadené buňky.^{15, 20}

2.4.2 Dělení podle struktury

2.4.2.1 Fenolové

Do této skupiny patří jednoduché fenoly (hydrochinon, guajakol, isoeugenol a další), tokoferoly, galláty a řada dalších. Galláty (estery kyseliny gallové) se využívají například pro stabilizaci živočišných tuků. Účinek gallátů mohou zesilovat BHT a BHA.¹⁵

2.4.2.2 Endioly

Mezi endioly patří například kyselina askorbová nebo kyselina erythorbová (kyselina isoaskorbová) a její soli.¹⁵

Na porovnávání účinnosti různých antioxidantů se zavádí pojem celková antioxidační aktivita (Total antioxidant activity – TAA). Pro její stanovení bylo vyvinuto několik analytických metod.²

2.5 Antioxidační aktivita

Pojem antioxidační aktivita byl zaveden pro posouzení antioxidační účinnosti různých směsí. TAA kvantifikuje schopnost látky eliminovat volné radikály. Existuje ale mnoho faktorů, které ji ovlivňují. Obecně mezi tyto faktory patří koncentrace antioxidantu, přítomnost jiných antioxidantů, teplota, substrát, rozpouštědlo, doba stání a přítomnost dalších látek.^{21 - 23}

Pro měření antioxidační aktivity existuje mnoho různých analytických metod. Pro jejich odlišné výsledky je vhodné použít pro jednu analýzu víc metod. Obecně se dají rozdělit například na metody eliminující volné radikály (dochází ke zhášení radikálů, které jsou směsí generovány nebo v případě stabilních radikálů, jsou do směsi uměle přidávány) a metody sledující redoxní vlastnosti antioxidantů, u kterých se na antioxidační aktivitu nahlíží jako na redukční schopnost látky.^{21 - 23}

2.5.1 Metody eliminující volné radikály

Většina metod vychytávající volné radikály vyžaduje použití činidel (například barevné stabilní radikály), které poskytují s antioxidanty barevné produkty nebo jsou působením antioxidantů odbarveny. Proto metody sledující zhášení volných radikálů mohou být zároveň metodami spektrofotometrickými. Antioxidanty jsou v tomto případě považovány za redukční činidla.²³

Měřenou veličinou u spektrofotometrických metod je absorbance a řídí se Lambert-Beerovým zákonem, který říká, že hodnota absorbance je přímo úměrná koncentraci látky v roztoku a tloušťce kyvety.

Vztah pro výpočet Lambert-Beerova zákona:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

A – absorbance

ε – molární absorpční koeficient [$\frac{\text{mol}}{\text{l} \cdot \text{cm}}$]

c – koncentrace látky v roztoku [$\frac{\text{mol}}{\text{l}}$]

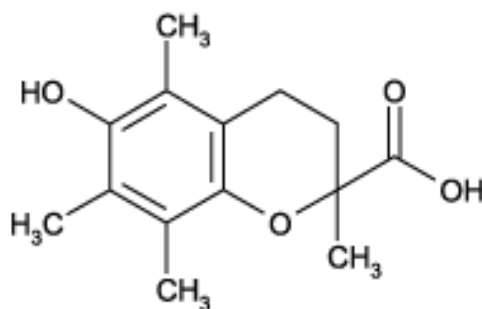
d – tloušťka absorbující vrstvy (tloušťka kyvety) [cm]

2.5.1.1 Metoda ORAC

Principem metody ORAC (oxygen radical absorbance capacity) je vytváření kyslíkových radikálů a na antioxidační aktivitu je nahlíženo jako na schopnost antioxidantů v látce zastavit nebo zpomalit radikálovou reakci. Vyhodnocování je založeno na sledování rychlostního úbytku fluorescence β -fykoerytrinu (β -PE) po přidání vzorku. U látek obsahujících polyfenoly není vhodné použití β -PE vzhledem k jeho omezené fotostabilitě. Jako náhradu lze použít fluorescein pro jeho jednoduchý reakční mechanismus (přenos vodíku). Antioxidační vlastnosti jsou účinnější čím je větší hodnota ORAC.²³

2.5.1.2 Metoda ABTS

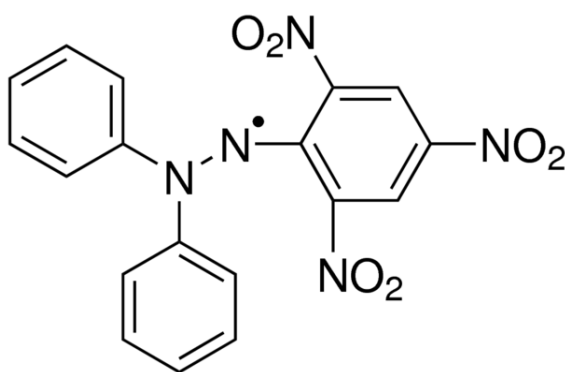
Jedna z nejzákladnějších analytických metod pro zjišťování antioxidační aktivity, též označovaná jako metoda TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), protože je antioxidační aktivita srovnávaná s antioxidační aktivitou ekvivalentního množství Troloxu (6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina). Trolox (Obrázek č. 3) ²¹ je syntetická látka, strukturně podobná vitamínu E. Metoda je založená na principu eliminace syntetických modrozelených radikálů $ABTS^{\cdot+}$ vzniklých oxidací ABTS [2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonátu)]. Vlivem antioxidantů se modrozelená forma radikálů $ABTS^{\cdot+}$ redukuje zpět na bezbarvou formu ABTS. Absorpční maximum kation radikálové formy $ABTS^{\cdot+}$ je při vlnové délce 734 nm. Metoda se používá na analýzu antioxidační aktivity jak čistých látek, tak směsí. ^{2, 23, 24}



Obrázek č. 3 – Trolox

2.5.1.3 Metoda DPPH

Při této metodě je k reakci s antioxidanty ve vzorku využíván stabilní radikál 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH \cdot) (Obrázek č. 4). Dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazin). Vzhledem k jeho výraznému fialovému zbarvení, které je způsobené nepárovým elektronem na atomu dusíku, je možné jej analyzovat spektrofotometricky. Působením antioxidantů dochází k odbarvování roztoku na světle žlutý, které doprovází úbytek absorbance. Absorpční maximum stabilního radikálu DPPH je ve viditelné oblasti spektra při vlnové délce 515 nm. U barevných vzorků je možné reakci analyzovat i metodou HPLC (High performance liquid chromatography). ^{22 - 24}



Obrázek č. 4 –2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl

Stejně jako u metody předchozí i zde je možné analyzovat jak čisté látky, tak směsi. U směsných vzorků je možné přepočítávat TAA na ekvivalentní množství Troloxu nebo kyseliny askorbové.²³

2.5.1.4 Metoda založená na zhášení OH-radikálů

Jde o metodu založenou na vychytávání OH-radikálů, které mohou být produkovány různými způsoby (př. UV-fotolýza peroxidu vodíku). Radikály reagují s látkami, jejichž reakční produkty jsou snadno detekovatelné a přítomnost antioxidantů, svou reakcí s radikály, snižuje množství těchto produktů. Vhodnou látkou k reakci s OH-radikály je kyselina salicylová.²³

2.5.2 Metody sledující redoxní vlastnosti látky

2.5.2.1 Metoda FRAP

Metoda FRAP (Ferric reducing antioxidant potential) je založená na principu redukce železitých iontů v komplexech spolu s chloridem železitým na železnaté ionty, přičemž železité komplexy jsou bezbarvé a redukované železnaté mají světle modrou barvu. Použití metody FRAP je limitováno v tom, že měření musí probíhat při velmi nízkém pH (až 3,6). Tato metoda není zároveň schopná zachytit pomalu reagující polyfenolické látky a thiole. Absorbance je měřena při 593 nm a množství může být přepočteno na ekvivalentní množství Troloxu pomocí kalibrační křivky. Antioxidační aktivita naměřená a skutečná nemusí vždy souhlasit vzhledem k tomu, že nám měření ukazuje pouze schopnost vzorku redukovat ionty železité na železnaté.^{23, 24}

2.5.2.2 Cyklická voltametrie

Cyklickou voltametrií se hodnotí redoxní vlastnosti látek. Pomocí této metody se kontroluje schopnost látek odštěpovat elektrony. Při měření se sleduje elektrický proud procházející soustavou v závislosti na elektrickém potenciálu.

Používají se tři typy elektrod.

1. Pracovní (z platiny, zlata nebo skelného uhlíku)
2. Referentní (kalomelová nebo argentochloridová)
3. Pomocná (z platinového drátku nebo plíšku)

Na pracovní elektrodu je vkládán potenciálový pulz. V roztoku jsou současně sledované proudové odezvy. Tato metoda je odvozená od polarografie.²³

2.5.2.3 Coulometrie

Patří mezi elektroanalytické metody, které nejčastěji sledují látky rozpuštěné v roztoku (většinou vodné roztoky). Roztok musí být zároveň vodivý, takže jeho nedílnou součástí musí být inertní elektrolyt. Při coulometrii dochází na pracovní elektrodě k reakci se 100% proudovou účinností buď za konstantního potenciálu pracovní elektrody (potenciostaticky), nebo za konstantního proudu (amperostaticky). Coulometrie potenciostatická a amperostatická se řídí Faradayovými zákony. Formulace Faradayových zákonů říká, že náboj prošlý roztokem, je úměrný množství látky vyloučené na elektrodě a za konstantního proudu i době, po kterou proud roztokem procházel.²⁵

$$m = \frac{M}{nF} It = \frac{MQ}{nF}$$

M – molární hmotnost [$\frac{\text{g}}{\text{mol}}$]

n – počet elektronů vyměněných při reakci

F – Faradayova konstanta [$F = 96\,485 \frac{\text{C}}{\text{mol}}$]

Q – elektrický náboj [C]

t – čas [s]

I – elektrický proud [A]

2.5.2.3.1 Průtoková coulometrie

Metoda též zvaná galvanostatická rozpouštěcí chronopotenciometrie (GRC). Při průtokové coulometrii se měření provádí za konstantního proudu a průběh se sleduje změnou elektrického potenciálu. Dochází ke kvantitativní přeměně analytu. Během oxidace se zpočátku potenciál mění pomalu, ale po zoxidování veškeré kyseliny askorbové nebo jiných antioxidantů dojde ke skokové změně potenciálu a tím je značen konec reakce. Konečný signál $E = f(t)$ má tvar píku, jehož plocha odpovídá přechodovému času a je přímo úměrná koncentraci antioxidantů.²⁶

2.5.3 Vnější faktory ovlivňující antioxidační aktivitu

Vzhledem k velkému množství metod vhodných ke stanovení antioxidační aktivity a vlastnostem antioxidantů, je relevantní sledovat možné změny výsledků TAA antioxidantů při změně různých faktorů nebo podmínek. Mezi obecné faktory ovlivňující celkovou antioxidační aktivitu patří koncentrace samotného antioxidantu, koncentrace jiných antioxidantů (možnost posílení či zeslabení účinků), rozpouštědlo, pH, přítomnost jiných látek, které mohou reagovat s antioxidanty přednostně, přístup vzdušného kyslíku, přítomnosti oxidačního činidla nebo i jiné fyzikální faktory (př. působení světla), které mohou změnit teplotu roztoku nebo zapříčinit oxidaci.

Při zpracování tuhých vzorků je většinou neodmyslitelnou částí jejich extrakce v rozpouštědlech. Část antioxidantů tak přechází do roztoku, ale část zůstává spojena s pevnou fází například kvůli nerozpustnosti antioxidantu, kvůli pevné vazbě s tuhým nerozpustnou částí vzorku nebo jejich uzavření v buněčných strukturách. V lidském organismu mohou samotné extrakci předcházet pochody schopné vyvézt antioxidanty z těchto struktur a tím zvýšit celkovou antioxidační aktivitu.

Dalším faktorem ovlivňujícím TAA je jejich vstřebatelnost trávicím traktem. Proto i u extrahovatelných antioxidantů může dojít ke zvýšení nebo snížení TAA (např. oxidací). Svůj podíl má také střevní mikroflóra, která je v některých případech schopná měnit biologickou aktivitu a TAA antioxidantů, ty mohou kromě vlastního antioxidačního působení pozitivně ovlivňovat složení střevní mikroflóry.²¹

Mnoho analytických výsledků ukazuje na skutečnost, že skladování potravin je zásadní s ohledem na udržení jejich výživových hodnot. Jak již bylo uvedeno, vliv na stabilitu složek potravin má hlavně přítomnost kyslíku, světlo, pH, teplota nebo přítomnost některých kovů. Z těchto důvodů lze pomyslně vitaminy rozdělit na relativně stabilní a labilní vůči těmto vlivům. Mezi stabilní můžeme zařadit vitaminy B₆, B₂, D nebo E. Naopak mezi labilní se řadí vitaminy C, B₁₂, K nebo A.³¹

3 Experimentální část

Účelem této práce bylo zjistit, při jakých podmínkách vykazuje Chlorella značky Green Ways nejvyšší antioxidační aktivitu ve srovnání s kyselinou askorbovou. Byla vybrána jedna metoda ze skupiny metod eliminující volné radikály a jedna ze skupiny metod sledující redoxní vlastnosti látek. Zvolenou elektrochemickou metodou byla průtoková coulometrie a spektrofotometrickou metoda DPPH. Byla sledována stabilita antioxidantů obsažených v tabletách Chlorelly v závislosti na teplotě a na čase u průtokové coulometrie a schopnost zhášet stabilní radikály u metody DPPH.

3.1 Přístrojové vybavení

K provedení průtokové coulometrie byl využit počítačem řízený elektrochemický analyzátor EcaFlow 120 GLP (Istran Bratislava) (Obrázek č. 5). Byla použita kompaktní průtoková měřící cela s pracovní porézní uhlíkovou elektrodou E56C nebo E53C. Vzorky, kalibrační roztoky i zásobní elektrolyt byly do přístroje přiváděny hadičkami pomocí peristaltického čerpadla.

Pro metodu DPPH, zhášení syntetických radikálů 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu, byl použit UV-Vis spektrometr (Lambda 25) s programem Wavelength 2.85.04. (Obrázek č. 6). Po proměření absorpčního spektra byla vybrána vlnová délka o 515 nm.

Pro přípravu zásobního elektrolytu, vzorků, kalibračních roztoků a roztoku syntetického radikálu byly použity automatické pipety Eppendorf research, dále automatické váhy METTLER TOLEDO. Pro filtraci vzorků chlorelly byly použity mikrofiltry LUT Syringe Filters Nylon (25 mm, 0,45 μm). V případě metody DPPH byly vzorky připravovány do 5 ml šroubovacích vialek a stanovovány v plastových kyvetách ($d = 1 \text{ cm}$).



Obrázek č. 5 – Elektrochemický analyzátor EcaFlow 120 GLP

3.2 Chemikálie

Použité chemikálie při měření:

- Pevný chlorid sodný – NaCl (Ing. Petr Švec, PENTA)
- L - askorbová kyselina – C₆H₈O₆ (Ing. Petr Švec, PENTA)
- Šťavelová kyselina – C₂H₂O₄ (Lachema)
- Triton – etylen glykol oktyl - fenol ether (Fluka)
- DPPH – 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl (Sigma Aldrich)
- Methanol – CH₃OH (Ing. Petr Švec, PENTA)

3.3 Průtoková coulometrie

3.3.1 Příprava roztoků a vzorků

3.3.1.1 Příprava základního elektrolytu

Roztok Tritonu byl připraven odvážením 5,48 g chloridu sodného, 1 g kyseliny šťavelové a kvantitativním převedením do litrové odměrné baňky. Suchý podíl byl rozpuštěn v malém množství destilované vody. Dále byl přidán 1 ml Tritonu. Takto připravená směs byla doplněna destilovanou vodou po rysku. (pH = 2,13)

3.3.1.2 Příprava zásobního a kalibračního roztoku kyseliny askorbové

Zásobní roztok kyseliny askorbové o koncentraci 10 g/l byl připraven kvantitativním převedením navážky do 25 ml odměrné baňky a doplněním destilovanou vodou po rysku. Navážka činila 0,25 g pevné kyseliny askorbové.

Kalibrační roztok byl připraven ze zásobního roztoku kyseliny askorbové do 25 ml odměrné baňky a doplněn základním elektrolytem po rysku. Nový kalibrační roztok byl připraven vždy před každým měřením. Konečná koncentrace kalibračního roztoku činila 20 mg/l.

3.3.1.3 Příprava vzorků chlorelly

Před každou přípravou vzorku chlorelly byly tablety jemně rozetřeny na prášek. Následně byl navážen vzorek o hmotnosti 1 g ($\pm 0,0010$ g). Doporučená denní dávka (DDD) chlorelly činí 5 g.⁸ Postupně byly všechny díly kvantitativně převedeny do 100 ml odměrných baněk a doplněny zásobním elektrolytem po rysku. Po rozmíchání prášku v zásobním elektrolytu byl suchý podíl roztoků zfiltrován přes filtrační papír. Filtrát prošel ještě filtrací mikrofiltrem upevněným na stříkačce. Takto zpracovaný vzorek byl zanalyzován průtokovým analyzátozem.

Vzhledem ke sledovaným závislostem byly jednotlivé vzorky připraveny různě. Při časové závislosti byly vzorky připraveny podle předchozího odstavce, ale vlastní analýza probíhala v různých časových intervalech (Tabulka I). Při teplotní závislosti byl prášek chlorelly rozmíchán v zásobním elektrolytu o různé teplotě (Tabulka II). Pro dané podmínky (čas, teplota) byly připraveny 3 vzorky. Každý vzorek byl přístrojem měřen 3x.

	Doba stání		
	vz. a	vz. b	vz. c
vzorek 1	0	2 hod	24 hod
vzorek 2			
vzorek 3			

Tabulka I – Vzorky sledované v závislosti na čase při 24 °C

	Teplota elektrolytu
vzorek 4a	24 °C
vzorek 4b	
vzorek 4c	
vzorek 5a	30 °C
vzorek 5b	
vzorek 5c	
vzorek 6a	40 °C
vzorek 6b	
vzorek 6c	
vzorek 7a	50 °C
vzorek 7b	
vzorek 7c	
vzorek 8a	100 °C
vzorek 8b	
vzorek 8c	

Tabulka II – Vzorky sledované v závislosti na teplotě

3.3.2 Postupy při měření

Před analýzou vzorků byl zapnut počítač a samotný přístroj. Rameno čerpadla bylo uvedeno do pracovní polohy. Na počítači se zapnul program EcaFlow Autosampler, všechny tři přívodné hadičky se ponořily do destilované vody a před samotnou analýzou se nechal přístroj 3 min promývat. Dále byly nastaveny potřebné parametry. Byla vybraná metoda č. 36 – kyselina askorbová. Poté byla zjišťována průtoková rychlost zvážením suché kádinky a následným jímáním vody z přístroje. Po 5 min byla kádinka zvážena a z hmotnostního přírůstku zjištěn objemový průtok (ml/min). Zjištěná hodnota byla zapsána do parametrů přístroje (Tabulka III). Po proměření standardu byly hadičky určené pro elektrolyt a standard umístěny do nádoby se zásobním elektrolytem. Hadička určená pro vzorek se podle potřeby vkládala do odměrných baněk se vzorky. Po provedení analýzy byly získané signály zintegrovány.

Objem dávky vzorku	3 ml
Počáteční potenciál	0 mV
Konečný potenciál	800 mV
Proud - konstantní	100 μ A
Koncentrace standardu	20 mg/l
Průtoková rychlost	7-8 ml/min

Tabulka III – Parametry nastavené v programu EcaFlow Autosampler



Obrázek č. 6 – UV/Vis spektrometr

3.4 Metoda DPPH

3.4.1 Příprava roztoků a vzorků

3.4.1.1 Příprava syntetického radikálu DPPH

Na přípravu 0,001 mol/l zásobního roztoku syntetického radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu bylo naváženo 39,5 mg pevné látky, rozpuštěno v malém množství methanolu a kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky. Následně doplněno methanolem po rysku.

3.4.1.2 Příprava kalibračních roztoků kyseliny askorbové

Ze zásobního roztoku kyseliny askorbové ($c = 10 \text{ g/l}$) byl odpipetován 1 ml do první odměrné baňky a poté byly postupným ředěním připraveny další kalibrační roztoky (16; 6,5; 5; 2,5 mg/l). Tyto roztoky byly doplněny destilovanou vodou po rysku. (Tabulka IV)

Pro spektrofotometrické měření byly kalibrační roztoky odpipetovány do 5 ml vialek v poměru: 10 μl kalibračního roztoku, 300 μl DPPH a 2,7 ml methanolu.

Číslo roztoku	C kalibračního roztoku (mg/l)
1.	16
2.	6,5
3.	5
4.	2,5

Tabulka IV – Kalibrační sada

3.4.1.3 Příprava vzorků

Tablety Chlorelly byly ve třecí misce opět rozetřeny na prach a byl připraven vzorek vážící 1 g ($\pm 0,0010$ g). V případě metody DPPH byly díly Chlorelly rozmíchány v destilované vodě a kvantitativně převedeny do 100 ml odměrných baněk. Pevný podíl byl zfiltrován přes filtrační papír. Pro spektrofotometrické měření bylo do 5 ml vialek odpipetováno 10 μ l filtrátu, 300 μ l syntetického radikálu DPPH a 2,7 ml methanolu.

3.4.1.4 Příprava methanového roztoku DPPH

Pro odečtení absorbance samotného DPPH od absorbance vzorků byl připraven roztok obsahující 2,7 ml methanolu a 300 μ l DPPH.

3.4.2 Postupy při měření

Všechny vzorky byly odstaveny na tmavém místě po dobu 30 minut. Po přípravě všech vzorků byl zapnut počítač a spektrometr. Byl zapnut program Wavelength 2.85.04. a zvolilo se nastavení na proměření absorpčního spektra (380 – 750 nm). Proměřeno bylo absorpční spektrum připraveného vzorku, vodného filtrátu Chlorelly bez přídavku DPPH a metanolového roztoku syntetického radikálu pro výběr vhodné vlnové délky. Nejvyšší absorbance byla zaznamenána při 515 nm.

Po zjištění vlnové délky, při které stabilní radikál vykazuje maximální absorbanci, bylo nastavení změněno na měření o jedné vlnové délce (515 nm).

Při dané vlnové délce v plastové kyvetě ($d = 1 \text{ cm}$) byla postupně proměřena kalibrační řada, methanolvý roztok DPPH a vzorky. Měření bylo prováděno proti methanolu. Každý vzorek byl ve třech vyhotoveních.

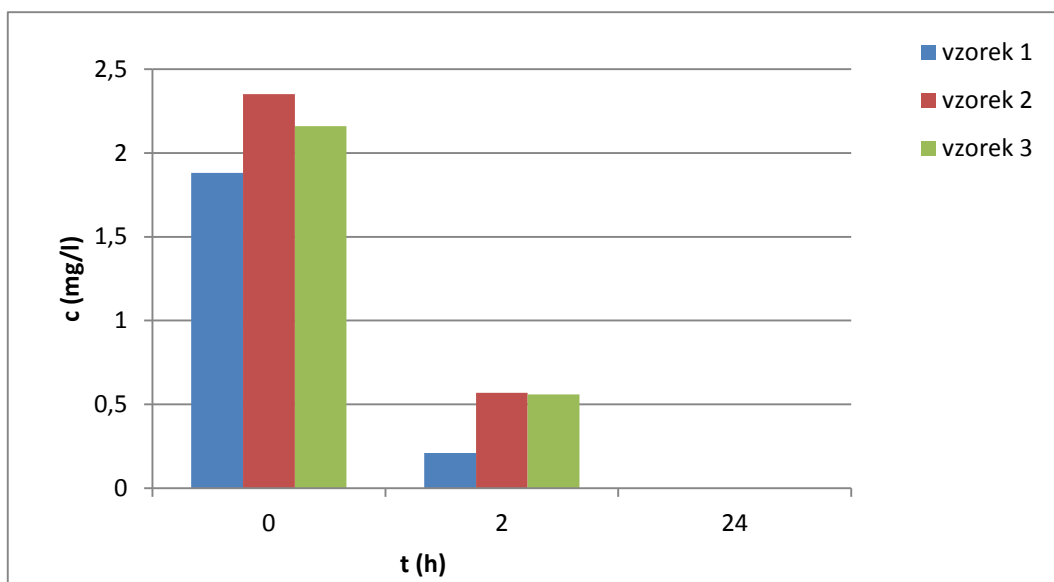
4 Výsledky a diskuze

V této práci byla sledována antioxidační aktivita potravinového doplňku Chlorella, a to v závislosti na vnějších podmínkách (teplota, čas). Srovnávací metodou byla metoda DPPH se spektrofotometrickou detekcí na UV/Vis spektrometru. U této metody byla sledována změna absorbance DPPH po přidání vzorku Chlorelly.

4.1 Průtoková coulometrie

Před každým měřením byl změřen standardní roztok o známé koncentraci. Jako standardní látka pro měření TAA roztoku Chlorelly byla zvolena kyselina askorbová ($c = 20 \text{ mg/l}$). Koncentrace následně proměřených vzorků odpovídala integrované ploše píku. Naměřené hodnoty koncentrace AA, TAA antioxidantů a vypočtené hodnoty směrodatné odchylky (σ) vzorků jsou uvedené v Tabulce V.

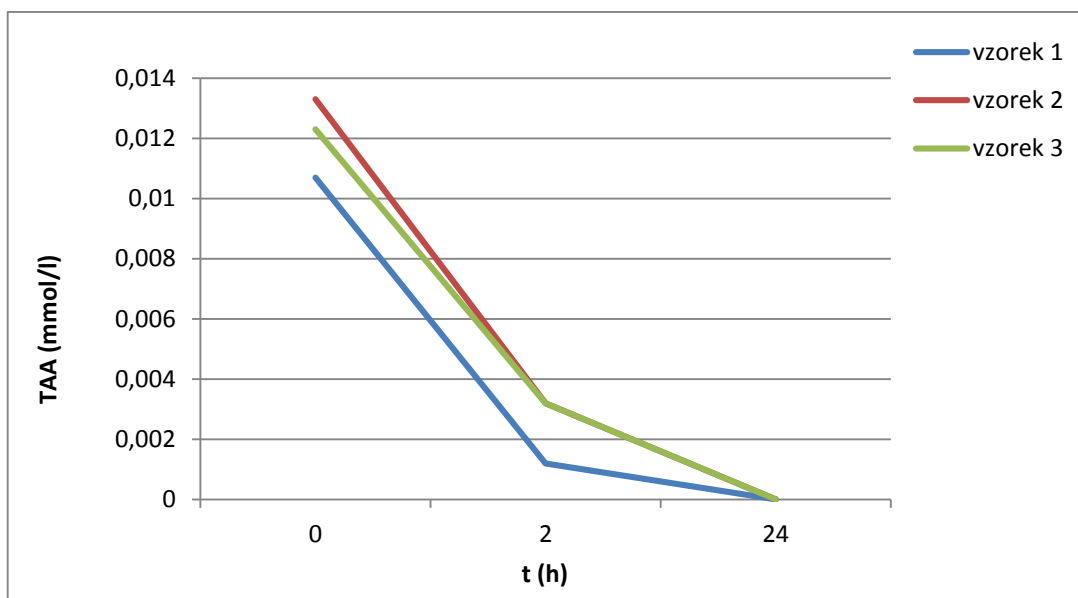
Při měření časové závislosti hodnota koncentrace (mg/l) antioxidantů v roztoku vztažená na ekvivalentní množství kyseliny askorbové klesala (Graf I) v důsledku možné oxidace antioxidantů způsobené stáním vzorku za přístupu vzdušného kyslíku či působením světla. V grafu II je vyjádřena hodnota TAA přepočtena na ekvivalentní množství kyseliny askorbové v mmol/l .



Graf I – Závislost ekvivalentního množství AA na době stání

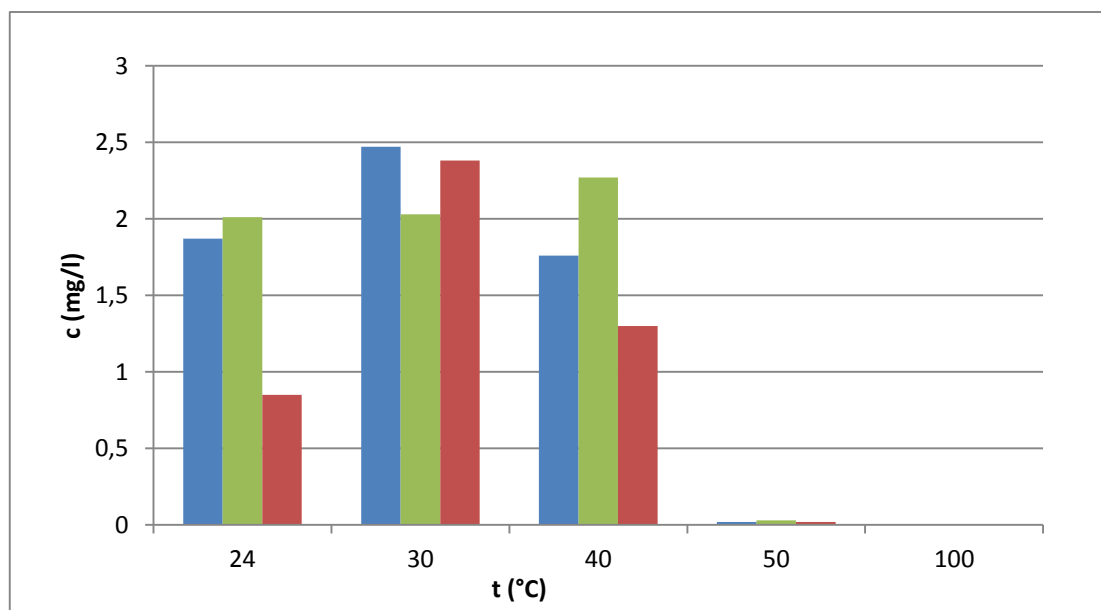
c (mg/l)	\bar{c} (mg/l)	TAA (mmol/l)	σ (mmol/l)	Doba stání (h)
1,65	1,88	0,0107	$1,14 \cdot 10^{-3}$	0
2,04				
1,94				
2,21	2,35	0,0133	$7,21 \cdot 10^{-4}$	0
2,45				
2,38				
1,95	2,16	0,0123	$1,02 \cdot 10^{-3}$	0
2,25				
2,27				
0,31	0,21	0,0012	$5,68 \cdot 10^{-4}$	2
0,11				
0,22				
0,43	0,57	0,0032	$7,96 \cdot 10^{-4}$	2
0,56				
0,71				
0,49	0,56	0,0032	$4,01 \cdot 10^{-4}$	2
0,57				
0,63				
0	0	0	0	24
0				
0				
0	0	0	0	24
0				
0				
0	0	0	0	24
0				
0				

Tabulka V – Naměřené hodnoty při opakovaném měření v různých časových intervalech



Graf II – Naměřené hodnoty TAA v závislosti na době stání vzorku vyjádřené v mmol/l vztažené na ekvivalentní množství AA

Při měření teplotní závislosti koncentrace (přepočtené na ekvivalentní množství AA) antioxidantů lze sledovat u většiny vzorků (Graf III) klesající trend u vyšších teplot zásobního elektrolytu (Tabulka VI). Vzhledem k lability některých vitaminů, které jsou obsaženy v tabletách chlorelly, dochází k jejich rozkladu. Příčinou tohoto trendu jsou vyšší teploty základního elektrolytu. Množství antioxidantů bylo přepočteno na ekvivalentní množství AA (mmol/l) (Graf IV).^{30, 31}

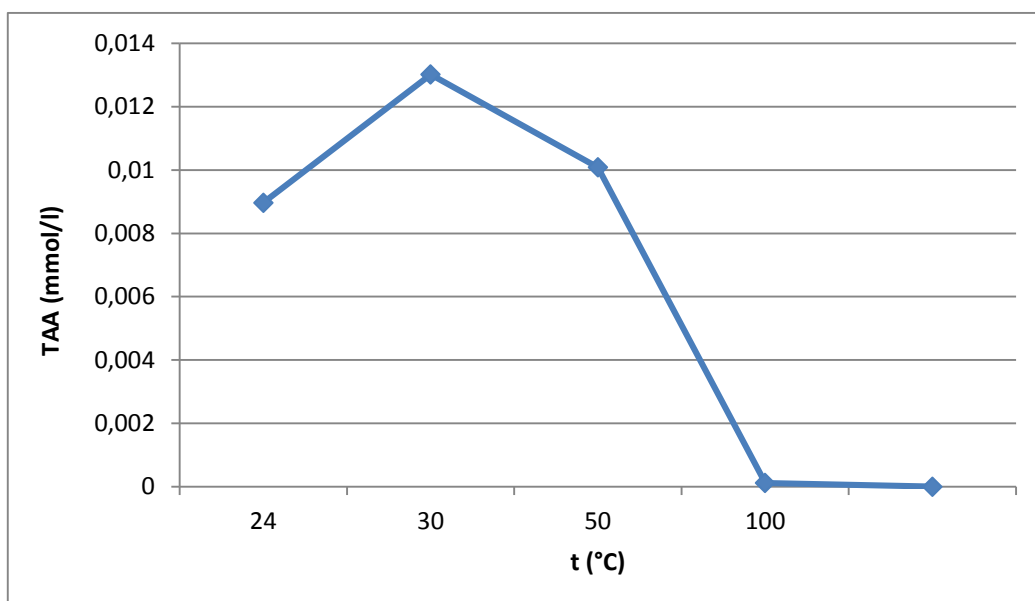


Graf III – Závislost koncentrace antioxidantů na teplotě základního elektrolytu

c (mg/l)	c (mg/l) vzorků	\bar{c} (mg/l) výsledná	TAA (mmol/l)	$\overline{\text{TAA}}$ (mmol/l)	σ (mmol/l)	t (°C)	
1,49	1,87	1,58	0,00846	0,008966	0,00227847	24	
2,29			0,013				
1,83			0,01039				
1,47	2,02		0,00834		0,01369		0,00277908
2,41			0,01232				
2,17			0,00818				
1,44	0,85		0,00273		0,00358		0,00293215
0,48							
0,63							
2,62	2,47	2,29	0,01488	0,013019	0,00131607	30	
2,2			0,01249				
2,58			0,01464				
2,3	2,03		0,01306		0,01039		0,00137158
1,83			0,01118				
1,97			0,01124				
1,98	2,38		0,01413		0,01516		0,00203222
2,49							
2,67							
1,83	1,76	1,78	0,01039	0,010084	0,00092455	40	
1,57			0,00891				
1,87			0,01061				
1,97	2,27		0,01118		0,01453		0,00167572
2,56			0,01294				
2,28			0,0067				
1,18	1,3		0,00738		0,00812		0,00071021
1,3							
1,43							
0,01	0,02	0,02	0,00005	0,000117	$3,4641 \cdot 10^{-5}$	50	
0,02			0,00011				
0,02			0,00011				
0,02	0,03		0,00011		0,00017		$3,4641 \cdot 10^{-5}$
0,03			0,00017				
0,03			0,00017				
0,02	0,02		0,00011		0,00011		0
0,02							
0,02							
0	0	0	0	0	0	100	
0			0				
0			0				

Tabulka VI – Naměřené koncentrace AA při různých teplotách základního elektrolytu

Při 30°C a 40°C byl zaznamenán růst hodnot TAA oproti hodnotám naměřených při laboratorní teplotě. Možným důvodem tohoto zvýšení je skutečnost, že jsou v tabletách Chlorelly obsaženy i antioxidanty enzymového charakteru. Aktivita enzymů je kromě jiných faktorů ovlivněna i teplotou. Z výsledků coulometrického měření vyplývá, že optimální teplota antioxidační aktivity se nachází mezi 30 – 40°C. ^{1, 32, 33}



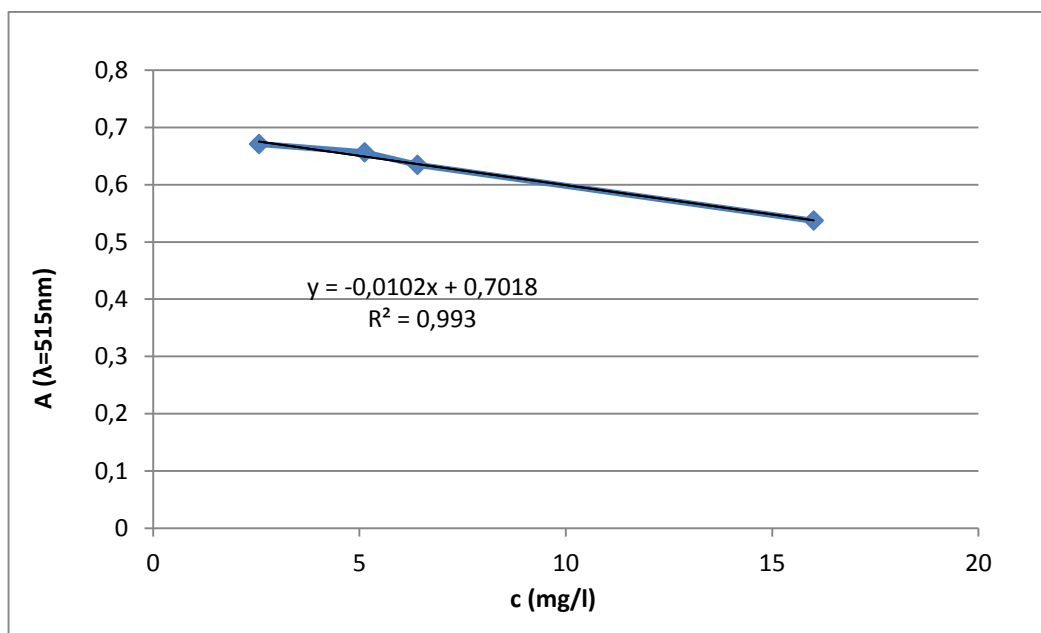
Graf IV – Trend měnící se hodnoty TAA při použití základního elektrolytu o různé teplotě

4.2 Metoda DPPH

Před měřením absorpance vzorku bylo změřeno absorpční spektrum stabilního syntetického radikálu DPPH a vzorku pro výběr vhodné vlnové délky. Nejvyšší absorpenci roztoky vykazovaly při 515 nm. Při dané vlnové délce byla proměřena kalibrační řada kyseliny askorbové (Graf V), která byla vybrána jako srovnávací roztok (Tabulka VII). Po proložení lineární spojnice trendu byla hodnota TAA, vztažená na ekvivalentní množství kyseliny askorbové, vypočítána pomocí rovnice regrese $y = - 0,010x + 0,701$.

	c (mg/l)	A
1.	16	0,5371
2.	6,5	0,6347
3.	5	0,6565
4.	2,5	0,6709

Tabulka VII - Naměřené hodnoty absorpance kalibračních roztoků



Graf V – Kalibrační sada kyseliny askorbové

Během reakce zhášení volných radikálů antioxidanty obsaženými v roztoku Chlorelly dochází k postupnému odbarvování syntetického radikálu z fialové barvy na žlutou. V důsledku odbarvování byla podle očekávání naměřena u vzorku absorbance nižší než u methanového roztoku DPPH (Tabulka IX).

Výsledná hodnota absorbance vzorku také přepočtena na procento odbarvení dle rovnice ³⁴: $A [\%] = \left[\frac{A_{DPPH} - A_{vzorku}}{A_{DPPH}} \right] \cdot 100$

	$A_{\lambda=515 \text{ nm}}$
DPPH	0,6370
Chlorella	0,0316

Tabulka VIII – Naměřené hodnoty absorbance DPPH a vzorku Chlorelly

	$A_{\lambda=515 \text{ nm}}$	$A_{\text{průměr}}$	c (mg/l)	TAA (mmol/l)	A [%]
8a	0,6316	0,6319	6,91	0,0392	0,8
8b	0,6360				
8c	0,6281				

Tabulka IX – Naměřené hodnoty absorbancí vzorků

Metodou DPPH bylo stanoveno 6,91 mg/l antioxidantů a přepočteno na ekvivalentní množství kyseliny askorbové (Tabulka IX).

4.3 Srovnání průtokové coulometrie a metody DPPH

Obě metody použité v praktické části práce jsou vhodné pro zjišťování TAA antioxidantů v roztoku. Vzhledem k použití různých rozpouštědel však nejsou úplně srovnatelné.

Nižší hodnoty TAA antioxidantů při použití průtokové coulometrie mohou být způsobeny použitím elektrolytu o nízkém pH jako rozpouštědla nebo nerozpustností antioxidantů ve vodě. Vzhledem ke kyselému prostředí mohou některé antioxidanty vykazovat nižší aktivitu nebo mohou být daným pH reakce antioxidantů úplně inhibovány. Na rozdíl od metody zhášení stabilního syntetického radikálu DPPH použití kyselého elektrolytu u průtokové coulometrie dobře demonstruje situaci v trávicím traktu, protože pH trávicího traktu „na lačno“ se průměrně pohybuje kolem hodnot 1,5 – 1,9. Z toho vyplývá, že žaludeční šťávy částečně eliminují působení volných radikálů.³⁵

Naopak metoda DPPH vzhledem k zásaditému pH methanolu může korespondovat s žaludečními šťávami po jídle, kdy se hodnota pH pohybuje v rozmezí 3 - 7. Toto pH se jeví pro přítomnost antioxidantů příznivější, ale z časových závislostí vyplývá, že při delším setrvání antioxidantů v roztoku jejich TAA klesá s časem.³⁵

5 Závěr

Cílem práce bylo stanovení antioxidační aktivity potravinového doplňku Chlorella. Chlorella obsahuje mnoho látek s příznivými účinky na lidský organismus. Včetně vitaminů s antioxidačními účinky také bílkoviny, aminokyseliny a minerály, které také mohou vykazovat antioxidační aktivitu. Antioxidační aktivita byla měřena metodou průtokové coulometrie a spektrofotometrickou metodou DPPH. Rozdíl hodnot je způsoben jednak různým pH roztoků Chlorelly dále také různým skladováním vzorků. TAA byla sledována v závislosti na teplotě a době stání. Z výsledků měření je zřejmé, že nejvyšších hodnot TAA dosahuje okolo 30 – 40 °C. I přes kyselé pH organismu jeho teplota umožňuje vyšší aktivitu antioxidantů.

Při porovnání jednotlivých výsledků a okolností analýzy vychází z práce, že užívání tablet Chlorelly je vhodnější „na lačno“, protože antioxidanty stráví v trávicím traktu méně času, a proto by měly vykazovat vyšší TAA i přes kyselé prostředí trávicího traktu.

6 Seznam použitých zkratek

AA - ascorbic acid

ABTS - 2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonátu)

BHA - butylhydroxyanisol

BHT - 3,5-di-terc-butyl-4-hydroxytoluen

DPPH· - 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl

DPPH-H – difenyl pikrylhydrazin

DDD – Doporučená denní dávka

FRAP - Ferric reducing antioxidant potential

GRC - galvanostatická rozpouštěcí chronopotenciometrie

HPLC - High performance liquid chromatography

ORAC - oxygen radical absorbance capacity

ROS - reactive oxygen species

RNS - reactive nitrogen species

TBHQ - terc. butylhydrochinon

TAA - total antioxidant activity

TEAC - Trolox equivalent antioxidant capacity

Trolox - 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman -2-karboxylová kyselina

β - PE - β – fykoerytrin

7 Seznam literatury

1. Racek J., Holeček V.: Chem. Listy 93, 774 – 780 (1999).
2. Fidler M., Kolářová L.: Chem. Listy 103, 232 - 235 (2009).
3. Šácha P.: Chlorella – nebezpečí nebo ochrana pro naše tělo? (2013), <http://www.celostnimediceina.cz/chlorella-nebezpeci-nebo-ochrana-pro-nase-telo.htm>, staženo 16. února 2015.
4. Mišurcová L., Stratilová I., Kráčmar S.: Chem. Listy 103, 1027 – 1033 (2009).
5. Rathouský V.: *Učebnice zelených potravin – Chlorella Pyrenoidosa*, Green Ways s.r.o., Staré Město 2008.
6. <http://www.zelene-zdravicko.cz/chlorofyl-nedoceneny-pritel>, staženo 16. února 2016.
7. Arndt T.: Chlorofyl, <http://www.celostnimediceina.cz/chlorofyl.htm>, staženo 16. února 2016.
8. <http://www.gw-int.net/cs/chlorella>, staženo 16. února 2016.
9. <http://www.zelenyobchod.cz/products/feoforbidy-zlobivejsi-braska-chlorofylu/>, staženo 25. Dubna 2016.
10. Fořt P.: *Zdraví a potravní doplňky*, Euromedia Group, k. s., Praha 2011.
11. Štípek S. a kol.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*, Grada Publishing, spol. s. r. o., Praha 2000.
12. Marounek M.: *Povaha a mechanismus účinku antioxidantů, význam ve výživě zvířat a lidí*, Výzkumný ústav živočišné výroby, Praha 2006
13. <http://www.margit.cz/encyklopedie/vitamin-c/>, staženo 16. Března 2016.
14. <http://mefanet-motol.cuni.cz/clanky.php?aid=417>, staženo 8. Prosince 2014.
15. Velíšek J.: *Chemie potravin 3*, OSSIS, Tábor 1999.
16. Kopřiva V.: Antioxidační kapacita potravin, <http://cit.vfu.cz/ivbp/wp-content/uploads/2011/07/ANTIOXIDA%C4%8CN%C3%8D-KAPACITA-POTRAVIN.pdf>, staženo 11. září 2015.
17. <http://www.juwital.cz/Upload/Documents/FLAVONOIDY.pdf>, staženo 5. Prosince 2014.
18. Slanina J., Táborská E.: Chem. Listy 98, 239-245 (2004).
19. <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Quercetin.svg>, staženo 25. listopadu 2014.
20. Fawzy G. A., Al - Taweel A. M., Perveen S.: Pharmacognosy Magazine 39, 519 – 523 (2014).

21. Réblová Z.: Chem. Listy 105, 667 – 673 (2011)
22. Karabín M., Dostálek P., Hofta P.: Chem. Listy 100, 184-189 (2006).
23. Paulová H., Bochořáková H., Táborská E.: Chem. Listy 98, 174 – 179 (2004).
24. Ferretti U.: Studentská konference 2014: Rozvoj in-vitro metod stanovení antioxidační aktivity vybraných nízkomolekulárních antioxidantů a rostlinných extraktů (2014).
25. Zýka J. a kolektiv: *Analytická příručka Díl I.*, SNTL, čtvrté, upravené vydání, Praha 1988.
26. <http://www.chempoint.cz/elektroanalyticke-stanoveni-kovu-a-jinych-latek-rozpustenych-ve-vodach-1338212537>, staženo 20. dubna 2016.
27. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/d9132?lang=en®ion=CZ>, staženo 18. dubna 2016.
28. <http://www.enzolifesciences.com/ALX-270-267/trolox/>, staženo 25. listopadu 2014.
29. http://www.mojechemie.cz/Biochemie:Energetika_biochemickych_deju, staženo 12. dubna 2016.
30. <https://is.muni.cz/el/1451/podzim2004/T086/vitaminy-seminar.txt>, staženo 18. dubna 2016.
31. Suchopárová L.: Změny nutričních hodnot potravin při přípravě a skladování, http://www.szu.cz/uploads/documents/czzp/skola/seminare/Zasady_pripravy_Suchoparova.pdf, staženo 19. dubna 2016.
32. <http://galenus.cz/clanky/biochemie/biochemie-biokatalyza-enzymova-kinetika>, staženo 19. dubna 2016.
33. Doležal M.: Bílkoviny, peptidy a aminokyseliny, přednáška předmětu Chemie potravin, <http://web.vscht.cz/~dolezala/CHPS/02%20B%C3%ADlkoviny.pdf>, staženo 19. dubna 2016
34. Barros L., Baptista P., Ferreira C. F. R. I.: Food and Chemical Toxicology 45, 1731-1737 (2007).
35. Vraníková B., Franc A., Gajdziok J., Vetchý D.: Chem. Listy 110, 126-132 (2016).