

Biologicky aktivní látky rajčat a jejich stanovení

Petra Vojtíšková

Bakalářská práce
2006



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav potravinářského inženýrství a chemie
akademický rok: 2005/2006

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Petra VOJTÍŠKOVÁ**
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Biologicky aktivní látky rajčat a jejich stanovení**

Zásady pro vypracování:

1. fyziologický popis rostliny rajčete
2. biologicky aktivní látky rajčat a jejich vliv na lidské zdraví
3. metody stanovení biologicky aktivních látek, především metodou kapalinové chromatografie – HPLC

Rozsah práce:
Rozsah příloh:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:
dle doporučení vedoucího BP

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Daniela Kramářová, Ph.D.**
Ústav potravinářského inženýrství a chemie
Datum zadání bakalářské práce: **10. října 2005**
Termín odevzdání bakalářské práce: **31. května 2006**

Ve Zlíně dne 20. dubna 2006


prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
děkan




prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

Cílem této bakalářské práce je popsat biologicky aktivní látky rajčat. Mezi tyto látky lze zařadit vitaminy rozpustné v tucích, vitamin C, β -karoten, lykopen. Z lipofilních vitaminů se v rajčatech nachází vitamin A a vitamin E. Je možno sem také zařadit β -karoten, který je prekurzorem vitaminu A. Biologicky aktivní látky se nejčastěji stanovují metodou HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Tato metoda má široké použití a poskytuje velmi dobré výsledky.

Klíčová slova: β -karoten, HPLC, rajčata, vitamin C, vitaminy rozpustné v tucích

ABSTRACT

This bachelor work describes biologically active substances of tomatoes. In tomatoes, there can be found some fat vitamins, vitamin C, β -carotene and lycopen. From fat vitamins there are vitamin A and vitamin E. β -carotene is an antecedent of vitamin A. Biologically active substances are the most frequently determined by the method HPLC. This method has a wide range of usage. It also affords very good results.

Keywords: β -carotene, fat vitamins, HPLC, tomatoes, vitamin C

Ráda bych na tomto místě poděkovala především své vedoucí bakalářské práce Ing. Daniele Kramářové, Ph.D. za odbornou pomoc, podporu, rady a připomínky při tvorbě této práce. Také bych chtěla poděkovat své spolubydlící Janě Návratové za technickou pomoc při práci s počítačem. Bez nich by tato práce nejspíše nevznikla.

OBSAH

ÚVOD	7
I TEORETICKÁ ČÁST	9
1 RAJČE JEDLÉ (LYCOPERSICON ESCULENTUM)	10
1.1 DRUHY RAJČAT	10
1.2 ŠKŮDCI A CHOROBY RAJČAT.....	11
1.3 FYZIOLOGICKÉ PORUCHY RAJČAT.....	13
2 BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKY RAJČETE	14
2.1 BARVIVA	15
2.2 VITAMINY	21
2.2.1 Vitamin A	23
2.2.2 Vitamin C	24
2.2.3 Vitamin E	27
3 ZMĚNY BILOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK V PRŮBĚHU ZRÁNÍ A ZPRACOVÁNÍ RAJČAT	29
4 METODY STANOVENÍ BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK V RAJČATECH	30
4.1 PŘÍRODNÍ ANTIOXIDANTY	30
4.2 VITAMIN A A VITAMIN E	30
4.3 VITAMIN C.....	30
4.3.1 Titrační stanovení kyseliny L–askorbové	31
4.3.2 Spektrofotometrické stanovení kyseliny L–askorbové.....	31
4.3.3 Chromatografické stanovení kyseliny L–askorbové.....	31
4.3.4 Chromatografické dělení a stanovení vitamínu C ve formě bis– 2,4–dinitrofenylhydrazonu	32
4.3.5 Stanovení přímou metodou HPLC/UV-VIS nebo HPLC/ECD	32
4.4 KAROTENOIDY	33
4.4.1 Stanovení karotenoidních barviv	34
4.4.2 β -karoten.....	34
4.4.3 Spektrofotometrické stanovení karotenu.....	34
4.4.4 Stanovení retinolu a β -karotenu kapalinovou chromatografií	34
4.5 CHLOROFYLY	35
ZÁVĚR	36
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	38
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	40
SEZNAM OBRÁZKŮ	41
SEZNAM TABULEK	42
SEZNAM PŘÍLOH	43

ÚVOD

Rajče jedlé (*Lycopersicon esculentum*) se někdy zařazuje mezi kyselé druhy ovoce, jindy do zeleniny. Podle tvaru plodu se rozdělují například na třešňovitá, vejčitá, masitá. Rostlina rajčete může být napadena různými škůdci a chorobami. Také se u nich mohou objevit fyziologické poruchy, které většinou vznikají z nedostatku některé minerální látky v půdě. Nedostatek se projeví jak na rostlině, tak na plodech.

V rajčatech se vyskytuje řada biologicky aktivních látek. Mezi tyto látky se řadí vitaminy a barviva. Z vitaminů se v rajčatech vyskytují vitamin A, vitamin E a vitamin C. Vitaminy A a E se řadí do skupiny vitaminů lipofilních a vitamin C do skupiny hydrofilních vitaminů. Do barviv lze zařadit karotenoidy, xanthofyly a chlorofyly.

Karotenoidy jsou převážně látky lipofilní povahy, nerozpustné ve vodě, ale dobře rozpustné v organických rozpouštědlech. Karotenoidy mají žlutou, oranžovou až červenou barvu a za svůj název vděčí uhlovodíku karotenu. Biologický význam karotenoidů spočívá ve funkci provitaminů vitaminů skupiny A. Hydrolytickým štěpením dvojně vazby ležící v ose symetrie vzniká z karotenoidů, které obsahují v molekule β -jononový kruh, vitamin A neboli retinol. Z karotenoidů jsou v rajčatech přítomny hlavně β -karoten a lykopen. Obě tyto látky patří do skupiny antioxidantů. Antioxidanty mají schopnost zabránit autooxidaci látek hlavně tím, že přeruší řetězovou radikálovou reakci.

Chlorofyly jsou skupinou zelených barviv, která se nacházejí v pletivech rajčat zajišťujících fotosyntézu. Základ chlorofylů tvoří protoporphyrin s vázaným atomem hořčíku. Chlorofyl je stálý při běžných teplotách, při vysokých teplotách je labilní. V kyselém prostředí se velmi rychle uvolňuje hořčík z molekuly chlorofylu a je nahrazen vodíkem. Takto vzniklé sloučeniny se nazývají feofytiny a mají olivově zelenou a žlutou barvu.

Vitamin C je esenciální, ve vodě rozpustný mikronutrient, který působí v biologických tkáních jako antioxidant. Zde snadno vycytává reaktivní kyslíkaté a dusíkaté radikály a tím efektivně chrání ostatní substráty před oxidativním poškozením. Oxidační účinek askorbátu spočívá v tom, že redukuje anorganické i organické radikály. Vitamin C je považován za ideální antioxidant, protože obě jeho formy, askorbyl i askorbylový radikál, mají jednoelektronový redukční potenciál. Vitamin C také stimuluje obranyschopnost organismu, askorbát zvyšuje hladinu protilátek a interferonu.

Vitamin A patří do skupiny vitaminů rozpustných v tucích. Po chemické stránce je to alkohol obsahující ve své molekule šestičlenný β -jononový kruh s bočním řetězcem složeným ze dvou isoprenoidních jednotek. Podle počtu dvojných vazeb v šestičlenném cyklu se rozlišuje vitamin A₁ a A₂. Vitamin A zasahuje do řady fyziologických pochodů v lidském těle. K základní funkci patří ovlivňování metabolismu rhodopsinu, tedy procesu vidění. Dále působí na diferenciaci buněk a zasahuje rovněž do syntézy bílkovin, nukleových kyselin a lipoproteinů.

Vitamin E patří do skupiny lipofilních vitaminů. Je odvozený od tokolu a tokotrienolu. Tokoferoly patří mezi významné antioxidanty a zabraňují destruktivnímu neenzymovému působení molekulárního kyslíku na dvojně vazby nenasycených mastných kyselin vázaných v tkáňových lipidech. Antioxidační schopnost tokoferolů vyplývá z jejich snadné oxidace za vzniku tokoferylchinonů v játrech, které mohou být redukovány na tokoferylhydrochinony. Z nich potom cyklizací vznikají opět tokoferoly.

Cílem této práce je vybrat nejvhodnější metodu pro stanovení biologicky aktivních látek rajčat. Tyto látky lze stanovit různými metodami. Ke stanovení antioxidantů v potravinářství je zapotřebí nejprve vhodným způsobem antioxidanty izolovat, nejčastěji selektivní extrakcí. K vlastnímu stanovení se nejčastěji využívá různých chromatografických technik, například dvourozměrné tenkovrstvé chromatografie, plynové chromatografie, nebo vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC (High Performance Liquid Chromatography), kombinovaných někdy se spektrofotometrickým stanovením. Přirozeně se vyskytující antioxidanty se stanovují metodou RP-HPLC (Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography) s UV-VIS (Ultraviolet-Visible) nebo ECD (Electrochemical Detection) detektorem. Kulometrická detekce poskytuje vysokou selektivitu a citlivost s detekcí v $\mu\text{g.l}^{-1}$. O metodě HPLC je více informací v této práci.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 RAJČE JEDLÉ (LYCOPERSICON ESCULENTUM)

čeleď : Lilkovité (*Solanaceae*)

Předpokládá se, že divoce rostoucí druh rajčat pochází ze severní a střední části Jižní Ameriky, odkud se rozšířil do Střední a Severní Ameriky společně s kukuřicí, v průběhu lidských migrací před zhruba dvěma sty lety. Když se s nimi evropští dobyvatelé poprvé setkali v Mexiku, pěstovali už je tamní obyvatelé po celá staletí pod jmény tomatl, tomatle a tomatas. Když bylo rajče okolo roku 1523 poprvé dovezeno do Evropy, považovali je lidé kvůli výrazné vůni a jasně bílému, červenému nebo žlutému zbarvení za jedovaté, a proto se pěstovalo pouze pro okrasu.⁽⁶⁾



Obr. 1. Rajče jedlé

1.1 Druhy rajčat

Rajčata se rozlišují podle formy plodu na třešňovitá, vejčitá, masitá a středně velká. Třešňovitá rajčata jsou malá a kulatá a konzumují se nejlépe celá. Oválná vejčitá rajčata jsou vhodná na omáčky, středně velká a masitá rajčata chutnají velmi dobře nakrájená a syrová.⁽⁸⁾

Obr. 2. Rajče keříčkové-třešňovité (viz PŘÍLOHA I)

Obr. 3. Rajče keříčkové-vejcovité (viz PŘÍLOHA I)

Obr. 4. Rajče jedlé-masité (viz PŘÍLOHA II)

Obr. 5. Rostlina rajčete (viz PŘÍLOHA II)

Tab. 1. Přehled druhů rajčat (viz PŘÍLOHA III)

1.2 Škůdci a choroby rajčat

Mezi hlavní škůdce rajčat patří vlnovník, krtonožka obecná, mšice broskvoňová, drátovci, potemníci a jejich larvy, molice skleníková, třásněnka skleníková, sviluška chmelová a kořenová háďátka. ⁽⁷⁾ (viz *Tab. 2. Škůdci rajčat*, PŘÍLOHA IV)

Mimo tyto vyjmenované škůdce škodí rajčatům i různé hniloby. Jako příklad můžeme uvést kladosporiovou skvrnitost listů, bílou sklerotinovou hnilobu a fytoftorovou hnilobu rajčat. ⁽⁷⁾

Tab. 3. Hniloby rajčat

Hniloby rajčat	Projev hniloby
Kladosporiová skvrnitost listů	Na listech vytváří žluté skvrny s hnědým sametovým povlakem.
Bílá sklerotinová hniloba	Napadá stonky v blízkosti kořenového krčku. Napadená pletiva měknou a na jejich povrchu se vytváří bílý hustý povlak.
Fytoftorová hniloba	Stonek rostliny postupně zasychá a rostlina hyne. Na plodech se objevuje hniloba.

U rajčat se také můžeme setkat s plísňovými a bakteriálními chorobami. Mezi ně lze zařadit plíseň bramborovou, alternariovou skvrnitost, bakteriální vadnutí a stolbur rajčete.⁽⁷⁾

Tab. 4. Choroby rajčat

Choroba rajčat	Projev choroby
Plíseň bramborová	Napadá stonky, listy a plody. Na listech vznikají hnědé skvrny, které se za vlhka pokrývají bílým plísňovým povlakem. Na plodech se objevují skořicově hnědé, tvrdé skvrny.
Alternariová skvrnitost	Choroba se projevuje na listech, plodech a lodyhách. Na plodech se objevují velké černé skvrny. Ve vlhkém počasí se listy, lodyhy i listy pokrývají černým sametovým povlakem.
Bakteriální vadnutí	Formou choroby je lokální onemocnění plodů, na nichž se objevují bílé nebo žluté skvrny s tmavým středem.
Stolbur	Napadené květy jsou deformované, někdy se z nich vyvinou plody, ale jsou drobné, zdřevnatělé a nepravidelně vybarvené.

Velmi často se u rajčat setkáváme i s virózy. Mezi ně můžeme uvést nekrotickou proužkovitost, mozaiku a hnilobu plodů rajčete.⁽⁷⁾ (viz **Tab. 5. Virózy rajčat**, PŘÍLOHA V)

1.3 Fyziologické poruchy rajčat

V uzavřených prostorách se vlivem nepříznivých podmínek vnějšího prostředí, objevují nekrotické skvrny nebo změny barvy listové čepele.

Pěstují-li se rajčata při nedostatečném osvětlení a zároveň při vysoké teplotě a nadměrné půdní vlhkosti, objevují se na rubu jejich listů vodnaté zduřeniny, přičemž se listové žilky zbarvují do růžova. Při silných poruchách tohoto typu listy odumírají.⁽⁷⁾

Nedostatek draslíku se na listech rajčat projevuje tvorbou žlutých, později hnědých skvrn. Na plodech se objeví nerovnoměrné zbarvení. Charakteristicky zbarvené partie pletiv se střídají s rozplývavými neohrazenými žlutými skvrnami. Nedostatek fosforu se u rajčat projevuje změnou barvy na rubu listů do červena nebo fialova. Značně se opoždí vývin reprodukčních orgánů. Nedostatek dusíku znamená pro rostlinu zaostávání v růstu. Nové listy jsou drobné a mají bledě zelené zbarvení. Také žilky na rubu listu mění barvu ze žlutozelené na tmavě červenou. Lodyhy jsou drsné a tenké. Nedostatek vápníku vyvolává na kořenech rajčat skořicově hnědé zbarvení a zaostávání v růstu, jindy kořeny od špiček odumírají. Listy v horní části rostlin žloutnou. Pokud mají rajčata nedostatek hořčíku, pozorujeme u nich mezižilkové žloutnutí pletiv. Později postižená pletiva hnědnou, přičemž žilky si zachovávají normální tmavě zelené zbarvení. Okraje čepelí se svinují dolů a listy se stávají křehkými.⁽⁷⁾

2 BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKY RAJČETE

Uvádí se, že rajčata snižují riziko vzniku rakoviny a zánětu slepého stěva. V americkém bylinkářství se rajčat užívá proti nechutenství, potížím s játry a ledvinami. Některé biologicky aktivní látky se řadí zároveň mezi antioxidanty.⁽⁶⁾

Jako antioxidanty neboli inhibitory oxidace jsou označovány všechny látky, které svou přítomností zpomalují autooxidační reakce. V užším smyslu se jako antioxidanty označují látky, které inhibují autooxidaci tím, že přerušují řetězovou radikálovou reakci. V praxi se antioxidanty v potravinářském průmyslu nejčastěji používají k ochraně tuků a jiných lipidů. Oxidace lipidů totiž vyvolává další chemické změny v potravinách, které negativně ovlivňují jejich výživové, hygienicko-toxikologické a sensorické hodnoty, jako jsou chuť, vůně a barva.⁽⁴⁾

K primárním antioxidantům náleží všechny povolené látky, např. L-kyselina askorbová a její deriváty, tokoferoly a galláty. K sekundárním antioxidantům se řadí např. cystein, kyselina lipoová, methionin a jiné přirozeně se vyskytující sloučeniny.⁽⁵⁾

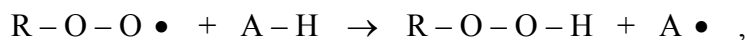
Podle původu dělíme antioxidanty na přírodní a syntetické. Z přírodních antioxidantů jsou jako aditiva povoleny pouze tokoferoly, ale i ty se dnes získávají převážně uměle. Četné další přírodní antioxidanty jsou přítomny v řadě olejů a jiných tuků, zejména v některých druzích koření. Ty však obvykle nemají konstantní složení, bývají méně účinné.⁽⁵⁾

Podle chemické struktury rozeznáváme antioxidanty fenolového, endiolového a jiného typu. Mezi fenolové antioxidanty z povolených látek náleží tokoferoly, fenolové antioxidanty a galláty, ale také řada dalších sloučenin přítomných v potravinách, koření a jiných přírodních materiálech. Endioly z povolených látek zahrnují kyselinu askorbovou, dále její soli a jiné deriváty.⁽⁵⁾

Antioxidanty interferují s procesem oxidace lipidů a jiných oxylabilních sloučenin tak, že:

1. primární antioxidanty reagují s volnými radikály nebo sekundární antioxidanty redukují vzniklé hydroperoxydy,
2. váží do komplexů katalyticky působící kovy,
3. eliminují přítomný kyslík.

Mechanismus účinku antioxidantů se řídí podle rovnice



kdy hydroperoxidový radikál ($\text{ROO}\cdot$) reaguje s antioxidantem (A) za vzniku hydroperoxidu (ROOH) a radikálu antioxidantů ($\text{A}\cdot$).⁽⁴⁾

Použití antioxidantů v potravinářství je vázáno podobnými předpisy jako použití jiných cizorodých látek, takže výběr je omezen na několik nezávadných látek. I látky považované za relativně neškodné jsou povoleny v omezených koncentracích. (viz zákon č. 110/ 1997 Sb. , *O potravinách a tabákových výrobcích* , vyhláška 304 / 2004 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných a pomocných látek).⁽⁵⁾

2.1 Barviva

Barviva jsou významnou skupinou sensoricky a biologicky aktivních látek potravin. Přírodní barviva se klasifikují podle struktury, výskytu v biologických materiálech či důležitých vlastností, např. podle rozpustnosti ve vodě a v tucích.⁽⁵⁾

Podle struktury je můžeme rozdělit na:

- dusíkaté heterocyklické sloučeniny
- kyslíkaté heterocyklické sloučeniny
- chinoidy
- terpenoidy

Mezi dusíkaté heterocyklické sloučeniny náleží pigmenty odvozené od pyrrolu a dále pigmenty odvozené od indolu, isochinolinu, pyrimidinu, respektive purinu a pterinu, příbuzného flavinu, fenazinu a fenoxazinu. Některá z nich patří mezi alkaloidy. K nejvýznamnějším barvivům se řadí hemová barviva.

Mezi kyslíkaté heterocyklické sloučeniny náleží množství fenolových sloučenin, zejména tzv. flavonoidy, k nimž se řadí příbuzné stilbeny a xanthony. Nejdůležitějšími barvivy jsou flavonoidní anthokyanová barviva.

Chinoidy zahrnují nejrůznější chinony, jejich redukované formy fenoly, oligomery, kondenzační a jiné produkty těchto sloučenin.

K terpenoidům se řadí tetraterpenové a některé další od tetraterpenů odvozené pigmenty zvané karotenoidy a některé monoterpenové pigmenty iridoidy. Nejvýznamnější skupinou těchto látek jsou karotenoidy.⁽⁵⁾

2.1.1 Chlorofyly

Chlorofylová barviva jsou skupinou zelených barviv, která se nacházejí v pletivech rajčat zajišťujících fotosyntézu.⁽⁵⁾ Základ chlorofylů tvoří protoporphyrin s vázaným atomem hořčíku. V molekule chlorofylu jsou 3 karboxylové skupiny, z nichž jedna je esterifikována fytolem a druhá methanolem. Třetí je maskována v izocyklu V, který se velmi snadno otevírá za vzniku dalšího karboxylu. Tato reakce je vratná.⁽²⁾

Chlorofyl je stálý při běžných teplotách, při vysokých teplotách je velmi labilní. V kyselém prostředí se velmi rychle uvolňuje hořčík z molekuly chlorofylu a je nahrazen vodíkem. Takto vzniklé sloučeniny, tzv. feofytiny, mají olivově zelenou a žlutou barvu. Rychlost tvorby feofytinu za daných podmínek určuje především pH prostředí, teplota a doba reakce. Ta se uplatňuje nejvýrazněji. Značná stálost chlorofylu v rostlinných tkáních i při mírně kyselém pH je způsobena vazbou chlorofylu na lipoproteiny, které jej chrání před feofytinací. Během termických technologických operací lipoprotein denaturuje a uvolňuje se tak volný chlorofyl, který se přítomnými organickými kyselinami rychle mění na feofytin.⁽²⁾

2.1.2 Karotenoidy

Karotenoidy jsou přírodní pigmenty, které jsou syntetizovány rostlinami a mikroorganismy. Struktura každého karotenoidu předurčuje jeho barvu i fotochemické vlastnosti jeho molekuly.⁽¹⁾

Většina karotenoidních látek se řadí mezi tetraterpeny, tedy mezi terpenoidy formálně obsahující osm isoprenových jednotek. Za svoji barevnost vděčí řetězci konjugovaných dvojných vazeb, které se vyskytují v několika základních strukturách a jejich kombinacích.⁽⁵⁾

Karotenoidy mají žlutou, oranžovou až červenou barvu a za svůj název vděčí uhlovodíku karotenu ($C_{40}H_{56}$) izolovanému poprvé z mrkve. Dnes je známo několik set různých karotenoidů podmiňujících typickou barvu nejen mrkve, ale např. rajsých jablíček, pomerančů, meruněk, šípků, jeřabin, papriky, šafránu, kukuřice atp.⁽³⁾

Karotenoidy jsou převážně látky lipofilní, nerozpustné ve vodě, dobře rozpustné v nepolárních (organických) rozpouštědlech.⁽³⁾

S rostlinnou potravou se dostávají do živočišného organismu a podmiňují žluté zbarvení vaječného žloutku, másla i tkáňových tuků. Význam karotenoidů pro živočichy spočívá v tom, že jsou prekursorů antixerofthalmických a antihemeraloptických faktorů-vitaminů A. Jsou tedy nepostradatelnými látkami podmiňujícími schopnost jak černobílého, tak barevného vidění.⁽³⁾

Základní látkou karotenoidů je alifatický nenasycený tetraterpenický uhlovodík **lykopen**, podmiňující červenou barvu rajsých jablíček. Jeho struktura je symetrická podle středové osy, má dvě izolované dvojně vazby a jedenáct konjugovaných, které jsou uspořádány vesměs v *trans*-konfiguraci („all-*trans*“).⁽³⁾

Biologický význam karotenoidů spočívá ve funkci provitaminů vitaminů skupiny A. Hydrolytickým štěpením dvojně vazby ležící v ose symetrie vzniká totiž z karotenoidů, které obsahují v molekule β -jononový kruh, vitamin A neboli retinol. **β -karoten** může poskytnout dvě molekuly vitaminu A, α - a γ -karoten jen jednu, neboť druhá molekula se zbytkem α -jononovým nebo pseudojononovým nevykazuje aktivitu vitaminu A.⁽³⁾

Kvalitativní a kvantitativní složení karotenoidů závisí na mnoha faktorech jako je druh

a odrůda rostliny, sezóna, stupeň zralosti, způsob zpracování apod. V mrkvi, rajčatech a paprikách se nachází stovky mg.kg^{-1} karotenoidů. V rajčatech je hlavním pigmentem lykopen, který běžně tvoří 90 % všech karotenoidů. β -karotenu je poměrně málo, asi do 6 mg.kg^{-1} a asi 1 mg.kg^{-1} představuje γ -karoten.⁽⁵⁾

Stabilita karotenoidních barviv se v rostlinných pletivech během technologických operací liší podle typu přítomných karotenoidů. Ve většině případů se změny karotenoidních barviv posuzují z celkového poklesu obsahu barevných pigmentů sledováním změn absorbance při vlnové délce 450 nm.⁽²⁾

V kyselém prostředí podléhají karotenoidy isomeraci. V ovoci, které obsahuje většinou poly-*cis*-karotenoidy se tyto změny projevují intenzivním zbarvením. Při zahřátí kyselých roztoků vzniká mezi jednotlivými isomery rovnováha, daná typem karotenoidů, hodnotou pH, teplotou a dobou záhřevu.⁽²⁾

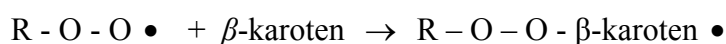
Nepříznivý vliv na stabilitu karotenoidních barviv má světlo, jehož působením dochází k isomeraci i k tvorbě epoxyderivátů. Karotenoidní barviva mohou být během technologických operací rovněž enzymově degradována *oxidasami* a *peroxidasami*.⁽²⁾

Karotenoidy se dělí na dvě hlavní skupiny:

- uhlovodíky nazývané karoteny,
- kyslíkaté sloučeniny odvozené od karotenů, které se nazývají xanthofyly.⁽⁵⁾

Xanthofyly primárně vznikají jako produkty biochemické oxidace karotenů. Například v rajčatech jsou jako minoritní pigmenty přítomny 1,2-epoxylykopen, 5,6-epoxylykopen, 1,2-epoxyfytoen aj. Nejběžnějšími látkami jsou monohydroxysubstituované deriváty alicyklických karotenů nazývané kryptoxanthiny, např. β -kryptoxanthin.⁽⁵⁾

Předpokládá se, že hydroperoxidový radikál vznikající při autooxidaci lipidů není redukován na hydroperoxid, ale je zachycen konjugovaným polyenovým systémem a vznikají tak relativně stabilní radikály β -karotenů stabilizované rezonancí:



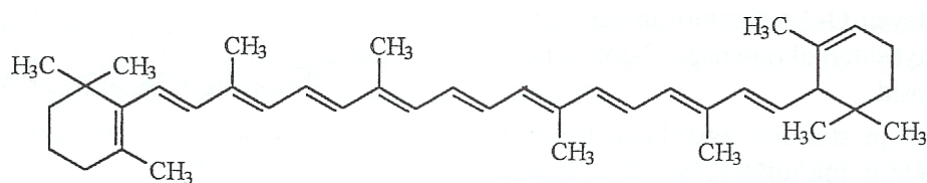
Tyto radikály se rozkládají za odštěpení alkoxylového radikálu a stabilizují se za vzniku epoxidů, karbonylových sloučenin a dalších produktů. Za anaerobních podmínek, resp. v přítomnosti malého množství kyslíku, kdy karoteny vykazují vyšší antioxidační účinky, reaguje β -karoten s dalším hydroperoxylovým radikálem na finální polární produkty.

Při vyšším parciálním tlaku kyslíku, např. při skladování tuku za přístupu vzduchu, může vznikat nestálý peroxylový radikál.⁽⁴⁾

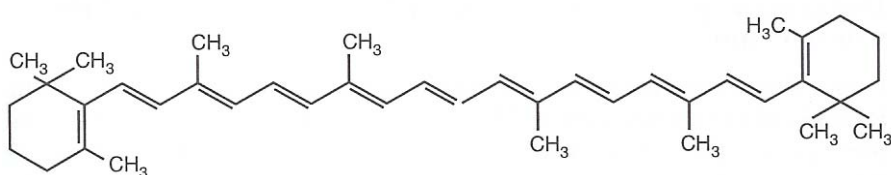
β -karoten je v přírodě nejrozšířenějším provitaminem vitamínu A. V přírodním materiálu je obvykle doprovázen α -karotenem a malým množstvím γ -karotenu. Molekula β -karotenu je tvořena dvěma β -jononovými kruhy spojenými čtyřmi isoprenovými jednotkami. Je hlavním dietním karotenoidem a v organismu plní dvě základní funkce:

1. je prekurzorem vitamínu A (jeho molekula se v průběhu metabolických pochodů může rozštěpit na dvě molekuly vitamínu A),
2. má významné antioxidační vlastnosti, které chrání organismus před oxidativním poškozením.

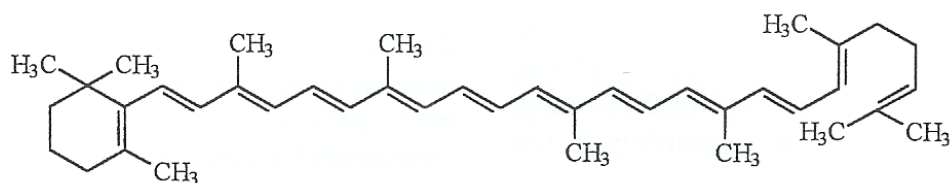
Molekula β -karotenu, stejně jako u ostatních karotenoidů, vzhledem ke své konfiguraci velmi snadno podléhá *cis*, *trans* isomerizaci, *all-trans* izomery jsou stáejší a v přirozených systémech se vyskytují nejčastěji.⁽¹⁾



α -karoten



β -karoten



γ -karoten

Dobrym zdrojem β -karotenu jsou především některé druhy ovoce a zeleniny, ale je obsažen i v živočišných produktech. Široká rozmezí obsahu karotenů u týchž rostlinných druhů je způsobena exogenními i endogenními vlivy, např. odrůdou, zralostí, vegetačním stadiem, složením půdy apod. Doporučená denní dávka pro β -karoten není stanove-

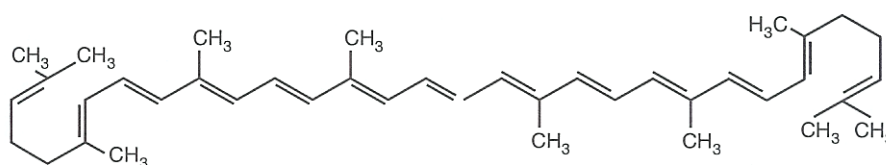
na, ale běžně se udává doporučení ve výši 2 až 4 mg za den. Tato dávka je nezbytná pro dosažení hodnoty snižující riziko ICHS (ischemické choroby srdeční).⁽¹⁾

Význam karotenoidů ve výživě je omezen jejich vstřebatelností z potravy a fyziologickou využitelností v organismu. Tepelné opracování potravinových surovin před konzumací zlepšuje využitelnost karotenoidů v organismu, protože se rozruší jejich vazby na bílkoviny nebo se dispergují jejich krystalické agregáty, rovněž tuky přítomné v potravě hrají významnou roli při jejich rozpouštění a následné absorpci.⁽¹⁾

Byla posuzována využitelnost karotenoidů z tomatových produktů. Bylo zjištěno, že neporušenost buněčných matic v čerstvých rajčatech významným způsobem ovlivňuje využitelnost β -karotenu v organismu a rozrušení těchto vazeb homogenizací či následným tepelným zpracováním tuto využitelnost významně zvyšuje.⁽¹⁾

Stejně jako ostatní karotenoidy je β -karoten ze střevní sliznice přenášen prostřednictvím chylomikronů do krve, kde je transportován pomocí lipoproteinů.⁽¹⁾

Lykopen je acyklický karotenoid, který je tvořen 8 isoprenovými jednotkami (jeho molekula má 40 atomů uhlíku a 11 lineárně sestavených konjugovaných dvojných vazeb). Nepůsobí jako provitamin vitamínu A, protože jeho molekula nemá β -jononový kruh. Lykopen je významným antioxidantem, kterému je věnována značná pozornost v souvislosti s prevencí civilizačních onemocnění.⁽¹⁾



lykopen

Lykopen se nachází v nemnoha potravinách. Ve většině potravin se vyskytuje v *all-trans* konfiguraci, což je jeho termodynamicky nejstabilnější forma. Více než 80 % lykopenu vstupujícího potravou do lidského organismu pochází z rajských jablíček a produktů z nich vyrobených. Lykopen je poměrně stabilní během zpracování suroviny a při vaření, v tomatových produktech činí jeho podíl až 64 % všech karotenoidů, zatímco ostatní karoteny pouze 15%.⁽¹⁾

Byl zkoumán vliv mechanické homogenizace a tepelného zpracování se závěrem, že homogenizace a uvaření potravy před požitím zlepšuje vstřebatelnost a využitelnost karotenoidů včetně lykopenu (disociace vazeb na proteiny, disperze karotenoidních krystalických agregátů) a důležitou roli hraje i přítomnost lipidů.⁽¹⁾

Lykopen, stejně jako ostatní karotenoidy, je po esterifikaci v enterocyty transportován v chylomikronech cestou *dictus thoracicus* do krevního řečiště. Specifickým nosičem lykopenu

i karotenoidů jsou lipoproteiny. *cis*-Isomery lykopenu jsou lépe rozpustné v lipofilních roztocích

a mohou tedy být rychleji transportovány do buněk nebo mezi tkáněmi. Lykopen nevykazuje provitaminový účinek, ale je předurčen být účinným antioxidantem v lidském organismu. Nejzávažnější biologický efekt z hlediska zlepšení a udržení zdraví je lykopenu a karotenoidům připisován v oblasti ochrany proti oxidativnímu poškození tkání.⁽¹⁾

Zdrojem lykopenu, který významnou měrou posiluje obranný mechanismus lidského organismu proti negativnímu působení reaktivních forem kyslíku, je vyvážená strava s dostatečným zastoupením nosičů lykopenu.⁽¹⁾

2.2 Vitaminy

Vitaminy jsou organické nízkomolekulární sloučeniny syntetizované autotrofními organismy. Heterotrofní organismy je syntetizují jen v omezené míře a získávají je jako exogenní látky především potravou a některé z nich prostřednictvím střevní mikroflóry.

Vitaminy jsou v určitém minimálním množství nezbytné pro látkovou přeměnu a regulaci metabolismu člověka. Nejsou zdrojem energie, ani stavebním materiálem, ale vesměs mají funkci jako součást katalyzátorů biochemických reakcí a proto bývají často označovány jako exogenní esenciální biokatalyzátory.

Vitaminy jsou látky s různou chemickou strukturou. V potravinách se obsah vitaminů běžně udává v jednotkách hmotnosti. Existují také mezinárodní jednotky IU (International Units), ve vazbě na hmotnost konkrétního vitamínu. Využívají se hlavně ve farmacii a medicíně u vitaminů rozpustných v tucích.⁽⁴⁾

Potřeba většiny vitaminů je poměrně nízká. Množství potřebné k zajištění normálních fyziologických funkcí člověka je však závislé na mnoha faktorech jako je stáří, pohlaví, zdravotní stav, životní styl, stravovací zvyklosti, pracovní aktivita apod.⁽⁴⁾

Nejběžnější hledisko třídění vitaminů je podle společných fyzikálních vlastností, rozpustnosti ve vodě, tj. v polárním prostředí, a rozpustnosti v tucích, tj. v nepolárním prostředí. Mezi hydrofilní vitaminy patří vitaminy skupiny B a vitamin C. K lipofilním vitaminům řadíme vitaminy A, D, E, K.⁽⁴⁾

Ve vodě rozpustné vitaminy nejsou zpravidla v organismu skladovány vůbec nebo jen omezeně a jejich přebytek je vylučován močí. Lipofilní vitaminy jsou skladovány v játrech. Při nedostatku, tzv. deficienci, některého vitaminu dochází k hypovitaminose (je-li vitamin podáván v nedostatečném množství) nebo až k avitaminose, což je přechodný úplný nedostatek vitaminu projevující se poruchou některých biochemických procesů. Hypervitaminosa způsobená nadměrným příjmem lipofilních vitaminů skupiny A a skupiny D rovněž vyvolá poruchy biochemických procesů a může vést k těžkým onemocněním.

Aktivita antivitaminů hlavně spočívá na následujících základních principech:

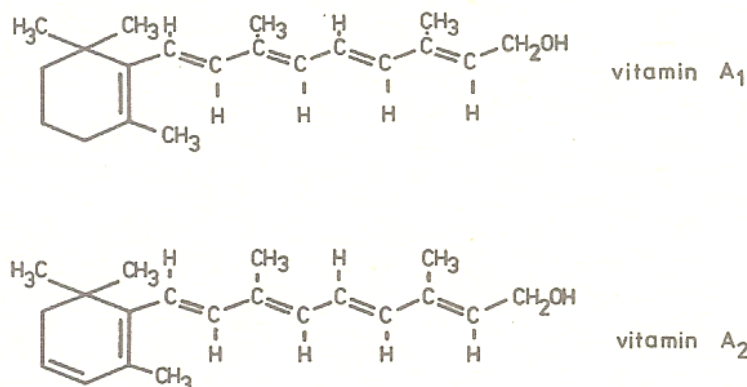
- strukturní analogy vitaminů reagují s příslušnými apoenzymy, které působí jako kompetitivní inhibitory enzymů, nebo s bílkovinami, které vitaminy transportují,
- některé enzymy přeměňují vitaminy na neúčinné látky,
- některé látky, většinou bílkoviny, ale i látky nízkomolekulární, tvoří s vitaminy nevyužitelné komplexy.

V potravinách se vitaminy vyskytují v proměnném množství zpravidla od $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ po stovky až tisíce $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ podle druhu vitaminu, druhu potraviny a způsobu jejího zpracování. Vyskytují se jednak volné, jednak v různých vázaných formách, obvykle vázané na bílkoviny nebo sacharidy. Fyziologickou aktivitu zpravidla vykazují více látek. Vitaminy obecně patří mezi velmi labilní složky potravin. Během technologického zpraco-

vání

i kulinární úpravy potravin dochází u většiny vitaminů k větším či menším ztrátám.⁽⁴⁾

2.2.1 Vitamin A



Vitamin A, původně nazývaný axeroftol, je nejdéle známým vitaminem. Podle IUPAC

(International Union of Pure and Applied Chemistry) je doporučen název retinol.

Vitamin A patří do skupiny vitaminů rozpustných v tucích, po chemické stránce je to alkohol obsahující ve své molekule šestičlenný β -jononový kruh s bočním řetězcem složeným ze dvou isoprenoidních jednotek. Podle počtu dvojných vazeb v šestičlenném cyklu se rozlišuje vitamin A₁ a A₂.⁽¹⁾

Vitamin A₁ – all-*trans*-retinol a vitamin A₂ – 3-dehydroretinol, který má jen 40 % účinnosti vitamínu A₁. V organismu se část retinolu mění na kyselinu retinovou, která se považuje za jeho aktivní formu.⁽³⁾

V potravě je vitamin A přijímán přímo nebo ve formě svého provitaminu β -karotenu, který hydrolýzou ve střevě poskytne dvě molekuly retinolu. Účinnou formou je i oxidací vznikající 11-*cis*-retinal, který je součástí fotorecepčního pigmentu tyčinek oční sítnice, rodopsinu.⁽¹⁾

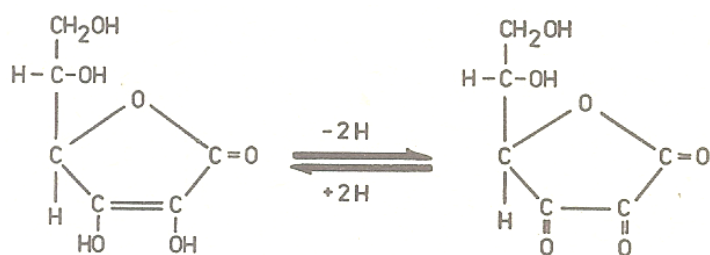
Vitamin A se vyskytuje pouze v živočišných potravinách, provitaminy, prekurzory vitamínu A, pocházejí převážně z rostlinných materiálů a jsou v těle s různým stupněm účinnosti přeměňovány na vitamin A.⁽¹⁾

Listové zeleniny jako špenát a zelí jsou velmi bohatým zdrojem provitaminů A, obsahují 10–30 mg.kg⁻¹ ekvivalentů retinolu, převážně ve formě β -karotenu. Retinoidy tvoří asi 25% z celkového množství přítomných karotenoidních pigmentů. Klasickým zdrojem β -karotenu je mrkev (karotka) obsahující kolem 20 mg.kg⁻¹ retinolu.⁽⁴⁾

Výživová doporučená dávka pro průměrného obyvatele ČR činí v současnosti 859 μ g vitamínu A na den. V ČR je pro těhotné a kojící matky doporučený příjem 1200 resp. 1600 μ g retinolu na den, pro děti do tří let 400 μ g na den, pro děti mezi 4. a 6. rokem se dávka zvyšuje na 500 μ g retinolu na den, pro sedmi až desetileté na 700 μ g na den, pro starší je doporučován příjem jako pro dospělé. Nejvyšší tolerovatelná hranice UL (Untolerable Limit) příjmu retinolu činí 3000 μ g pro muže a ženy.⁽¹⁾

Retinol i karotenoidy se vstřebávají v tenkém střevě, přičemž karotenoidy se vstřebávají jen z části. Samotné karotenoidy se konvertují na retinol ve střevní stěně a Kupferových buňkách jater za pomoci enzymu *karotenasy*. Z molekuly β -karotenu po rozložení ve střevní sliznici vznikají dvě molekuly retinolu při tzv. symetrickém štěpení, ale bylo zjištěno, že u savců za silně oxidačních podmínek a při vysokých dávkách β -karotenu může docházet i ke štěpení asymetrickému, které poskytuje oxidační produkty apokarotenaly, u nichž bylo prokázáno toxické působení. Účinnost přeměny klesá s rostoucí dávkou, proto ani při vysokém příjmu β -karotenu otrava vitamínem A nehrozí. Existují i další méně významné provitaminy (α -karoten, γ -karoten, β -kryptoxanthin), z jejichž molekuly vzniká pouze jedna molekula vitamínu A.

2.2.2 Vitamin C



kyselina L-askorbová a L-dehydroaskorbová

Vitamin C je esenciální, ve vodě rozpustný mikronutrient. Při normální funkci organismu je nezbytný pro řadu biochemických dějů. Lidé musí tento vitamin přijímat v potravě, zejména v ovoci a zelenině, protože ztratili schopnost tento vitamin syntetizovat.

Za vitamin C je považován reverzibilní oxidačně–redukční systém, který je charakterizován přenosem dvou elektronů a který tvoří kyselina L-askorbová (γ -lakton-2-oxo-L(-)-gulonové kyseliny), její monoanion askorbát, dále kyselina semihydro-L-askorbová (jakožto meziprodukt ve formě volného radikálu a kyselina L-dehydroaskorbová (γ -lakton-2,3-dioxo-L(+)-gulonové kyseliny). Přenos elektronů je reverzibilní, dokud není porušena kruhová struktura kyseliny L-dehydroaskorbové. Když dojde k jejímu rozštěpení, vzniká kyselina 2,3-dioxo-L-gulonová a aktivita vitaminu C zaniká.⁽¹⁾

Vitamin C se nachází téměř ve všech živých organismech, nejvíce ho obsahuje čerstvá zelenina a ovoce, zejména citrusové plody.⁽¹⁾

Vitamin C se snadno ničí při skladování, při povaření a při dalších kulinářských úpravách, protože L-kyselina askorbová tak přechází na kyselinu L-dehydroaskorbovou, která poměrně snadno otevírá laktonový kruh, což má za následek ztrátu biologické aktivity. Rozklad vitaminu C urychlují i enzymy a stopy kovů z nářadí a nádobí, takže ztráty nastávají již při opracování rostlinného materiálu.

Kyselina L-askorbová má díky svým vlastnostem široké použití jako potravinářské aditivum především v konzervářské a kvasné technologii, v technologii masa, tuků a cereálií. Jako antioxidant se používá také ve vodě rozpustná sůl kyseliny L-askorbové askorbát sodný a lipofilní 6-palmitoyl-L-askorbová kyselina, která současně inhibuje tvorbu nitrosaminů v nakládaném masu a masných výrobcích.⁽⁴⁾

Funkce vitaminu C v lidském organismu je vysoce důležitá pro lidské zdraví. Zásoby vitaminu C jsou v lidském organismu rozloženy nerovnoměrně v jednotlivých tkáních, přičemž vysokou koncentraci vitaminu C mají především tkáně s vysokým metabolickým obratem. Klinické příznaky nedostatku se projevují, když se celková tělová zásoba vitaminu C sníží pod 300 mg. Požadavek na příjem vitaminu C se zvyšuje při extrémní tělesné zátěži, trvalém psychickém stresu, abúzu drog a alkoholu, u některých nemocí a infekcí a při enviromentální zátěži. U kuřáků dochází ke snížené absorpci a zvýšenému obratu vita-

minu C, takže doporučený příjem pro ně byl zvýšen o 50 %. V České republice je doporučený příjem vitamínu C pro muže i ženy v produktivním věku 75 mg vitamínu C na den. Doporučená výživová dávka pro průměrného obyvatele činí 78,8 mg na den.⁽¹⁾

Vitamin C je pro člověka esenciálním nutričním faktorem a jeho koncentrace ve vnitřním prostředí lidského organismu je plně závislá na perorálním příjmu. Absorpce kyseliny

L-askorbové v horní části tenkého střeva, její přenos placentou, její renální tubulární reabsorpce a její akumulace v tělových buňkách jsou zajišťovány aktivním transportním procesem. Druhý mechanismus pro akumulaci vitamínu C v tkáních spočívá v transportu kyseliny

L-dehydroaskorbové, která je ihned po dosažení cíle redukována, v mnoha tkáních primárně *thioltransferasou*. Tento transport je desetkrát rychlejší než transport kyseliny L-askorbové, ale je kvantitativně limitován.

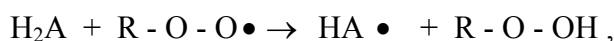
Dlouhodobý nedostatečný příjem vitamínu C potravou vyvolá u dětí Moellerovu-Barlowovu nemoc, u dospělých pak kurděje. Množství vitamínu C nutné pro prevenci kurdějí je nízké, lehce dosažitelné pouhou konzumací čerstvého ovoce a zeleniny. Činí pouze 10 mg na den.⁽¹⁾

Vitamin C se podílí na mnoha hydroxylačních reakcích probíhajících v organismu. Dále se účastní biosyntézy mukopolysacharidů, prostaglandinů, absorpce iontových forem železa, jeho transportu, stimuluje transport vodných, chloridových a zřejmě i Ca^{2+} iontů, uplatňuje se v metabolismu cholesterolu, drog a v řadě dalších reakcí.⁽⁴⁾

Vitamin C je důležitý ve vodě rozpustný antioxidant působící v biologických tkáních, kde snadno vychytává reaktivní kyslíkaté a dusíkaté radikály, a tím efektivně chrání ostatní substráty před oxidativním poškozením. Oxidační účinek askorbátu spočívá v tom, že redukuje anorganické i organické radikály. Působí rovněž jako kooxidant při regeneraci α -tokoferolu, když při eliminaci radikálů rozpustných v tuku vznikají tokoferoxylové radikály, přičemž se mění na askorbylový radikál. Tato jeho funkce je potenciálně velmi důležitá, neboť tak zabraňuje prooxidačnímu působení α -tokoferolu.

Vitamin C je považován za ideální antioxidant, protože obě jeho formy, askorbyl i askorbylový radikál, mají nízký jednoelektronový redukční potenciál. Další jeho výhoda spočívá ve stabilitě a nízké reaktivitě askorbylového radikálu, který vzniká při vychytávání kyslíkových a dusíkatých radikálů. Vitamin C stimuluje obranyschopnost organismu, askorbát zvyšuje aktivitu fagocytů a chrání jejich membrány předoxidačním poškozením, zvyšuje hladinu protilátek a interferonu.⁽¹⁾

Kyselina L-askorbová i její isomery a deriváty mohou reagovat s volnými radikály, které způsobují oxidaci lipidů a dalších oxylabilních složek potravin. Brzdí tak řetězovou antioxidační reakci a účinně působí jako antioxidanty. Reakce kyseliny L-askorbové s peroxylovým radikálem mastné kyseliny (R-O-O●), případně s alkoxylovým radikálem (RO●) lze schematicky znázornit rovnicí:



kde R-O-OH je hydroperoxid mastné kyseliny.

Vzniklý askorbylradikál již není schopen vyvolat další řetězovou reakci a disproportionuje na kyselinu L-askorbovou a L-dehydroaskorbovou.

Kyselina L-askorbová je obecně účinnějším antioxidantem použije-li se v kombinaci s tokoferoly. Ty potom přednostně reagují s volnými radikály lipidů. Vzniklé radikály tokoferolů jsou na fázovém rozhraní tuk-voda redukovány zpět na tokoferoly kyselinou L-askorbovou.

Kyselina

L-askorbová reaguje podobně také s toxickými formami kyslíku jako je hydroxylový radikál, anion superoxidového radikálu a singletový kyslík. Všechny tyto reakce tak současně zpomalují oxidaci lipidů.⁽⁴⁾

2.2.3 Vitamin E

Vitamin E patří do skupiny lipofilních vitaminů. Je odvozený od tokolu a tokotrienolu. Z rostlinných materiálů bylo izolováno osm derivátů tokolu a tokotrienolu, které projevovaly účinky vitaminu E a tvoří zároveň jeho strukturní skelet. Z nich nejvýznamnější je α -tokoferol, dále β -tokoferol a γ -tokoferol, které však mají jen 40 % biologickou aktivitu α -tokoferolu. Tokoferoly patří mezi významné antioxidanty a zabraňují destruktivnímu neenzymovému působení molekulárního kyslíku na dvojně vazby nenasycených mastných

kyselin vázaných v tkáňových lipidech. Antioxidační schopnost tokoferolů vyplývá z jejich snadné oxidace za vzniku tokoferylchinonů v játrech, které mohou být redukovány na tokoferylhydrochinony. Z nich potom cyklizací vznikají opět tokoferoly. Tokoferoly vytvářejí v organismu důležitou oxidačně redukční soustavu. V krevním řečišti je vitamin E transportován asociovaný s lipidovou fází LDL (Low Density Lipoprotein). Absorpce vitaminu E probíhá v tenkém střevě a jeho účinnost vstřebávání závisí na povaze tuku, který je s ním současně vstřebáván. Tokoferoly jsou v přírodě rozšířeny zejména v rostlinných olejích, ořechách, z živočišných produktů jsou to vejce, maso, játra. Obzvláště bohatý na vitamin E je olej slunečnicový, řepkový a olej z obilných klíčků. Potřeba vitaminu E pro organismus je závislá na příjmu nenasycených mastných kyselin potravou. Obecně se doporučuje, při průměrném denním příjmu do 20 g polyenových mastných kyselin, dávka 15 mg vitaminu E.⁽¹⁶⁾

3 ZMĚNY BILOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK V PRŮBĚHU ZRÁNÍ A ZPRACOVÁNÍ RAJČAT

Rajčata obsahují mnoho esenciálních živin, hlavně vitaminy A, C, E, foláty a různé biogenní prvky. Jsou také dobrým zdrojem karotenoidů.⁽⁹⁾

Během zrání mění rajčata barvu ze zelené přes oranžovou do jasně červené. Rajčata a výrobky z rajčat obsahují lykopen a β -karoten. β -karoten je karotenoid, který je schopen se přeměňovat na retinol lépe než jiné karotenoidy. β -karoten a lykopen jsou esenciální složky. Lykopen je hlavní karotenoid vyskytující se v rajčatech a výrobcích z rajčat, zabraňuje oxidaci LDL cholesterolu a snižuje riziko rozvoje aterosklerózy a kardiovaskulárních onemocnění. Lykopen je dvakrát účinnější antioxidant než β -karoten a desetkrát účinnější než vitamin E.

Ochranného účinku lykopenu lze dosáhnout pitím dvou sklenic rajčatové šťávy denně. Výzkumy ukazují, že lykopen z rajčat může být efektivněji využit pokud je podáván ve zpracovaných výrobcích, jako jsou rajčatová šťáva, omáčka, pasta nebo kečup. Využitelnost lykopenu se zvyšuje působením vyšších teplot při zpracování.⁽⁹⁾

4 METODY STANOVENÍ BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK V RAJČATECH

4.1 Přírodní antioxidanty

Ke stanovení antioxidantů v potravinářství je zapotřebí nejprve vhodným způsobem antioxidanty izolovat, nejčastěji selektivní extrakcí. K vlastnímu stanovení se nejčastěji využívá různých chromatografických technik, např. dvourozměrné tenkovrstvé chromatografie, plynové chromatografie, nebo vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC (High Performance Liquid Chromatography), kombinovaných někdy se spektrofotometrickým stanovením.⁽⁴⁾

Přirozeně se vyskytující antioxidanty se stanovují metodou RP-HPLC s UV-VIS nebo ECD detektorem. Kulometrická detekce poskytuje vysokou selektivitu a citlivost s detekcí v $\mu\text{g.l}^{-1}$.⁽¹¹⁾

4.2 Vitamin A a vitamin E

Vitaminy rozpustné v tucích se stanovují metodou HPLC s elektrochemickou detekcí. Elektrochemická detekce zajistí citlivost i na nízká množství stanovovaných látek. Používají se mobilní fáze obsahující methanol a octan amonný v poměru 90:10, nebo methanol, 1-propanol a octan amonný v poměru 78:20:2. Rychlost průtoku kolonou je 0,8 ml za minutu, teplota stanovení 37°C a promývacím rozpouštědlem je 2-propanol.⁽²⁰⁾

Také lze použít stanovení s použitím mobilních fází obsahujících kyanid methylnatý ve směsi s vodou nebo s 1-propanolem s přidavkem kyseliny chloristé a chloristanu sodného. Rychlost průtoku v koloně je 1,5 ml za minutu a teplota stanovení je 32°C.⁽¹⁹⁾

4.3 Vitamin C

Ke stanovení kyseliny L-askorbové a L-dehydroaskorbové se používá velké množství metod, které lze rozdělit do několika skupin:

1. stanovení kyseliny askorbové titračními metodami,
2. spektrofotometrické metody,
3. polarografické metody,
4. chromatografické metody.

4.3.1 Titrační stanovení kyseliny L-askorbové

Kyselina L-askorbová se v kyselém prostředí oxidačně redukuje 2,6-dichlorfenolindofenolem na kyselinu L-dehydroaskorbovou; 2,6-dichlorfenolindofenol se redukuje na bezbarvou bázi. Jako oxidační činidlo nalezl největší uplatnění 2,6-dichlorfenolindofenol. Tyto metody však nejsou specifické a jsou rušeny přítomností látek schopných za daných experimentálních podmínek oxidace. Některé z nich je možné eliminovat například tvorbou kondenzačních produktů s formaldehydem.

Metoda je vhodná pro většinu potravinářských výrobků. Není však specifická a je rušena především látkami obsahujícími thiolové skupiny a redukty. Jsou-li ve vzorku přítomny ve vyšší koncentraci, je nutno pracovat podle speciálního pracovního postupu. Titrační metoda je velmi rychlá a vhodná především pro sledování úbytku kyseliny L-askorbové během technologického procesu.⁽¹³⁾

4.3.2 Spektrofotometrické stanovení kyseliny L-askorbové

Stanovení je založeno na měření úbytku absorbance modrého zbarvení 2,6-dichlorfenolindofenolu po reakci s kyselinou L-askorbovou v prostředí benzenu. Také lze použít měření některých barevných produktů, které poskytuje kyselina L-askorbová například s diazotovaným 4-methoxy-2-nitroanilinem, nebo na stanovení barevného produktu, který poskytuje kyselina L-dehydroaskorbová vzniklá oxidací bromem z kyseliny L-askorbové s 2,4-dinitrofenylhydrazinem. Tento postup není specifický a je nutné jej kombinovat s chromatografickým čištěním příslušných hydrazonů. Metoda se používá hlavně u zbarvených roztoků vzorků.⁽¹³⁾

4.3.3 Chromatografické stanovení kyseliny L-askorbové

Metody chromatografického stanovení jsou založené na oddělení interferujících složek některou chromatografickou technikou a na stanovení kyseliny L-askorbové

z velikosti plochy skvrn na chromatogramu nebo na jejím stanovení titrační metodou po eluci. Volba vhodné metody se řídí typem analyzovaného materiálu a požadavkem na přesnost stanovení. Pro některé srovnávací pokusy je postačující i nesespecifická titrační metoda.

Kyselina L-askorbová se oddělí chromatografií na papíře od ostatních rušivých látek, skvrny se vyloučí a kyselina L-askorbová se stanoví kolorimetricky z úbytku absorbance modrého zbarvení 2,6–dichlofenolindofenolu.

Metodu lze použít jen pro takový materiál, ze kterého lze získat extrakt obsahující 5 až 20 µg kyseliny askorbové v 10 až 100 µl. Metodu lze použít pro analýzu vzorků s vysokým obsahem interferujících látek, je však časově velmi náročná.⁽¹³⁾

4.3.4 Chromatografické dělení a stanovení vitamínu C ve formě bis–2,4–dinitrofenylhydrazonu

Kyselina L-askorbová reaguje po oxidaci bromem s 2,4–dinitrofenylhydrazinem za tvorby bis–2,4–dinitrofenylhydrazonu. Od ostatních derivátů, které ruší přímé spektrofotometrické stanovení se hydrazon kyseliny L-dehydroaskorbové oddělí tenkovrstvou chromatografií na vrstvě silikagelu, vyloučí se a stanoví spektrofotometricky.

Metodu lze použít pro všechny druhy potravin neobsahující vyšší množství jiných karbonylových látek poskytujících hydrazony, jinak není chromatografické dělení ostré. Nevýhodou tohoto postupu je poměrně značná časová náročnost.⁽¹³⁾

4.3.5 Stanovení přímou metodou HPLC/UV-VIS nebo HPLC/ECD

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je separační metoda, která se využívá k rozdělování směsí a následnému stanovování jednotlivých složek směsi vhodnou metodou. Tato metoda má velmi široké použití, vyznačuje se rychlostí a vysokou citlivostí. HPLC se řadí do sloupcové chromatografie. Sloupec obsahuje stacionární část, která je spojena s vhodnou maticí a je umístěna do kovové kolony, a pohyblivou část, která prochází kolonou. Průchod mobilní fáze není samovolný, je nutno použít čerpadla.⁽¹⁵⁾

V kapalinové chromatografii se využívají čtyři systémy podle převažujícího mechanismu separace:

- kapalinová adsorpční chromatografie (LSC, liquid-solid chromatography),
- kapalinová rozdělovací chromatografie (LLC, liquid-liquid chromatography),
- gelová permeační chromatografie (GPC, gel permeation chromatography),
- iontově výměnná chromatografie (IEC, ion exclusion chromatography).

Ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii plníme skleněnou trubici délky asi 0,5 m a průměru asi 2 cm zrnitým sorbentem, jakým je například oxid hlinitý. Na horní vrstvu náplně dávkujeme malé množství vzorku a pak přidáváme mobilní kapalnou fázi. Pro analytické účely se používají kolony o délce 5 až 30 cm.⁽¹⁸⁾

Kapalinový chromatograf může obsahovat zásobníky na více kapalin a je možné naprogramovat zařízení pro řízení změn ve složení výsledné mobilní fáze. Zůstává-li složení mobilní fáze stálé, hovoříme o isokratické eluci. Kapalina se do kolony čerpá pístovými nebo membránovými čerpadly. Obvykle pracují dvě čerpadla tak, aby na sebe navazovaly fáze výtlačku a fáze sání. Kolony používáme pouze náplňové. Jsou ze silného borosilikátového skla pro nižší tlaky nebo z nerezavějící oceli pro tlaky vysoké (kolem 50 MPa).⁽¹⁸⁾

4.4 Karotenoidy

Pro jejich stanovení se využívá jejich barevnosti, po chromatografickém rozdělení se stanoví spektrofotometricky. Pokud se nesledují fyziologicky významné deriváty, lze je stanovit pouze měřením absorpance při vlnové délce 450 nm.⁽²⁾

K izolaci karotenoidních barviv z rostlinných zelených materiálů slouží buď přímá extrakce acetonem, nebo extrakce diethyletherem po zmýdelnění alkalickým hydroxidem. Tímto způsobem se ze vzorku odstraní přítomné tuky, které by ve většině případů měly při stanovení karotenoidů, resp. jejich bližší identifikaci, rušivý vliv. Pokud jde o stanovení jednotlivých karotenoidních barviv je nutné směs karotenoidů po extrakci rozdělit některou z vhodných dělicích technik. Pro praktické účely našla uplatnění především kapalinová

chromatografie na oxidu hlinitém a hořečnatém. K identifikaci lze rovněž použít R_F (retenční faktor) po rozdělení na papíře s obrácenými fázemi nebo na tenké vrstvě a po eluci rozdělených látek a spektrofotometrické charakterizaci.⁽²⁾

Pro analýzu se karotenoidy z různých materiálů získávají extrakční metodou. Nejvhodnějšími extrakčními činidly jsou ethanol a hexan.⁽¹⁴⁾

4.4.1 Stanovení karotenoidních barviv

Karotenoidní barviva se ze vzorků extrahují organickým rozpouštědlem a chromatograficky dělí na sloupci oxidu hlinitého a oxidu hořečnatého. Oddělená barviva se stanoví spektrofotometricky.

Metoda je vhodná pro stanovení karotenoidních barviv v obilí, těstovinách, sušených rajčatových polévkách, sýrech, krmivech a jiných materiálech.⁽¹³⁾

4.4.2 β -karoten

Krystaluje z methanolu v tmavě fialových šesterečných hranolcích, z petroletheru krystaluje ve fialových destičkách kovového lesku. Bod tání má 182–184°C.⁽²⁾

4.4.3 Spektrofotometrické stanovení karotenu

Žlutavě zbarvený petroletherový extrakt vzorku se čistí chromatograficky na sloupci oxidu hlinitého; karoteny se po eluci stanoví spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm. U materiálů s vyšším obsahem tuků se karoteny extrahují až po zmýdelnění.

Metodu lze použít pro všechny druhy potravinářských surovin i potravin. Pouze způsoby čištění mohou být v jednotlivých případech rozdílné.⁽¹³⁾

4.4.4 Stanovení retinolu a β -karotenu kapalinovou chromatografií

Retinol a β -karoten se izolují ze vzorku nejčastěji po zmýdelnění extraktu n-hexanem, dělí se na sloupci oxidu hlinitého s obsahem 5 % vody a stanoví se spektrofotometricky. Taktéž lze použít extrakci retinolu a β -karotenu pomocí n-hexanu a methanolu. Rozpuštěné vzorky v methanolu lze aplikovat na kolonu za použití methanolu

jako imobilní fáze. Pokud se použije UV/VIS detektor, pak tyto látky mají absorpční při 450 nm.

Metoda je vhodná pro všechny druhy potravin obsahující vyšší množství retinolu a β -karotenu. Ve srovnání s klasickými metodami je značně rychlá. Dělení lze provádět automaticky za použití vhodného zařízení pro kapalinovou chromatografii.⁽¹³⁾

4.5 Chlorofyly

Ke stanovení celkového obsahu chlorofylu se používá spektrofotometrických metod. Pro odlišení chlorofylů se využívá odlišné absorpce těchto látek v různých rozpouštědlech.⁽²⁾

Chlorofyly lze stanovit po extrakci acetonem, změřením absorpce při vlnových délkách 663 nm a 645 nm oproti acetonu jako blanku. Množství chlorofylů se vypočte podle vztahů, zvláště pro chlorofyl a i pro chlorofyl b, nebo lze vypočítat celkovou koncentraci obou barviv.⁽¹⁷⁾

ZÁVĚR

Rajče jedlé je zdrojem mnoha biologicky aktivních látek. Mezi ně se řadí především vitaminy, dále β -karoten a lykopen. Z vitaminů jsou obsaženy retinol (vitamin A), tokoferol

(vitamin E) a kyselina L-askorbová (vitamin C). Většina biologicky aktivních látek se řadí zároveň mezi antioxidanty. Takto se označují všechny látky, které jsou schopny svou přítomností zpomalovat autooxidační reakce. β -karoten a lykopen se zařazují do skupiny karotenoidů. Jsou to látky barevné. Za svoji barevnost vděčí řetězci konjugovaných dvojných vazeb, které se vyskytují v několika základních strukturách. Karotenoidy jsou nepostradatelnými látkami podmiňujícími schopnost jak černobílého, tak barevného vidění.

Nejdůležitější částí této práce bylo posouzení jednotlivých metod stanovení biologicky aktivních látek. Ke stanovení těchto látek se využívá mnoho různých metod.

Ke stanovení kyseliny L-askorbové a L-dehydroaskorbové lze použít metody chemické (titrační), spektrofotometrické, chromatografické a polarografické. Titrační metoda je založena na oxidaci kyseliny L-askorbové na kyselinu L-dehydroaskorbovou v kyselém prostředí. Jako činidlo se používá 2,6-dichlorfenolindofenol. Tato metoda je velmi rychlá a používá se především pro sledování úbytku kyseliny L-askorbové během technologického procesu. Spektrofotometrické metody jsou založeny na měření úbytku absorbance barevných produktů kyseliny L-askorbové. Tyto metody jsou vhodné pro barevné vzorky. Polarografické metody využívají ke stanovení kyseliny L-askorbové její oxidace na rtuťové kapkové elektrodě. Dnes se již téměř nepoužívají. Chromatografické metody jsou založeny na oddělení interferujících složek ze vzorku použitím některé chromatografické techniky. Následuje stanovení kyseliny L-askorbové z velikosti plochy skvrn na chromatogramu nebo její stanovení titrační metodou po eluci.

β -karoten a chlorofyly lze stanovit spektrofotometricky. Nejčastěji se ovšem používá,

u všech biologicky aktivních látek, stanovení chromatografické. Nejběžnější je použití metody kapalinové chromatografie HPLC s následným spektrofotometrickým stanovením zkoumaných látek. Tato metoda má velmi široké použití, je rychlá a velmi citlivá.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HLÚBIK, P., OPLTOVÁ, L. *Vitaminy*. Grada Publishing a. s., Praha, 2004. ISBN 80-247-0373-4
- [2] DAVÍDEK, J. , JANÍČEK, G. , POKORNÝ, J. *Chemie potravin*. SNTL, Praha, 1983
- [3] DUCHOŇ, J. a kol. *Lékařská chemie a biochemie*, učebnice pro lékařské fakulty. AVICENUM, zdravotnické nakladatelství, n. p. , Praha, 1985
- [4] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2*. OSSIS, Tábor, 1999
- [5] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*. OSSIS, Tábor, 1999
- [6] BIGGS, M. *Zelenina, velká kniha zeleninových druhů*. VOLVOX GLOBATOR, Praha, 1997, ve spolupráci s londýnským nakladatelstvím Kyle Cathie Limited
- [7] TYMČENKO, V. J. , JEFREMOVOVÁ, T. G. *Atlas škůdců a chorob zeleniny a bramboru*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 1987
- [8] *Zelenina a koření – zahrada rostlin*. karta 7, skupina 12
- [9] *VITAMINS 2005*. The Abstract Book. Pardubice, September, 14-15, 2005, str. 33
- [10] *VITAMINS 2005*. The Abstract Book. Pardubice, September, 14-15, 2005, str. 87
- [11] *VITAMINS 2005*. The Abstract Book. Pardubice, September, 14-15, 2005, str. 89
- [12] *VITAMINS 2005*. The Abstract Book. Pardubice, September, 14-15, 2005, str. 146
- [13] DAVÍDEK, J. a kol. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. SNTL, Praha, 1981
- [14] TAUNGBODHITHAM, A. K. a kol. *Food Chemistry*, Volume 63, Issue 4, December 1998, [online], [citováno 24.4.2005] , dostupné z internetu: < www.sciencedirect.com >, str. 577-584
- [15] WILSON, K. , WALKER, J. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. Fifth edition. Cambridge University Press 2000. ISBN 0521 65 87 3X (paperback)
- [16] HOZA I. , KRAMÁŘOVÁ, D. , BUDÍNSKÝ, P. *Potravinářská biochemie II*. skriptum UTB ve Zlíně. UTB ve Zlíně 2006. ISBN 80-7318-395-1
- [17] *Návody do laboratorních cvičení z biochemie*, přístupné z intranetu UTB ve Zlíně

-
- [18] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Učebnice základů instrumentálních analytických metod. Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava. ISBN 80-902155-0-5
- [19] *Simultaneous Measurement of Vitamins A, D, E, K along with Coenzym Q₁₀ and Carotenoids*. <www.esainc.com>
- [20] *Simultaneous Analysis of Carotenoids, Retinoids, Tocoferols, Vitamin K₁ and Coenzym Q₁₀*. <www.esainc.com>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ECD	Electrochemical detection, elektrochemická detekce
GPC	Gel Permeation Chromatography, gelová permeační chromatografie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEC	Ion Exclusion Chromatography, iontově výměnná chromatografie
ICHS	Ischemická choroba srdeční
IU	International Units, mezinárodní jednotky
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry, Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii
LDL	Low Density Lipoprotein, lipoprotein s nízkou hustotou
LLC	Liquid-Liquid Chromatography, kapalinová rozdělovací chromatografie
LSC	Liquid-Solid Chromatography, kapalinová adsorpční chromatografie
RP-HPLC	Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenou fází
UL	Untolerable Limit, nejvyšší přípustná mez
UV-VIS	Ultraviolet-Visible, ultrafialová a viditelná oblast světla

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Rajče jedlé	10
---------------------------	----

SEZNAM TABULEK

Tab. 3. Hniloby rajčat	11
Tab. 4. Choroby rajčat	12

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA P I: Rajče keříčkovité

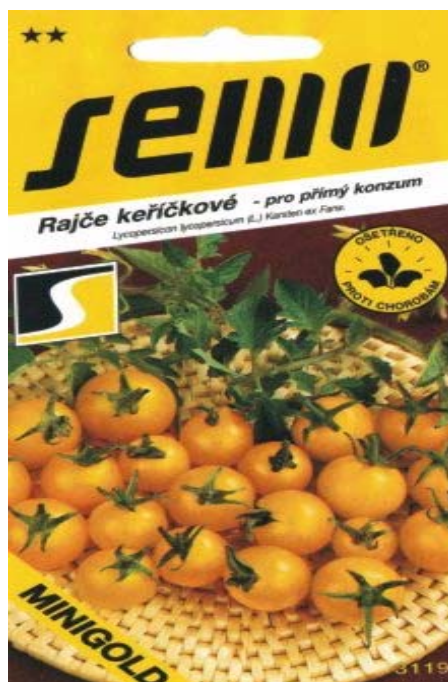
PŘÍLOHA P II: Rajče jedlé

PŘÍLOHA P III: Druhy rajčat

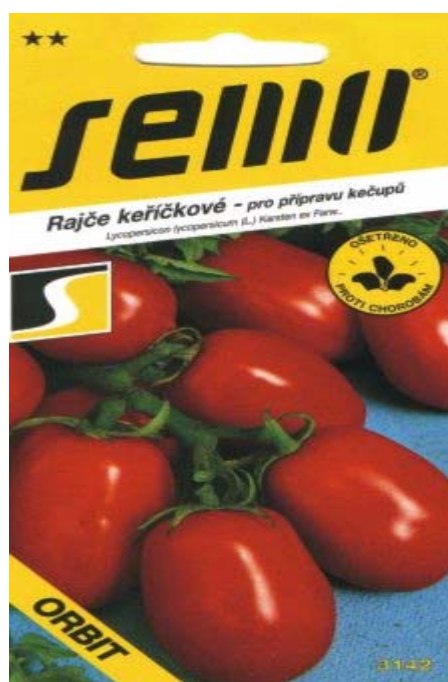
PŘÍLOHA P IV: Škůdci rajčat

PŘÍLOHA P V: Virózy rajčat

PŘÍLOHA P I: RAJČE KEŘIČKOVITÉ



Obr. 2. Rajče keříčkové-třešňovité



Obr. 3. Rajče keříčkové-vejcovité

PŘÍLOHA P II: RAJČE JEDLÉ



Obr. 4. Rajče jedlé-masité



Obr. 5. Rostlina rajčete

PŘÍLOHA P III: DRUHY RAJČAT

Tab. 1. Přehled druhů rajčat

Forma plodu rajčete	Druh rajčete	Popis druhu rajčete
TŘEŠŇOVITÁ	„Sweet 100“	sladká, 2,5 cm velké plody, velké trsy rajčat
	„Evita“	jasně červená, pravidelně velké plody, vynikající chuť, robustní
	„Mirabell“	zlatožlutá, asi 2 cm velké plody, roste kaskádovitě
VEJCOVITÁ	„Roma“	rajče se silnou slupkou a málo semeny, lahodná chuť
	„San Marzano“	velké, podlouhlé plody, choulostivá
STŘEDNĚ VELKÁ	„Martina“	jasně červená, pevné plody, nepraskají, vzrostlá a zdravá
	„Zlatá královna“	zlatožluté pevné plody, velmi bohatá odrůda na výnosy
	„Oheň Harzu“	polozelené rajče, velmi osvědčená a zdravá odrůda
	„Balkonstar“	keřovité rajče, stejnoměrně velké, světlé plody, robustní
MASITÁ	„Master“	velké, kulaté plody, mohutný zdravý vzrůst
	„Beefmaster“	velké šťavnaté plody, se silnou slupkou, plody až do 1 kg, odolné proti napadení plísní, robustní
	„Supermarmande“	zploštělé, trochu žebrované plody, visí v hroznech, odolné proti chorobám

PŘÍLOHA P IV: ŠKŮDCI RAJČAT

Tab. 2. Škůdci rajčat

Škůdci rajčat	Účinek škůdce
Vlnovník	Vysává šťávu z lodyh, listů a plodů rajčat
Krtonožka obecná	Nejvíce poškozuje sadbu a rané zeleniny ve sklenicích, kde se živí kořinky mladých rostlin. Překusuje kořinky a stonky rostlin.
Mšice broskvoňová	Živí se šťávou rostlin, vyvolává zkadeření listů, zbrždění růstu a při silném napadení i odumírání celých rostlin.
Drátovci	Podhryzávají nebo překusují podzemní části stonků rostlin.
Potemníci a jejich larvy	Vykusují na klíčcích rostlinách a mladých vysázených sazenicích děložní listy i mladé pravé listy, překusují stonky u kořenového krčku.
Molice skleníková	Larvy vysávají z listových pletiv šťávu, napadené listy se zkrucují.
Třásněnka skleníková	Vysávají šťávu z listů, poškozené listy žloutnou a usychají.
Sviluška chmelová	Svilušky propichují pokožku na rubu listu a živí se rostlinnou šťávou. Poškozené listy usychají a odumírají, rostliny zaostávají v růstu a předčasně ukončují vegetaci.
Kořenová háďátka	Živí se pletivy v kořenech rostlin, vytvářejí nádorky, tzv. hálky.

PŘÍLOHA P V: VIRÓZY RAJČAT

Tab. 5. Virózy rajčat

Virózy rajčete	Účinek virózy
Nekrotická proužkovitost	Na stoncích, řapících listů a stopkách plodů se tvoří přerušované, skořicově hnědočervené čárky a proužky. Na listech se choroba projevuje tmavými nekrotickými skvrnami. Původcem choroby je virus mozaiky tabáku.
Mozaika	Napadené listy se stávají mozaikovými, tmavě zelené partie se střídají se žlutozelenými. Na plodech se objevuje ve formě střídajících se červených a světle zelených skvrn.
Hniloba plodů	Na vrcholu plodů se tvoří velká, zelená, vodnatá skvrna, která tmavne a vrcholek plodu se zplošťuje, tvrdne a stává se zvrásněným.