

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

BIOCHEMICKÉ ASPEKTY KONZUMACE
ČOKOLÁDY

AUTOR PRÁCE: Jana Řihošková

VEDOUcí PRÁCE: RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.

2009

UNIVERSITY OF PARDUBICE

FACULTY OF CHEMICAL-TECHNOLOGY

DEPARTMENT OF ANALYTICAL CHEMISTRY

**BIOCHEMICAL ASPECTS OF CHOCOLATE
CONSUMMATION**

AUTHOR:

Jana Řihošková

SUPERVISOR:

RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.

2009

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra analytické chemie
Akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jana ŘIHOŠKOVÁ**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**

Název tématu: **Biochemické aspekty konzumace čokolády**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Vypracujte teoretickou rešerši zabývající se biochemickými aspekty konzumace čokolády.
Zaměřte se na:

- 1) Biochemicky důležité látky obsažené v čokoládě.
- 2) Pozitivní a negativní vlivy čokolády na lidské zdraví.
- 3) Možnosti stanovení vybraných látek obsažených v čokoládě.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

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

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce:

23. února 2009

Termín odevzdání bakalářské práce:

26. června 2009



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Vytřas, DrSc.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2009

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 25. června 2009

Jana Řihošková

Na tomto místě bych ráda poděkovala RNDr. Lucii Korecké, Ph.D. za veškerou pomoc s bakalářskou prací.

Poděkování patří také mé rodině za jejich všestrannou podporu po celou dobu studia.

Souhrn

Tato bakalářská práce se zabývá látkami obsaženými v čokoládě a zejména jejich pozitivními a negativními účinky na lidské zdraví. V úvodní části jsou uvedeny látky bez pozitivního vlivu na lidský organismus, další část je věnována látkám s pozitivním vlivem na organismus, zejména pak na látky patřící do skupiny flavonoidů, které vykazují antioxidační vlastnosti, a tím jsou důležitými faktory v ochraně zdraví a zvláště kardiovaskulárního systému. V práci jsou rozebrány jednotlivé látky s ohledem na jejich strukturu a biochemii. Poslední část práce je věnována metodám stanovení vybraných látek, zejména flavonoidů.

Klíčová slova:

- Čokoláda
- Flavonoidy
- Stanovení fenolických látek

Summary

This thesis is considered on chocolate composition and especially its positive and/or negative influence of human health. In the first part is aimed to substances without any positive effect to organism, the next part is focused on substances with positive influence of human health, particularly on flavonoids which act as antioxidants. They play an important role in health protection especially cardiovascular system. The substances are described with respect to their structure and biochemistry. The last part is devoted to the methods which could be used for analysis of chocolate, mainly for determination of selected fenolic compounds presented in chocolate.

Keywords:

- Chocolate
- Flavonoids
- Determination of phenolic compounds

Seznam zkratek

LDL	lipoprotein o nízké hustotě (low density lipoprotein)
HDL	lipoprotein o vysoké hustotě (high density lipoprotein)
PEA	fenyletylamin
DNA	deoxiribonukleová kyselina
$O_2^{\bullet-}$	superoxidový radikál
e^-	elektron
O_2	kyslík
H^+	vodíkový iont
H_2O_2	peroxid vodíku
HO^{\bullet}	hydroxylový radikál
OH^-	hydroxidový anion
Fe^{2+}	dvojmocné železo
Fe^{3+}	trojmocné železo
HCl	chlorovodíková kyselina
SFE	extrakce nadkritickou tekutinou (supercritical fluid extraction)
CO_2	oxid uhličitý
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
NP-HPLC	Chromatografie v systémech s normálními fázemi (high-performance normal-phase liquid chromatography)
RP-HPLC	Chromatografie v systémech s obrácenými fázemi (high-performance reversed-phase liquid chromatography)
SF	stacionární fáze
MF	mobilní fáze

Obsah

1	ÚVOD	10
2	HISTORIE ČOKOLÁDY	10
3	LÉČIVÁ ČOKOLÁDA V HISTORII	11
4	SLOŽENÍ ČOKOLÁDY	11
4.1	Látky bez pozitivního biochemického vlivu	11
4.1.1	Cukr a tuk	11
4.1.2	Methylxanthiny	12
4.1.3	Biogenní aminy	12
4.1.4	N-acetyletanolaminy	13
4.2	Látky s pozitivním biochemickým vlivem	13
4.2.1	Polyfenoly	14
4.2.1.1	Flavonoidy	14
4.2.2	HLAVNÍ VÝZNAM polyfenolů	19
4.2.2.1	Antioxidační vlastnosti	19
4.2.2.2	Volné radikály	20
4.2.2.3	Vznik volných radikálů	20
4.2.2.4	Oxidační stres	21
4.2.2.5	Oxidace LDL cholesterolu a aterosklerosa	22
4.2.3	Stanovení polyfenolů	23
4.2.4	Metody stanovení	26
4.2.4.1	Extrakce	26
4.2.4.2	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography, HPLC)	27
4.2.4.3	Kolorimetrie	28
5	ZÁVĚR	30
6	POUŽITÁ LITERATURA	31

1 Úvod

V poslední době čokoláda budí čím dál více pozornosti a to kvůli látkám v ní obsaženým. Čokoláda neobsahuje jen zdraví neprospěšné tuky, cukry, methylxantiny, biogenní aminy, N-acetylethanolaminy, které potenciálně způsobují vznik nadváhy a závislost, ale hlavně látky, které mohou být zdraví prospěšné, a to minerály, vitamíny a polyfenoly. Mezi polyfenoly patří flavonoidy, stilbeny, lignany a fenolové kyseliny. Tato bakalářská práce se zabývá vedle výše zmíněných látek zejména flavonoidy, mezi které řadíme flavonoly, flavony, isoflavony, flavanony, anthocyanidiny a flavanoly. Tyto látky působí příznivě na náš organismus jako tzv. antioxidanty. Antioxidanty ničí volné radikály, které vznikají v našem organismu působením mnoha faktorů jako např. stres, kouření, špatná životospráva, pobyt ve znečištěném prostředí a v neposlední řadě prostým stárnutím organismu. Volné radikály oslabují náš organismus tím, že napadají biologicky významné sloučeniny, především bílkoviny, lipidy a nukleové kyseliny, pozměňují strukturu buněk a v konečném důsledku mohou vést ke zhoubnému nádorovému bujení. Oxidují LDL cholesterol, jenž se usazuje v cévách jako estery cholesterolu a tím podporuje vznik aterosklerozy. HDL cholesterol, který vzniká působením nasycených mastných kyselin, inhibuje oxidaci LDL cholesterolu a tím brání vzniku aterosklerozy a také kardiovaskulárních nemocí. Stanovení flavonoidů je závislé na použité metodě, např. kolorimetrickou metodou byly získány mnohem vyšší výsledky než při HPLC, ale také na použitém standardu: katechin, kyselina galová nebo jiné látky.

2 Historie čokolády

Původní čokoláda pochází z Mexika, kde Majové, Olmekové a Aztékové pěstovali kakaový strom (*Theobroma Macao*) a jeho plody nabízeli Bohům. Čokoládu jako samotnou považovali za afrodiziakum a byla dostupná jen vládnoucí třídě [1].

Kakaové boby (KB) se též používaly jako platidlo, např. za 10 KB šlo pořídit králíka a za 100 KB otroka [2].

Důležitým mezníkem pro čokoládu se stal rok 1502. Tehdy se s ní setkal Kryštof Kolumbus. Sice mu nechutnala (asi proto, že se tam přidávala kukuřičná mouka, různé koření jako vanilka a chilli [3]) přesto se rozhodl vzít kakaové boby do Evropy. A když

mexické misionářky přidaly cukr, vznikl sladký nápoj, jehož popularita začala prudce stoupat [3].

Ačkoliv známe mnoho různých typů, z pěstitelského hlediska dělíme kakaové boby na 3 základní: Criollo, Forastero a Trinitario [1]. Criollo je považováno za kvalitnější, avšak za méně odolnější a náročnější na půdu. Je také podstatně dražší. Mezi dnešní pěstitelé criolla patří hlavně Venezuela, Madagaskar, Srí Lanca a Indonésie. Forastero se dnes pěstuje hlavně v Brazílii a západní Africe [3]. Trinitario je přírodní hybrid odrůd Criollo a Forastero. Svůj název získalo podle ostrova Trinidad, odkud pochází [4].

V roce 1847 vznikla první tuhá čokoláda smícháním kakaového másla, kakaového prášku a přidáním cukru, která se stala levnější a všem společenským vrstvám dostupnější.

První mléčná čokoláda byla vyrobena v roce 1875 přidáním kondenzovaného mléka [3].

3 Léčivá čokoláda v historii

V 17. a 18. století se čokoláda prodávala v lékárnách a věřilo se, že je lékem na různé nemoci. Podle lékařů prodlužovala život, působila proti nespavosti, pročišťovala krev, snižovala horečky a měla spoustu dalších účinků. Dokonce mnoho lékařských autorit 18. století trvalo na tom, že čokoláda je celkově prospěšná, pokud jí není příliš. Čokoláda může také léčit deprese, pocit podrážděnosti a zlepšovat náladu [5]. Evropané věřili, že čokoláda má příznivý vliv na srdce, játra, zažívání, anemii, tuberkulózu, horečku, dnu a dělá lidi šťastnější [6].

4 Složení čokolády

4.1 LÁTKY BEZ POZITIVNÍHO BIOCHEMICKÉHO VLIVU

4.1.1 CUKR A TUK

Ačkoli návykové chování je obecně spojeno s užíváním drog a alkoholu nebo nutkavé sexuální aktivitě, čokoláda může vyvolávat podobné psychologické reakce u citlivých osob jako např. drogy [1].

Podle vědeckých závěrů cukr a tuk vyvolávají smyslové uspokojení a působí na hormonální mechanismus a způsobuje závislost [7].

Suchý kakaový bob obsahuje 50% až 57% kakaového másla, které je odpovědné za vlastnosti čokolády. Převažují nasycené mastné kyseliny (stearová 35% a palmitová 25%) mononenasycené (olejová 35%), zbývající tuk je především polynenasycená mastná kyselina linolová (3%). Obecně lze říci, že nasycené mastné kyseliny stearová a palmitová zvyšují riziko vzniku ischemické srdeční choroby a rozvoj trombózy, neboť zvyšují hladinu lipidů a lipoproteinů v plazmě [6].

4.1.2 METHYLXANTHINY

Další látky objevující se v čokoládě jsou alkaloidy methylxantinu (viz obr. 1), především se jedná o kofein a theobromin [1]. Kofein stimuluje centrální nervovou soustavu a srdeční činnost [8], theobromin má podobné účinky jako kofein, ale v mnohem menším měřítku [9].

Kakao a čokoládové výrobky mohou být toxické nebo smrtící pro psy a jiná domácí zvířata, jako jsou koně, protože tato zvířata tráví theobromin pomaleji než lidé [9].

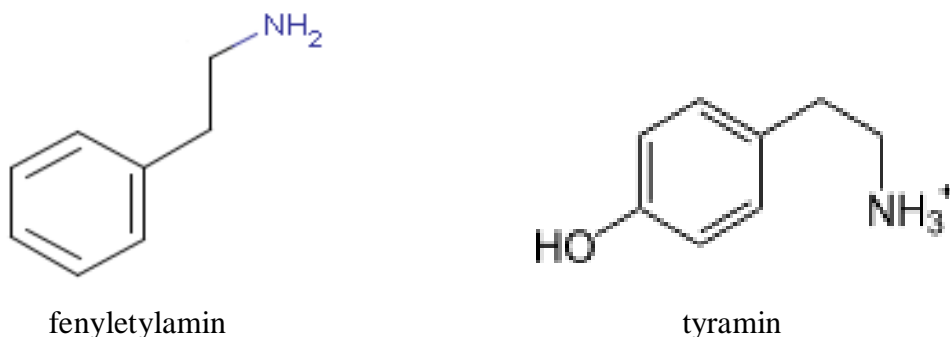


Obr. č. 1: **Struktury methylxanthinů** (převzato z [10])

4.1.3 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární organické dusíkaté báze (viz obr. 2) a jsou přítomny ve všech živých organismech [11]. Biogenní aminy jsou látky endogenního původu, působící jako sympathomimetikum. V čokoládě nalezneme zvláště pak tyramin a fenyletylamin (PEA). PEA působí jako neuromodulátor a strukturně i farmakologicky je podobný katecholaminu a amfetaminu. Několik studií ukázalo, že PEA je důležitý modulátor nálad, a že nízká hodnota může způsobovat patologické deprese. PEA v tkáních může způsobovat snížení depresí. V čokoládě je obsah této látky 0,4-6,6 $\mu\text{g/g}$ a někteří

experti tvrdí, že touha po čokoládě je způsobená právě touto látkou na zlepšení nálady. PEA je v těle velmi rychle rozložen, jeho poločas rozpadu je 5 – 10min. [1].



Obr. č. 2: **struktury biogenních aminů** (převzato z [11, 12])

4.1.4 N-ACETYLETANOLAMINY

Mezi *N-acetylethanolaminy* s vyšším zastoupením v čokoládě jsou *N-oleylethanolamin* a *N-linoleylethanolamin*. Neaktivují cannabinoidní receptor, ale účinně inhibují rozpad anandamidu. Naznačuje to, že tyto látky mohou přispívat k neodolatelné touze po čokoládě tím, že zabraňují rozpadu anandamidu a ten se v místech jeho účinku hromadí [1, 14, 15].

Anandamid (arachidonoylethanolamid; AEA) je endogenní cannabinoid, neboť se v mozku váže na receptory, na které se váže také psychotomimeticky aktivní (-)-trans- Δ^9 -tetrahydrocannabinol, rostlinný cannabinoid z *Cannabis sativa* (hašiš, marihuana). Nalézají se v některých zvířecích a lidských orgánech, především pak v mozku. Anandamid funguje buď jako neuromodulátor nebo jako neurotransmiter. Tato informační molekula hraje roli v bolesti, depresi, chuti k jídlu, paměti a plodnosti [1, 14, 15, 16].

Vzhledem k jeho nízkému obsahu v čokoládě jsou však uvedené neurochemické efekty nevýznamné [1].

4.2 LÁTKY S POZITIVNÍM BIOCHEMICKÝM VLIVEM

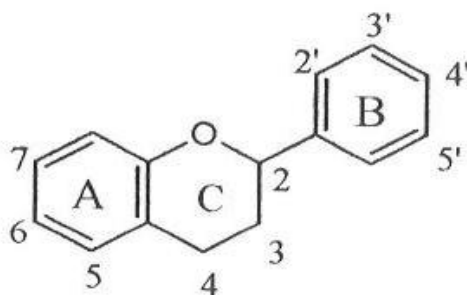
Mezi látky s pozitivním vlivem obsažené v čokoládě patří polyfenoly, ale i nenasycené kyseliny (olejová 35% a linolová 3%), které se od nasycených (stearová 35% a palmitová 25%) liší tím, že nezvyšují hladinu cholesterolu v krvi a tím potencionálně zabranují vzniku aterosklerosy [17].

4.2.1 POLYFENOLY

Jejich přítomnost byla zjištěna ve vyšších rostlinách. Tyto molekuly jsou sekundární metabolity rostlin a jsou obvykle zapojeny do obrany proti ultrafialovému záření nebo agresivním patogenům. Tyto sloučeniny mohou být zařazeny do různých skupin v závislosti na počtu fenolových kruhů, které obsahují konstrukční prvky vázané na tyto kruhy jako např. hydroxylové skupiny. Rozdíly jsou tedy mezi fenolovými kyselinami, flavonoidy, stilbeny a lignany. Flavonoidy mají společnou základní strukturu a mezi ně patří: flavonoly, flavony, isoflavony, flavanony, anthocyanidiny a flavanoly [18].

4.2.1.1 Flavonoidy

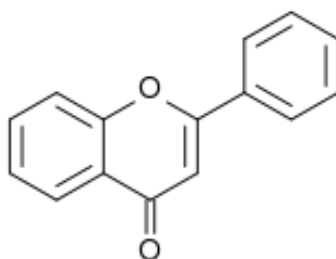
Flavonoidy jsou velká skupina látek, které obsahují flavanový skelet. Flavanový skelet sestává ze dvou benzenových jader (krajní) a prostředního pyranového cyklu. Značení kruhů je zleva doprava A, C, B (viz obr. 3). Prostřední pyranový cyklus s kyslíkem je zodpovědný za typické reakce flavonoidů. Fenyl B může být napojen v takové pozici jako je uvedeno 3 (tzv. normální flavonoidy, mezi něž patří většina flavonoidních barviv) či na druhé straně dvojné vazby (tzv. isoflavonoidy) a nebo je napojen na uhlík číslo (tzv. neoflavonoidy). Podle stupně oxidace pyranosového cyklu flavonoidů existují podskupiny [19].



Obr. č. 3: **Základní struktura flavonoidu** (převzato z [20])

4.2.1.1.1 **Flavony**

Struktura flavonu je nejjednodušší ze všech flavonoidů, jelikož neobsahuje žádné postraní hydroxylové skupiny (viz obr. 4). V posledních letech, vědecký i veřejný zájem o flavony enormně vzrostl díky jejich prospěšnému účinku proti aterosklerose, osteoporose, cukrovce a některých druhů karcinogenních onemocnění [21].



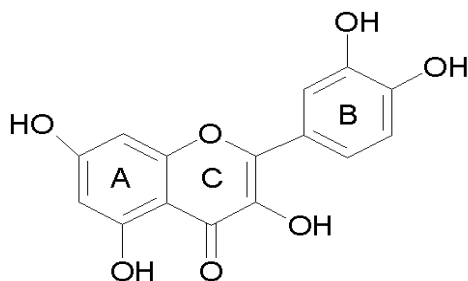
Obr.č. 4: **Struktura flavonu** (převzato z [21])

4.2.1.1.2 Flavonoly

Kvercetin

Struktura Kvercetinu je podobná struktuře flavonu, ale na některých uhlících jsou navázány hydroxidové skupiny (viz obr. 5). Kvercetin je jedním z nejsilnějších biologicky aktivních látek flavonolu a nachází se v ovoci, zelenině a čokoládě. Zabraňuje poškození buněčné DNA a působení enzymů, které podněcují růst nádoru. Kvercetin působí i proti zánětům, bakteriálním, myotickým a virovým infekcím. Účinkuje i tak, že pomocí modulace imunitního systému tlumí alergické reakce (potlačuje uvolnění histaminu z buněk). Kvercetin je chemicky podobný Cromolynu, antialergickému léku, který blokuje histamin. Kvercetin působí proti trombóze tím, že pomáhá bránit vzniku krevní sraženiny [22].

Kvercetin usnadňuje absorpci a udržení hladiny vitamínu C, zvyšuje sílu kapilár, reguluje jejich prostupnost, předchází krvácení a protržení kapilár, pojivové tkáně, posiluje cévní oblast oka [23]. Hlavní zdroje kvercetinu jsou žlutá a červená cibule (ne však cibule bílá), červené hrozny (ne však hrozny bílé), brokolice a italská žlutá tykev. Česnek, blízký příbuzný cibule, kvercetin neobsahuje. Kvercetin se tepelnou přípravou nebo mrazením neničí [22].



Obr.č. 5: **Struktura kvercetinu** (převzato z [24])

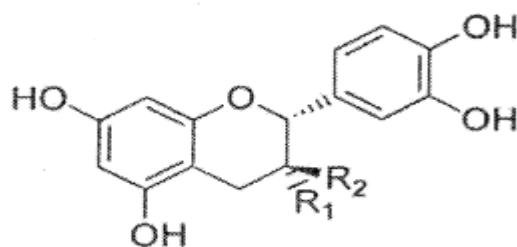
4.2.1.1.3 Flavanoly

Do této skupiny patří katechin, procyanidin (polymerní flavanol) [6]. Zatím toho není moc známo o polyfenolech v čokoládě, ale jsou známé jiné zdroje katechinu a procyanidinu jako např. zelený a černý čaj, červené víno. Nejvíce flavanolů obsahuje kůra stromu *Pinus maritima* [25].

Katechin a epikatechin

Katechiny (viz obr. 6) jsou hlavní antioxidační složkou čaje. Proto se o nich mluví jako o čajových flavonoidech. Čaj účinkuje svými katechiny protektivně proti kardiovaskulárním nemocím, proti karcinogennímu onemocnění [26], snížení poškození DNA způsobené zářením a chemoterapií. Studie rovněž ukazují, že zelený čaj může pomoci předcházet osteoporóze, je prospěšný kůži a má silné protizánětlivé vlastnosti [27]. Na základě experimentů *in vitro* a na zvířatech vykazuje příznivý vliv na imunitní systém, na shlukování destiček a na některé enzymové systémy [26]. Katechiny spolu s proantocyanidy brzdí oxidaci LDL cholesterolu a tím budoucí vznik aterosklerosy [28]. Arts a kol. (1998) měřili obsah nejdůležitějších katechinů v potravinách pomocí RP-HPLC s UV detekcí (270 nm) [29] a zjistili, že tmavá čokoláda má nejvyšší obsah celkových katechinů: 53,5 mg/100 g, mléčná jen 15,9 mg a nálev z černého čaje má 13,9 mg na 100 ml. Typy katechinů v čaji a v čokoládě jsou trochu odlišné. Čokoláda má pouze (+)-katechin a (-)-epikatechin (viz obr. 6), zatímco v čaji je spektrum katechinů širší. Antioxidační účinnost tím ovlivněna není [26].

Katechiny a epikatechiny v tmavé čokoládě zlepšují vysoký krevní tlak a mají vliv na cévní funkce [27].

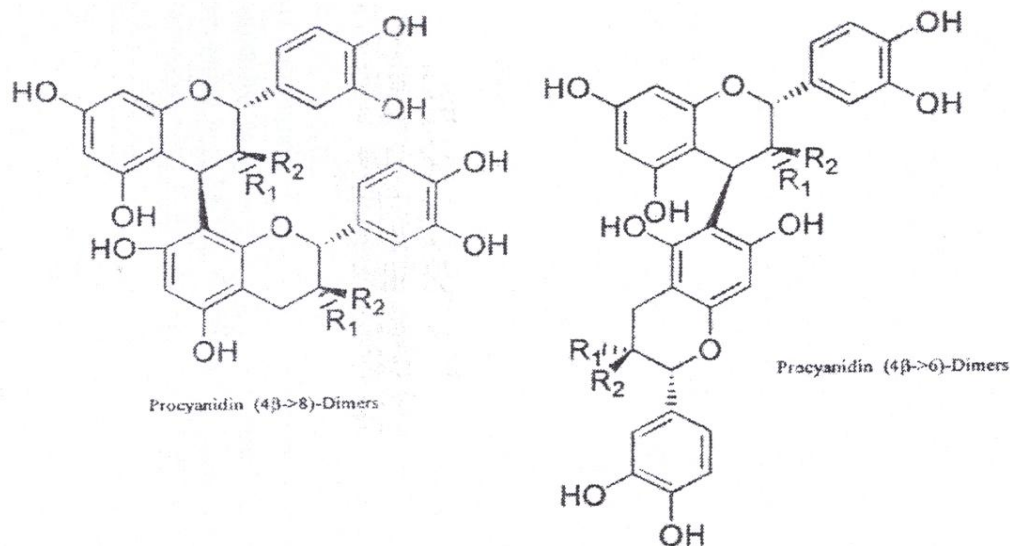


$R_1 = H, R_2 = OH = (+)$ -catechin
 $R_1 = OH, R_2 = H = (-)$ -epicatechin

Obr. č. 6: **Struktura katechinu** (převzato z [25])

Proantocyanidiny

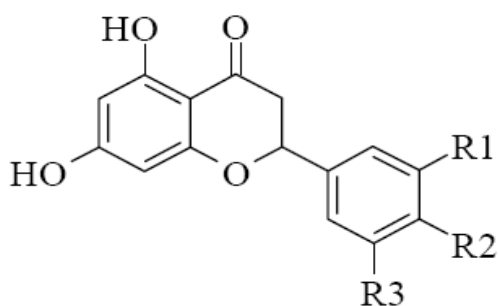
Proantocyanidin je polymerní řetězec tvořený katechinem (viz obr. 7) [30]. Čokoláda obsahuje řadu polyfenolů zvaných flavonoidy, zvláště procyanidiny, které významně zpomalují oxidaci LDL cholesterolu, procesu spojeného s ucpáváním cév [31].



Obr. č. 7: **Struktura proantocyanidinu** (převzato z [25])

4.2.1.1.4 Flavanony

Struktura flavanonu je podobná flavonu, ale na některých uhlících jsou napojeny různé skupiny (viz obr. 8). Flavanony jsou bezbarvé až světle žluté pigmenty a v potravinách jsou rozšířeny poměrně málo a jako barviva nemají téměř žádný význam. Jejich obsah v čokoládě je zanedbatelný. Ve vyšších koncentracích se nacházejí pouze v citrusovém ovoci [32]. Obsah flavonoidních glykosidů v rostlinných plodech narůstá v průběhu zrání [32].



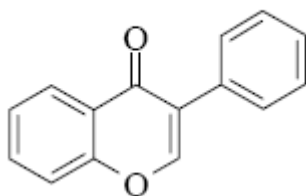
Obr. č. 8: **Základní struktura flavanonu** (převzato z [33])

4.2.1.1.5 Izoflavony

Izoflavony patří do skupiny fytoestrogenů [34] vyskytují se např. červeném jeteli nebo v plodech sóji. Izoflavony (viz obr. 9) jsou strukturně podobné ženskému pohlavnímu hormonu estrogeneru. Vzhledem k této podobné struktuře, mohou zasahovat do činnosti estrogeneru např. vázat se na stejné estrogenové receptory na buňkách a tím regulovat množství estrogeneru a snižovat příznaky menopauzy [35].

Estrogenové receptory: α -receptory se nacházejí převážně v prsní a děložní tkáni, varlatech a játrech. β -receptory mají příznivý vliv na zdraví, lze je nalézt v krvinkách, plicích, prostatě a kostech. Tady izoflavony snižují hladinu estrogenerů tím, že se naváží na jejich místo [35].

Tyto polyfenoly mají antioxidační účinky, které zastavují růst rakovinných buněk prostřednictvím inhibice replikace DNA a snížením aktivity různých enzymů. Dále pomáhají vytvořit nové kosti a tím bojují proti osteoporose [35].



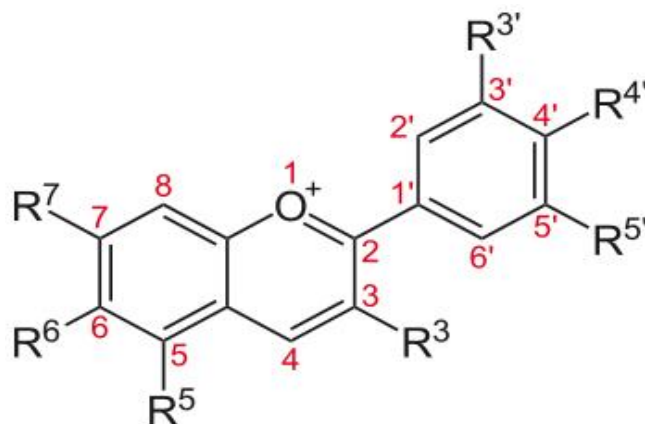
Obr. č. 9: **Struktura izoflavonu** (převzato z [33])

4.2.1.1.6 Antokyany

Během kvašení kakaových bobů jsou antokyany hydrolyzovány na antokyanidiny a ty spolu s katechiny vytváří složité taniny [36]. Jsou to ve vodě rozpustné pigmenty obsažené v buněčné šťávě vakuol. Zbarvují květy a listy rostlin podle reakce buněčné šťávy vakuol, tj. její kyselosti či zásaditosti. Mění se barva antokyanů, kyselé roztoky antokyanů bývají červené, neutrální fialové a zásadité modré [37].

Antokyany se vyskytují v čaji, medu, vínu, ovoci, zelenině, ořechách, olivovém oleji, kakau a obilovinách. Často jsou označovány jako bioflavonoidy, protože mají příznivý vliv na lidské zdraví. Antokyany v potravinách jsou obvykle požitý jako součásti komplexních směsí flavonoidů. Bioaktivní vlastnosti antokyanů jsou závislé na chemické struktuře (poloze, počtu a typu substituentu) (viz. obr. 10). Denní příjem se odhaduje od 500 mg až 1 g, ale může být až několik g/d, pokud jsou užívány doplňky s flavonoidy Ginkgo biloba

nebo pycnogenol. Antokyanidy mohou poskytovat ochranu před štěpením DNA, ovlivňovat estrogenní činnosti (vývoje hormonů), enzymové inhibice, zvyšovat produkci cytokinů (regulují imunitní reakce), mají anti-zánětlivé účinky, snižují kapilární propustnost a křehkost [38, 39]. Antokyany dále zlepšují noční vidění. Snižují rakovinné buněčné proliferace a inhibují nádorového bujení. Strava bohatá na antokyany zlepšuje nervové a behaviorální funkce (paměť a motorické funkce). Dále bylo zjištěno, že antokyany jsou vysoce aktivní v endoteliálních buňkách, které hrají roli v prevenci aterosklerosy. Antokyany včetně prevence tvorby volných radikálů, snižují oxidaci LDL cholesterolu, otok slinivky břišní a také hladinu cukru v moči a krevním séru [38, 40, 41, 42, 43].



Obr. č. 10: **základní struktura antokyanů** (převzato z [44])

4.2.2 HLAVNÍ VÝZNAM POLYFENOLŮ

Flavonoidy mají antioxidační schopnosti, jež chrání lidské zdraví [25].

4.2.2.1 Antioxidační vlastnosti

Mnohé flavonoidy fungují jako „účinné lapače“ volných radikálů. Kromě toho jsou některé také schopny vázat do komplexů ionty přechodných kovů a tak měnit jejich dostupnost jako katalyzátorů redukčně-oxidačních reakcí. Antioxidačně působící látky např. chrání před poškozením výstelky cév. Někteří autoři právě výrazným rozdílem obsahu antioxidačně působících látek v národní stravě vysvětlují skutečnost, že Francouzi trpí kardiovaskulárními chorobami méně, než je v zemích s tak vysokou životní úrovní obvyklé. Významným zdrojem antioxidantů má být pro Francouze podle těchto hypotéz jejich záliba v častém pití červeného vína [19].

4.2.2.2 Volné radikály

Volné radikály působí na biologicky významné sloučeniny, především lipidy, bílkoviny a nukleové kyseliny, pozměňují jejich strukturu a tím modifikují jejich funkci. Reakce iniciované radikály vedou k následným změnám ve struktuře buněk, poškození celých tkání, orgánů [45].

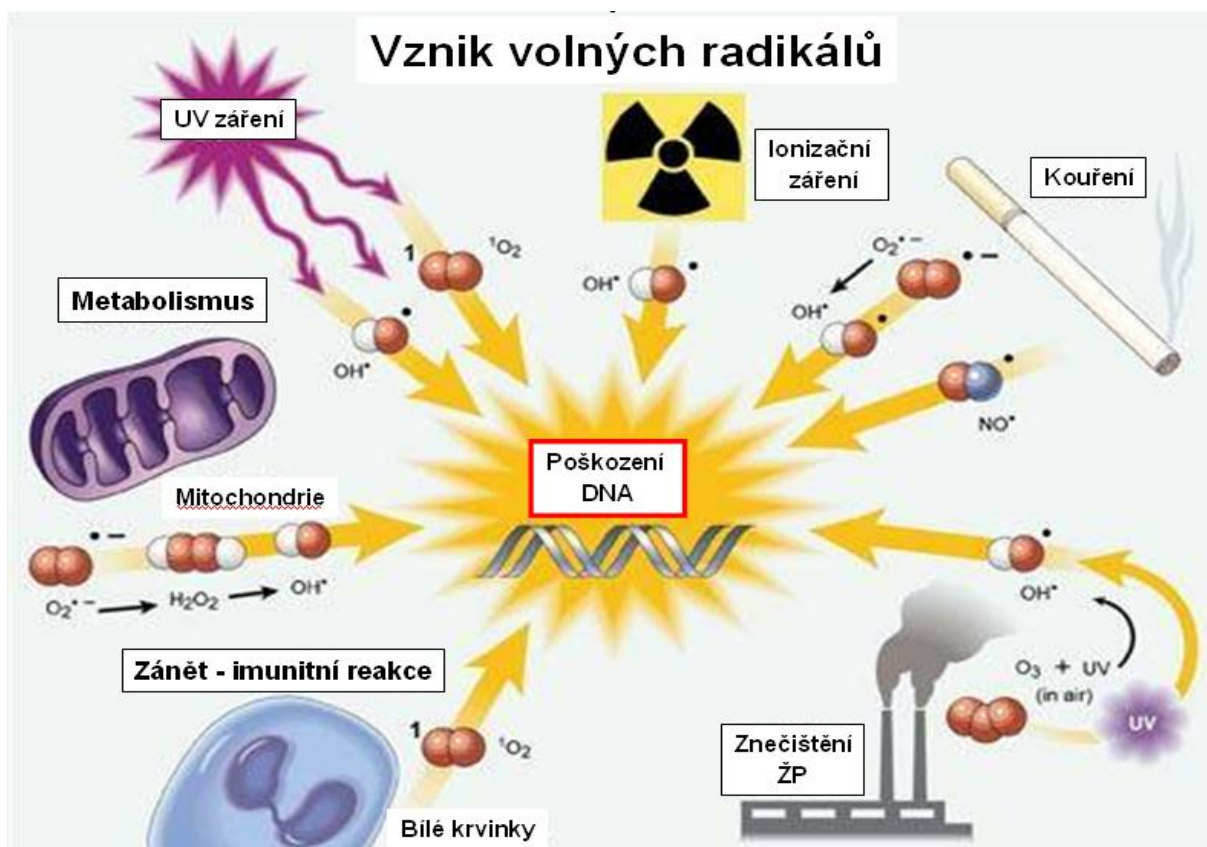
4.2.2.3 Vznik volných radikálů

Volné radikály vznikají z molekul třemi způsoby:

- homolytickým štěpením kovalentní chemické vazby, přičemž každý fragment získá jeden nepárový elektron
- přidáním jednoho elektronu k normální molekule (redukce)
- ztrátou jednoho elektronu (oxidace)

Mezi reaktivní formy kyslíku se řadí např. superoxidový radikál ($O_2^{\bullet-}$) vznikající přijetím jednoho elektronu molekulou kyslíku: $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$. Pokud superoxidový radikál přijme další elektron, dojde k redukcí na peroxid vodíku: $O_2^{\bullet-} + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$. Vzniklý peroxid vodíku se může vlivem dalšího elektronu rozpadnout na vodu a hydroxylový radikál (HO^{\bullet}) a ten opět reaguje s jedním elektronem za vzniku hydroxidového anionu (OH^-) (viz. obr. 11). Tato čtyřelektronová redukce molekulového kyslíku na dvě molekuly vody je nezbytnou reakcí pro aerobní způsob života a probíhá v dýchacím řetězci mitochondrií v aktivním centru enzymu cytochromoxidázy viz. obr. 12. Vzniklý hydroxylový radikál není ve vazbě s enzymem škodlivý. Za jiné situace, v tzv. Fentonově reakci (viz rce 1), vzniká z peroxidu vodíku v reakci s dvojmocným železem Fe^{2+} vysoce toxický hydroxylový radikál HO^{\bullet} , který v živé hmotě okamžitě reaguje s okolními molekulami, a jako extrémně silné oxidační činidlo vytrhuje elektron z nenasycených mastných kyselin a atakuje baze nukleových kyselin [45].





Obr. č. 11: Vznik volných radikálů (převzato z [46])

4.2.2.4 Oxidační stres

Za normálních okolností existuje v organismu rovnováha mezi tvorbou volných radikálů a působením antioxidačního obranného systému. Tato rovnováha je žádoucí, protože převaha jednoho či druhého může vést k vážnému poškození organismu. Častěji se vyskytují stavy s vyšším výskytem volných radikálů. Ty mohou nastat jejich zvýšenou produkcí nebo snížením antioxidační obrany, v úvahu přichází i kombinace obou těchto stavů. Převaha volných radikálů se nazývá oxidační stres [47].

Některé volné radikály jsou běžnou součástí zdravého metabolismu, jiné se objevují nebo se jejich množství zvyšuje v průběhu nemoci či psychické a fyzické zátěže. Volné radikály způsobují rychlé opotřebovávání tkáňových buněk, především, když se jejich množství v těle zvyšuje špatnou výživou a pobytem ve znečištěném prostředí (viz.obr.11). Volným radikálům, které vznikají in vivo a mají řadu fyziologických funkcí, se v současnosti věnuje velká pozornost a sleduje se jejich negativní působení [45].

Převaha antioxidantů je pro organismus rovněž škodlivá. Může blokovat životně důležité účinky volných radikálů, což může vést k poruše imunity nebo k narušení signální funkce. Může také paradoxně zvyšovat oxidační stres, např. nadbytek vitamínu C způsobuje redukci Fe^{3+} na Fe^{2+} a umožní tím účast železa ve Fentonově reakci [45, 47].

Oxidační stres vede k poškozování různých biomakromolekul v organismu. Poškození lipidů může negativně ovlivnit fluiditu membrán, může vést ke změně propustnosti pro ionty, k ovlivnění enzymů vázaných na membránách. Poškozením bílkovin dochází ke ztrátě jejich enzymové, signální či transportní funkce. Narušení DNA se může projevit jako např. translační chyba, inhibice proteosyntézy, mutace, která může vést i ke karcinogenezi. Vlivem volných radikálů dochází také k disregulaci nitrobuněčné signalizační sítě. Poškození oxidačními procesy se v konečném důsledku může projevit změnou ve fungování buňky nebo jejím zánikem [45,47].

Oxidační stres se může podílet na vzniku onemocnění, často však bývá jen doprovodným jevem, který může mít vliv na zhoršování průběhu onemocnění nebo může způsobovat komplikace [47].

4.2.2.5 Oxidace LDL cholesterolu a aterosklerosa

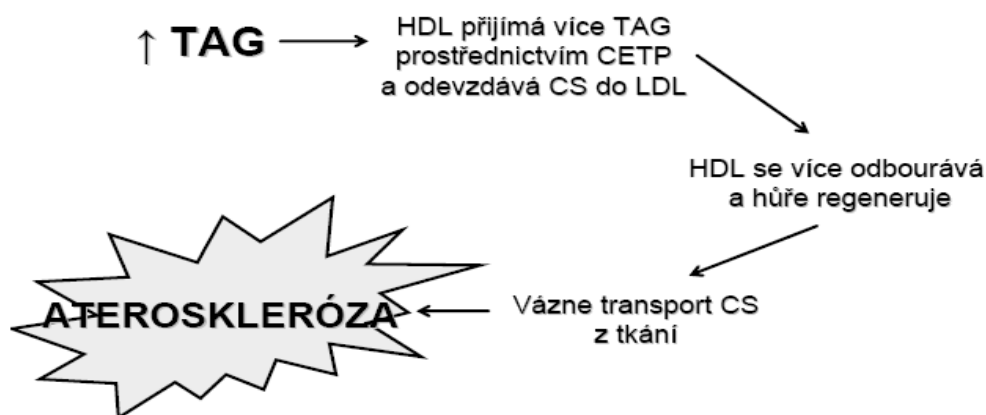
Jak bylo zmíněno v předešlých kapitolách (4.2.1.1.3, 4.2.1.1.6), kakaový prášek je bohatý na polyfenoly, u kterých bylo prokázáno, že brzdí oxidaci LDL a tím mohou předcházet vzniku aterosklerozy. [28]

Volné radikály oxidují LDL, které se usazují v cévách jako estery cholesterolu a tím vzniká aterosklerosa (viz obr. 12). HDL cholesterol inhibuje oxidaci LDL a tím brání vzniku aterosklerozy a také kardiovaskulárních nemocí [28].

S. Baba a kol. (2007) provedli studii, které se zúčastnilo 160 jedinců rozdělených do 4 skupin, kteří konzumovali po 4 týdny 2x denně stravu bohatou na polyfenoly v kakaovém prášku (13, 19 a 26 g/d) a jedna skupina dostávala placebo v kakaovém prášku. Po 4 týdnech byla odebrána krev a měřila se koncentrace oxidovaných LDL cholesterolu. Bylo zjištěno, že u prvních tří skupin koncentrace oxidovaných LDL poklesly a HDL cholesterol se zvýšil. [28]

Jiné studie zjistily, že příjem 105 g/d mléčné čokolády za 14 d rovněž způsobují pokles LDL cholesterolu v plazmě o 15% ve srovnání s výchozími hodnotami. [28]

↑ TAG a ↓ HDL



Obr. č. 12: Vznik aterosklerosis (převzato z [48])

4.2.3 STANOVENÍ POLYFENOLŮ

Všechny čokolády nejsou standardizované, rozdíly lze vysvětlit různým množstvím tuku, polyfenolů v kakaové sušině nebo postupem výroby, protože suroviny podléhají změnám během jednotlivých kroků zpracování kaka. Např. během procesu kvašení je pokles epikatechynu 10% – 20%. Nicméně získané výsledky jsou velmi závislé spíše na použité metodě, např. kolorimetrickou metodou byly získány mnohem vyšší výsledky než při HPLC (viz tab. 1) [36].

Tab. č. 1: obsah polyfenolů v kakaovém prášku, hořké čokoládě a mléčné čokoládě podle použitých metod. (převzato z [36])

<i>zdroj</i>	<i>Extrakční činidlo</i>	<i>Použitá metoda</i>	<i>výsledky</i>	<i>Číslo odkazu</i>
Kakaový prášek	95% metanol	Folin-Ciocalteu (gallová kyselina jako standard)	20 mg/g všechny polyfenoly	[49]
Kakaový prášek	Kyselina chlorovodíková	Folin-Ciocalteu	65 ± 19 mg/g všechny	[50]

(odtučněná)	v metanolu	(katechin jako standard)	polyfenoly	
Kakaový prášek	70% metanol	Folin-Ciocalteu (gallová kyselina jako standard)	58 mg/g všechny polyfenoly	[51]
Kakaový prášek (instantní)	70% metanol	Folin-Ciocalteu (gallová kyselina jako standard)	6.46±2.44 mg/g všechny polyfenoly	[51]
Kakaový prášek	Kyselina chlorovodíková v metanolu	RP-HPLC (katechin jako standard)	2.96-3.27 mg/g katechin a epikatechin	[50]
Kakaový prášek	75% aceton	RP-HPLC (epikatechin jako standard)	3mg/g epikatechin	[51]
Kakaový prášek	75% aceton	RP-HPLC (epikatechin jako standard)	0.26±0.05 mg/g epikatechin	[51]
Hořká čokoláda	95% metanol	Folin-Ciocalteu (gallová kyselina jako standard)	8.4mg/g všechny polyfenoly	[49]
Hořká čokoláda	Kyselina chlorovodíková v metanolu	Folin-Ciocalteu (gallová kyselina jako standard)	36.5 ± 5 mg/g všechny polyfenoly	[50]
Hořká čokoláda	70% metanol	Modifikovaná NP-HPLC	1.7 ± 0.08 mg/g všechny	[52]

		(procyanidin jako standard)	procyanidiny	
Hořká čokoláda	70% metanol	RP-HPLC (katechin jako standard)	0.5mg/g katechin a epikatechin	[29, 53]
Hořká čokoláda	Kyselina chlorovodíková v metanolu	RP-HPLC (katechin jako standard)	0.48-1.37 mg/g katechin a epikatechin	[50]
Hořká čokoláda	70% aceton	Modifikovaná NP-HPLC (procyanidin jako standard)	0.8 ± 0.08 mg/g katechin a epikatechin	[52]
Hořká čokoláda	Není uvedeno	Není uvedeno	2mg/g	[54]
Mléčná čokoláda	95% metanol	Folin-Ciocalteu (gallová kyselina jako standard)	5mg/g všechny polyfenoly	[49]
Mléčná čokoláda (odtučněný)	Kyselina chlorovodíková v metanolu	Folin-Ciocalteu (katechin jako standard)	15 ± 5.8 mg/g Všechny polyfenoly (a)	[50]
Mléčná čokoláda	70% aceton	Modifikovaná NP-HPLC (procyanidin jako standard)	0.7 ± 0.17 mg/g všechny procyanidiny	[52]
Mléčná čokoláda	70% metanol	RP-HPLC (katechin jako standard)	0.16 mg/g katechin a epikatechin	[29, 53]
Mléčná čokoláda	Kyselina chlorovodíková	RP-HPLC (katechin jako	0.15-0.16 mg/g katechin a	[50]

	v metanolu	standard)	epikatechin	
Mléčná čokoláda	70% aceton	Modifikovaná NP-HPLC (procyanidin jako standard)	0.2 ± 0.05 mg/g katechin a epikatechin	[52]

4.2.4 METODY STANOVENÍ

4.2.4.1 Extrakce

Extrakce je separační technika založená na distribuci látky mezi dvě nemísitelné fáze. Při extrakci se snažíme převést co největší podíl látky do fáze organické, odkud může být izolována, nebo kde může být stanovena. Ve většině případů výtěžek z jediné extrakce není postačující, proto extrakci opakujeme, vždy s čerstvým rozpouštědlem jako např. methanol, aceton... (viz tab. 1). Volba rozpouštědla se řídí charakterem látek, které mají být extrahovány. Pro extrakci nepochlárých látek budeme používat nepolární nebo málo polární látky. Extrakce z tuhé fáze (vyluhování) je využívána především v potravinářském průmyslu (např. extrakce rostlinných olejů a tuků z různých, převážně rostlinných surovin) [55, 23, 49, 50, 51, 52].

Ideální extrakční metoda by měla být rychlá, jednoduchá, levná, s minimální spotřebou organických rozpouštědel. [55]

4.2.4.1.1 Extrakce nadkritickou tekutinou (supercritical fluid extraction-SFE)

Jedná se o metodu extrakce různých látek z čaje, kakaa, chmele, tabáku, koření a olejnatých semen. [55]

Má-li plyn teplotu vyšší než je jeho teplota kritická, nemůže být zkapalněn žádným tlakem. Při dostatečně velkém tlaku (desítky MPa) však přechází do stavu nadkritické tekutiny. Nadkritická tekutina je vhodná právě pro extrakci z tuhých vzorků, protože díky nízké viskozitě dobře vzorkem proniká. Běžně je k SFE používán CO₂. Je nepolární, proto je výhodný k extrahování nepolárních látek. Je však možné jeho polaritu ovlivnit přidáním malých množství polárních modifikátorů (voda, methanol). Po skončení extrakce lze nadkritický CO₂ od extraktu snadno oddělit odpařením [55].

Výtěžnost této extrakce je 30% – 70% polyfenolů, ale předpokládá se, že kvercetin a prokyanidiny budou mít nižší hodnotu než ve skutečnosti, jelikož se používá methanol, který snižuje polární složky kakaa [36, 56].

4.2.4.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography, HPLC)

HPLC je pokročilou a instrumentálně náročnou technikou kapalinové chromatografie. V HPLC je dosahováno vysoké účinnosti použitím kolon naplněných stacionární fází o malé a dobře definované velikosti částic. Separační kolony pro HPLC se vyznačují vysokou hustotou a homogenitou náplně stacionární fáze a tedy i velkým hydrodynamickým odporem [55].

V praxi se většinou používá eluční chromatografie, kdy se vzorek zavádí na kolonu diskontinuálně a jeho složky jsou tedy z kolony eluovány v pořadí velikosti sorpce na stacionární fázi a do detektoru dospějí v různých retenčních časech [55].

Kapalinová chromatografie je vhodná pro separaci nepolárních až iontových, méně těkavých a tepelně nestálých organických látek, neboť je možné pracovat za laboratorní teploty bez nutnosti převádět vzorek na plyn [55] (viz tab. 1).

Detektory dělíme na selektivní a univerzální. Pro HPLC se obvykle používají detektory spektrofotometrické, fluorescenční, refraktometrické, elektrochemické a hmotnostní [55].

4.2.4.2.1 Chromatografie v systémech s normálními fázemi fázemi (high-performance normal-phase liquid chromatography, NP-HPLC)

Polarita mobilní fáze v systému s normálními fázemi je vždy nižší než polarita použitého absorbentu. Nejčastěji používaný polární absorbent je silikagel s přesně definovanými vlastnostmi. Jeho povrch je slabě kyselý, takže přednostně zadržuje bazické látky [57].

Většina rozpouštědel používaných v systémech s normálními fázemi má velkou těkavost, což je výhodné zejména v preparativní chromatografii. Na druhé straně může v průběhu analýzy docházet k jejich selektivnímu odpařování a tím ke změně složení mobilní fáze a k posunu retenčních časů analyzovaných látek. Jako nepolární složka mobilní fáze se používá heptan nebo hexan, jako polární propanol, acetonitril a jiné [57].

Modifikovaná NP-HPLC používá pro detekci hmotnostní spektrometrii [36].

Např. Adamson a kol. (1999) použili jako SF aceton, vodu a kyselinu octovou a jako MF použili Supelcocil LCSi, separace byla sledována při UV 280nm a výsledky jsou uvedeny (viz tab. č. 1) [52].

4.2.4.2.2 Chromatografie v systémech s obrácenými fázemi (high-performance reversed-phase liquid chromatography, RP-HPLC)

V těchto systémech se používají nejčastěji nepolární stacionární fáze a polární mobilní fáze. Jako náplně kolon se používají převážně chemicky vázané nepolární fáze na silikagelu jako nosiči. Na volné hydroxylové skupiny silikagelu se chemicky váží alkylové řetězce. Reakcí příslušného alkylochorsilanu se silikagelem vzniká kovalentní vazba Si-O-Si-C, která je odolná proti hydrolyze. Nepolární uhlovodíková fáze bývá nejčastěji oktyl, oktadecyl nebo alkyly s fenolovými bifenylovými skupinami, které mají mírně zvýšenou polaritu a vykazují efektivní afinitu zejména k fenolům a aminům [57].

Jako mobilní fáze se používají směsi vody s přídavkem polárních organických rozpouštědel (nižší alkoholy, acetonitril, tetrahydrofuran, dioxin), případně i s přídavkem pufru, soli nebo kyseliny. Při použití chemicky vázaných stacionárních fází na nosiči nedochází k jejich vymývání z kolony ani vlivem rozpouštění v mobilní fázi, ani vlivem eroze při velkém průtoku eluentu, což je prakticky výhodnější ve srovnání s fyzikálně zakotvenými kapalnými fázemi [57].

V systémech s obrácenými fázemi lze separovat jak málo polární látky (např. aromatické uhlovodíky), tak i látky středně a silně polární (např. fenoly, aminy, cukry). Látky jsou tím více zadržovány, čím nižší je jejich polarita a čím větší je jejich uhlovodíková část. Retence se též zvyšuje s rostoucí polaritou mobilní fáze a prodlužující se délkou alkylového řetězce chemicky vázané fáze [57].

Např. Vinson a kol. (1999) použili jako SF C8 a jako mobilní fázi kyselinu octovou ve vodě, identifikace katechinu a epikatechinu byla provedena spektrálním skenováním a výsledky jsou uvedeny (viz tab. č. 1) [50].

4.2.4.3 Kolorimetrie

Metoda je založena na spektrofotometrickém měření barevných produktů skupin fenolických sloučenin s činidlem [59].

Nejčastější kolorimetrické metody jsou tři: Folin-Ciocalteu, berlínská modř a Vanilin-HCl test. Všechny tyto metody lze použít pro kvantitativní odhad celkových polyfenolů [36] (viz tab. 1).

5 Závěr

Vliv čokolády na lidské zdraví nelze popřít. Je obecně známo, že v čokoládě se vyskytují látky s negativním biologickým vlivem jako jsou cukry a nasycené mastné kyseliny stearová a palmitová, které zvyšují riziko vzniku ischemické srdeční choroby a rozvoj trombozy, neboť zvyšují hladinu lipidů a lipoproteinů v plazmě. Co už však není obecně známo je fakt, že čokoláda obsahuje celou řadu látek, které nejsou zdraví škodlivé, naopak, mají pozitivní vliv na lidský organismus. Např. polynenasycená mastná kyselina linolová (3%) patří do látek s pozitivním biologickým vlivem, jelikož zvyšuje hladinu HDL cholesterolu. HDL cholesterol inhibuje oxidaci LDL cholesterolu a tím brání vzniku aterosklerosy a také kardiovaskulárních nemocí. Do látek s pozitivním vlivem dále patří flavonoidy: flavonoly, flavony, isoflavony, flavanony, anthocyanidiny a flavanoly, které ovlivňují nejen barvu, vůni, chuť, konzistenci, ale hlavně působí jako významné antioxidační látky proti volným radikálům, které vznikají v našem organismu působením mnoha faktorů jako např. stres, kouření, špatná životospráva, pobyt v znečištěném prostředí či stárnutí. Volné radikály oslabují náš organismus, protože napadají biologicky významné sloučeniny, především bílkoviny, lipidy a nukleové kyseliny, pozměňují strukturu buněk a v konečném důsledku mohou vést ke zhoubnému nádorovému bujení. Oxidují LDL cholesterol, jenž se usazuje v cévách jako estery cholesterolu a tím podporuje vznik aterosklerosy.

Předložená práce poukazuje na látky v čokoládě, které posilují imunitu, působí proti zánětům, bakteriálním, myotickým a virovým infekcím. Účinkují i tak, že pomocí modulace imunitního systému tlumí alergické reakce, působí proti aterosklerose, osteoporose, cukrovce, zabraňují vzniku karcinogenních onemocnění a ischemické srdeční choroby, usnadňují absorpci a udržení hladiny vitamínu C, zvyšují sílu kapilár, regulují jejich prostupnost, předchází krvácení a protržení kapilár, posilují cévní oblast oka.

Čokoláda tedy může být i zdraví prospěšná. Stále však platí, že malém množství a jen kvalitní!

6 Použitá literatura

1. **Kristen Bruinsma MS, Douglas L, Taren Phd**: Chocolate: food or drug? *Journal of the American Dietetic Association*, Volume 99, Issue 10, Pages 1249-1256
2. <http://www.cokolada.info/historie-cokolady.html> (2.2.2009)
3. <http://www.paralaxa.cz/lide-a-spolecnost/ruzne/59-tajemstvi-cokolady-1dil> (2.2.2009)
4. <http://www.giallo.cz/ucinky.html> (28.5.2009)
5. **Fracene M. Steinberg, PhD, RD; Monica M. Bearden, RD; Carl L Keen, PhD**, Cocoa and chocolate flavanoids: Implications for cardiovascular health, *Journal of the American Dietetic Association*, Volume 103, Issue 2, Pages 215-223
6. **Michener W, Rozin P**. Pharmacological versus sensory factors in the satiation of chocolate craving, *Elsevier*, Volume 56, Issue 3, September 1994, Pages 419-422
7. <http://cs.wikipedia.org/wiki/Kofein> (3.2.2009)
8. <http://chemistry.about.com/library/weekly/aa090301a.htm> (3.2.2009)
9. <http://web.vscht.cz/poustkaj/SAP%20122007%20PREDNASKA%2013Fa.pdf> (3.2.2009)
10. **Křížek, M., Pelikánová, T.**: Determination of seven biogenic amines in foods by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr. A*, 815, 1998, s.243-250.
11. **Luboslav Stárka**: Hormony a láska, *Chem. Listy 101*, 13–17 (2007)
12. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tyramin_-_Tyramine.svg (15.6.2009)
13. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dekarboxylace_fenylalaninu.PNG (15.6.2009)
14. <http://cs.wikipedia.org/wiki/Anandamid> (21.3.2009)
15. **di Tomaso E., Beltramo M., Piomelli D.**: Brain cannabinoids in chocolate, *Nature* 382, 677-678 (1996)
16. Devane W. A., Hanuš L., Breuer A., Pertwee R. G., Stevenson L. A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., Mechoulam R.: Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258, 1946-1949, (1992)
17. **Lairon D.**: Dietary fatty acids and arteriosclerosis. *Biomed Pharmacother.* 1997;51:333-336.

18. **Claudine Manach, Augustin Scalbert, Christine Morand, Christian Rémésy and Liliana Jiménez:** Polyphenols: food sources and bioavailability, *American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 79, No. 5, 727-747, May 2004
19. **Veronika Protivová,** *Bakalářská práce:* Flavonoidy a jejich role ve vývoji rostlin, Masarykova univerzita, přírodovědecká fakulta, ústav experimentální biologie, Oddělení fyziologie a anatomie rostlin., 2006, s.7,12
20. **Marie Motáčková,** *Bakalářská práce:* Význam ovoce v lidské výživě, Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, , rok 2006, s 14.
21. **Cermak R,** Effect of dietary flavonoids on pathways involved in drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, , 4(1):17-35, (2008)
22. http://www.thorne.com/media/quercetin_monograph.pdf (8.4.2009)
23. http://www.kpreichman.cz/jomla_install/soubory/Zdrav%C3%A9%20O%C4%8Di_web.pdf (8.4.2009)
24. **E. Dadáková:** Metoda kvantitativní analýzy kvercetinu v rostlinném materiálu, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, katedra chemie
25. **Jan Wollgast , Elke Anklam,** Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health?, *Food Research International* 33 (2000) 449±459
26. **Ija C W Arts, Peter C H Hollman, Daan Kromhout** Chocolate as a source of tea flavonoids, , *THE LANCET* , Vol 354, August 7, 1999
27. <http://www.elaine-moore.com/LinkClick.aspx?fileticket=M0WYASgHyeI%3D&tabid=153&mid=598> (22.3.2009)
28. **Seigo Baba, Midori Natsume, Akiko Yasuda, Yuko Nakamura, Takaaki Tamura, Naomi Osakabe, Minoru Kanegae a Kazuo Kondo,:** Plasma LDL and HDL Cholesterol and Oxidized LDL Concentrations Are Altered in Normo- and Hypercholesterolemic Humans after Intake of Different Levels of Cocoa Powder, *American Society for Nutrition J. Nutr.* 137:1436-1441, June 2007
29. **Arts ICW, Hollman PCH.:** Optimization of a quantitative method for the determination of catechins in fruits and legumes. *J Agric Food Chem* 1998; **46** : 5156 – 62
30. <http://en.wikipedia.org/wiki/Proanthocyanidin> (15.6.2009)
31. <http://www.jergym.hiedu.cz/~canovm/tabulka/bitman/zajimavo.htm> (6.2.2009)
32. **Davídek J., Janíček G.,** *Chemie potravin*, 1. vydání, SNTL 1983, 632 str.

33. **Doc. Ing. Jitka MORAVCOVÁ, CSc.** Biologicky aktivní přírodní látky, učební text pro VŠCHT, v Praze 2006
34. <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/soyiso/> (10.4.2009)
35. <http://www.isoflavones.info/> (22.3.2009)
36. **Jan Wollgast**, *Disertační práce*: The contents and effects of polyphenols in chocolate, Dipl. oec. troph., Justus Liebig University Giessen, Faculty of Agricultural and Nutritional Sciences, Home Economics, and Environmental Management, Institute of Nutritional Sciences 2004, s 26-27, 30, 38, 121
37. <http://www.biology.webz.cz/bunka.php> (10.4.2009)
38. **Mary Ann Lila**, Anthocyanins and Human Health: An In Vitro Investigative Approach, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 306-313 (2004)
39. **Skibola C, Smith M.**: Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic Biol Med.* 2000;29(3-4):375–383.
40. **Kang S, Seeram N, Nair M, Bourquin L.** : Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in Apc(Min) mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. *Cancer Lett.* 2003;194(1):13–19.
41. **Joseph J, Shukitt-Hale B, Denisova N, et al.**: Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation., *J Neurosci.* 1999;19(18):8114–8121.
42. **Youdim K, McDonald J, Kalt W, Joseph J.** Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insult, *J Nutr Biochem* 2002;13(5):282–288.
43. **Jankowski A, Jankowska B, Niedworok J.** The influence of *Aronia melanocarpa* in experimental pancreatitis, *Pol Merkuriusz Lek.* 2000;8(48):395–398.
44. <http://en.wikipedia.org/wiki/Anthocyanin> (23.3.2009)
45. **Iva Cabálková**, *Bakalářská práce*: Antioxidační účinky ovoce a zeleniny, Masarykova univerzita v Brně, Lékařská fakulta, 2007, s 8
46. www.mpouzar.net/prednasky/kovy1.ppt(26.3.2009)
47. **MUDr. Pavla Havlíková**, *Disertační práce*, Změny v celkové antioxidační kapacitě séra u depresivní poruchy, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Psychiatrická klinika, 2006, s 23
48. http://chel.lf1.cuni.cz/html/Lipidy_PB_stom.pdf (22.3.2009)
49. **Waterhouse AL, Sirley JR, Donovan JL.**: Antioxidants in chocolate, *The Lancet*, (1996), 348:834

50. **Vinson JA, Proch J, Zubic L J**: Chem Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Cocoa, Dark Chocolate, and Milk Chocolate, *Agric Food*, (1999),47:4821–4824
51. **Serra Bonvehí, J.; Ventura Coll, F.**: Evaluation of bitterness and astringency of polyphenolic compounds in cocoa powder. *Food Chem* (1997), 60, 365–370.
52. **Adamson GE, Lazarus SA, Mitchell AE, Prior RL, Cao G, Jacobs PH, Kremers BG, Hammerstone JF, Rucker RB, Ritter KA, Schmitz HH** :Chem HPLC Method for the Quantification of Procyanidins in Cocoa and Chocolate Samples and Correlation to Total Antioxidant Kapacity, *Agric Food* (1999) 47:4184–4188
53. **Özlem Tokusoglu , M. Kemal Ünal**, Optimized method for simultaneous determination of catechin, gallic acid, and methylxanthine compounds in chocolate using RP-HPLC, *Eur Food Res Technol* (2002) 215:340–346
54. **Richelle, M., Tavazzi, I., Enslin, M. and Offord, E.A.**, Plasma kinetics in man of epicatechin from black chocolate. *European Journal of Clinical Nutrition* (1999) 53, pp. 22–26.
55. **Kateřina Borovská**, *Bakalářská práce*: Izolace a stanovení antioxidantů v rostlinách, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko- technologická, katedra Analytické chemie, 2008, s 19, 21, 25
56. **Lucie Hrubá**, *Diplomová práce*: Analýza triacylglycerolů v rostlinných olejích technikou HPLC/MS, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko- technologická, katedra Analytické chemie, 2002, s 16-17
57. **M. L. Lee and K. E. Markides, Eds.**, Analytical Supercritical Fluid Chromatography and Extraction, *Chromatography Conferences, Provo, UT*, 1990, p. 577.
58. **Petra Parišová**, *Diplomová práce*: Analýza přírodních antioxidantů micelární elektrokinetikou chromatografií, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko- technologická, katedra Analytické chemie, 2008, s 14-15
59. **Šárka Kuchyňková**, *Diplomová práce*: Změny obsahových látek v brukvovité zelenině při různé kulinární úpravě, Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, Ústav preventivního lékařství, 2007, s 42