

Z výzkumu a praxe

OXIDAČNÍ DESTRUKČNÍ ANALÝZA PIVA A MEZIPRODUKTŮ

Doc. Ing. JAN ŠAVEL, CSc., Ing. DANA ZDVIHALOVÁ, Ing. MARIE PROKOPOVÁ, Budějovický Budvar, n. p., Č. Budějovice

Klíčová slova: pivo, meziproducty, oxidační destrukční analýza

1. ÚVOD

Oxidační destrukční analýza (ODA) je postup, který se zakládá na oxidaci piva oxidačními činidly, způsobujícími změnu spotřebitelsky významných vlastností piva. Tento postup umožňuje posuzovat stabilitu významných vlastností nápojů, podléhající ztrátě působením kyslíku.

K studiu vlastností různých objektů nebo výrobků se všeobecně využívá destrukčních metod. Jako příklad mohou sloužit destrukční metody při hodnocení odolnosti průmyslových výrobků v extrémních podmínkách. Částečná oxidace organických sloučenin umožňuje rozeznávat jejich strukturu. Oxidační destrukční analýza piva se zaměřuje na posouzení jeho stability i přípravy produktů, vznikajících při jeho stárnutí.

Kyslík rozpuštěný v pivu, nebo působící při jeho výrobě, se může při oxidaci uplatňovat v různých formách s rozdílným oxidačním účinkem. Mezi aktivní formy kyslíku náleží superoxidový, peroxohydroxylový a hydroxylový radikál. Silné oxidační účinky mají i elektronově excitované stavy kyslíku, např. singletový kyslík $^1\Sigma^+$, který rychle přechází na formu $^1\Delta_g$ se slabším účinkem. Přesto tato forma může oxidovat organické substráty snáze než kyslík v základním, tripletovém stavu [1].

Aktivní formy kyslíku mohou vznikat za účinku světla, za tmy při účasti kovových iontů, popř. za současného působení obou mechanismů [2, 3]. Předpokládá se rovněž výskyt peroxidu vodíku, který má rovněž silnější oxidační účinky ve srovnání s molekulárním kyslíkem.

Výskyt cizích vůní a chuti při stárnutí piva se spojuje s tvorbou karbonylových sloučenin, které mohou vznikat z nenasyčených mastných kyselin, vyšších alkoholů, hořkých kyselin a aminokyselin [1].

S fotochemickými reakcemi rovněž souvisí vznik tzv. letinkové příchuti piva, způsobené 3-methyl-2-buten-1-thiolem [4].

Výskyt štiplavé, lepenkové nebo papírové chuti v prvních fázích stárnutí piva se obvykle přisuzuje *trans*-2-nonenalu, ačkoliv analyticky se mohou prokázat i další příbuzné sloučeniny [5]. Senzoricky aktivní je rovněž *cis*-3-nonenal, charakter jeho vůně je však odlišný [6].

Všeobecně se tvorba *trans*-2-nonenalu spojuje s oxidací nenasyčených mastných kyselin. Lipidy pocházející ze sladu se po hydrolyze mohou oxidovat enzymaticky lipoxygenasou (EC 1.13.11.12), nebo bez

účasti enzymů působením světla, popř. iontů kovů. Počátečním produktem oxidace jsou hydroperoxy [7].

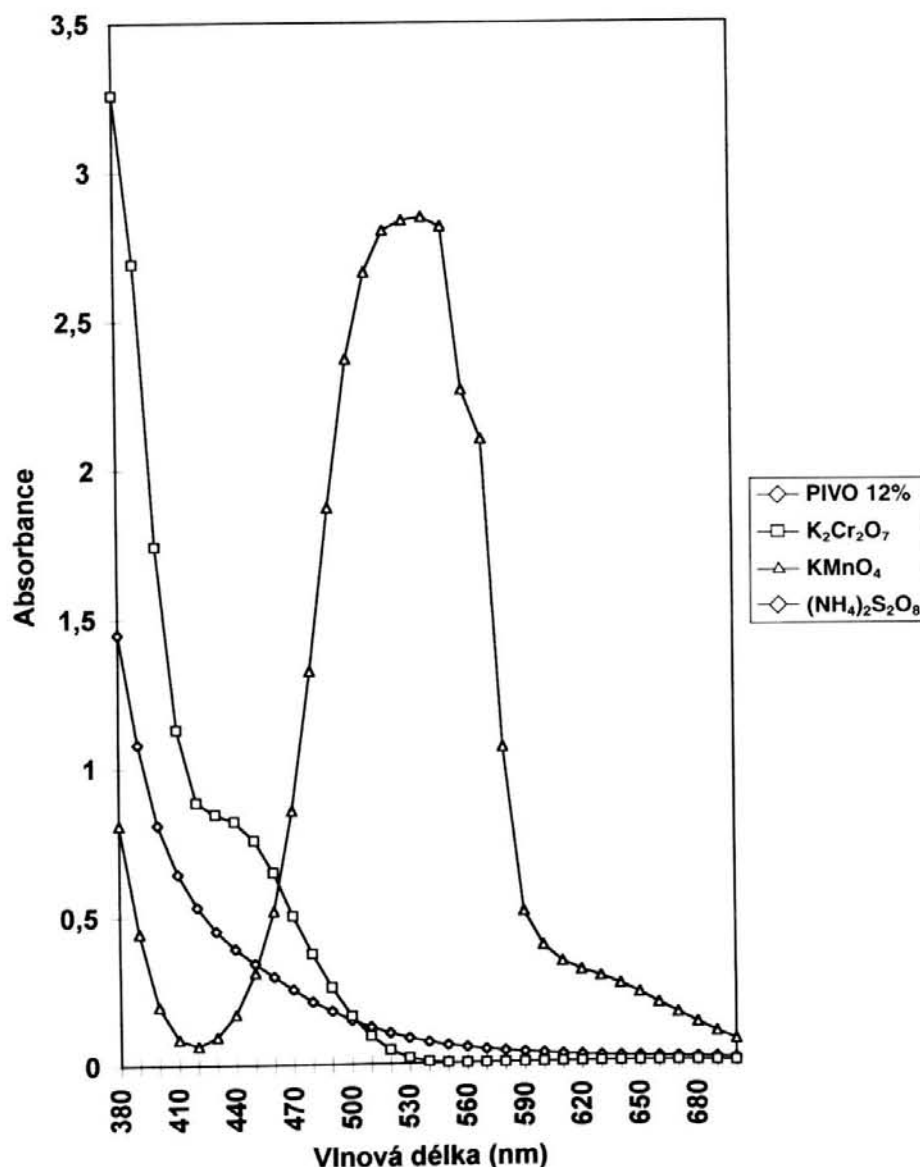
Během rmutování vznikají hydroperoxidové deriváty, které se přeměňují na trihydroxykyseliny a posléze v pivu přecházejí na smyslově aktivní *trans*-2-nonenal [8]. *Trans*-2-nonenal, vznikající při sladování a rmutování, může reagovat se složkami sladin a mladiny a přecházet na deriváty, ze kterých vzniká *trans*-2-nonenal při stárnutí piva [9, 10].

Nežádoucí oxidační reakce mohou alespoň částečně potlačit antioxidanty, mezi

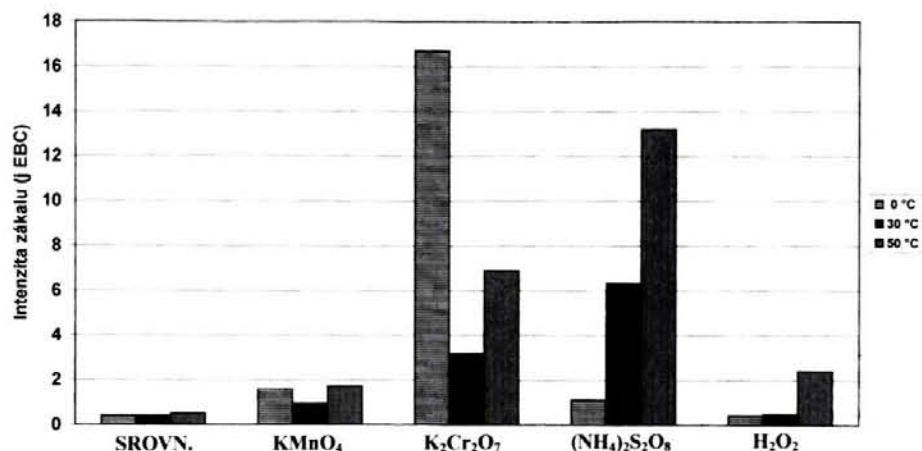
které patří kyselina askorbová, glutathion, vitamin E a polyfenolické látky. Účinek aktivních forem kyslíku mohou rovněž eliminovat enzymy, např. superoxiddismutasa (EC 1.5.1.1), katalasa (EC 1.11.1.6), peroxidasa (EC 1.11.1.7) a polyfenoloxidas (EC 1.10.3.2) [1].

Fenolické antioxidanty mohou vázat volné radikály, zhaset singletový kyslík, inaktivovat oxidasy a tvorbou chelátů omezovat katalytické působení kovů [11].

Kromě *trans*-2-nonenalu mohou během stárnutí piva vznikat další aldehydy, sloužící jako indikátory stárnutí piva. Mezi ně patří



Obr. 1 Absorpční spektra 12% piva a 0,05 % roztoků oxidačních činidel.



Obr. 2 Zákal po třídenní oxidaci 12% piva oxidačními činidly při 0, 30 a 50 °C.

acetaldehyd, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, fenylacetaldehyd, benzaldehyd, 2-furfural, heptanal a další [12].

Postupy předpovídající náchylnost piva k smyslovému stárnutí se zakládají na měření obsahu těkavých aldehydů během stárnutí piva, sledování tvorby radikálů nebo obsahu hydroxylového radikálu [13–17].

V roce 1993 navrhl Idota test pro posouzení náchylnosti surovin k tvorbě *trans*-2-nonenalu. Po přidavku 0,05 % peroxidu vodíku k pivu a jeho ohřevu po tři dny při 37 °C se stanovil obsah *trans*-2-nonenalu [18].

Pro stanovení odolnosti piva proti oxidačním změnám jsme navrhli sledování změn vlastností piva po přidavku roztoku peroxidisíranu draselného nebo amonného [19, 20].

Spektrofotometrická měření prokázala podobné změny při oxidaci piva i při fotochemické oxidaci [21].

2. MATERIÁL A METODY

2.1 Chemikálie a roztoky

Peroxodisíran amonný čistý, manganistan draselný, hydrogensířičitan sodný p. a., fuchsin indikátor, chlorid uhličitý čistý, benzen pro UV spektroskopii, chloroform čistý (všechny od firmy LACHEMA Brno), dichroman draselný p. a., peroxid vodíku 30 % medical extra pure, stabilized, 1,3-fenylendiamin, dihydrát nitroprusidu sodného p. a., kyselina chlorovodíková 37 % p. a., n-hexan p. a. (MERCK), piperidin, 2,4-dinitrofenylhydrazin p. a., 2-thiobarbiturová kyselina, purum (FLUKA).

Pro oxidaci piva a meziproductů výroby se připravily 5% manganistan draselný, 10% dichroman draselný a 40% peroxidisíran amonný rozpuštěním v destilované vodě. Absorpční spektra těchto roztoků po naředění na 0,05% ve srovnání s 12% světlým pivem uvádí obr. 1.

2.2 Činidla pro stanovení aldehydů (upraveno podle [22])

Schiffovo činidlo: 0,2 g fuchsinu se rozpustilo za tepla ve 120 ml destilované vody, po ochlazení se přidalo 2 g hydrogensířičitanu sodného, rozpuštěného ve 20 ml destilované vody, 2 ml kyseliny chlorovodíkové

a směs se zředila na 200 ml. K 1 ml vzorku se přidalo 9 ml činidla a po 15 min se měřila absorpce při 560 nm proti slepému pokusu.

Činidlo na průkaz acetaldehydu: ve směsi 8 g destilované vody a 2 g piperidinu se rozpustilo 0,2 g nitroprusidu sodného. K 5 ml

vzorku se přidalo 1 ml činidla a hodnotila se intenzita modrého zbarvení.

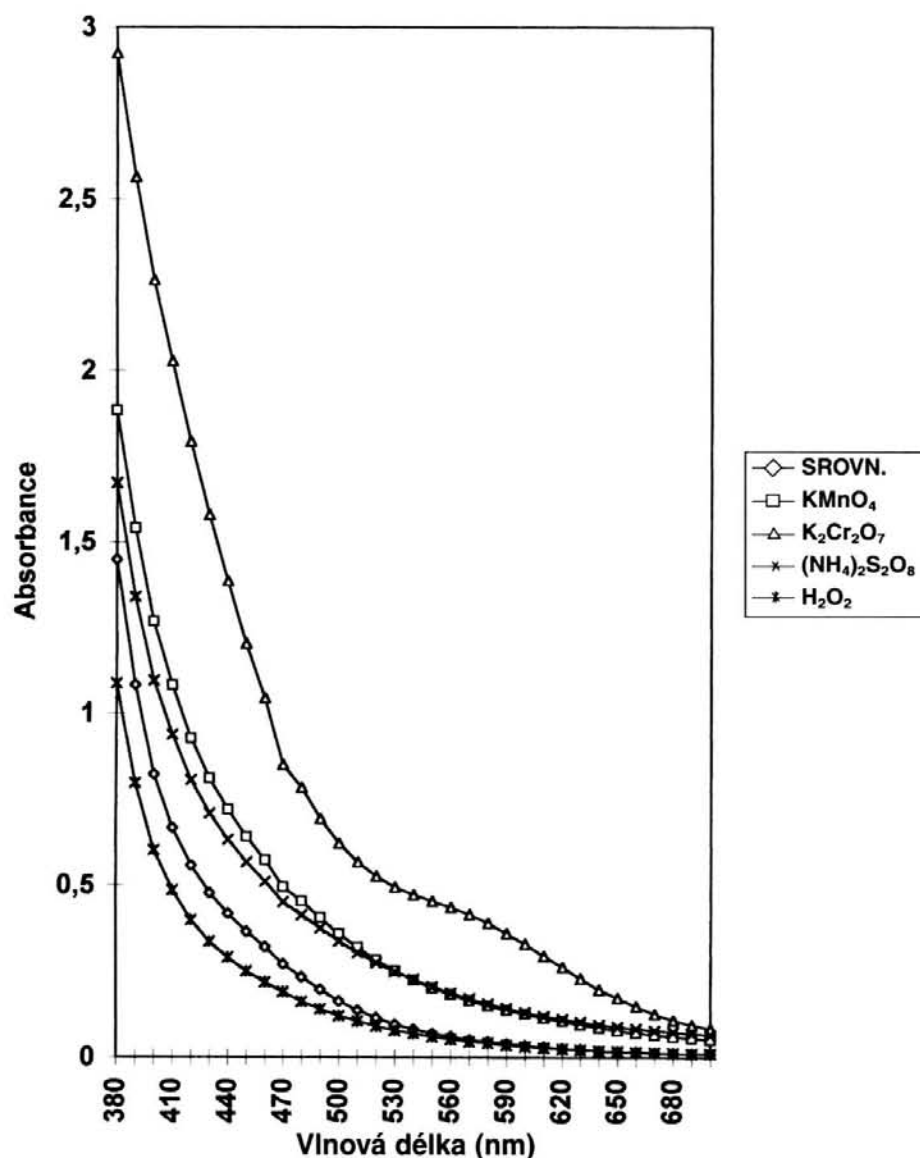
Činidlo na průkaz aldehydů m-fenylendiaminem: 4% roztok m-fenylendiaminu se smísil se stejným dílem kyseliny fosforečné (1,62 g.ml⁻¹). K 5 ml vzorku se přidalo stejné množství činidla a po 1 h se měřila absorpce při 400 nm proti slepému pokusu.

2.3 Stanovení aldehydů reakcí s kyselinou thiobarbiturovou (TBS) (upraveno podle [23])

Činidlo: roztok kyseliny thiobarbiturové ($c = 0,025 \text{ mol.l}^{-1}$) v kyselině fosforečné ($c = 1 \text{ mol.l}^{-1}$) se připravilo rozpuštěním 0,36 g TBS v roztoku 6,7 ml 85% kyseliny fosforečné v 90 ml destilované vody a objem se doplnil na 100 ml. Po smísení 5 ml vzorku s 2 ml činidla se roztok doplnil na 10 ml a po ohřevu ve vodní lázni 1 h při 60 °C se měřily absorpce při 450 a 530 nm proti slepému pokusu.

2.4 Příprava a identifikace těkavých oxidačních produktů piva a meziproductů

K 100 ml tekutého vzorku, popř. zbave-



Obr. 3 Absorpční spektra 12% piva po třídenní oxidaci 0,05 % oxidačními činidly při 50 °C.

ného oxidu uhličitého třepáním, se přidal roztok oxidačního činidla a směs se přeháněla vodní párou. Do předlohy se jímalo prvních 50 ml destilátu.

K 50 ml destilátu po přehánění vodní párou se přidalo 5 ml 1% 2,4-dinitrofenylhydrazinu v koncentrované kyselině chlorovodíkové a směs se zahřívala 30 min při 60 °C na vodní lázni. Po ochlazení se roztok ponechal do druhého dne v chladničce.

Vyloučená sraženina se odsála na membránovém filtru (0,45 µm), promyla kyselinou chlorovodíkovou ($c = 2 \text{ mol.l}^{-1}$), destilovanou vodou a sušila 2 h při 105 °C. Po usušení se sraženina z filtru odstranila nerezovým nožem a zvažila.

Pro měření absorpčních spekter a chromatografi se 2,4-dinitrofenylhydrazony zachytily na skleněné fritě a po promytí kyselinou chlorovodíkovou a destilovanou vodou se sraženina rozpustila v 15 ml rozpouštědla. Měřila se absorpční spektra roztoků 2,4-dinitrofenylhydrazonů v roztoku hydroxidu sodného ($c = 0,25 \text{ mol.l}^{-1}$) a v chloroformu. Chloroformové roztoky se chromatografovaly na tenké vrstvě.

Na start destičky s tenkou vrstvou silikagelu se nanoslo 150 µl roztoku 2,4-dinitrofenylhydrazonu v chloroformu. Chromatogram se vyvíjel směsí chlorid uhličitý:benzen v poměru 9 : 1.

2.5 Přístroje a zařízení

Hodnoty absorbancí a absorpční spektra se měřily spektrofotometrem CADAS 100 (Dr. B. Lange, SRN) v křemenné nebo skleněné 1 cm kyteti, s programy TEST a PCS-CAN s intervalem měření 10 nm. Zákal se měřil zákalometrem LTP 6B (Dr. B. Lange, SRN).

K chromatografii na tenké vrstvě se použily aluminiové destičky s vrstvou silikagelu SILUFOL UV 254 (Kavalier Sázava).

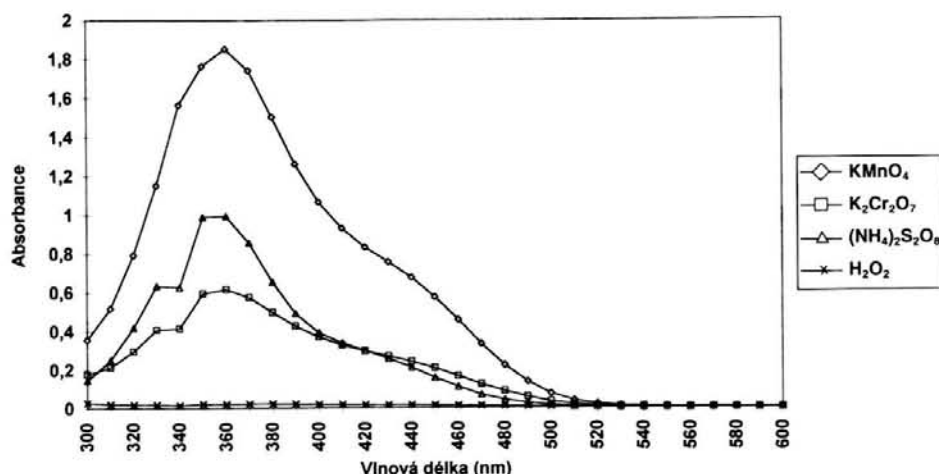
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Změny vlastností piva oxidací různými činidly

K 12% lahvovému pivo se přidaly roztoky oxidačních činidel do výsledné koncentrace 0,05% účinné složky. Po uzavření korunkou se láhve udržovaly 3 dny při 0,30 a 50 °C. Po dalších 24 h v ledové lázni se měřil zákal a po ohřátí vzorků na pokojovou teplotu se posoudila barva a vůně piva. Barva piva se hodnotila subjektivně i podle průběhu absorpčních spekter. V závodové degustační komisi se posoudily intenzita a charakter cizí vůně. Výsledky změn vlastností piva uvádějí obr. 2 a 3.

Tab. 1 Obsah karbonylových sloučenin po oxidaci ethanolu a piva

Oxidační činidlo	2,4-dinitrofenylhydrazon (mg)	
	Ethanol	Pivo
KMnO ₄	26,1	25,9
K ₂ Cr ₂ O ₇	1,0	1,6
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	27,7	27,6
H ₂ O ₂	1,6	0,8



Obr. 4 Absorpční spektra 2,4-dinitrofenylhydrazonů v chloroformu po oxidaci sladiny.

Podle obr. 2 se jednotlivá činidla lišila v schopnosti vyvolávat zákal měřitelný při 0 °C i v intenzitě změn absorpčního spektra. Nejsilnější zákal se sice tvořil u vzorku s nejvíce změněnou barvou, závislost mezi barvou a intenzitou zákalu se však nepodařilo prokázat. Na dně láhvi piva po oxidaci manganistanem draselným se tvořily hrubé klky, pravděpodobně oxid manganický.

Typické zbarvení starého, silně oxidovaného piva, zahrnující červenohnědou až tmavě hnědou barvu, se lišilo intenzitou u pív oxidovaných jednotlivými činidly (obr. 3). Pivo po oxidaci peroxidem vodíku mělo žlutou barvu a nižší absorbanci proti srovnávacímu pivo v celé oblasti viditelného spektra.

Intenzita cizí vůně byla velmi silná po oxidaci při 50 °C a dobře patrná i po oxidaci při 0 °C. Pivo po oxidaci manganistanem draselným mělo zatuchlou, nepříjemnou vůni po starých houbách. Pivo oxidované dichromanem draselným vykazovalo sirupovitou až karamelovou vůni, hodnocenou také jako vůně po sherry.

Oxidace peroxodisíranem draselným a peroxidem vodíku poskytovaly štiplavou, oxidační vůni po lepence, přičemž mnohem výraznější byla tato vůně po oxidaci peroxodisíranem.

3.2 Oxidace 12% piva a ethanolu různými oxidačními činidly

Vytřepané 12% pivo s přidávkou oxidačního činidla ve výsledné koncentraci 0,2% v pivo se přehánělo vodní párou a posoudila se vůně destilátů. Z destilátů se připravily 2,4-dinitrofenylhydrazony. Stejně se postupovalo s 4% ethanolom, jehož pH se předem upravilo kyselinou sírovou na hodnotu 4,5.

Destiláty po oxidaci piva různými oxidačními činidly měly podobný charakter cizích vůní jako piva po jejich přidávce (odstavec 3.1), zatímco destiláty po oxidaci ethanolu

poskytovaly pouze příjemnou ovocnou vůni po acetaldehydu, popř. po ethanolu. Množství vyloučených 2,4-dinitrofenylhydrazonů uvádí tab. 1.

Manganistan draselný a peroxodisíran amonný poskytovaly při oxidaci větší množství acetaldehydu. Přítomnost acetaldehydu se prokázala reakcí s nitroprusidem sodným.

3.3 Oxidace sladiny různými oxidačními činidly

Sladina (předek po naředění na 12%) se oxidovala stejným postupem jako v odstavci 3.2. Vůně destilátů po přehánění vodní párou se částečně podobaly vůním destilátů pív. Téměř shodný charakter měla vůně piva nebo sladiny, oxidované peroxodisíranem amonným.

Destiláty po přehánění vodní párou se zpětně dávkovaly do piva, aby se zjistila prahová hodnota těchto izolátů.

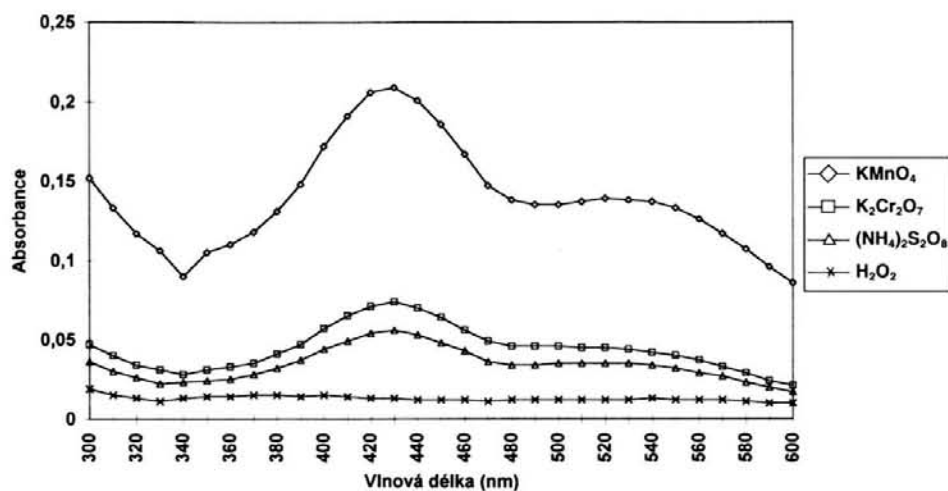
Produkty oxidace manganistanem a dichromanem draselným se podařilo smyslově rozeznat ve zředění 1 : 100, produkty oxidace peroxodisíranem amonným ve zředění 1 : 1000.

V destilátech po oxidaci sladiny se prokazovaly aldehydy barevnými reakcemi (tab. 2). V tabulce se rovněž pro porovnání uvádí intenzita reakce s destilátem po oxidaci ethanolu peroxodisíranem amonným (odst. 3.2) po zředění 1 : 9.

Z destilátu po oxidaci sladiny se připravily 2,4-dinitrofenylhydrazony, jejichž absorp-

Tab. 2 Obsah těkavých aldehydů po oxidaci sladiny a ethanolu (PA = peroxodisíran amonný)

Oxidační činidlo	Absorbance			
	Fuchsin	m-fenylendiamin	kyselina thiobarbiturová	
			450 nm	530 nm
KMnO ₄	0,012	0,037	0,056	0,024
K ₂ Cr ₂ O ₇	0,009	0,019	0,038	0,013
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	0,016	0,085	0,048	0,043
H ₂ O ₂	0,006	0,017	0,060	0,013
EtOH+PA (1:9)	0,080	0,011	0,016	0,018



Obr. 5 Absorpční spektra 2,4-dinitrofenylhydrazonů v NaOH po oxidaci sladiny

ční spektra v chloroformu a v roztoku hydroxidu sodného uvádějí obr. 4 a 5. Izolované 2,4-dinitrofenylhydrazony se dále dělily na tenké vrstvě.

Absorpční spektra v chloroformu vykazovala hlavní maxima při 360 nm, v hydroxidu sodném při 430 nm, což podle literatury odpovídá nasyceným aldehydům nebo ketonům. Chromatografie na tenké vrstvě prokázala přítomnost nejméně tří oddělených složek v jednotlivých izolátech.

4. DISKUSE

Oxidační destrukční analýza (ODA) se zakládá na zkoumání typických vlastností piva po oxidaci oxidačními činidly. Metoda umožňuje studovat spotřebitelsky významné vlastnosti piva po účinku extrémních podmínek a usuzovat tak na jejich stabilitu. Poprvé jsme tento název použili pro posouzení vlastností piva po oxidaci piva peroxodisíranem amonným [24].

Při stárnutí piva se jako destrukční činidlo uplatňuje zejména kyslík, jehož molekuly se mohou nacházet v různých energeticky bohatých stavech. Proto se studovaly změny vlastností piva po aplikaci různých oxidačních činidel. Tím vznikaly oxidační produkty s různými smyslově významnými vlastnostmi.

Oxidace roztoky manganistanu a dichromanu draselného se zejména uplatňovaly při změnách barvy a tvorbě zákalu v pivu. Pivo silně hnědlo a původní fialová barva manganistanu draselného ihned po přidávku přecházela na hnědou barvu za vzniku hrubých klků, tvořených pravděpodobně oxidem manganitým, které se usadily na dně láhve. Oxidace peroxodisíranem amonným měnila v menším rozsahu barvu do hněda, zatímco po oxidaci peroxidem vodíku byla barva žlutá. Všechna oxidační činidla zvyšovala tvorbu zákalu měřeného při 0 °C.

Vůně piva se po oxidaci manganistanem a dichromanem draselným měnila na starou a zatahou, zcela odlišnou od ostré, štiplavé vůně po oxidaci peroxodisíranem amonným, typické pro počáteční fázi přiroze-

ného stárnutí piva. V menší míře se tato vůně vyskytovala po oxidaci peroxidem vodíku.

Po oxidaci piva oxidačními činidly za poměrně mírných podmínek (pH piva bylo 4,5) se prokázala tvorba těkavých aldehydů, především acetaldehydu (tab. 1). Nejvíce acetaldehydu vzniklo při oxidaci piva manganistanem draselným a peroxodisíranem amonným.

Působení různých oxidačních činidel může modelovat změny spotřebitelsky významných vlastností piva při jejich stárnutí. Podle druhu činidla lze zvýraznit tvorbu barvy, zákalu, popř. získat těkavé produkty s různou vůní. Oxidační reakce lze řídit tak, aby se ve větší míře oxidoval ethanol a tím i pravděpodobně i vyšší alkoholy, nebo naopak tyto reakce potlačit. Podle literárních údajů se při přirozeném stárnutí piva tvoří nejdříve acetaldehyd, později jeho tvorba ustává a oxidační změny se podobají změnám po oxidaci piva dichromanem draselným.

Podle získaných výsledků se pro urychlení typických počátečních změn při stárnutí piva nejlépe hodí peroxodisíran amonný. Oxidace touto látkou nejlépe napodobuje typické změny vlastností piva při přirozeném stárnutí a její působení je silnější než u peroxidu vodíku. Roztoky peroxodisíranu amonného se snadno připravují a jsou dostatečně stálé. Peroxid vodíku bývá stabilizován proti rozkladu, což vnáší další látky do zkoušeného systému.

Působení oxidačních činidel na sladinu poskytovalo rovněž senzoričky významné látky s reakcemi aldehydů. Ze vzájemného porovnání hmotností 2,4-dinitrofenylhydrazonů a intenzit barevných reakcí lze odhadovat koncentrace aldehydů vznikajících oxidací sladiny, vyjádřených jako acetaldehyd, na řádové jednotky až desítky miligramů v 1 litru destilátu po přehánění vodní párou.

Větší šířka absorpčních pásů izolovaných 2,4-difenyldiazonů (obr. 4, 5) odpovídá spíše směsi karbonylových sloučenin než jediné složce, což potvrdila chromatografie na tenké vrstvě. Nalezená maxima absorpčních pásů jsou podle literárních údajů charakte-

ristická pro nasycené aldehydy nebo ketony [25].

Z provedených experimentů nelze jednoznačně prokázat, zda izolované aldehydické složky byly skutečnou příčinou pozorovaných cizích vůní, nebo zda s nimi souběžně vznikaly. Pouze u oxidačního produktu vznikajícího po oxidaci peroxodisíranem amonným se podařilo rozkladem izolovaného 2,4-dinitrofenylhydrazonu roztokem zředěné kyseliny sírové potvrdit opět tvorbu typické cizí vůně, což pravděpodobně souvisí s extrémně nízkou prahovou hodnotou účinné složky.

Charakter vůně odpovídá nejspíše vůním, souvisejícím s přítomností sloučenin příbuzných s *trans*-2-nonenalem.

Tento produkt pravděpodobně vzniká v menší míře i při oxidaci peroxidem vodíku. Ze získaných výsledků lze odhadnout prahovou hodnotu této sloučeniny v pivu na řádově $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Podle výsledků práce mohou těkavé aldehydy vznikat již oxidací sladiny, takže není nezbytně nutná přítomnost vyšších alkoholů, vznikajících při hlavním kvašení. Pro identifikaci těchto složek bude nutné použít moderní analytické metody, jako jsou hmotnostní spektrometrie, plynová chromatografie a infračervená spektrofotometrie.

Při stárnutí piva se zřejmě uplatňuje nejen složení piva, ale i jednotlivé formy kyslíku, na nichž závisí výsledné změny organoleptických vlastností piva. Tento závěr se např. shoduje s pozorováním, že fotochemická oxidace piva může sice měnit barvu piva a vyvolávat zákal, ale smyslové změny jsou odlišné od smyslových změn, způsobených chemickou oxidací při přirozeném stárnutí.

Podle výsledků práce může oxidační destrukční analýza přispět k poznání mechanismů stárnutí piva i k stanovení odolnosti jednotlivých piv vůči stárnutí.

LITERATURA

- [1] BAMFORTH, C. W., MULLER, R. E., WALKER, M. D.: J. Am. Soc. Brew. Chem., **51**, 1993, s. 79.
- [2] IRWIN, A. J., BARKER, R. L., PIPASTS, P.: J. Am. Soc. Brew. Chem., **49**, 1991, s. 140.
- [3] LUŇÁK, S., SEDLÁK, P.: J. Photochem. Photobiol. A: Chem., **68**, 1992, s. 1.
- [4] TEMPLAR, J., ARRIGAN, K., SIMPSON, W. J.: Brew. Dig., **70**, 1995, (5), s. 18.
- [5] BONTE, S., DUPIRE, S.: EBC Biochem. Microbiol. Group Bull. 1994, s. 39.
- [6] SAKUMA, S., KOWAKA, M.: J. Am. Soc. Brew. Chem., **52**, 1994, s. 37.
- [7] KAUKOVIRTA-NORJA, A., et al.: Proc. EBC Congr. 1995, s. 193.
- [8] De BUCK, A., et al: Proc. EBC Congr. 1995, s. 209.
- [9] NOËL, S., COLLIN, S.: EBC Proc. Congr. 1995, s. 483.
- [10] CANTRELL, I. C., GRIGGS, D. L.: Techn. Quart. MBAA, **33**, 1996, s. 82.

- [11] BOIVIN, P., et al.: EBC Brew. Sci. Group Bull. 1996, s. 34.
- [12] MIEDANER, H., NERZISS, L., EICH-HORN, P.: Proc. EBC Congr. 1991, s. 401.
- [13] KANEDA, H., et al.: Techn. Quart. MBAA, **32**, 1995, s. 76.
- [14] KANEDA, H., et al.: Techn. Quart. MBAA, **32**, 1995, s. 90.
- [15] UCHIDA, M., ONO, M.: J. Am. Soc. Brew. Chem., **54**, 1996, s. 198.
- [16] UCHIDA, M., SUGA, S., ONO, M.: J. Am. Soc. Brew. Chem., **54**, 1996, s. 205.
- [17] WACKERBAUER, K., HARDI, R.: Brauwelt, **126**, 1996, s. 1880.
- [18] WAESBERGHE van, I. J.: Techn. Quart. MBAA, **33**, 1996, s. 96.
- [19] ŠAVEL, J., PROKOPOVÁ, M., ZDVIHALOVÁ, D.: Kvas. prům., **41**, 1995, s. 374.
- [20] ŠAVEL, J., ZDVIHALOVÁ, M., PROKOPOVÁ, M.: Kvas. prům., **42**, 1996, s. 275.
- [21] ŠAVEL, J., ZDVIHALOVÁ, M., PROKOPOVÁ, M.: Kvas. prům., **43**, 1997, s. 67.
- [22] VEČEŘA, M., GASPARIČ, J.: Důkaz a identifikace organických látek. 2. vyd., Praha 1973.
- [23] LANGE, B., VEJDĚLEK, Z. J.: Photometrische analyse. Verlagsgesellschaft Weinheim, SRN 1987.
- [24] ŠAVEL, J.: Kvas. prům., **42**, 1996, s. 376.
- [25] DAVÍDEK, J. et al.: Laboratorní příručka analýzy potravin. 1. vyd., SNTL Praha, 1977.
- Lektoroval Doc. Ing. J. Čepička, CSc.
Do redakce došlo 6. února 1997*