

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

POROVNÁNÍ ANALYTICKÝCH METOD PRO STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY POTRAVIN

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

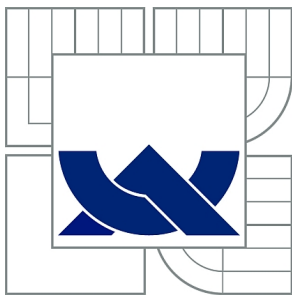
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

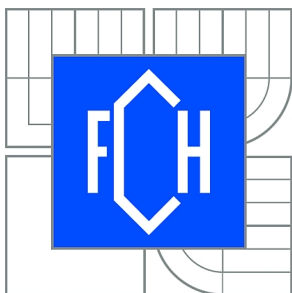
ALENA KŘENOVÁ

BRNO 2013



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

POROVNÁNÍ ANALYTICKÝCH METOD PRO STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY POTRAVIN

COMPARISON OF AN ANALYTICAL TECHNIQUES FOR DETERMINATION OF AN ANTIOXIDANT
ACTIVITY IN FOOD

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

ALENA KŘENOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. PAVEL DIVIŠ, Ph.D.

BRNO 2013



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0732/2012	Akademický rok: 2012/2013
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Alena Křenová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901R021)	
Vedoucí práce	Ing. Pavel Diviš, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Porovnání analytických metod pro stanovení antioxidační aktivity potravin

Zadání bakalářské práce:

Cílem bakalářské práce je vypracování literární rešerže z oblasti stanovení antioxidační aktivity potravin, vypracování jednotlivých vybraných postupů pro stanovení antioxidační aktivity potravin, jejich ověření a popř. jejich vzájemné porovnání v rámci analýzy vybraných druhů potravin.

Termín odevzdání bakalářské práce: 10.5.2013

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Alena Křenová
Student(ka)

Ing. Pavel Diviš, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2013

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá charakteristikou přírodních a syntetických antioxidantů a jejich působením na volné radikály. Přírodní antioxidanty přijímáme většinou jako součásti složitých směsí, a proto se snažíme antioxidační aktivitu charakterizovat jako celek. Pro stanovení celkové antioxidační aktivity potravin byly vyvinuty chemické a fyzikální metody. Práce se soustředí na chemické metody, konkrétně na ABTS a DPPH, které jsou založeny na reakci antioxidantů se syntetickými radikály, a dále na metodu FRAP, která je založena na redukční schopnosti antioxidantů. V experimentální části jsou tyto metody porovnávány z hlediska jejich náročnosti a poskytnutých výsledků z analýz reálných vzorků potravin.

ABSTRACT

This bachelor's thesis deals with the characterization of natural and synthetic antioxidants and their effects on free radicals. Natural antioxidants are usually absorbed as a part of complex mixtures and that's why we try to characterize an antioxidant activity as a whole. Chemical and physical methods have been developed to determine the total antioxidant activity of food. This thesis focuses on chemical methods, specifically on ABTS and DPPH, which are based on a reaction of antioxidants with synthetic radicals. Next chemical method is FRAP, which is based on the reducing ability of antioxidants. In the experimental part, these methods are compared from a perspective of their performance and the results of the analysis of real food samples.

KLÍČOVÁ SLOVA

Volné radikály, antioxidanty, celková antioxidační aktivita, ABTS, DPPH, FRAP.

KEYWORDS

Free radicals, antioxidants, total antioxidant activity, ABTS, DPPH, FRAP.

KŘENOVÁ, A. *Porovnání analytických metod pro stanovení antioxidační aktivity potravin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 40 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Pavel Diviš, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala Ing. Pavlu Divišovi, Ph.D., za odborné vedení a cenné rady při vzniku této práce.

OBSAH:

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Volné radikály	9
2.1.1	Reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS)	9
2.1.2	Oxidační stres.....	10
2.2	Antioxidanty	10
2.2.1	Dělení antioxidantů	11
2.2.2	Přírodní látky s antioxidačními účinky.....	12
2.2.2.1	Vitamin A – retinol.....	12
2.2.2.2	Vitamin C – kyselina askorbová.....	13
2.2.2.3	Vitamin E – tokoferol	14
2.2.2.4	Flavonoidy.....	15
2.2.2.5	Karotenoidy	16
2.2.2.6	Fenolické látky	17
2.2.3	Syntetické látky s antioxidačními účinky	17
2.2.3.1	BHA	17
2.2.3.2	BHT	18
2.2.3.3	TBHQ.....	18
2.2.3.4	Fumarová kyselina (E297)	19
2.2.3.5	Galláty.....	19
2.2.4	Mechanismus působení antioxidantů	19
2.2.4.1	Přeměny antioxidantů při inhibičním procesu.....	20
2.2.4.2	Synergie antioxidantů	20
2.3	Stanovení celkové antioxidační aktivity potravin	20
2.3.1	Metody založené na eliminaci radikálů	20
2.3.1.1	Metoda TEAC (metoda používající ABTS).....	21
2.3.1.2	Metoda používající DPPH.....	22
2.3.1.3	Metoda ORAC.....	22
2.3.2	Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek	23

2.3.2.1	Metoda FRAP	23
2.3.2.2	Cyklická voltametrie	23
2.3.2.3	HPLC metoda s elektrochemickou detekcí	24
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
3.1	Seznam použitých přístrojů a chemikálií	25
3.1.1	Přístroje	25
3.1.2	Chemikálie	25
3.1.2.1	Standardní chemikálie	25
3.1.2.2	Ostatní chemikálie	25
3.1.3	Pracovní pomůcky	25
3.1.4	Příprava roztoků	25
3.1.5	Vzorky – rostlinný materiál	26
3.1.6	Příprava vzorků	26
3.2	Pracovní postupy při provádění jednotlivých metod	27
3.2.1	Metoda TEAC (metoda používající ABTS)	27
3.2.1.1	Stanovení kinetiky reakce	27
3.2.1.2	Stanovení kalibrační křivky	27
3.2.2	Metoda DPPH	27
3.2.2.1	Stanovení kinetiky reakce	27
3.2.2.2	Stanovení kalibrační křivky	28
3.2.3	Metoda FRAP	28
3.2.3.1	Stanovení kinetiky reakce	28
3.2.3.2	Stanovení kalibrační křivky	28
3.2.4	Měření vzorků	28
3.2.4.1	Měření vybraných vzorků metodami ABTS, DPPH a FRAP	28
3.2.4.2	Statistické hodnocení	29
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	30
4.1	Příprava roztoků	30
4.2	Kinetika reakcí	30
4.3	Kalibrační křivky	31

4.4	Porovnání testovaných metod	33
5	ZÁVĚR	36
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	37
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	40

1 ÚVOD

Antioxidační aktivita potravin je bezprostředně spojena s ochranou biologických systémů proti škodlivému účinku reakcí zahrnujících reaktivní formy kyslíku a dusíku (ROS a RNS). Tyto radikály působí na biologicky významné sloučeniny, především lipidy, bílkoviny a nukleové kyseliny, a pozměňují tím jejich strukturu a funkci. Jejich působením může docházet ke změnám ve struktuře buněk a k poškození celých tkání a orgánů. Jednou z možností ochrany organismu proti volným radikálům je působení antioxidantů. Antioxidanty zabraňují nebo omezují oxidační destrukci těchto látek. Mnoho látek přírodního původu, které přijímáme v potravě, má tyto vlastnosti, zejména pak antioxidační vitaminy, polyfenolické látky, karotenoidy a flavonoidy.

Přírodní antioxidanty přijímáme většinou jako součásti složitých směsí, jejichž složky reagují s radikály odlišnými mechanismy. Z tohoto důvodu se snažíme charakterizovat antioxidační aktivitu vzorku jako celek. Byl zaveden pojem celková antioxidační aktivita (TAA), pomocí kterého můžeme porovnávat antioxidační účinky různých směsí měřených různými metodami.

Ochranné účinky antioxidantů upoutávají stále větší pozornost a tím se zvyšuje požadavek na jednoduché a spolehlivé metody pro stanovení antioxidační aktivity potravin. Celkovou antioxidační aktivitu lze stanovit jak metodami chemickými, tak fyzikálními. Tato práce se zaměřuje na chemické metody, které jsou založeny na reakci antioxidantů se syntetickými (ABTS, DPPH) nebo kyslíkovými radikály (ORAC). Kromě těchto metod je v práci dále použita metoda FRAP, která využívá pro měření antioxidační aktivity látek schopnosti antioxidantů redukovat komplex Fe^{III} -TPTZ na Fe^{II} -TPTZ.

Cílem této bakalářské práce bylo na základě dostupných literárních zdrojů vypracovat postupy pro stanovení celkové antioxidační aktivity a porovnat tyto metody na základě analýzy vybraných vzorků potravin.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Volné radikály

Volné radikály jsou nestabilní, vysoce reaktivní molekuly, atomy nebo ionty, které obsahují alespoň jeden nebo více nepárových elektronů ve své valenční sféře [1]. Ve snaze získat chybějící elektron jsou schopny se rychle vázat na jinou strukturu nebo odebrat či přidat elektron jiné molekule. Z toho pramení jejich velká reaktivita a omezená doba existence. Reagují nejen s ostatními volnými radikály, ale i s inaktivními molekulami, a tím vytvářejí další volný radikál; tento děj dále pokračuje jako řetězová reakce [2]. V molekulách mohou volné radikály vznikat třemi způsoby: redukcí, oxidací a homolytickým štěpením kovalentní vazby [3]. Oxidace představuje základní proces metabolismu a celého aerobního života. Volné radikály mohou napadat lipidy v lipoproteinech a buněčných membránách, nukleové kyseliny, sacharidy i bílkoviny včetně enzymů, což může vést k těžkému poškození tkání a celých orgánů [2]. Důsledkem agresivního působení na buňky způsobují volné radikály různé zdravotní problémy, včetně aterosklerózy, zánětů, srdečně-cévních chorob a některých typů rakoviny [1].

2.1.1 Reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS)

V organismu jsou nejdůležitější reaktivní formy kyslíku a dusíku. Reaktivní formy kyslíku, známé pod pojmem ROS, jsou v těle produkovány při metabolických procesech vyžadujících kyslík – při dýchání a při určitých buněčných imunitních funkcích [3],[4]. Zahrnují jak radikálové, tak neradikálové formy. Reaktivní formy dusíku jsou označovány jako RNS (reactive nitrogen species) [4].

Tabulka 2.1. Reaktivní formy kyslíku (ROS), reaktivní formy dusíku (RNS) a neradikálové formy [4]

Reaktivní formy kyslíku		Neradikálové formy	
Superoxid	$O_2^{\cdot -}$	Peroxid vodíku	H_2O_2
Hydroxyl	$HO^{\cdot}$	Singletový kyslík	1O_2
Hydroperoxyl	$HOO^{\cdot}$	Ozon	O_3
Lipid	$L^{\cdot}$	Lipid hydroperoxid	$LOOH$
Lipid peroxy	$LOO^{\cdot}$	Kyselina chlorná	$HOCl$
Peroxy	$ROO^{\cdot}$	Peroxynitrit	$ONOO^-$
Lipid alkoxy	$LO^{\cdot}$	Oxid dusitý	N_2O_3
Oxid dusičitý	$NO_2^{\cdot}$	Kyselina dusitá	HNO_2
Oxid dusnatý	$NO^{\cdot}$	Nitryl chlorid	NO_2Cl
Nitrosil	NO^+	Nitroxyl	NO^-
Thiyl	$RS^{\cdot}$	Kyseliny peroxydusitá	$ONOOH$
Protein	$P^{\cdot}$	Oxid dusný	N_2O

Nejvýkonnějším producentem reaktivních metabolitů kyslíku v buňkách jsou membránově vázané enzymy – hlavně ty, jejichž koenzymy jsou schopné redukovat kyslík pouze jediným elektronem za vzniku superoxidu $O_2^{\cdot-}$. Jedná se o koenzymy s flavinovou nebo chinoidní strukturou, koenzymy s mědí v aktivním centru nebo o hemové koenzymy [5]. Velikým zdrojem ROS je respirační řetězec mitochondrií, kdy místo čtyřelektronové redukce kyslíku na vodu dochází pouze k jedoelektronové redukci kyslíku za vzniku superoxidu, který je samovolně nebo enzymaticky převeden na peroxid vodíku. Dalším zdrojem ROS je vznik superoxidu z oxykomplexu cytochromu P-450 v endoplazmatickém retikulu nebo β -oxidace mastných kyselin probíhající v peroxisomech. Ve specializovaných buňkách (např. leukocyty, makrofágy) je superoxid produkován NADPH-oxidázou obsaženou v cytoplazmatické membráně jako součást baktericidního ochranného systému. ROS jsou v těle tvořeny i velkým množstvím dalších procesů [3].

Nejvýznamnějším reaktivním metabolitem kyslíku je superoxidový radikál, který není příliš reaktivní, ale je prekurzorem a výchozí látkou pro tvorbu dalších neredukovaných reaktivních forem kyslíku (např. hydroxylového radikálu) [1].

Nejvýznamnějším reaktivním metabolitem dusíku je oxid dusnatý. Oxid dusnatý je radikál, za určitých okolností prudce jedovatý. Při nízkých koncentracích reaguje velmi pomalu s většinou molekul, včetně kyslíku. Pomalá reakce je způsobena několika faktory: průběžným vychytáváním oxidu dusnatého v erytrocytech za vzniku methemoglobinu, mnohem rychlejší difuzí oxidu dusnatého do krve, než je rychlost syntézy oxidu dusnatého, regulační funkcí oxidu dusnatého v nízkých koncentracích a schopností oxidu dusnatého reagovat *in vivo* dostatečně rychle jen s tranzitními kovy [1].

Na druhou stranu ale oxid dusnatý ovlivňuje regulaci krevního tlaku a krevního oběhu. Dále je součástí systémů, které chrání organismus proti bakteriím, prvokům, nádorům a zasahuje do procesů nespecifické imunity [3].

2.1.2 Oxidační stres

Pojmem oxidační stres označujeme poškození rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním reaktivních forem kyslíku a dusíku. Může být vyvolán nedostatečnou funkcí antioxidačního systému, nadměrnou produkcí RONS nebo spojením obou nedostatků [5].

ROS jsou v organismu součástí enzymových mechanismů, účastní se uvolňování a přeměny energie nezbytné pro život. Za normálních okolností v organismu neškodí – škodí pouze, vymknou-li se kontrole [5].

2.2 Antioxidanty

Antioxidanty jsou molekuly, které – jsou-li přítomny v malých koncentracích ve srovnání s látkami, jež by měly chránit – mohou zabraňovat nebo omezovat oxidační destrukci těchto látek [6]. Antioxidanty (správně nazývány inhibitory oxidace) mají značný význam z hlediska eliminace volných radikálů – zejména kyslíku a dusíku. Zajišťují ochranu buněk a jejich struktur před nežádoucím působením těchto radikálů a podílejí se na eliminaci účinků tzv. oxidačního stresu v živočišných i rostlinných buňkách [7]. Antioxidanty představují skupinu látek, které se velmi liší chemickou strukturou a mají rozdílné mechanismy působení. Jedním z nejdůležitějších mechanismů působení je reakce s volnými radikály a tvorba inaktivních, netoxických produktů [8]. Antioxidanty tedy vytváří přirozený ochranný systém organismu před nežádoucími změnami, kterými jsou nejčastěji nenasycené mastné kyseliny,

některé aminokyseliny (zejména tryptofan a methionin), působení na integritu a následně permeabilitu membrán a řadu strukturálních dezintegračních změn s funkčními projevy [7]. Tato ochrana organismu představuje složitý komplex mechanismů, které prodlužují údržnost potravin tak, že je chrání před znehodnocením oxidací a před snadno se oxidujícími látkami. Projevem oxidace potravin je např. žluknutí tuků [9].

Epidemiologické studie dokazují, že nezdravý životní styl je nejčastější faktor přispívající k výskytu degenerativních chorob, jako je rakovina a kardiovaskulární choroby. Je prokázáno, že zvýšená konzumace ovoce a zeleniny přispívá k lepšímu zdravotnímu stavu. Ovoce a zelenina jsou zdrojem velkého množství živin, které mohou svými reakcemi snížit LDL cholesterol, krevní tlak, a mohou zlepšit celkový stav antioxidačního systému. Nedostatek antioxidantů je spojován s mnoha zdravotními komplikacemi. Za ubývání antioxidantů mohou diety omezující celkový přísun potravin, znečištění životního prostředí, kouření, stresové situace, atd. [10].

2.2.1 Dělení antioxidantů

Antioxidační systémy zahrnují jak antioxidační enzymy (superoxiddismutáza, kataláza, aj.), tak i neenzymatické substráty [7]. Mezi neenzymatické substráty patří endogenní nízkomolekulární antioxidanty (glutathion, kyselina močová, kyselina lipoová, koenzym Q) a přírodní látky s antioxidačními účinky (vitamin C, vitamin A, vitamin E, flavonoidy, katechiny, fenolické kyseliny a karotenoidy) [6]. Mezi antioxidanty řadíme i některé biomolekuly, jako je transferin, feritin, hemopexin, haptoglobin, aj. Nezastupitelnou roli v donor-akceptorovém systému sehrávají přechodné prvky železo a měď. Železo je vázáno na hemoglobin a uplatňuje se při transportu kyslíku a při dalších fyziologických funkcích v organismu. Měď je součástí řady enzymů (superoxiddismutázy, cytochromoxidázy a biomolekuly ceruloplazminu) [7].

Antioxidanty rozdělujeme podle různých kritérií. Nejčastěji je uvedeno dělení podle původu, mechanismu působení, chemického složení nebo podle stupně ochrany v komplexním antioxidačním systému [3], [9].

Podle původu dělíme antioxidanty na přírodní (extrakty a směsi získané ze zeleniny, koření, bylin, obilovin, olejnin, ovoce), přírodně identické (kyselina askorbová, syntetické tokoferoly) a syntetické (BHA, BHT, galláty) [9].

Podle struktury dělíme antioxidanty na fenolové sloučeniny (tokoferoly, syntetické tokoferoly, fenolové antioxidanty, galláty), endioly (kyselina askorbová, kyselina erythorbová, jejich soli a deriváty) a na jiné látky (amidy, kurkuminoidy, alkaloidy rostlin, flavonoidy) [9].

Podle stupně ochrany v komplexním antioxidačním systému dělíme antioxidanty na primární antioxidanty (eliminaci volných iontů Cu nebo Fe různými interními chelatačními činidly nebo inhibicí enzymů, které katalyzují tvorbu ROS, zabráňují tvorbě radikálů), sekundární antioxidanty (enzymové systémy a nízkomolekulární sloučeniny vychytávají již vytvořené ROS) a terciární antioxidanty (lipofilní a proteolytické enzymy a regenerační systémy pro opravu oxidačního poškození DNA odstraňují molekuly poškozené působením ROS) [3].

Podle ovlivnění procesu oxidace lipidů a jiných oxilabilních látek dělíme antioxidanty tak, že mohou reagovat s volnými radikály (primární antioxidanty), redukovat již vzniklé hydroperoxy (sekundární antioxidanty), vázat do komplexů katalyticky působící kovy nebo reagovat s přítomným kyslíkem [9].

2.2.2 Přírodní látky s antioxidačními účinky

V poslední době je velká pozornost věnována látkám přírodního původu, které se do lidského organismu dostávají společně s potravou. Některé potraviny rostlinného původu mají důležitou roli jako zdroj antioxidantů [6]. K přírodním látkám s antioxidačními účinky řadíme antioxidační vitaminy A, C a E. Čím dál tím větší význam je přikládán dalším přírodním látkám, zejména polyfenolickým sloučeninám a karotenoidům [11]. Zdrojem těchto látek je zelenina, ovoce, vláknina, čaje, vína a aromatické a léčivé rostliny [6].

Dávkování jednotlivých antioxidantů je individuální, proto je v případě nemoci nutná konzultace s lékařem. Preventivní dávkování je nižší než dávkování v době nemoci nebo při nesprávné stravě [12].

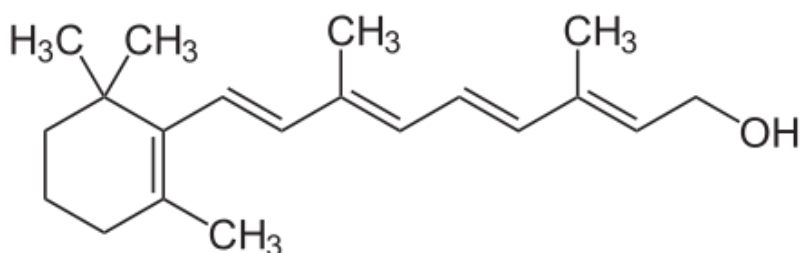
2.2.2.1 Vitamin A – retinol

Vitamin A a jeho provitaminy se řadí mezi terpenoidy nazývané také isoprenoidy. Provitaminy A jsou tetraterpeny (uhlovodíky) nebo tetraterpenoidy (jejich kyslíkaté deriváty), které obsahují v molekule 40 atomů uhlíku. Jejich štěpné produkty nazýváme apokarotenoidy, z nichž nejznámější biologicky aktivní apokarotenoid živočišných tkání je retinol neboli vitamin A₁ [13].

Karoteny jsou prekurzory vitaminu A a patří mezi nejdůležitější antioxidanty v naší výživě. Představují nejširší skupinu přírodních barviv. Nejznámějším prekurzorem vitaminu A je β-karoten. Vitamin A má však mnoho možných prekurzorů, jako je α-karoten, γ-karoten, aj. Často bývá zmiňováno 30 až 50 karotenů, které mají účinnost vitaminu A, avšak celkem jich existuje více než 400 [11]. Vitamin A je rozpustný v tucích a je skladován v játrech, proto je nutné syrové karoteny vždy spojit s konzumací tuků [12].

Provitaminy A jsou součástí kontrolních mechanismů likvidujících volné radikály, avšak výrazně vyšší antioxidační kapacitu mají některé jiné karotenoidy bez vitaminové účinnosti [13].

Provitaminy A (karoteny nebo xanthofyly) se vyskytují v potravinách rostlinného původu a také v mnoha mikroorganismech a vyšších houbách [13].



Obrázek 2.1. Vitamin A – retinol [14]

2.2.2.2 Vitamin C – kyselina askorbová

Vitamin C zaujal během posledních let klíčovou roli při prevenci a léčbě velkého množství nejrozličnějších onemocnění, poněvadž jeho účinky významně posilují fungování našeho imunitního systému. V našem těle se účastní více než tří set tělesných funkcí, proto je pro náš organismus naprosto nepostradatelný [11]. Vitamin C má čtyři možné stereoisomery, ale pouze kyselina L-askorbová vykazuje příslušnou aktivitu. Názvem vitamin C se označuje nejen kyselina L-askorbová, ale také celý reversibilní redoxní systém, který zahrnuje produkt jednoelektronové oxidace L-askorbylradikál a produkt dvouelektronové oxidace L-dehydroaskorbovou kyselinu [13].

Vitamin C je vitaminem pouze pro člověka a pro některé další savce (primáti, netopýři živící se ovocem, morčata). V potravinách rostlinného původu (stejně jako v plasmě a tkáních živočichů) je 90-95 % vitaminu přítomno ve formě askorbové kyseliny, zbytek je tvořen dehydroaskorbovou kyselinou. Nejbohatším zdrojem vitaminu C je čerstvé ovoce a čerstvá zelenina. Zpravidla nám ale konzumace ovoce a zeleniny nepokryje naši spotřebu vitaminu, neboť ji konzumujeme pouze příležitostně (sezónní ovoce) a v malém množství. Proto pro nás mají mnohem větší význam plodiny, které mají průměrnou hladinu vitaminu C, ale zato je konzumujeme celý rok – např. brambory nebo zelí [13].

Kyselina askorbová je v rostlinách syntetizována z D-glukosy. Jako antioxidant reaguje s peroxidem, superoxidem nebo s tokoferolovým radikálem za vzniku monodehydroaskorbové kyseliny nebo dehydroaskorbové kyseliny. Redukované formy jsou recyklovány zpět na askorbát pomocí NADPH nebo glutathionu za účasti příslušných enzymů [3].

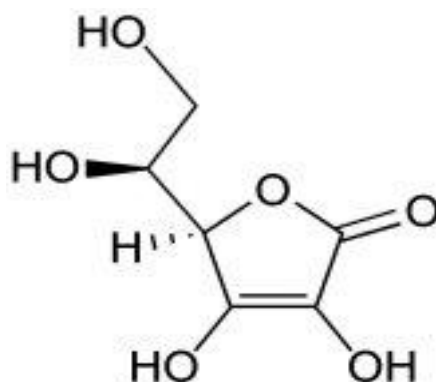
Kyselina askorbová má pro své vlastnosti široké využití jako potravinářské aditivum. Jako antioxidant se používá také natrium askorbát (askorbát sodný), ve vodě rozpustná sůl askorbové kyseliny a lipofilní sloučenina 6-palmitoyl-L-askorbová kyselina [13].

Kyselina askorbová je jedním z nejúčinnějších antioxidantů, působí proti celé řadě oxidačních látek a volných radikálů [11]. Velmi důležité jsou reakce s aktivními formami kyslíku a oxidovanými formami vitaminu E, které zabezpečují ochranu vitaminu E a lipidů membrán před oxidací. Reakce askorbové kyseliny s peroxylovým radikálem mastné kyseliny (R-O-O) nebo s alkoxylovým radikálem (RO) je uvedena v rovnicích 1–3 (R-O-OH je hydroperoxid mastné kyseliny) [13].



Vzniklý askorbylradikál disproportionuje na askorbovou a dehydroaskorbovou kyselinu, protože už není schopen vyvolat další řetězovou reakci [13].

Vitamin C má ochrannou funkci i pro labilní formy listové kyseliny a inhibuje také tvorbu nitrosaminů. Působí jako modulátor mutageneze a karcinogeneze [13].



Obrázek 2.2. Vitamin C – kyselina askorbová [15]

2.2.2.3 Vitamin E – tokoferol

Vitamin E, zvláště α -tokoferol, je nejvýznamnější v tukách rozpustný antioxidant, uplatňující se u eukaryotických buněk. Je považován za nejvýznamnější antioxidant, který spolu s β -karotenem a koenzymy Q chrání strukturu a integritu biomembrán – buněčné (cytoplasmatické) membrány a membrán vnitrobuněčných organel (buněčné jádro, mitochondrie, endoplasmatické retikulum, lysozomy) [13]. Dále se uplatňuje při rozbíjení řetězových reakcí volných radikálů v lipidech a lipoproteinech. Vitamin E napomáhá chránit LDL před oxidací (je transportován asociovaný s lipidovou fází lipoproteinových částic LDL), minimalizuje opotřebovávání nervových tkání a zabraňuje většímu hromadění krevních destiček, tvoření krevních sraženin, křečových žil a srdečním a mozkovým mrtvicím [11], [12]. Vitamin E je faktorem zpomalujícím proces stárnutí organismu a nachází uplatnění v prevenci kardiovaskulárních chorob a vzniku rakoviny [13].

Aktivitu vitamínu E vykazuje osm základních strukturně příbuzných derivátů chroman-6-olu. Strukturním základem všech sloučenin vykazujících aktivitu vitamínu E jsou tokol a tokotrienol, které dále obsahují chromanový cyklus s hydrofobním nasyceným nebo nenasyceným isoprenoidním postranním řetězcem o 16 atomech uhlíku [13].

Za nejúčinnější antioxidant (*in vivo*) je považován α -tokoferol. To však nemusí platit vždy, poněvadž antioxidační aktivita přítomných tokoferolů a tokotrienolů v potravinářských lipidech závisí na řadě faktorů – významným faktorem je složení nenasycených mastných kyselin. Při určitých podmínkách skladování jsou např. tokoferoly účinnějšími antioxidanty v živočišných tucích (hlavní mastnou kyselinou je olejová kyselina) než v rostlinných olejích (hlavní mastnou kyselinou je linolová kyselina) [13].

Mechanismus antioxidačního účinku vitamínu E je podobný účinku ostatních lipofilních antioxidantů, jako jsou např. fenolové sloučeniny. Tokoferoly reagují s volnými radikály, včetně ROS. Jedna molekula tokoferolu může reagovat celkem se dvěma hydroperoxylovými radikály. Autooxidace lipidů je inhibována reakcí s hydroperoxylovými radikály lipidů za vzniku hydroperoxidů a radikálů tokoferolů, čímž se přeruší řetězová reakce v propagační fázi (rovnice 4) [13].

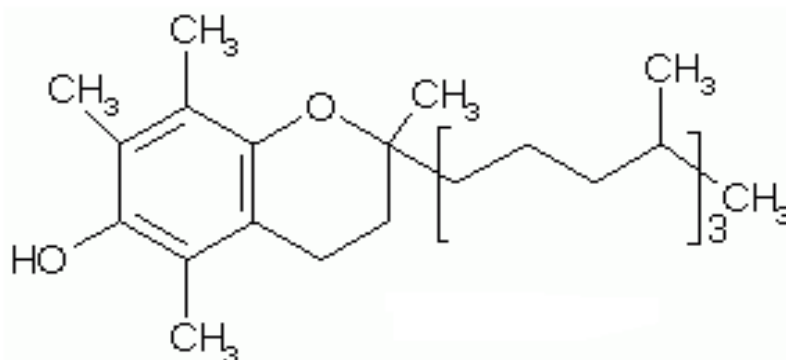


$R-O-O\bullet$ je hydroperoxylový radikál lipidu nebo mastné kyseliny, $T-OH$ je tokoferol, $R-O-OH$ je hydroperoxid a $T-O\bullet$ je radikál tokoferolu. Vzniklý radikál tokoferolu není dostatečně reaktivní, a proto nemůže štěpit další molekulu lipidu. V poslední fázi radikálové reakce – terminaci – dochází ke stabilizaci radikálu tokoferolu, a to nevratnou reakcí s jinými radikály, nejčastěji s druhým hydroperoxylovým radikálem (rovnice 5) [13].



Je-li koncentrace tokoferolu vyšší, mohou některé tokoferolové radikály reagovat vzájemně za vzniku dimeru (případně trimeru) [13].

V potravinách se vyskytuje všech osm biologicky aktivních tokoferolů a tokotrienolů. Samotný tokol a tokotrienol se v přírodě nevyskytují. Vitamin E se vyskytuje především v potravinách rostlinného původu, méně už v potravinách živočišného původu, tudíž živočišné tuky budou obsahovat mnohem méně vitaminu E než tuky rostlinné. V potravinách živočišného původu ovlivňuje složení vitaminů E hlavně složení krmiva, hlavní složkou je však vždy α -tokoferol [13]. Nejlepšími zdroji jsou olej z obilných klíčků (obsahuje 59,4 mg na 100 g), neloupané lněné semínko, slunečnicový olej (50 mg na 100 g), olej ze slunečnicových klíčků, sójový olej, ořechy, čerstvé pšeničné klíčky, zelená listová zelenina, vaječný žloutek, lískové oříšky, mandle a luštěniny [11], [12].



Obrázek 2.3. Vitamin E – tokoferol [16]

2.2.2.4 Flavonoidy

Flavonoidy jsou přírodní fenolické antioxidanty obsažené v lidské stravě. K antioxidační aktivitě potravin přispívají hlavně v zelenině, ovoci, olivách, v sojovém oleji, červeném víně, čokoládě a čaji [17].

Flavonoidy (vitaminy skupiny P) jsou rostlinná barviva syntetizovaná z fenylalaninu, představující obrovskou skupinu polyfenolických sloučenin. Základními rysy struktury polyfenolů je přítomnost jednoho nebo více hydroxylovaných benzenových jader s heterocyklickým kruhem obsahujícím ve své struktuře kyslík a další hydroxylové skupiny. Společným strukturním základem je uhlíkatý skeleton $C_6-C_3-C_6$. Díky jejich polyfenolické povaze vykazují flavonoidy dobré antioxidační účinky. Antioxidační aktivita flavonoidů

závisí na redoxních vlastnostech a struktuře flavonoidů [17]. Důležitý je pro ně počet hydroxylových skupin v molekule a jejich poloha [18].

Mezi flavonoidy řadíme katechiny, leukoanthokyanidiny, flavanony, flavanonoly, flavony, anthokyaniny, chalkony, dihydrochalkony a aurony [18].

Flavonoidy jsou hlavní barevnou složkou kvetoucích rostlin. Potravinám udávají určitou barvu a chuť, navíc působí jako prevence proti oxidaci tuků a jako ochránce vitaminů a enzymů [17].

Flavonoly jsou nejvíce zastoupenými flavonoidy v potravinách – řadíme mezi ně quercetin, kaempferol a myricetin. Flavonony se vyskytují hlavně v citrusových plodech, flavony v celeru [17].

Anthokyaniny

Anthokyaniny, nazývané též anthokyaniny, jsou nejrozšířenější a početně velice rozsáhlou skupinou rostlinných barev – v přírodě bylo identifikováno přes 500 různých antokyanů [19]. Anthokyaniny jsou barviva rozpustná ve vodě a udávají barvu květinám a spotřebitelsky žádaným druhům ovoce a zeleniny. Vyznačují se oranžovou, červenou, fialovou a modrou barvou [18].

Podle počtu vázaných molekul cukru se anthokyaniny dělí na 18 skupin, z nichž nejvýznamnější jsou monosidy s glukosou, galaktosou, rhamnosou nebo arabinosou v poloze C-3; biosidy s disacharidy (např. rutinosa, sambubiosa, soforosa, genciobiosa) vázanými v poloze C-3; triosidy s lineárními nebo rozvětvenými trisacharidy vázanými v poloze C-3; 3,5-diglykosidy s monosacharidy v poloze C-3 a C-5; 3,7-diglykosidy s monosacharidy v poloze C-3 a C-7 a 3-biosidy-5-monosidy, u kterých je v polohách C-3 vázán disacharid a v poloze C-5 monosacharid [18].

Anthokyaniny se vyskytují v různých druzích rostlin, kde jsou lokalizovány v buněčných vakuolách [18]. Anthokyaniny jsou poměrně nestabilní a snadno oxidovatelné, jsou citlivé na mnoho faktorů, jako je pH, které může ovlivnit jejich stabilitu a barvu, dále na teplotu a UV záření [19].

Katechiny

Zelený čaj obsahuje 15–20 % katechinů – přírodních zdrojů antioxidantů, které jsou absorbovány a zpracovány metabolismem [20]. Kromě zeleného čaje se vyskytují také v čajích černých a v červeném víně [17].

2.2.2.5 Karotenoidy

Karotenoidy jsou v tucích rozpustné sloučeniny, které jsou zodpovědné za barvy mnoha rostlin a potravin [21]. Vyskytují se ve všech fotosyntetizujících rostlinných pletivech, kde jsou přítomny jako fotochemicky aktivní složky [18]. Hromadí se jako sekundární metabolity v chromoplastech, čímž rostlinám propůjčují jejich červenou, oranžovou nebo žlutou barvu [22]. Přítomnost karotenoidů v zelených částech rostlin bývá maskována chlorofylem. Dnes je známo asi 700 karotenoidních pigmentů vyskytujících se přirozeně v přírodě [18]. V rostlinách mají díky jejich struktuře potenciální antioxidační vlastnosti a také v lidském organismu jsou součástí antioxidačního obranného systému. Jejich účelem je ochrana rostlin proti fotooxidačním procesům a vychytávání singletového kyslíku a peroxylového radikálu [23].

Většina zástupců se řadí mezi tetraterpeny, tedy mezi terpenoidy, které formálně obsahují osm izoprenových jednotek. Důvodem jejich barevnosti je řetězec konjugovaných dvojných vazeb, vyskytující se v několika základních strukturách, nebo kombinace těchto řetězců. Karotenoidy rozdělujeme na dvě hlavní skupiny – karoteny a xantofyly [18].

Karoteny jsou uhlovodíky, jejichž nejjednodušším prototypem je acyklický polynenasycený uhlovodík fytoen. Acyklické karoteny se nacházejí v potravinářských materiálech málo a pouze jako doprovodné látky alicyklických karotenů a xanthofylů. Výjimku tvoří lykopen, který je obsažen poměrně hojně. Alicyklické karoteny vznikají enzymově katalyzovanou cyklizací na jednom nebo na obou koncích acyklických ψ -karotenů [18]. Nejdůležitějším zástupcem karotenů přijímaných ve stravě je β -karoten, lutein a lykopen [23].

Xanthofyly – kyslíkaté sloučeniny odvozené od karotenů – jsou hlavními karotenoidy rostlin. Jedná se o alkoholy, aldehydy, ketony, epoxidy aj., které primárně vznikají jako produkty biochemické oxidace karotenů [18]. Nejdůležitějšími námi přijímanými xanthofyly jsou β -kryptoxanthin, zeaxanthin a astaxanthin [23].

Mezi potraviny bohaté na karotenoidy řadíme ovoce, mrkev, listovou zeleninu, rajčata, papriky, šafrán, rostlinné oleje, vejce, ryby a korýše [18].

2.2.2.6 Fenolické látky

Antioxidační aktivita fenolických látek spočívá v jejich redoxních schopnostech, které mohou hrát důležitou roli při poutání a neutralizaci volných radikálů, při rozkladu peroxidu nebo vychytávání (quenchingu) singletového a tripletového kyslíku [24]. Nacházejí se v rostlinných tkáních, kde slouží jako pigmenty nebo jako lákadla opylovačů. Obsahují chemický obranný mechanismus proti zranění hmyzem a infekcím způsobeným mikroorganismy [25]. Fenoly zpomalují oxidační degradaci lipidů, čímž zlepšují kvalitu a nutriční hodnoty potravin. Kromě výskytu v ovoci, rostlinách a obilí se hojně vyskytují v koření, jako je šalvěj, oregano a tymián [24].

Fenolické látky mohou být rozděleny na dvě hlavní třídy podle stavby uhlíkového řetězce – flavonoidy a neflavonoidové sloučeniny. Hlavní podíl neflavonoidových sloučenin představují skořicové kyseliny (kávová, kumarová a ferulová kyselina), benzoové kyseliny (gallová, vanilová a syringová kyselina), stilbeny (resveratrol) [26], tanniny, lignany a ligniny [27].

2.2.3 Syntetické látky s antioxidačními účinky

Mezi syntetické antioxidanty řadíme sloučeniny fenolového typu, dihydrochinolinové sloučeniny a sloučeniny s dusíkatým heterocyklem, které jsou však pro značnou toxicitu méně používané. V ČR jsou povolené BHA, BHT, TBHQ, fumarová kyselina a galláty [28].

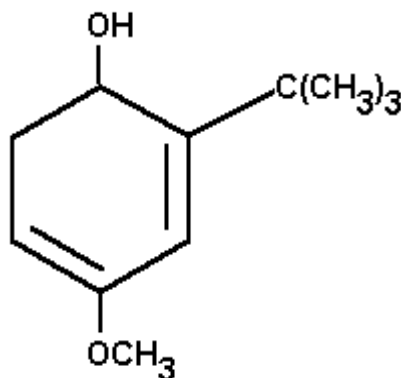
2.2.3.1 BHA

Butylhydroxyanisol (E320) je směsí dvou isomerů, z čehož asi 90 % představuje 3-*terc*-butyl-4-hydroxyanisol (3-BHA) a 10 % jeho isomer 2-*terc*-butyl-4-hydroxyanisol (2-BHA). Používá se hlavně jako ochrana tuků obsahujících mastné kyseliny s kratším řetězcem, aroma a barvy silic; může se však projevovat pachem připomínajícím fenoly [18].

BHA vykazuje synergismus s BHT a galláty. Má vyšší tzv. *carry-through* efekt než BHT, což znamená, že je účinným antioxidantem i po konečném tepelném zpracování potraviny.

Nejběžnějšími produkty při oxidaci lipidů jsou dimery, bifenyly a jejich ethery, přičemž většina primárních oxidačních produktů si zachovává antioxidační aktivitu [18].

Butylhydroxyanisolu se využívá hlavně v pekárenství, masné výrobě, tukovém průmyslu, cukrářství, ve výrobě nealkoholických nápojů, cereálií, žvýkaček, aj. [29].

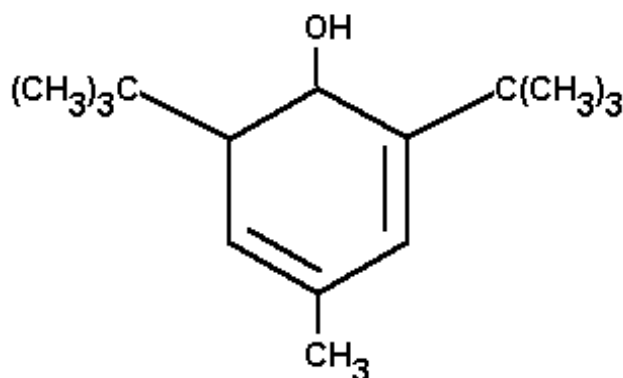


Obrázek 2.4. Syntetický antioxidant BHA [30]

2.2.3.2 BHT

BHT (butylhydroxytoluen) je ve srovnání s BHA účinnější jako antioxidant živočišných tuků. Významnými produkty degradace 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluenu jsou rovněž aktivní antioxidanty [18].

Využití nachází převážně při výrobě cereálií, másla, bramborových lupínek, olejů a margarínů a při zpracování mořských plodů pro ochranu přítomných lipidů [29].

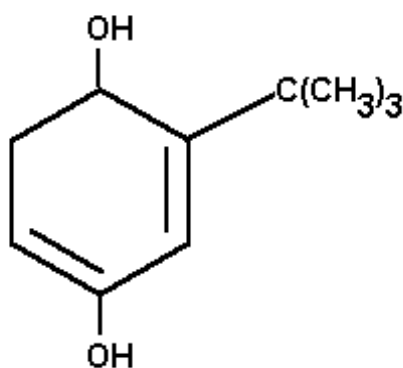


Obrázek 2.5. Syntetický antioxidant BHT [31]

2.2.3.3 TBHQ

TBHQ (2-*tert*-butylhydrochinon) patří k nejlepším syntetickým antioxidantům tuků určeným na smažení, jeho *carry-through* efekt je srovnatelný s BHA. Ke zvýšení antioxidační aktivity dochází v kombinaci s chelatačními činidly (např. s kyselinou citronovou). Všechny degradační produkty TBHQ vykazují antioxidační aktivitu, 2,3-dihydro-2,2-dimethyl-benzofuran-5-ol vykazuje antioxidační aktivitu dokonce vyšší [18].

Přidává se do uzenin, sušeného masa, tuků na smažení; dále slouží jako ochrana cereálií, margarínů a při zpracování drůbežního masa [29].



Obrázek 2.6. *Syntetický antioxidant TBHQ* [32]

2.2.3.4 Fumarová kyselina (E297)

Fumarová kyselina ((E)-but-2-endiová kyselina se vyskytuje ve všech rostlinných a živočišných organismech a ve vybraných druzích hub. Používá se v uzeninách, sušeném mléku, chipsech, v másle (zabraňuje žluknutí) nebo jako ochucovadlo [28].

2.2.3.5 Galláty

Jedná se o estery gallové kyseliny (E310, E311, E312), z nichž nejvýznamnější jsou propyl-gallát, oktylgallát a dodecylgallát [28]. Galláty jsou polárnější než BHA, BHT a TBHQ a účinnější v bezvodých tucích. V emulzích, kde jsou galláty rozpustnější, jsou méně aktivní než fenolové antioxidanty BHA a BHT [18].

Propyl-gallát není vhodný pro tuky určené ke smažení (kde teplota přesahuje 190 °C), poněvadž je poměrně nestabilní a vykazuje slabý *carry-through* efekt. Využívá se v kombinaci s chelatačními činidly. Synergismus vykazují s BHA a BHT, kombinace s TBHQ není povolena [18].

Používají se v omezeném množství pro rybí tuk, sádlo, lůj, drůbeží sádlo, směsi pro přípravu moučníků, přípravky pro polévky a vývary, studené omáčky, majonézy, koření, přípravky, cereálie, žvýkačky, aj. [28].

2.2.4 Mechanismus působení antioxidantů

Přidávkem antioxidantu do reakční směsi dochází k inhibici reakce tím, že interferuje s nahromaděnými přechodnými radikály. Jestliže je antioxidant přidán do reakční směsi až ve fázi, kdy se utvořila vysoká koncentrace těchto látek, nemusí dojít k zastavení reakce. Mechanismus a účinnost působení antioxidantů jsou přímo ovlivněny výskytem reaktivních produktů autooxidace lipidů. Obecně platí, že spotřeba antioxidantů je přímo úměrná rychlosti a obsahu vznikajících volných radikálů. Jejich účinnost je vyšší, přidáme-li je do chráněného substrátu před rozvinutím vlastní oxidační reakce. Po rozvinutí oxidační reakce jsou schopny substrát chránit pouze vysoce účinné antioxidanty rozkládající hydroperoxy na neaktivní látky, poněvadž méně účinné antioxidanty nereagují s hydroperoxy, tudíž jsou účinné pouze při přidání před začátkem reakce [33].

2.2.4.1 Přeměny antioxidantů při inhibičním procesu

Pro posouzení účinnosti antioxidantů je důležitá nejen znalost způsobu, jakým probíhá reakce mezi peroxidickými látkami a antioxidantem, ale i znalost charakteru látek tvořících se z antioxidantů v průběhu inhibičního procesu. Na celém procesu se významně podílejí reaktivní přechodné produkty a produkty přeměny. Mechanismus přeměn může být odlišný v různých fázích oxidace podle obsahu hydroperoxysloučenin [28].

V průběhu inhibiční reakce za účasti antioxidantů může docházet k několika odlišným procesům, ke kterým dochází převážně v primárních fázích přeměny. Dochází k rychlé přeměně inhibitorů na aktivní látku, ke zvýšení antioxidační aktivity produktu ve srovnání s původní sloučeninou, k zachování antioxidační účinnosti primárního produktu, kterou však tento produkt ztrácí po dalších reakcích, nebo k cyklické regeneraci produktů v synergickém systému [33].

2.2.4.2 Synergie antioxidantů

Synergismus představuje zesílení účinnosti inhibičních systémů, jehož mechanismus je odlišný podle povahy složek. Synergická směs bývá tvořena antioxidanty a dalšími látkami, které kladně ovlivňují působení primárních antioxidantů a jejich vlastní inhibiční činnost je často zcela zanedbatelná [28]. Z hlediska reakce antioxidantů rozeznáváme homosynergismus, kde směs antioxidantů reaguje stejným mechanismem a heterosynergismus, kde směs antioxidantů reaguje různými mechanismy [33].

Aktivita synergických systémů je ovlivněna složením substrátu, kdy např. voda přítomná v tucích má spíše negativní vliv na působení synergických směsí [28].

Základním mechanismem synergie je vznik hydroperoxidů a jejich následný rozklad na neaktivní látky pomocí druhé složky přítomné synergické směsi, čímž je první antioxidant chráněn před přímou oxidací hydroperoxidem. Dále dochází ke snížení rychlosti reakce iniciované aktivními produkty rozpadu hydroperoxidu a ke snížení spotřeby první látky. Tímto mechanismem se řídí nejen směsi dvou antioxidantů, ale i jejich směsi s látkami, jejichž vlastní účinek je slabý [33].

2.3 Stanovení celkové antioxidační aktivity potravin

Celková antioxidační kapacita (TAA) je termín, který charakterizuje souhrnnou koncentraci všech látek s antioxidačními účinky ve vzorku [5].

V literatuře je popsáno hodně metod používaných ke stanovení celkové antioxidační aktivity. Tyto metody bývají velmi rozmanité, což je dáno působením různých mechanismů nízkomolekulárních antioxidantů. Obecně mohou být rozděleny do dvou skupin: metody hodnotící schopnost eliminovat radikály a metody posuzující redoxní vlastnosti látek [6].

2.3.1 Metody založené na eliminaci radikálů

Tyto metody využívají schopnosti vzorku zastavit nebo alespoň zpomalit tvorbu volných radikálů [3]. Z chemického hlediska se jedná o kyslíkové radikály (hydroxyl, peroxy, superoxidový anion-radikál) nebo syntetické stabilní radikály (DPPH, ABTS^{•+}, galvinoxyl). Radikály mohou být v reakční směsi generovány nebo jsou přidávány [6].

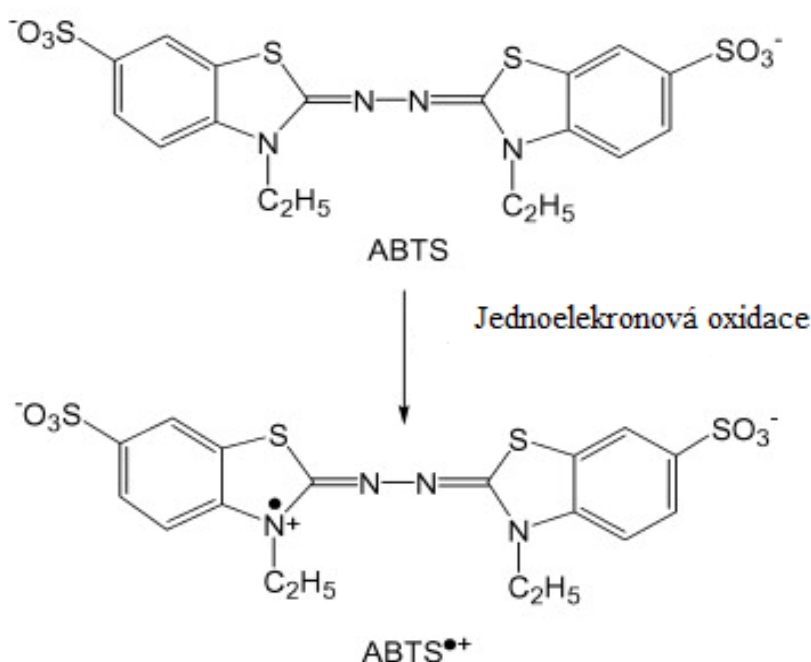
2.3.1.1 Metoda TEAC (metoda používající ABTS)

Tato metoda je jednou z nejpoužívanějších metod pro stanovení celkové antioxidační kapacity [6]. ABTS (2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)) je peroxidázový substrát, který reakcí s peroxylovými radikály nebo jinými oxidanty vytváří v přítomnosti H_2O_2 metastabilní radikál kation $\text{ABTS}^{\bullet+}$, který je intenzivně zeleno-modře zbarven a může být sledován spektrofotometricky v rozmezí 600–750 nm [34]. Nejčastěji se měření provádí při 734 nm [6]. Antioxidační aktivita látky, která se chová jako donor vodíků, je měřena jako schopnost snížit intenzitu zbarvení přímou reakcí s $\text{ABTS}^{\bullet+}$ [34].

Využívá se systém ABTS/ H_2O_2 /peroxidasa nebo ABTS/methmyoglobin/ H_2O_2 , dále se využívá i chemické oxidace ABTS, např. peroxodisíranem draselným nebo oxidem manganičitým. Při vlastním měření se antioxidant přidává buď do reakční směsi, ve které již byl vytvořen radikál $\text{ABTS}^{\bullet+}$, nebo je v reakční směsi obsažen při generování radikálu $\text{ABTS}^{\bullet+}$ [6].

K hodnocení TAA vzorků se využívá parametr TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), jenž označuje antioxidační aktivitu vzorku ekvivalentní definovanému množství syntetického derivátu Troloxu [6]. Trolox je analog vitamínu E rozpustný ve vodě [35].

$\text{ABTS}^{\bullet+}$ v roztoku není ovlivňován iontovými silami a může být rozpuštěn jak ve vodě, tak v organickém rozpouštědle. Z tohoto důvodu můžeme změřit hydrofilní i lipofilní antioxidanty [34]. Metoda stanovení pomocí ABTS je jednoduchá, rychlá a má široké uplatnění – od hodnocení antioxidační aktivity látek různého původu až po směsné vzorky [6].



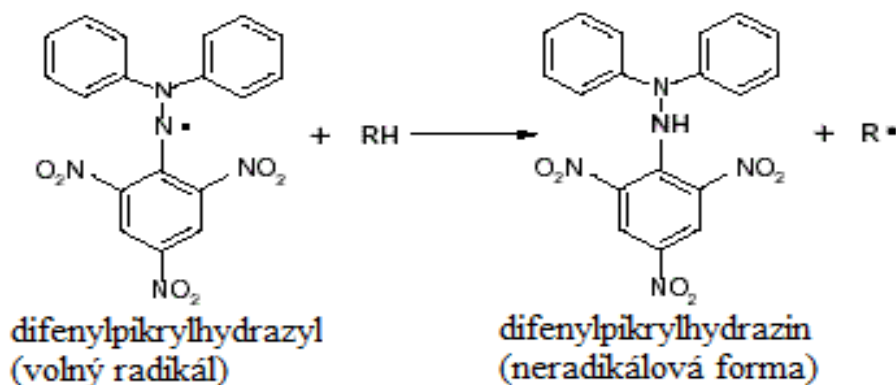
Obrázek 2.7. Jednoelektronová oxidace ABTS [36]

2.3.1.2 Metoda používající DPPH

DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl) je stabilní organický dusíkatý radikál tmavě fialové barvy. Je komerčně dostupný a před měřením nemusí být generován [34]. Metoda spočívá v reakci testované látky se stabilním radikálem DPPH, při které dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazinu) [6] a ke ztrátě fialové barvy (vzniká světle žlutá barva kvůli přítomnosti pikrylové skupiny) [34]. Reakce bývá nejčastěji sledována spektrofotometricky, kdy se měří pokles absorbance při 517 nm buď po uplynutí určitého konstantního času, nebo se pracuje v kinetickém režimu [6]. Redukční schopnost antioxidantů vůči DPPH v organickém rozpouštědle lze měřit i elektronovou spinovou rezonancí nebo sledováním poklesu absorbance při 515–528 nm, dokud se absorbance neustálí na konstantní hodnotě [34]. Detekci ubývajícího radikálu je možno provádět pomocí HPLC, což je vhodné převážně při měření barevných roztoků, které by mohly při spektrofotometrickém stanovení interferovat [3].

U směsných vzorků se radikálová aktivita vyjadřuje v jednotkách standardu Troloxu nebo v ekvivalentech askorbové kyseliny [6]. Na základě hodnoty T_{EC50} je klasifikováno kinetické chování následovně: <5 min (rychlé), 5–30 min (střední) a >30 min (pomalé). Parametr EC_{50} (efficient concentration value) udává koncentraci substrátu, který zapříčiní 50% pokles aktivity nebo barvy DPPH [34].

Tento test je po technické stránce jednoduchý, je zapotřebí pouze UV-VIS spektrofotometru. Analýza většího množství vzorků může být provedena na mikrotitračních destičkách. Nevýhodou metody je, že DPPH může být rozpuštěno pouze v organických rozpouštědlech (přednostně v alkoholech) a ne ve vodě [34].



Obrázek 2.8. Redukce radikálu DPPH na DPPH-H [37]

2.3.1.3 Metoda ORAC

Metoda ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) je založena na schopnosti testované látky zpomalit nebo zastavit radikálovou reakci, zatímco se v testovaném systému generují kyslíkové radikály [6]. Peroxylové radikály se generují tepelným rozkladem AAPH (2,2'-azobis(isobutyrimidamid)-dihydro-chloridu), zatímco hydroxylové radikály se generují systémem $Cu^{2+} + H_2O_2$ [34]. Detekce je založena na úbytku fluorescence β -fykoerytrinu (β -PE) po útoku radikály [6].

Při stanovení antioxidační kapacity polyfenolů byla objevena omezení, která se týkají vlastností β -PE (např. omezená fotostabilita). Použitím jiného typu fluorescenční sondy – fluoresceinu (FL) – se metodika (ORAC_{FL}) zpřesňuje [6].

Výsledky se vyjadřují v jednotce standardu Troloxu [35].

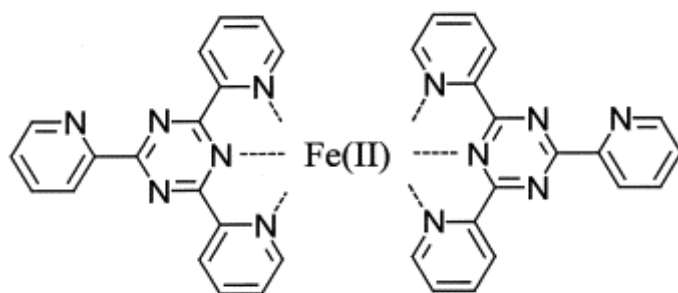
2.3.2 Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek

Nízkomolekulární antioxidanty charakterizujeme mimo jiné jako redukční činidla, která reagují s oxidanty, redukuje je, a tím je inaktivují [6].

2.3.2.1 Metoda FRAP

Metoda FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) využívá schopnost antioxidantů redukovat železité komplexy (Fe^{III} -TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin)), které jsou téměř bezbarvé a po redukci vytvářejí barevné produkty [38]. Nárůst absorpance při 593 nm odpovídající množství komplexu Fe^{II} -TPTZ je mírou antioxidační aktivity vzorku [6].

Redoxní potenciál Fe^{III} soli (0,70 V) je podobný jako redoxní potenciál $\text{ABTS}^{\bullet+}$, a proto je mezi těmito metodami pouze malý rozdíl. Tento rozdíl spočívá v pH, při kterém metody pracují. TEAC využívá neutrálního prostředí, kdežto FRAP potřebuje kyselé podmínky (pH 3,6) [35]. Dále nejsou při měření zachyceny polyfenolické látky a thiohy – z důvodu pomalé reakce s komplexem. Metoda FRAP představuje pouze schopnost látek redukovat Fe^{III} komplexy a s celkovou antioxidační aktivitou vzorku nemusí pozitivně korelovat [6].



Obrázek 2.9. Kladně nabitý komplex $\text{Fe}(\text{II})$ -TPTZ₂ [39]

2.3.2.2 Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie indikuje schopnost látek odštěpovat elektrony. Na pracovní elektrodu se vkládá potenciálový pulz s určitou rychlostí polarizace, zároveň se sledují proudové odezvy v roztoku měřené látky. Získaný záznam se zachycuje pomocí křivky – cyklického voltamogramu. Redukční schopnost látek se pak vyhodnocuje dvěma parametry. Prvním parametrem je potenciál anodického oxidačního píku E_A , druhým parametrem je jeho anodický proud I_A . Platí, že čím je nižší hodnota E_A , tím látka snadněji odevzdává elektrony, a proto může být lepším antioxidantem. Koncentraci látek je možné určit z hodnoty výšky proudu anodického píku I_A . Tato metoda je vhodná pro získání informace, jestli je látka schopna snadno odevzdávat elektrony – poté je možné určit metodu na stanovení antioxidační kapacity [6].

2.3.2.3 HPLC metoda s elektrochemickou detekcí

Při analýze HPLC je možno velmi přesně a citlivě detekovat elektroaktivní látky použitím amperometrických nebo coulochemických detektorů (HPLC-ECD). Při HPLC-ECD se na pracovní elektrodu detektoru vkládá určitý kladný potenciál. Je-li látka při tomto potenciálu oxidována, zobrazí se její pík. Látka je tedy charakterizována retenčním časem a potenciálem, při kterém dochází k její oxidaci. To umožňuje analýzu komplexní směsi a identifikaci jednotlivých účinných antioxidačních komponent na základně hodnoty potenciálu vloženého na elektrodu. Při analýze je důležité dodržet vysokou čistotu reagensů v mobilní fázi (včetně snížení koncentrace stopových prvků). Zbarvení analyzovaných směsí neruší [6].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Seznam použitých přístrojů a chemikálií

3.1.1 Přístroje

- UV ± VIS spektrofotometr Helios γ (Unicam, UK)
- analytické váhy (Boeco, SRN)

3.1.2 Chemikálie

3.1.2.1 Standardní chemikálie

- Trolox 97%, (($\pm$)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), $C_{14}H_{18}O_4$, Sigma-Aldrich, RUS
- ABTS 98%, (diamonná sůl 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzo-thiazolin)-6-sulfonové kyseliny) $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$, Sigma-Aldrich, CAN
- TPTZ $\geq 99,0\%$, (2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazin), $C_{18}H_{12}N_6$, Sigma Aldrich, CHE
- DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl), $C_{18}H_{12}N_5O_6$, Sigma Aldrich, SRN

3.1.2.2 Ostatní chemikálie

- Octan sodný $CH_3COONa \cdot 3H_2O$, Lachema, ČR
- Hexahydrát chloridu železitého, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, Sigma-Aldrich, USA
- Peroxodisíran draselný $K_2S_2O_8$, Lach-Ner, s.r.o., ČR
- Kyselina octová ledová CH_3COOH , Penta, ČR
- Methanol CH_4O , Sigma-Aldrich, SRN

3.1.3 Pracovní pomůcky

- mikropipeta Finnpipette, Thermo labsystems (objem 0,1-1,0 ml) a příslušné špičky
- mikropipeta Finnpipette F1, Thermo scientific (objem 0,5-5,0 ml) a příslušné špičky
- filtrační aparatura – filtrační papír KA 5 – M (střední filtrační rychlost)
- stojan na zkumavky
- odměrné a běžné laboratorní sklo

3.1.4 Příprava roztoků

Všechny níže uvedené roztoky byly pro každé měření připravovány čerstvé. Příprava roztoků vycházela z výsledků publikovaných prací [40], [38]. Chemikálie Trolox, ABTS, TPTZ a DPPH byly mezi měřeními uskladněny v lednici.

Trolox

800 μ M roztok standardu byl připraven rozpuštěním 0,020 0 g Troloxu v methanolu a doplněním na 100,0 ml.

ABTS^{•+}

7,4 mM roztok byl připraven rozpuštěním 0,038 1 g ABTS v destilované vodě a doplněním na 10,0 ml.

Peroxidisíran draselný

2,6 mM roztok byl připraven rozpuštěním 0,070 3 g $K_2S_2O_8$ v destilované vodě a doplněním na 100,0 ml.

DPPH

0,024 0 g DPPH bylo rozpuštěno v methanolu a doplněno na 100,0 ml, čímž byla získána koncentrace 6,1 μ M.

TPTZ

10 mM roztok byl připraven rozpuštěním 0,031 0 g TPTZ v methanolu a doplněním na 10,0 ml.

Hexahydrát chloridu železitého

20 mM roztok byl připraven rozpuštěním 0,054 0 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ v destilované vodě a doplněním na 10,0 ml.

Acetátový pufr

300 mM roztok acetátového pufru o pH = 3,6 byl připraven rozpuštěním 0,31 g $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ v destilované vodě, přidáním 1,60 ml ledové kyselina octové a doplněním na 100,0 ml.

3.1.5 Vzorky – rostlinný materiál

Pro účel srovnání metod ABTS, DPPH a FRAP byly vybrány 3 náhodné vzorky, zakoupené v obchodech TESCO a Brněnka.

- Müller Thurgau 2011, Moravské zemské víno bílé – suché, vinný sklep Sovín
- Zlatý Gunpowder – zelený čínský čaj sypaný, JEMČA
- 100% pomerančový džus z koncentrátu, HELLO

3.1.6 Příprava vzorků

100% pomerančový džus byl přefiltrován přes filtrační papír (střední filtrační rychlost). Sypaný zelený čaj byl připraven podle doporučeného návodu na obalu – obsah jedné lžičky byl zalit 200 ml vody o teplotě cca 80 °C a byl ponechán 3 minuty vyluhovat. Bílé víno nebylo třeba před měřením připravovat. Všechny tři vzorky byly pro měření metodami ABTS, DPPH a FRAP 10krát naředěny.

3.2 Pracovní postupy při provádění jednotlivých metod

3.2.1 Metoda TEAC (metoda používající ABTS)

3.2.1.1 Stanovení kinetiky reakce

Zásobní roztok byl připraven smícháním 7,4 mM roztoku $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a 2,6 mM roztoku $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ v poměru 1 : 1 (5,0 ml roztoku $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a 5,0 ml roztoku $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$). Zásobní roztok byl ponechán reagovat 12 h ve tmě při pokojové teplotě. Vlastní pracovní roztok byl získán smícháním 2,0 ml roztoku $\text{ABTS}^{\bullet+}$ s 60,0 ml methanolu [40].

Pro stanovení kinetiky reakce byl vybrán standardní roztok Troloxu o koncentraci 400 $\mu\text{mol/l}$, který byl připraven ředěním zásobního roztoku Troloxu o koncentraci 800 $\mu\text{mol/l}$. 2 850 μl pracovního roztoku $\text{ABTS}^{\bullet+}$ bylo smícháno se 150 μl Troloxu. Absorbance byla měřena při 734 nm proti blanku (methanolu), a to prvních 30 minut v 10minutových intervalech a dále pak v 15minutových intervalech, celkem byla měřena 140 minut. Mezi měřeními byla zkumavka se vzorkem ponechána ve tmě při pokojové teplotě.

3.2.1.2 Stanovení kalibrační křivky

Pracovní roztok byl připraven stejně jako v případě stanovení kinetiky reakce ABTS.

Pro naměření a sestrojení kalibrační křivky byl použit základní standardní roztok Troloxu o koncentraci 800 $\mu\text{mol/l}$. Z tohoto roztoku byla připravena kalibrační řada Troloxu o vzrůstající koncentraci v jednotlivých vzorcích: 100, 200, 300, 400, 500, 600 $\mu\text{mol/l}$. V tomto rozmezí je kalibrační závislost lineární. Ke 2 850 μl pracovního roztoku $\text{ABTS}^{\bullet+}$ bylo přidáno vždy 150 μl roztoku Troloxu o určité koncentraci. Takto připravené kalibrační roztoky byly promíchány a ponechány reagovat 2 h ve tmě při laboratorní teplotě. Po 2 h byla změřena absorbance při 734 nm proti blanku (methanolu) [40].

3.2.2 Metoda DPPH

3.2.2.1 Stanovení kinetiky reakce

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním 0,024 0 g DPPH v methanolu a doplněním na 100,0 ml. Pracovní roztok byl získán smícháním 10,0 ml roztoku DPPH s 45,0 ml methanolu [40].

Pro stanovení kinetiky reakce byl vybrán standardní roztok Troloxu o koncentraci 400 $\mu\text{mol/l}$. 2 850 μl pracovního roztoku DPPH bylo smícháno se 150 μl Troloxu. Absorbance byla měřena při 515 nm proti blanku (methanolu), a to prvních 40 minut v 10minutových intervalech, dalších 80 minut v 20minutových intervalech, a poté každou hodinu po dobu 5 hodin. Další měření byla provedena po 24 a po 29 hodinách od začátku měření. Celkem tedy byla kinetika reakce měřena po dobu 29 hodin. Mezi měřeními byla zkumavka se vzorkem ponechána ve tmě při pokojové teplotě.

3.2.2.2 Stanovení kalibrační křivky

Pracovní roztok DPPH byl připraven stejně, jako při stanovení kinetiky reakce.

Pro naměření a sestavení kalibrační křivky byl použit základní standardní roztok Troloxu o koncentraci 800 $\mu\text{mol/l}$. Z tohoto roztoku byla připravena kalibrační řada o vzrůstající koncentraci v jednotlivých vzorcích: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 $\mu\text{mol/l}$. V tomto rozmezí je kalibrační závislost lineární.

Ke 2 850 μl pracovního roztoku DPPH bylo přidáno 150 μl roztoku Troloxu o určitých koncentracích. Kalibrační roztoky byly ponechány reagovat 24 h ve tmě při laboratorní teplotě. Absorbance byla změřena při 515 nm proti blanku (methanol) [40].

3.2.3 Metoda FRAP

3.2.3.1 Stanovení kinetiky reakce

Pracovní roztok pro metodu FRAP byl připraven smícháním 25,0 ml acetátového pufru ($\text{pH} = 3,6$), 2,50 ml roztoku TPTZ a 2,50 ml roztoku $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [40].

Pro stanovení kinetiky reakce byl vybrán standardní roztok Troloxu o koncentraci 300 $\mu\text{mol/l}$. 2 850 μl pracovního roztoku bylo smícháno se 150 μl Troloxu. Absorbance byla měřena při 593 nm proti blanku (acetátový pufr), a to prvních 5 minut v minutových intervalech a dalších 35 minut v 5minutových intervalech. Celkem tedy byla kinetika reakce měřena po dobu 40 minut. Mezi měřeními byla zkumavka se vzorkem ponechána ve tmě při pokojové teplotě.

3.2.3.2 Stanovení kalibrační křivky

Pracovní roztok FRAP byl připraven stejně, jako při stanovení kinetiky reakce.

Pro naměření a sestavení kalibrační křivky byl použit základní standardní roztok Troloxu o koncentraci 800 $\mu\text{mol/l}$. Z tohoto roztoku byla připravena kalibrační řada o vzrůstající koncentraci v jednotlivých vzorcích: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 $\mu\text{mol/l}$. V tomto rozmezí je kalibrační závislost lineární.

Ke 2 850 μl pracovního roztoku FRAP bylo přidáno 150 μl roztoku Troloxu o určitých koncentracích. Kalibrační roztoky byly ponechány reagovat 30 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Absorbance byla změřena při 593 nm proti blanku (acetátový pufr). Vzorky obsahující koncentraci Troloxu od 500 až do 800 $\mu\text{mol/l}$ musely být pro měření absorbance dvakrát zředěny [40].

3.2.4 Měření vzorků

3.2.4.1 Měření vybraných vzorků metodami ABTS, DPPH a FRAP

Pracovní roztoky jednotlivých metod byly připraveny stejně jako v případě stanovení kalibrační křivky i stanovení kinetiky reakce. Ke 2 850 μl pracovního roztoku bylo přidáno 150 μl vzorku – vína, čaje a džusu (10krát naředěného). Vzorek byl ponechán reagovat ve tmě za laboratorní teploty. Pro metodu ABTS byla absorbance změřena po 2 hodinách při 734 nm proti methanolu, pro metodu DPPH po 24 hodinách při 515 nm proti methanolu a pro metodu FRAP po 30 minutách při 593 nm proti acetátovému pufru.

3.2.4.2 Statistické hodnocení

Všechna stanovení vzorků byla opakována 3krát.

Výsledky opakovaných měření jsou v důsledku nahodilých chyb rozmístěny v okolí nejpravděpodobnější střední hodnoty. Odhadem střední hodnoty je aritmetický průměr $\bar{x}$ (rovnice 6),

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (6)$$

kde n je počet analýz a x_i (pro $i = 1, 2, 3 \dots n$) jsou jednotlivé naměřené hodnoty.

Ze získaných výsledků byly odstraněny odlehle výsledky provedením Dean-Dixonova testu (rovnice 7),

$$Q_1 = \frac{x_2 - x_1}{R} \quad (7)$$

kde vypočtenou veličinu Q_1 porovnáваме s kritickou hodnotou Q_a . Pro hladinu významnosti $\alpha = 0,05$ je $Q_a = 0,941$. Je-li $Q_1 \geq Q_a$, výsledek je odlehlý [41].

Rozdíl hodnoty výsledku a průměrné hodnoty střední hodnoty vyjadřuje směrodatná odchylka s , která vrací míru rozptýlenosti od měřítka původních dat (rovnice 8),

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (8)$$

kde n je počet analýz, x_i (pro $i = 1, 2, 3 \dots n$) jsou jednotlivé naměřené hodnoty a $\bar{x}$ je aritmetický průměr.

Pro porovnání metod bylo použito porovnání aritmetických průměru a Lordův test (rovnice 9),

$$u = \frac{|\bar{x}_A - \bar{x}_B|}{R_A + R_B} \quad (9)$$

kde $\bar{x}_A$ a $\bar{x}_B$ jsou aritmetické průměry výsledků porovnávaných metod, R_A a R_B jsou rozptyly výsledků porovnávaných metod.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

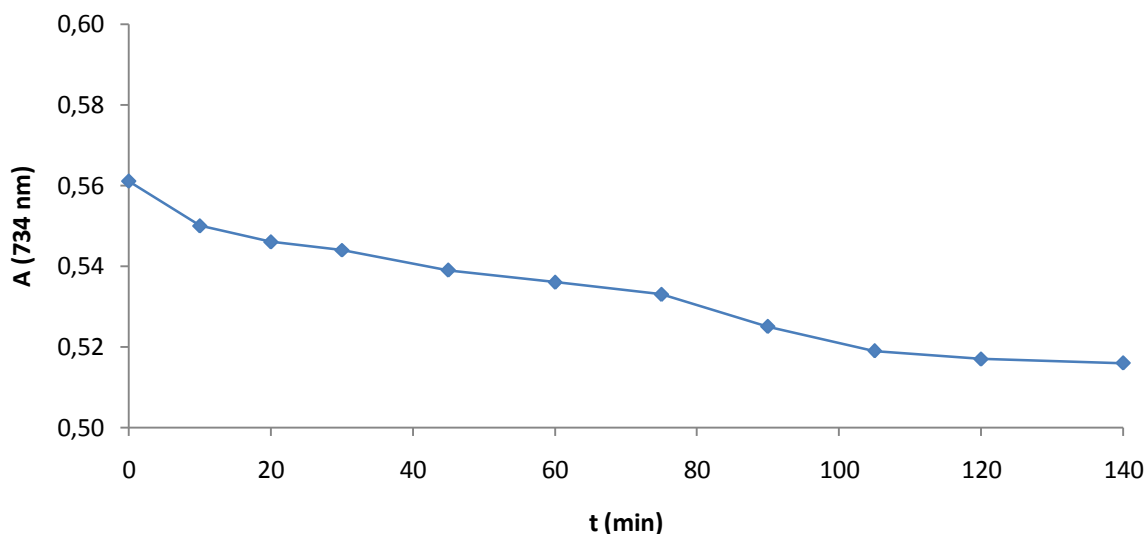
4.1 Příprava roztoků

Příprava roztoků vycházela z publikované literatury [40], [38].

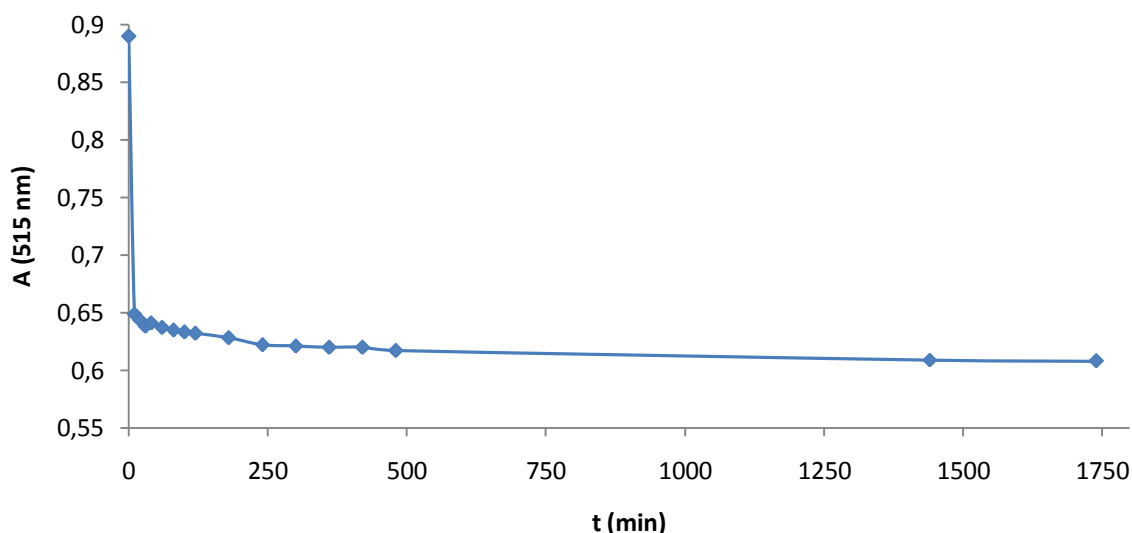
Literatura uvádí, že roztok TPTZ má být připraven rozpuštěním TPTZ v 40 mM kyselině chlorovodíkové, popř. ve vodě. Ten se však ve vodě ani v kyselině nerozpustil, nepomohlo ani dlouhodobé zahřívání na vyšší teplotu. Proto jsme přistoupili k možnosti, rozpustit ho v methanolu, v němž se rozpustil.

4.2 Kinetika reakcí

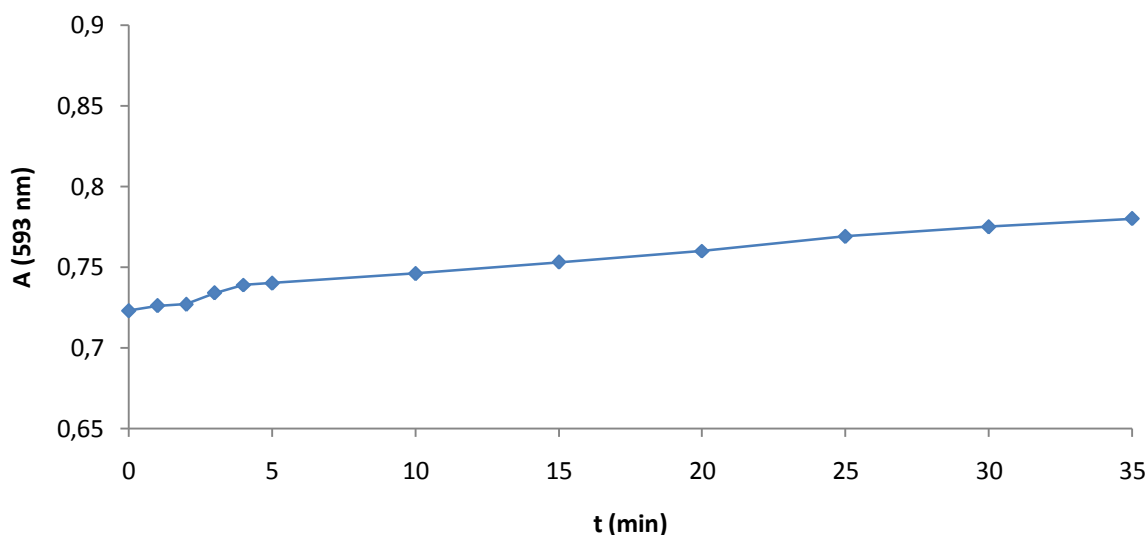
Převzatý postup z publikované literatury [40] uvádí pro každou metodu určité časy, po jejichž uplynutí se měří absorbance vzorku (popř. standardu Troloxu). Účelem měření kinetiky reakce bylo ověření, jestli se v daném experimentu nadále mění absorbance i po uplynutí uvedeného času nebo jestli absorbance zůstává konstantní. Výsledné změny absorbancí jsou zobrazeny pro metodu ABTS (*graf 4.1*), DPPH (*graf 4.2*) a FRAP (*graf 4.3*). U všech tří metod můžeme pozorovat pokles absorbance, který se ustálil na konstantní hodnotě, z čehož předpokládáme ustálení vlastní reakce.



Graf 4.1. Stanovení kinetiky reakce ABTS



Graf 4.2. Stanovení kinetiky reakce DPPH



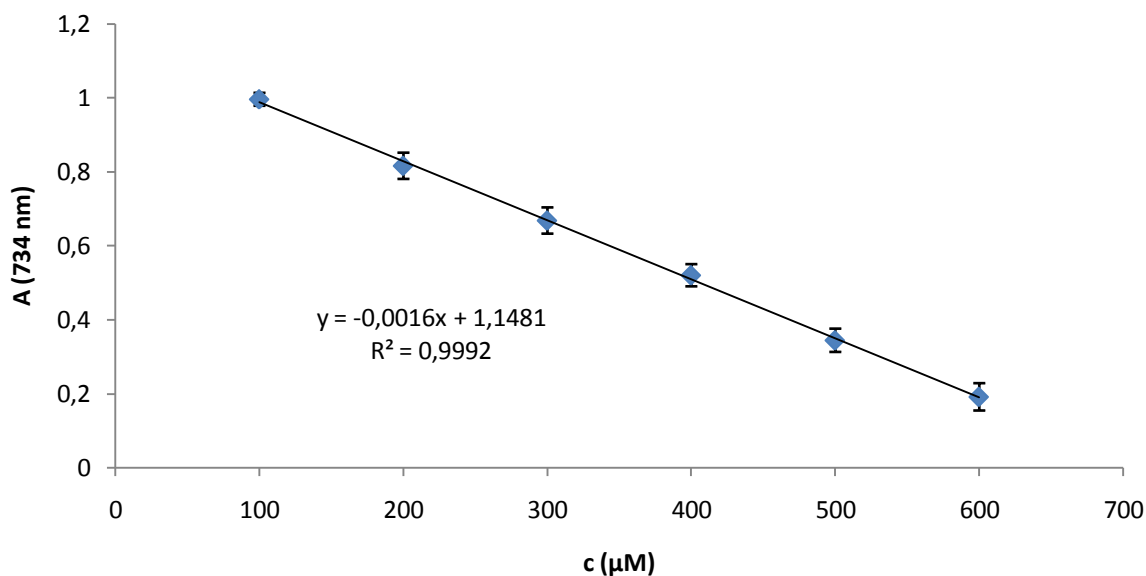
Graf 4.3. Stanovení kinetiky reakce FRAP

4.3 Kalibrační křivky

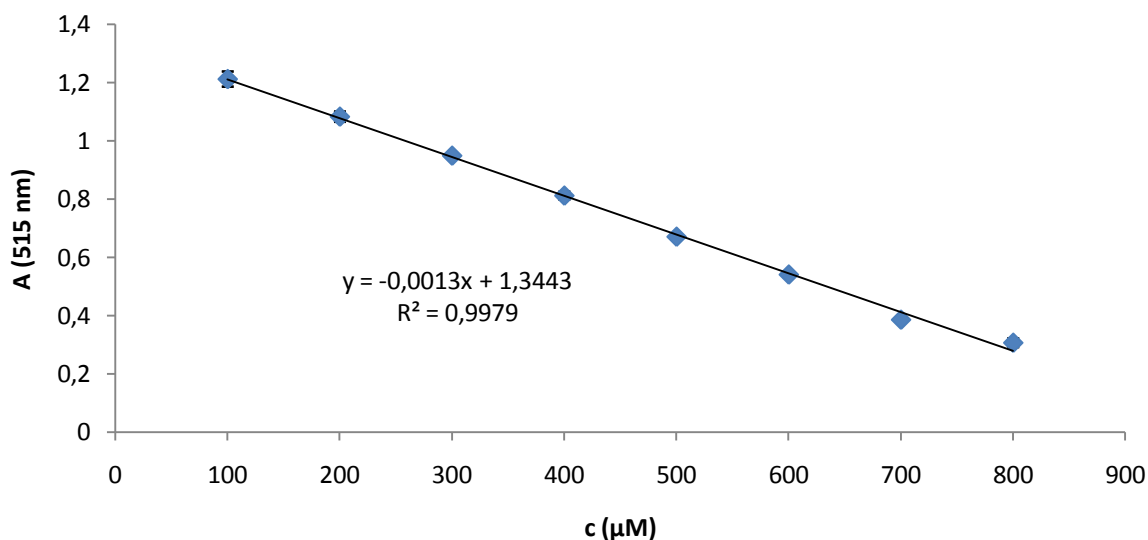
Dle postupů popsaných v kapitole 3.2.1–3.2.3 byly sestrojeny kalibrační závislosti. Sestrojení kalibračních křivek pro metody ABTS, DPPH a FRAP bylo provedeno několikrát a v různé dny, abychom dokázali reprodukovatelnost měření. Kalibrační závislost se měnila minimálně. Rozdíly v jednotlivých měřeních jsou zobrazeny pomocí chybových úseček.

Z grafů můžeme vyčíst, že kalibrační závislost metod ABTS a DPPH má velice podobný průběh (graf 4.4, graf 4.5). Po smíchání pracovního roztoku a Troloxu dochází u metod ABTS a DPPH ke snížení intenzity zabarvení přímou reakcí látky se stabilními radikály. Látka se v tomto případě chová jako donor protonů, čímž dochází k zániku radikálů a k jejich odbarvení. ABTS^{•+} je tmavě modro-zelený, po odbarvení je světle zelený až čirý. DPPH je fialový, po odbarvení přechází na světle fialovou až světle žlutou. Platí tedy, že čím koncentrovanější roztok Troloxu přidáme k pracovnímu roztoku, tím více se roztok ABTS nebo DPPH odbarví.

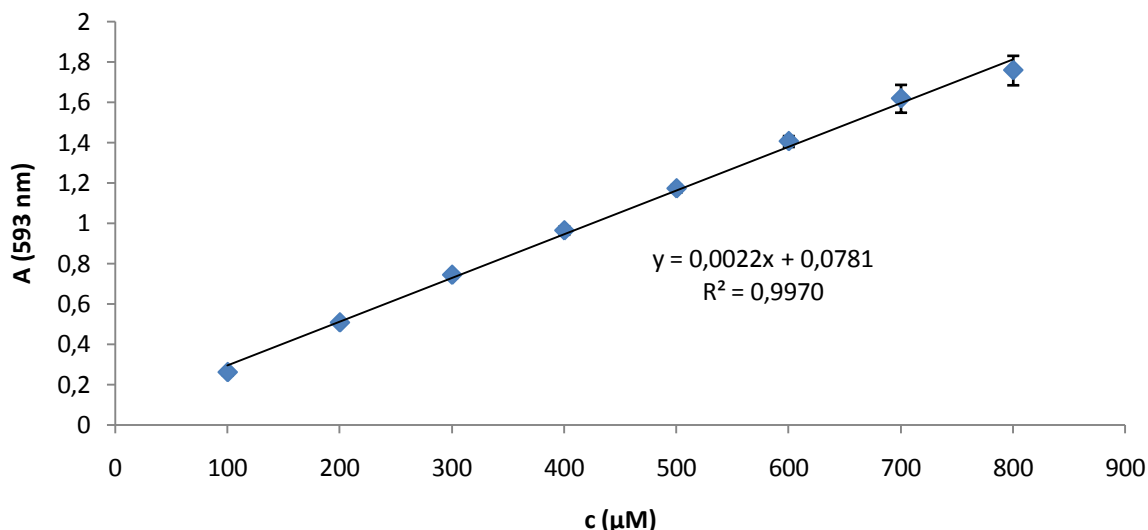
Kalibrační křivka metody FRAP (*graf 4.6*) má odlišný průběh od obou předcházejících metod. Metoda je založena na schopnosti antioxidantů redukovat železité komplexy (Fe^{III} -TPTZ). Nárůst absorbance při 593 nm pak odpovídá množství komplexu Fe^{II} -TPTZ a je mírou antioxidační aktivity vzorku. Čím koncentrovanější je roztok Troloxu, tím více vzniká železnatého komplexu. Samotný pracovní roztok je bezbarvý až nažloutlý, po vytvoření Fe^{II} -TPTZ je roztok světle až tmavě modrý. V rozmezí koncentrací Troloxu 500–800 $\mu\text{mol/l}$ musely být roztoky dvakrát ředěny.



Graf 4.4. Kalibrační křivka metody ABTS



Graf 4.5. Kalibrační křivka metody DPPH



Graf 4.6. Kalibrační křivka metody FRAP

4.4 Porovnání testovaných metod

Zkoumané metody pro stanovení celkové antioxidační aktivity potravin nejsou náročné na vybavení a přístroje – k měření je potřeba pouze spektrofotometr. Metody se však liší v časové náročnosti. U metody FRAP se měří absorbance po 30 minutách od smíchání pracovního roztoku se vzorkem (popř. Troloxem) a u metody DPPH se měří absorbance po 24 hodinách. V případě metody ABTS se musí generovat $ABTS^{+\bullet}$, a to po dobu 12 hodin. Po získání $ABTS^{+\bullet}$ můžeme připravit pracovní roztok a smíchat ho se vzorkem (popř. Troloxem) a absorbanci pak měříme po 2 hodinách.

Pro vzájemné porovnání použitých metod byla proměřena sada vybraných vzorků. Jako vzorky byly vybrány sypaný zelený čaj, bílé víno a 100% pomerančový džus. Všechny tři vzorky byly po přípravě desetkrát zředěny. Vhodné ředění vzorků bylo určeno experimentálně. Výsledky absorbancí, průměrné absorbance a směrodatné odchylky pro jednotlivé metody jsou uvedeny v tabulce 4.1.

Tabulka 4.1. Naměřené hodnoty absorbancí, průměrné hodnoty absorbancí a směrodatné odchylky

Vzorky	ABTS			DPPH			FRAP		
	A	Průměr	Odch.	A	Průměr	Odch.	A	Průměr	Odch.
Čaj 1	0,147	0,135	0,009	0,303	0,287	0,012	0,954	0,959	0,011
Čaj 2	0,126			0,282			0,948		
Čaj 3	0,133			0,275			0,974		
Víno 1	0,575	0,573	0,003	0,632	0,638	0,008	0,703	0,687	0,012
Víno 2	0,569			0,633			0,686		
Víno 3	0,576			0,650			0,673		
Džus 1	0,661	0,653	0,006	0,763	0,751	0,010	0,689	0,684	0,004
Džus 2	0,651			0,753			0,679		
Džus 3	0,647			0,738			0,684		

Z průměrné hodnoty absorbance a z rovnice regrese příslušné kalibrační křivky byly vypočteny koncentrace antioxidantů ve všech vzorcích. Vypočtené koncentrace byly zkorigovány pomocí zředovacího faktoru. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 4.2–4.4.

Tabulka 4.2. *Koncentrace antioxidantů ve vzorcích stanovené metodou ABTS*

ABTS	A	c_1 (μmol)	c_2 (μmol)	c (mmol)
čaj	0,135	633,188	6331,9	6,332
víno	0,573	359,438	3594,4	3,594
džus	0,653	309,438	3094,4	3,094

V tabulkách 4.2–4.4 jsou uvedeny průměrné hodnoty absorbancí. Hodnota c_1 představuje koncentraci antioxidantů vypočítanou z kalibračních křivek příslušné metody, hodnota c_2 představuje již celkovou koncentraci antioxidantů (po vynásobení faktorem zředění).

Tabulka 4.3. *Koncentrace antioxidantů ve vzorcích stanovené metodou DPPH*

DPPH	A	c_1 (μmol)	c_2 (μmol)	c (mmol)
čaj	0,287	813,308	8133,1	8,133
víno	0,639	542,538	5425,4	5,425
džus	0,751	456,385	4563,8	4,564

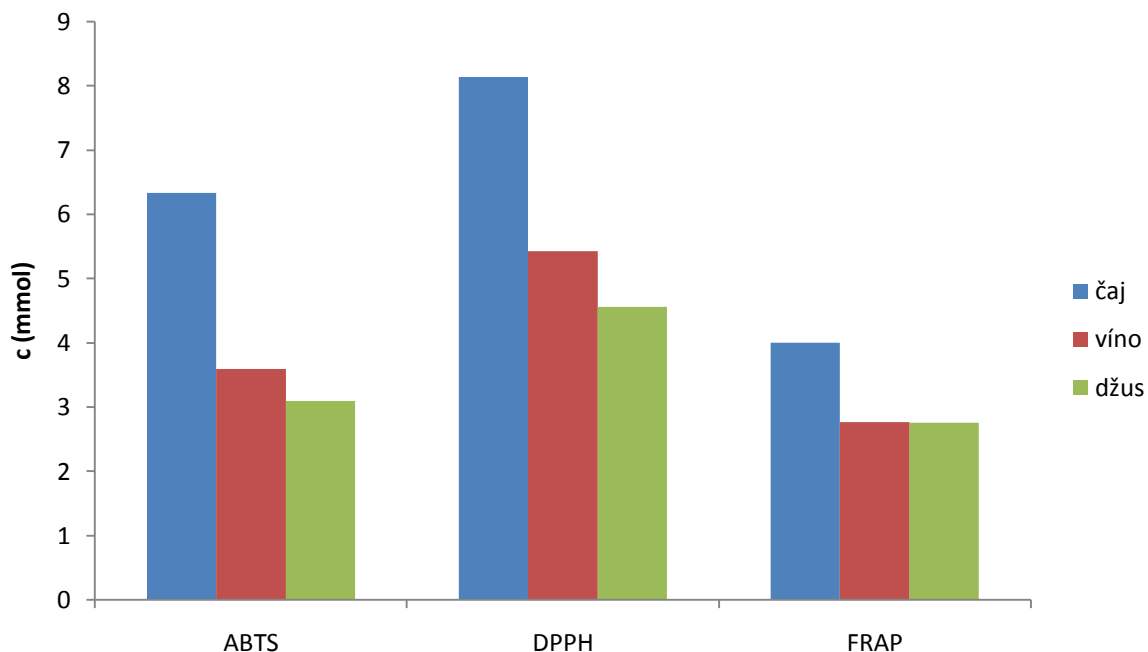
Tabulka 4.4. *Koncentrace antioxidantů ve vzorcích stanovené metodou FRAP*

FRAP	A	c_1 (μmol)	c_2 (μmol)	c (mmol)
čaj	0,959	400,409	4004,1	4,004
víno	0,687	276,773	2767,7	2,768
džus	0,684	275,409	2754,1	2,754

Výsledné hodnoty koncentrací ve vzorcích měřených různými metodami nám ukazuje tabulka 4.5 a graf 4.7.

Tabulka 4.5. *Porovnání výsledných koncentrací antioxidantů stanovených metodami ABTS, DPPH a FRAP*

Vzorek	c (mmol TE)		
	ABTS	DPPH	FRAP
Čaj	6,332	8,133	4,004
Víno	3,594	5,425	2,768
Džus	3,094	4,564	2,754



Graf 4.7. Porovnání výsledných koncentrací antioxidantů stanovených různými metodami

Podle Dean-Dixonova testu naměřené výsledky neobsahují žádné odlehlé hodnoty ($n = 3$, $\alpha = 0,05$) a rozdíly aritmetických průměrů získané metodami ABTS, DPPH i FRAP jsou statisticky významné ($n = 3$, $\alpha = 0,05$). Celková antioxidační aktivita naměřená různými metodami se tedy významně lišila. Každá reakční směs reaguje s různými antioxidanty různými mechanismy. Nejpresnější by měla být metoda ABTS, kde činidlo reaguje se všemi látkami vykazujícími antioxidační aktivitu [38]. Výsledky získané metodou DPPH by měli být na základě podobného principu s metodou ABTS srovnatelné. Tento předpoklad se však po analýze reálných vzorků potravin nepotvrdil. Rozdílnost ve stanovené celkové antioxidační aktivitě může být způsobena tím, že radikál DPPH je hned po namíchání připraven k použití, kdežto $\text{ABTS}^{+\bullet}$ musí být před použitím generován (po dobu 12 hodin). Hodnoty naměřené metodou FRAP jsou menší a odráží redukční schopnost látek, která přímo nemusí korelovat s antioxidační aktivitou. Nižší hodnoty stanovené celkové antioxidační aktivity jsou způsobeny pomalou reakcí polyfenolických látek s železitým komplexem, což vede k tomu, že polyfenolické látky nejsou do měření zahrnuty. Na základě prvních získaných poznatků o různých metodách používaných pro stanovení celkové antioxidační aktivity v této práci se lze domnívat, že k vytvoření celkového závěru o antioxidační aktivitě daného vzorku potravin je třeba analyzovat vzorek více nezávislými metodami. K vytvoření hlubšího závěru by bylo třeba analyzovat více vzorků potravin a měření několikrát zopakovat.

5 ZÁVĚR

V předložené práci byla vypracována literární rešerše z oblasti problematiky antioxidantů a stanovení antioxidační aktivity potravin. Dále byly vypracovány a ověřeny jednotlivé vybrané postupy pro stanovení antioxidační aktivity potravin. Tyto postupy byly porovnávány na základě analýzy vybraných vzorků potravin.

Celková antioxidační aktivita vybraných vzorků potravin byla změřena metodami využívajícími schopnosti antioxidantů zhaset syntetické radikály ABTS a DPPH. Byla také odzkoušena a použita metoda FRAP, u které působením antioxidantů dochází k redukci železitého komplexu na železnatý. Antioxidační aktivita vzorků potravin byla stanovena z kalibračních křivek sestrojených za použití modelové látky Troloxu. Analýzou vzorků bylo zjištěno, že metoda DPPH vykazuje vyšší hodnoty antioxidační aktivity než metody ABTS a FRAP. Vyšší hodnoty antioxidační aktivity získané metodou s DPPH ve srovnání s metodami ABTS a FRAP mohou být způsobeny tím, že radikál DPPH je hned po namíchání připraven k použití a reaguje se vzorkem po dobu 24 hodin, kdežto ABTS^{•+} musí být před použitím generován (po dobu 12 hodin) a poté se vzorkem reaguje 2 hodiny. Nižší hodnoty získané metodou FRAP mohou být způsobeny tím, že při metodě FRAP je měřena spíše redukční schopnost látek, která nemusí zcela korelovat s antioxidační aktivitou potravin. Vzhledem k tomu, že každá z testovaných metod poskytovala statisticky významně rozdílné hodnoty antioxidační aktivity, je třeba při analýze reálných vzorků potravin pro stanovení celkové antioxidační aktivity použít vždy více metod. K vytvoření hlubšího závěru by však bylo třeba analyzovat více vzorků potravin a měření několikrát zopakovat.

- [1] ŠTINDLOVÁ, J. *Změny antioxidantů ve vybraných druzích ovoce v průběhu mražení*. Brno, 2010. Bakalářská práce. FCH VUT Brno.
- [2] RACEK, Jaroslav a Václav HOLEČEK. Enzymy a volné radikály. *Chemické listy*. 1999, č. 93.
- [3] MACUCHOVÁ, S., *Studium aktivity enzymových a nízkomolekulárních antioxidačních systémů*. Brno, 2010. Disertační práce, FCH VUT Brno.
- [4] GÜLÇİN, İlhami. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*. 2012, č. 86, s. 345-391.
- [5] ŠTÍPEK, Stanislav. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. 1. vyd. Praha: Grada, 2000, 314 s. ISBN 80-7169-704-4.
- [6] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*. 2004, č. 98, s. 174-179.
- [7] KOPŘIVA, Vladimír. *Antioxidační kapacita potravin* [online]. 2009 [cit. 13.2.2013]. Dostupné z: <http://cit.vfu.cz/ivbp/wp-content/uploads/2011/07/ANTIOXIDA%C4%8CN%C3%8D-KAPACITA-POTRAVIN.pdf>
- [8] TOMKOVÁ, M., *Obsah antioxidačních látek ve vybraných druzích ovocných a bylinných čajů*. Brno, 2008. Diplomová práce. FCH VUT Brno.
- [9] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999. 368 s. ISBN 80-902391-5-3.
- [10] ŽITŇANOVÁ, Ingrid, Silvia RANOSTAJOVÁ, Hana SOBOTOVÁ, Denisa DEMELOVÁ, Ivan PECHÁŇ a Zdeňka ĎURAČKOVÁ. Antioxidative activity of selected fruits and vegetables. *Biologia*. 2006, č. 61, s. 279-284.
- [11] ORTEMBERG, Adriana. *Mládneme s antioxidanty*. Vyd. 1. Praha: Ivo Železný, 2003, 126 s. ISBN 80-237-3742-2.
- [12] JORDÁN, Václav a Marie HEMZALOVÁ. *Antioxidanty: zázračné zbraně : vitaminy, minerály, stopové prvky, aminokyseliny a jejich využití pro zdravý život*. Vyd. 1. Brno: Jota, 2001, 153 s. ISBN 80-7217-156-9.
- [13] VELÍŠEK, J., *Chemie potravin 1*. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [14] The main pathway of retinol metabolism. *Www.thetriplehelixian.com* [online]. 2012 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://thetriplehelixian.com/2012/08/05/part-i-updated-post-on-the-main-pathway-of-retinol-metabolism-v-0-02/>
- [15] Kyselina askorbová E300. *Www.fichema.cz* [online]. 2013 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: http://www.fichema.cz/chemikalie-kyselina-askorbova-e300-potravin-c-37_117.html
- [16] Tokoferol. *Www.vydavatelstvi.vscht.cz* [online]. [cit. 2013-04-17]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/tokoferol.html
- [17] YAO, L. H., Y. M. JIANG, J. SHI, F. A. TOMÁS-BARBERÁN, N. DATTA, R. SINGANUSONG a S. S. CHEN. Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2004, č. 59, s. 113-122.
- [18] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, xx, 623 s. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [19] PASCUAL-TERESA, Sonia a Maria Teresa SANCHEZ-BALLESTA. Anthocyanins: from plant to health. *Phytochemistry Reviews*. 2008, č. 7, s. 281-299.

- [20] DONG, Jun-Jie, Jian-Hui YE, Jian-Liang LU, Xin-Qiang ZHENG a Yue-Rong LIANG. Isolation of antioxidant catechins from green tea and its decaffeination. *Food and Bioprocess Processing*. 2011, č. 89, s. 62-66.
- [21] WANG, C. C., S. C. CHANG, B. Stephen INBARAJ a B. H. CHEN. Isolation of carotenoids, flavonoids and polysaccharides from *Lycium barbarum* L. and evaluation of antioxidant activity. *Food Chemistry*. 2010, č. 120, s. 184-192.
- [22] LI, Hongyan, Zeyuan DENG, Ronghua LIU, Steven LOEWEN a Rong TSAO. Carotenoid compositions of coloured tomato cultivars and contribution to antioxidant activities and protection against H₂O₂-induced cell death in H9c2. *Food Chemistry*. 2013, č. 136, s. 878-888.
- [23] MÜLLER, Lars, Kati FRÖHLICH a Volker BÖHM. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*. 2011, č. 129, s. 139-148.
- [24] JAVANMARDI, J, C. STUSHNOFF, E. LOCKE a J.M. VIVANCO. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food chemistry*. 2003, č. 83, s. 547-550.
- [25] LI, Hongyan, Zeyuan DENG, Tao WU, Ronghua LIU, Steven LOEWEN a Rong TSAO. Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food Chemistry*. 2012, č. 130, s. 928-936.
- [26] GRANATO, Daniel, Flávia Chizuko Uchida KATAYAMA a Inar Alves de CASTRO. Phenolic composition of South American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price and sensory quality. *Food chemistry*. 2011, č. 129, s. 366-373.
- [27] SURVESWARAN, Siddharthan, Yi-Zhong CAI, Harold CORKE a Mei SUN. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*. 2007, č. 102, s. 938-953.
- [28] MITUROVÁ, Veronika. *Antioxidanty syntetické a přírodní*. Zlín, 2009. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.
- [29] SMITH, J., HONG-SHUM, L. *Food Additives Data Book*. Massachusetts: Blackwell Publishing, 2003. ISBN 978-0-632-06395-6.
- [30] BHA. [www.hplc1.sweb.cz](http://hplc1.sweb.cz) [online]. 2004 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://hplc1.sweb.cz/ANTIOXIDANT/Chrom/bha.gif>
- [31] BHT. [www.hplc1.sweb.cz](http://hplc1.sweb.cz) [online]. 2004 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://hplc1.sweb.cz/ANTIOXIDANT/Chrom/bht.gif>
- [32] Butylhydrochinon. [www.hplc1.sweb.cz](http://hplc1.sweb.cz) [online]. 2004 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://hplc1.sweb.cz/ANTIOXIDANT/Chrom/buthydrochinon.gif>
- [33] POSPÍŠIL, J. *Antioxidanty*. 3.vyd. Praha: Academia, 1973. 392 s. ISBN 509-21-875.
- [34] KARADAG, Ayse, Beraat OZCELIK a Samim SANER. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*. 2009, č. 2, s. 41-60.
- [35] MACDONALD-WICKS, Lesley K, Lisa G WOOD a Manohar L GARG. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2006, č. 86, s. 2046-2056.
- [36] LEE, Yunho, Jeyong YOON a Urs von GUNTEN. Spectrophotometric determination of ferrate (Fe(VI)) in water by ABTS. *Water Research*. 2005, č. 39, s. 1946-1953.

- [37] Proprietà antiossidanti dei polifenoli. *Www.lem.ch.unito.it* [online]. 2007 [cit. 2013-04-15].
Dostupné z:
http://lem.ch.unito.it/didattica/infochimica/2007_Polifenoli_Vino/antiox.html
- [38] MARTIN, Fidler a Lenka KOLÁŘOVÁ. Analýza antioxidantů v chmelu a pivu. *Chemické listy*. 2009, č. 103, s. 232-235.
- [39] DAHLÉN, Johan a Stefan KARLSSON. Determination of iron(II) in natural waters by capillary zone electrophoresis using on-capillary complexation with 2,4,6-tri(2'-pyridyl)-1,3,5-triazine. *Journal of Chromatography A*. 1999, č. 848, s. 491-502.
- [40] THAIPONG, Kriengsak, Unaroj BOONPRAKOB, Kevin CROSBY, Luis CISNEROS-ZEVALLOS a David HAWKINS BYRNE. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006, č. 19, s. 669-675.
- [41] MELOUN, Milan a Jiří MILITKÝ. *Statistické zpracování experimentálních dat*. Praha: PLUS, 1994, 839 s. ISBN 80-852-9756-6.

AAPH	2,2'-azobis(isobutyrimidamid)-dihydro-chlorid
ABTS	2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)
BHA	butylhydroxyanisol
BHT	butylhydroxytoluen
DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPLC-ECD	High Performance Liquid Chromatography – Electrochemical Detection
LDL	Low-density lipoprotein
NADPH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
RNS	Reactive Nitrogen Species
RONS	Reactive Nitrogen and Oxygen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
TAA	Total Antioxidant Activity
TBHQ	2-terc-butylhydrochinon
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TPTZ	2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin
Trolox	(±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina