

353

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ
OBSAHU ANTIOXIDANTŮ
VE VYBRANÝCH DOPLŇCÍCH STRAVY**

**Spectrophotometric determination
of antioxidant content
in selected dietary supplements**

**Bakalářská práce
studijního programu Klinická a toxikologická analýza**

Praha 2008

Darina Kováčová

pr.č. 1278/08 stud (anal.)

UNIVERZITA KARLOVA v Praze
Přirodovědecká fakulta
Oborová knihovna chemie
Albertov 6, 128 43 Praha 2
IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208
UK 22

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Mgr. Václava Červeného a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 1. září 2008.

Barbora Křížová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Mgr. Václavu Červenému za odborné vedení, pomoc, rady a připomínky, které mi po celou dobu řešení mé bakalářské práce poskytoval.

Klíčová slova: spektrofotometrie, celková antioxidační aktivita

Předmětová hesla: potravinové doplňky, ABTS, Trolox

OBSAH

1 ÚVOD	8
2 TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Molekulová absorpční spektrometrie ve viditelné oblasti.....	9
2.2 Volné radikály.....	11
2.3 Antioxidační ochrana organismu.....	14
2.4 Antioxidační aktivita a základní metody jejího stanovení.....	15
2.4.1 Metody založené na eliminaci syntetických radikálů.....	16
2.4.2 Metody založené na eliminaci kyslíkových radikálů.....	18
2.4.3 Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek.....	19
2.5 Hodnocení výsledků měření.....	20
2.5.1 Kalibrace a lineární regrese.....	20
2.5.2 Mez detekce.....	20
2.5.3 Mez stanovitelnosti.....	21
2.5.4 Opakovatelnost.....	21
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
3.1 Použité chemikálie.....	22
3.2 Laboratorní přístroje.....	22
3.3 Pracovní postup pro stanovení celkové antioxidační aktivity	23
4 VÝSLEDKY MĚŘENÍ	24
4.1 Ověření optimálních experimentálních podmínek pro stanovení celkové antioxidační aktivity.....	24
4.1.1 Stabilita radikálu ABTS ⁺	24
4.1.2 Nadbytek ABTS v reakční směsi.....	25
4.1.3 Vliv pH na stanovení TAA.....	26
4.1.4 Kalibrační závislost pomocí standardu Troloxu.....	27
4.2 Optimální podmínky pro stanovení celkové antioxidační aktivity praktických vzorků.....	28
4.3 Analýza praktických vzorků.....	29
4.4 Mez detekce, mez stanovitelnosti, opakovatelnost	32
4.5 Vyhodnocení výsledků.....	33
5 DISKUZE A ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ	37
6 ZÁVĚR	38
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	39

Seznam zkratek a symbolů

A	absorbance
c	molární koncentrace ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)
cm	centimetr
E_0	energie základního elektronového stavu (J)
E_1	energie excitovaného stavu (J)
ΔE	absorbovaná energie (J)
E_e	energie elektronového přechodu (J)
E_r	energie rotačního přechodu (J)
E_v	energie vibračního přechodu (J)
ε_λ	molární absorpční koeficient při vlnové délce λ ($\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)
g	gram
h	Planckova konstanta ($6,62607\cdot 10^{-34}$ J.s)
hod	hodina
J	Joule
l	tloušťka absorpční vrstvy (cm)
λ	vlnová délka (nm)
M	molární; $1 \text{ M} = 1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$
mM	milimolární; $1 \text{ mM} = 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$
μM	mikromolární; $1 \mu\text{M} = 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$
ml	mililitr; $1 \text{ ml} = 10^{-3} \text{ l}$
μl	mikrolitr; $1 \mu\text{l} = 10^{-6} \text{ l}$
M_r	relativní molekulová hmotnost
nm	nanometry; $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$
σ	směrodatná odchylka
t	čas (hod)
τ	propustnost (transmittance)
ν	frekvence záření (Hz)
Φ	zářivý tok vystupující
Φ_A	absorbovaný zářivý tok
Φ_0	zářivý tok vstupující
AAPH	(2,2'-azobis(isobutyrimidamid)-dihydrochlorid)

ABTS	(2,2'-azinobis)3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
DMPO	(2,2-dimethyl-2 <i>H</i> -pyrrol-1-oxid)
DPPH	(1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl))
EGCG	epigalokatechingalát
FRAP	ferric reducing antioxidant power (metoda hodnotící redukci železitých komplexů)
GSHPx	glutathionperoxidáza
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-ECD	HPLC s elektrochemickou detekcí
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (redukovaná forma)
ORAC	oxygen radical absorbance capacity (metoda hodnotící eliminaci peroxylového radikálu)
RNS	reactive nitrogen species (reaktivní formy dusíku)
ROS	reactive oxygen species (reaktivní formy kyslíku)
SOD	superoxid dismutáza
TAA	total antioxidant activity (celková antioxidační aktivita)
TEAC	trolox equivalent antioxidant capacity (antioxidační aktivita ekvivalentní množství Troloxu)
TPTZ	2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin))

1 ÚVOD

Cílem bakalářské práce bylo stanovit celkovou antioxidační aktivitu vybraných potravinových doplňků a nápojů spektrofotometrickou metodou používající ABTS ((2,2'-azinobis)3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonovou kyselinu). V první části práce byly hledány optimální podmínky stanovení celkové antioxidační aktivity v kapalných vzorcích, ve druhé části práce byla zjišťována antioxidační aktivita reálných vzorků a její hodnoty byly následně vzájemně porovnány u jednotlivých vzorků.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Molekulová absorpční spektrometrie ve viditelné oblasti

Molekulová absorpční spektrometrie patří mezi nejstarší a nejoblíbenější fyzikálně-chemické metody. Je jednou z nejužívanějších analytických metod díky své přesnosti, rychlosti, citlivosti a experimentální nenáročnosti. Absorpční spektrometrie je založena na interakci molekul látek s elektromagnetickým zářením. Pro viditelnou oblast sleduje absorpci záření v rozsahu vlnových délek 380 až 770 nm, pro ultrafialové záření oblast v rozsahu 200 – 400 nm. Pohlcením elektromagnetického záření se molekula dostává ze svého základního stavu E_0 do energeticky bohatšího, excitovaného stavu E_1 . Rozdíl energií ΔE odpovídá energii absorbovaných fotonů a splňuje tzv. Planckovu podmínku:

$$\Delta E = h \frac{c}{\lambda} \quad (1)$$

kde h je Planckova konstanta [$6,62607 \cdot 10^{-34}$ Js], c rychlost světla ve vakuu [$299\,792\,458$ m.s⁻¹] a λ vlnová délka záření [nm].

Absorpci elektromagnetického záření lze popsat vztahem:

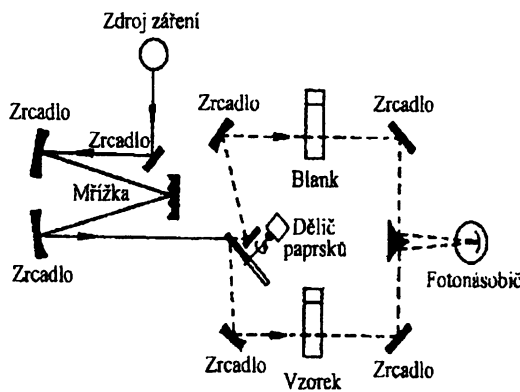
$$\Delta E = E_1 - E_0 = h\nu = \Delta E_e + \Delta E_v + \Delta E_r \quad (2)$$

kde ΔE je absorbovaná energie [J], E_1 energie v energeticky vyšším stavu (excitovaném) [J], E_0 energie v základním energetickém vztahu [J], h Planckova konstanta [$6,62607 \cdot 10^{-34}$ Js],

ν frekvence [Hz], E_e energie elektronového přechodu [J], E_v energie vibračního přechodu [J] a E_r energie rotačního přechodu [J].

Absorpci záření lze měřit na přístrojích, které se nazývají absorpční spektrometry. Základní prvky spektrometru mohou být uspořádány způsobem jednopaprskovým nebo dvoupaprskovým. V této práci byl používán spektrometr dvoupaprskový (*Obr. 2.1*). Paprsek po

výstupu z monochromátoru dvoupaprskových přístrojů je směřován rotujícím polokruhovým zrcadlem střídavě do měrné a do srovnávací kyvety. Po výstupu z kyvet jsou oba paprsky pomocí zrcadel spojeny do paprsku společného, který dopadá na detektor s dostatečně rychlou odezvou. Vzniká střídavý proud, odpovídající poměru toků Φ/Φ_0 . Záznam absorpčního spektra trvá obvykle několik minut.



Obr. 2.1: Schéma dvoupaprskového spektrometru

Při absorpčním měření je ze vstupjícího toku záření Φ_0 část absorbována vzorkem (absorbovaný zářivý tok Φ_A), zbytek záření vzorkem projde a je zaznamenán jako zářivý vystupující tok Φ . Podíl zářivých toků se nazývá propustnost (transmittance). Na většině spektrofotometrů lze také odečíst hodnotu absorbance A – záporně vzaty logaritmus transmittance [3].

$$A = -\log \tau = \log (\Phi/\Phi_0) \quad (3)$$

kde τ je transmittance, Φ_0 je zářivý tok vstupující, Φ je zářivý tok vystupující.

Největší počet aplikací molekulové absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti je v kvantitativní analýze a je založen na platnosti *Lambertova – Beerova zákona*:

$$A = \epsilon_{\lambda}.c.l \quad (4)$$

kde ε_λ je molární absorpční koeficient při dané vlnové délce λ ($\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), c je molární koncentrace ($\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) a l je tloušťka absorpční vrstvy (cm).

Pracuje se obvykle při vlnové délce maxima absorbance. Absorbance pro danou látku závisí nejen na její koncentraci a tloušťce absorpční vrstvy, ale také na molární absorptivitě ε . Látky, které mají ve své molekule skupiny schopné absorpce viditelného záření, lze stanovovat přímo. Naopak látky, které viditelné záření neabsorbují nebo látky, které mají nízké hodnoty ε , je nutné nejprve kvantitativně převést na absorbující látky reakcemi, kdy se do sloučeniny zanesou vhodný chromofor, s kterým poskytují intenzivní zbarvení [4].

2.2 Volné radikály

Volné radikály jsou sloučeniny kyslíku a dusíku, které vznikají v našem těle jako vedlejší produkt buněčného metabolismu. Jsou charakterizovány nepárovými elektrony a proto jsou velmi reaktivní – reaktivní formy kyslíku ROS (reactive oxygen species) (Tab. 2.1a, Tab. 2.1b), reaktivní formy dusíku RNS (reactive nitrogen species) (Tab. 2.2a, Tab. 2.2b). V přítomnosti kyslíku se na místo nepárového elektronu okamžitě naváže molekula kyslíku a vzniká peroxylový radikál, který se snaží z jiné sloučeniny získat chybějící elektron, čímž vytváří jiný volný radikál. Tato řetězová reakce je buď přerušena vazbou dvou radikálů na sebe nebo reakcí s antioxidantem [5]. Převaha volných radikálů nad antioxidanty se nazývá **oxidační stres** [6].

V živém organismu je mnoho biochemických pochodů s účastí reaktivních forem kyslíku.

Nejznámější vznik volných radikálů probíhá v dýchacím řetězci, kde oxidací vzdušným kyslíkem vzniká energie a jako vedlejší produkty volné radikály superoxid (O_2^\cdot) a volný hydroxylový radikál (OH^\cdot). Superoxid je účinkem superoxididismutázy (SOD) zpracován na peroxid vodíku, který není volným radikálem, ale je neméně škodlivý, proniká přes buněčné membrány a má delší poločas trvání než volné radikály, které mají obvykle poločas v rozmezí 10^{-5} - 10^{-9} sekund. Peroxid vodíku sice není radikálem, ale do skupiny ROS patří, neboť se účastní vzniku radikálů (Obr. 2.2). Reakce samotného peroxidu vodíku s biomolekulami jsou pomalé, ale v přítomnosti přechodných kovů (Fe^{2+} či Cu^{2+}) se peroxid rychle redukuje na vysoce toxický hydroxylový radikál HO^\cdot , který v živé hmotě okamžitě reaguje s okolními

biomolekulami; jde o extrémně silné oxidační činidlo, vytrhující elektron z nenasycených mastných kyselin, a atakující aminokyseliny a báze nukleových kyselin [7].

Tab. 2.1a: Reaktivní formy kyslíku (ROS) [5]

Volné radikály	
název	vzorec
superoxid	O_2^{\cdot}
hydroxylový radikál	HO^{\cdot}
peroxyl	ROO^{\cdot}
alkoxyl	RO^{\cdot}
hydroperoxyl	HO_2^{\cdot}

Tab. 2.1b: Reaktivní formy kyslíku (ROS) [5]

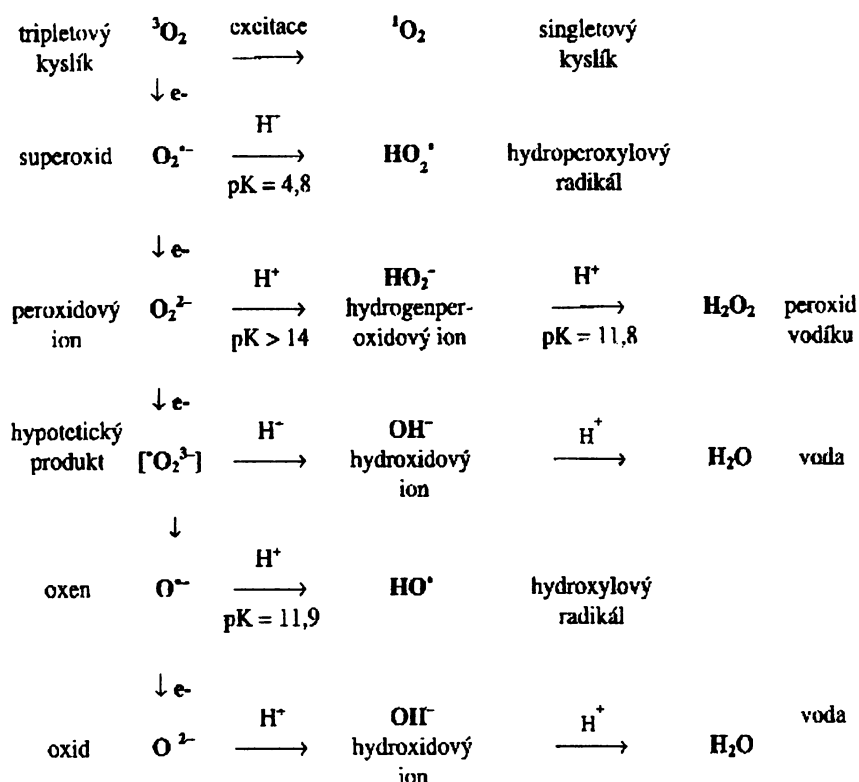
Látky, které nejsou volnými radikály	
název	vzorec
peroxid vodíku	H_2O_2
kyselina chlorná	$HOCl$
ozon	O_3
singletový kyslík	1O_2

Tab. 2.2a: Reaktivní formy dusíku (RNS) [5]

Volné radikály	
název	vzorec
oxid dusnatý	NO^{\cdot}
oxid dusičitý	NO_2^{\cdot}

Tab. 2.2b: Reaktivní formy dusíku (RNS) [5]

Látky, které nejsou volnými radikály	
název	vzorec
nitrosyl	NO^+
nitroxid	NO
kyselina dusitá	HNO_2
oxid dusitý	N_2O_3
oxid dusičitý	N_2O_4
nitronium	NO_2^+
peroxynitrit	ONOO
alkylperoxynitrit	ROONO



Obr. 2.2: Postupná redukce kyslíku (upraveno dle [8])

Organismy jsou přirozeně vybaveny enzymy, které jim pomáhají vyrovnávat se s náporom radikálů. Peroxid vodíku je v organismu zneškodňován hlavně glutathionperoxidázou (GSHPx), méně pak katalázou (CAT). Při nedostatku těchto enzymů a v přítomnosti kovů (Fe, Ni, Cu) vznikají z peroxidu vodíku dva volné hydroxylové radikály, které až s dalším elektronem dají molekulu vody [5].

Volné radikály přispívají významně ke vzniku a průběhu diabetu, vzniku očních chorob, zánětů, řady plicních a kožních chorob, poruch imunity, podporují virové infekce či způsobují mužskou neplodnost. Mnoho studií se zabývá úlohou volných radikálů při rakovinném bujení a procesu stárnutí organismu. Na druhé straně organismus umí využívat volné radikály, např. bílé krvinky obsahují hodně volných radikálů, jimiž zabíjí mikroorganismy [9].

2.3 Antioxidační ochrana organismu

Jednou z možností, jak organismus chránit před vlivem exogenních i endogenních volných radikálů, je působení antioxidantů. Antioxidanty jsou molekuly, které mohou zabraňovat nebo omezovat oxidační destrukci látek, omezují aktivitu kyslíkových radikálů - snižují pravděpodobnost jejich vzniku nebo je převádějí do méně reaktivních nebo nereaktivních stavů. Reagují s volnými radikály a ukončují tak řetězovou reakci před tím, než dojde k poškození buněk.

Antioxidanty jsou látky různé podoby a různého složení. Jsou to látky jednoduchých struktur a složení (stopové prvky selen a zinek) i složitějších struktur (např. enzymy - superoxididismutáza SOD). Dělí se na *endogenní* a *exogenní* antioxidanty, podle toho jestli si je organismus vytváří sám nebo je přijímá z vnějšku. Endogenní antioxidanty rozdělujeme na *enzymové* a *neenzymové*. Mezi enzymové antioxidanty se řadí cytochrom c, SOD, GSHPx, katalasa. Mezi neenzymové antioxidanty patří membránové (α -tokoferol, β -karoten, koenzym Q_{10}) a nemembránové (askorbát, uráty, transferin a bilirubin). K vysokomolekulárním endogenním antioxidantům řadíme transferin, kyselinu močovou, flavonoidy, melatonin, feritin, haptoglobin, hemopexin a albumin. K exogenním antioxidantům patří mnoho látek různé velikosti a struktury, k těm nejjednodušším patří stopové prvky selen a zinek. Selen ovlivňuje vstřebávání vitamínu E (Obr. 2.3), zinek stabilizuje buněčné membrány, zvyšuje

imunitní odpověď a má účinek jako antagonistu železa. Ke složitějším se řadí mnoho vitamínů. Mezi nejvýznamnější vitamínové antioxidanty patří vitamín C, který je rozpustný ve vodě, dále kyselina listová, vitamín E a vitamín A.

Velký význam se přikládá i polyfenolickým sloučeninám. Mezi ně patří např. flavonoidy, katechiny a fenolické kyseliny. Tyto látky mají mimo antioxidantní aktivity i antimikrobiální schopnosti. Zdrojem těchto látek jsou zelenina, ovoce, vláknina, čaj a vína. V řadě experimentálních studií bylo prokázáno, že antioxidantní aktivita mnoha rostlinných fenolických látek je vyšší než účinek antioxidantních vitamínů.

Většinu přírodních antioxidantů přijímáme jako součást složitých směsí, jejichž složky mohou reagovat s různými radikály různými mechanismy, mohou na sebe také vzájemně působit (synergicky i inhibičně). Proto je snaha charakterizovat antioxidantní aktivitu směsných vzorků i jako celku [10].

Za fyziologických podmínek je tvorba radikálů i antioxidantů v rovnováze, ideální poměr volných radikálů a antioxidantů je 1:3. Produkce radikálů je ale často nadlimitně vyšší. Mezi vnitřní příčiny patří např. vyšší hladina krevního cukru nebo svalová námaha na tzv. kyslíkový dluh. Do vnějších vlivů nadprodukce patří kouření, konzumace alkoholu, nevhodná úprava potravin, vysoký příjem kalorií, UV záření, znečištění životního prostředí a mnohé další.

Volné radikály, které uniknou antioxidantnímu působení, mohou působit lokální, ale i celková poškození. Proto musí antioxidantní terapie obsahovat více antioxidantů, aby pokryla celou škálu různých volných radikálů. Odstraňování volných radikálů pak probíhá často ve vzájemné souhře různých reakcí. Např. superoxid je odbourán na kyslík vitamínem E, přitom však vzniká radikál vitamínu E, dále vitamín C regeneruje vitamín E za vzniku radikálu vitamínu C a ten je teprve odstraňován redukováným glutathionem. Ten je zpětně redukován glutathionreduktázou za účasti NADPH [5].

2.4 Antioxidantní aktivita a základní metody jejího stanovení

Pro vzájemné porovnávání antioxidantních účinků různých směsí byl zaveden pojem **celková antioxidantní aktivita TAA** (total antioxidant activity). TAA je parametrem, který kvantifikuje schopnost vzorku biologického materiálu eliminovat radikály.

Existuje velký počet metod používaných ke stanovení antioxidační aktivity. Antioxidační aktivitu látek lze měřit metodami chemickými a fyzikálními. Chemické metody jsou založeny na použití činidel poskytujících s volnými kyslíkovými radikály barevné produkty. Vzniku radikálů brání ve vzorku obsažené antioxidanty. Intenzita zabarvení se měří nejčastěji spektrofotometricky. Jejich rozmanitost vyplývá ze skutečnosti, že nízkomolekulární antioxidanty mohou působit různými mechanismy. Nejčastěji jde o přímou reakci s radikály (zhášení, vychytávání) nebo reakci s přechodnými kovy.

Metody stanovení antioxidační aktivity mohou být rozděleny do dvou skupin – na *metody založené na eliminaci radikálů* (metoda používající ABTS (Obr. 2.4), metoda používající DPPH, metoda ORAC (oxygen radical absorbance capacity), metody založené na vychytávání hydroxylových-radikálů, superoxidového anion-radikálu) a dále na *metody posuzující oxidačně-redukční vlastnosti látek* (metoda FRAP, cyklická voltametrie, HPLC metoda s elektrochemickou detekcí) [10].

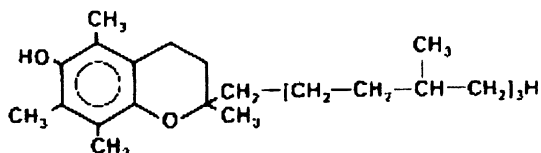
2.4.1 Metody založené na eliminaci syntetických radikálů

Metoda používající ABTS (metoda TEAC)

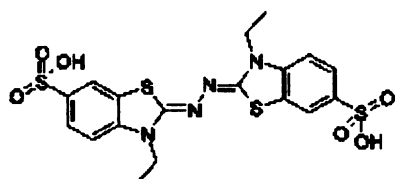
Jednou ze základních a nepoužívanějších metod pro stanovení TAA je metoda TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Výsledná antioxidační aktivita vzorku je srovnávána s antioxidační aktivitou syntetické látky, standardu Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina). Chemická struktura Troloxu je zobrazena na Obr. 2.5.

V reakční směsi se kation-radikál $ABTS^{\cdot+}$ (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)) generuje oxidací ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)) např. peroxidisíranem draselným za vzniku modrozeleného roztoku. Reakční směs je složena z radikálu ABTS a nezreagovaného ABTS. Nadbytek ABTS je nutný pro zachování stability reakční směsi. Zhášení radikálu $ABTS^{\cdot+}$ antioxidanty, které se chovají jako donory vodíku, se sleduje spektrofotometricky nejčastěji při vlnové délce 734 nm na základě změn absorpčního spektra $ABTS^{\cdot+}$. Vlivem přidání antioxidantů dochází k odbarvení reakční směsi.

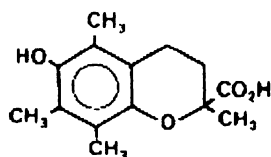
Úbytek / nárůst absorbance je úměrný antioxidační aktivitě. Nejčastěji se používá postup, při němž se antioxidant přidává k již vyprodukovanému radikálu $ABTS^{\cdot+}$ [10].



Obr. 2.3: Chemická struktura vitamínu E



Obr. 2.4: Chemická struktura ABTS



Obr. 2.5: Chemická struktura Troloxu

TAA vzorků se hodnotí parametrem TEAC. Určuje antioxidační aktivitu vzorku ekvivalentní definovanému množství syntetického derivátu Troloxu (ve vodě rozpustný homolog vitamínu E). Pro čisté látky je TEAC definována jako milimolární koncentrace Troloxu vykazující stejnou antioxidační aktivitu jako testovaná látka při koncentraci 1 mM. vzorku [9]. Hodnota TEAC vyjadřuje tedy počet radikálových kationtů $ABTS^{\bullet+}$ inaktivovaných jednou molekulou antioxidantu. Antioxidační aktivita směsných vzorků se vyjadřuje jako látkové množství Troloxu odpovídající aktivitě 1 g či 1 ml vzorku. Stanovení TEAC je závislé na čase inkubace i na poměru množství vzorku a koncentrace $ABTS^{\bullet+}$.

Metoda stanovení TAA vzorků pomocí ABTS je jednoduchá, rychlá v provedení a velmi přesná. Činidlo reaguje se všemi látkami vykazujícími antioxidační aktivitu a má široké

uplatnění od hodnocení antioxidační aktivity látek různého původu až po směsné vzorky, je vhodná pro měření hydrofilních i lipofilních antioxidantů [11].

Metoda používající DPPH

Tato metoda je založena na reakci testované látky se stabilním radikálem DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl). Při reakci dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazin). Reakce je sledována nejčastěji spektrofotometricky. Pokles absorbance při 517 nm se měří buď po uplynutí nějakého konstantního času nebo se pracuje kineticky. Reakci je možno sledovat i metodou elektronové spinové rezonance (ESR) nebo HPLC. Hodnoty antioxidační aktivity stanovené touto metodou mohou být v některých případech nižší než je tomu např. u metody ABTS, neboť některé polyfenolické látky reagují s DPPH pomalu či nereagují vůbec [10].

2.4.2 Metody založené na eliminaci kyslíkových radikálů

Metoda ORAC

Při použití této metody se v testovaném systému generují kyslíkové radikály a hodnotí se schopnost testované látky zpomalit nebo zastavit radikálovou reakci. Detekce je založena na sledování poklesu fluorescence β -fykoerytrinu po reakci s radikály. Pro generování peroxylových radikálů se používá AAPH (2,2'-azobis(isobutyrimidamid)-dihydrochlorid), při generování hydroxylových radikálů systém $H_2O_2 + Cu^{2+}$. Jelikož tyto radikály patří k nejreaktivnějším, test ORAC patří k důležitým parametrům charakterizujícím antioxidanty [6].

Metody založené na vychytávání OH-radikálů

OH-radikály jsou generovány různými postupy (Fentonova reakce, UV fotolýza peroxidu vodíku). Detekce je založena na vychytávání radikálu látkami, jejichž reakční produkty lze snadno stanovit. Antioxidanty vychytávající $OH\cdot$ snižují tvorbu těchto produktů. Jednou z možností je vychytávání těchto radikálů kyselinou salicylovou, kdy vznikají hydroxylované produkty salicylové kyseliny, jejichž detekce a kvantifikace se provádí metodou HPLC s UV detekcí.

Metody založené na vychytávání superoxidového anion-radikálu

K produkci radikálu se používá např. systém xanthin/xanthinoxidáza. Vzniklý radikál redukuje nitrotetrazoliovou modř, detekce se provádí spektrofotometricky při 550-560 nm. Je také možná detekce metodou ESR na základě superoxidového anion-radikálu s DMPO (2,2-dimethyl-2H-pyrrol-1-oxid) [10].

2.4.3 Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek

Metoda FRAP (ferric reducing antioxidant power)

Jedná se o metodu chemickou, při které antioxidanty ze vzorku redukují bezbarvé železité komplexy (např. Fe^{3+} -2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin)) (Fe^{3+} -TPTZ) a vytváří barevné produkty. Nárůst absorbance odpovídající množství komplexu Fe^{2+} -TPTZ je mírou antioxidantní aktivity vzorku. Měření probíhá při nízké hodnotě pH (3,6) a při této metodě nejsou zachyceny s komplexem pomalu reagující polyfenolické látky. Metoda odráží pouze schopnost látek redukovat ion Fe^{3+} a s celkovou antioxidantní aktivitou vzorku nemusí souhlasit [10].

Cyklická voltametrie

Tato elektrochemická metoda indikuje schopnost látek odštěpovat elektrony. Na pracovní elektrodu se vkládá potenciálový pulz s určitou rychlostí polarizace a sledují se proudové odezvy v roztoku studované látky. Záznam zachycuje křivka (tzv. cyklický voltamogram). Redukční schopnost látek se vyhodnocuje z potenciálového anodického oxidačního píku E_A a jeho anodického proudu I_A . Čím je nižší hodnota E_A , tím látka snadněji odevzdává elektrony a je lepším antioxidantem. Cyklickou voltametrií se získá informace, zda látka snadno odevzdává elektrony a pak je možné zvolit metodu pro stanovení antioxidantní aktivity [6].

HPLC metoda s elektrochemickou detekcí (HPLC-ECD)

Při HPLC-ECD metodě se na pracovní elektrodu vkládá kladný potenciál, pík látky se objeví pouze tehdy, je-li látka při tomto potenciálu oxidována. Látka je charakterizována retenčním časem a potenciálem, při kterém se oxíduje. Tato metoda umožňuje analyzovat komplexní směsi a identifikovat v nich jednotlivé antioxidanty na základě hodnoty potenciálu

vložené na elektrodu. Hodnocení antioxidačních vlastností látek pomocí HPLC-ECD koreluje s různými jinými metodami, např. s metodou DPPH [10].

2.5 Hodnocení výsledků měření

2.5.1 Kalibrace a lineární regrese

Kalibrační závislost je nejvhodnější a univerzální způsob určení koncentrace analytu. Ta se odečítá pomocí kalibrační křivky, která vyjadřuje závislost měřeného signálu (odezvy) se standardy na měřené vlastnosti (koncentraci). Výsledky měření odezvy standardů mohou být zpracovány buď graficky nebo lineární regresí s použitím metody nejmenších čtverců. Ta umožňuje určení parametrů v rovnici Lambertova-Beerova zákona:

$$A = k \times c \quad (5)$$

kde k je směrnice a c koncentrace analytu ve vzorku (mM).

2.5.2 Mez detekce

Mez detekce daného analytického postupu je dána nejmenším množstvím analytu ve vzorku, které může být detekováno, ale nemusí být stanovitelné jako exaktní hodnota. Mez detekce je nejnižší výsledek měření pro daný analytický postup a analyt či složku, který může být na dané hladině významnosti přijat za odlišný od hodnoty získané stejným analytickým postupem při použití materiálu, který daný analyt či složku neobsahuje. Mez detekce je výsledek měření, získaný určeným měřicím postupem, pro který platí, že pravděpodobnost a výskytu falešně negativního výsledku je rovna pravděpodobnosti b výskytu falešně pozitivního výsledku. IUPAC doporučuje užít pro tento vztah hodnot $a = b = 0,05$. Dle IUPAC se určí mez detekce (L_D) obecně podle vztahu:

$$L_D = 3,29 \cdot s_{bl} \quad (6)$$

kde s_{bl} je směrodatná odchylka blanku - slepého pokusu.

2.5.3 Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti metody je nejnížší množství analytu ve vzorku, které může být stanoveno jako exaktní hodnota s požadovanou hodnotou nejistoty. Mez stanovitelnosti (L_Q) se dle IUPAC určí takto:

$$L_Q = 10 s_Q \quad (7)$$

kde s_Q je směrodatná odchylka v bodě meze stanovitelnosti.

2.5.4 Opakovatelnost

Určení opakovatelnosti s jakou byla hodnota zjišťované veličiny určena, je nezbytnou součástí každé analýzy. Opakovatelnost je vlastností metody, ne výsledku. Podmínky opakovatelnosti jsou ty, při nichž se nezávislé výsledky zkoušek získají toutéž metodou, na identických zkoušených jednotkách, v téže laboratoři, týmž operátorem, za použití téhož vybavení, během krátkého časového rozmezí [12].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

ABTS chromofor (2,2'-azinobis-(3-ethyl-benzothiazolin-6-sulfonová kyselina)), diamonná sůl; $M_r = 548,7$; čistota: 99,4%; Merck, Darmstadt, Německo

zásobní 3,5mM roztok ve vodě (0,1920 g ABTS rozpuštěno, doplněno na celkový objem 100 ml deionizovanou vodou)

Peroxodisíran draselný ($K_2S_2O_8$); $M_r = 270,33$; Merck, Darmstadt, Německo

zásobní 60mM roztok ve vodě (1,6218 g $K_2S_2O_8$ rozpuštěno a doplněno na celkový objem 100 ml deionizovanou vodou)

Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina); $M_r = 250,3$; Merck, Darmstadt, Německo

zásobní 1mM roztok v methanolu (25 mg Troloxu rozpuštěno a doplněno na celkový objem 100 ml methanolem)

Acetátový pufr ($c = 60$ mM; pH = 4,3); připraven smícháním kyseliny octové (CH_3COOH ; $M_r = 60,05$; 99%; Lachema, Brno, ČR) a octanu sodného ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$; $M_r = 136,08$; 99%; Lachema, Brno, ČR)

Deionizovaná voda produkovaná zařízením *Mili Q_{PLUS}*; Milipore; USA

3.2 Laboratorní přístroje

Spektrofotometr Pye-Unicam PU 8800; Philips-Unicam; Anglie, připojený k řídicímu počítači a ovládaný vytvořeným softwarem Labview; National Instruments; USA

Spektrum snímáno v intervalu vlnových délek 400 – 800 nm, rychlost snímání spektra $2 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$, šířka spektrálního intervalu 1 nm, krok digitalizace spektra 1 nm

pH metr pHM 82; Radiometer; Dánsko

skleněné kyvety s tloušťkou absorbující vrstvy 10 mm

3.3 Pracovní postup pro stanovení celkové antioxidační aktivity

Pracovní postup stanovení celkové antioxidační aktivity byl převzat z experimentální práce „Analýza antioxidantů v chmelu a pivu“, katedra analytické chemie, Univerzita Pardubice [13].

Při stanovení TAA praktických vzorků se k roztoku ABTS přidá odpovídající množství $K_2S_2O_8$, aby vzniklá směs byla v poměru 2:1 (ABTS: $K_2S_2O_8$). Roztok se nechá reagovat přes noc za nepřístupu světla při laboratorní teplotě. Takto vzniklý roztok se smíchá s čerstvě připraveným octanovým pufrem o pH 4,3 v poměru 39:1 (pufr:ABTS⁺). 2 ml této směsi se přidají ke 25 μ l vzorku. Roztok se po promíchání nechá reagovat 30 min při laboratorní teplotě za nepřístupu světla a proměří se absorbance při vlnové délce 414 nm proti slepému vzorku [13].

Pro vyhodnocení antioxidační aktivity analyzovaných praktických vzorků se použije standardní látka Trolox. Ředěním se připraví řada o koncentracích 5 μ M – 25 μ M a konečném objemu 50 μ l a sestrojí se kalibrační závislost při vlnové délce 414 nm.

Takto byla proměřena spektra jednotlivých studovaných vzorků, potravinové doplňky stravy byly připraveny dle doporučeného dávkování a následně podle potřeby zředěny.

4 VÝSLEDKY MĚŘENÍ

Tato práce je zaměřena na stanovení celkové antioxidační aktivity u vybraných nápojů a doplňků stravy. Jak bylo řečeno v úvodní části, v této bakalářské práci byla pro stanovení celkové antioxidační schopnosti vybrána reakce s ABTS, která je založena na měření odbarvování připraveného roztoku $ABTS^{\cdot+}$ příslušným antioxidantem.

V první části experimentální práce byly ověřovány optimální podmínky pro stanovení celkové antioxidační aktivity metodou s ABTS.

Byla sledována stabilita připraveného zásobního roztoku radikálu ABTS, různé poměry ABTS a $K_2S_2O_8$ v reakční směsi a vliv pH na průběh a citlivost stanovení.

4.1 Ověření optimálních experimentálních podmínek pro stanovení celkové antioxidační aktivity (TAA)

4.1.1 Stabilita radikálu $ABTS^{\cdot+}$

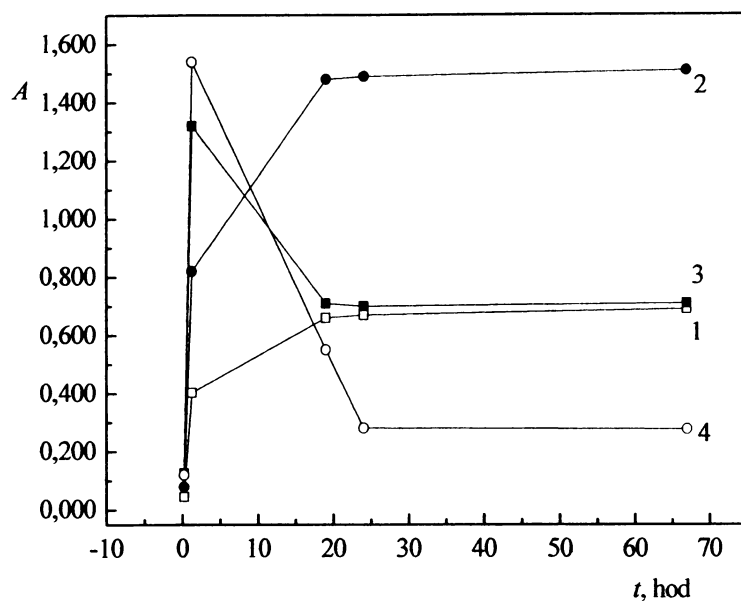
V první fázi experimentální práce bylo proměřeno spektrum směsi roztoku ABTS a $K_2S_2O_8$, ve kterém byla zjištěna 3 absorpční maxima při vlnových délkách 414 nm, 646 nm a 734 nm.

Dále byly připraveny roztoky ABTS (3,5 mM) se čtyřmi různými koncentracemi $K_2S_2O_8$ (1 mM, 2 mM, 3,5 mM a 5 mM) ve směsi a byla sledována časová stabilita těchto roztoků měřením absorbance při vlnové délce 414 nm, 646 nm a 734 nm po dobu 65 hodin.

Při všech třech zmíněných vlnových délkách byly získány podobné časové závislosti, proto je na *Obr 4.1* znázorněna pouze časová závislost absorbance při vlnové délce 414 nm, tj. při vlnové délce, která poskytla nejvyšší citlivost. Vyhodnocením časových závislostí stability bylo zjištěno, že roztoky ABTS s 1 mM a 2 mM $K_2S_2O_8$ ve směsi jsou dostatečně stabilní po zvolenou dobu.

Radikál $ABTS^{\cdot+}$ s těmito koncentracemi $K_2S_2O_8$ v roztoku je stabilní zhruba po 19 hodinách od smíchání reagentů. Tuto dobu je tedy nutné nechat reagovat ABTS s $K_2S_2O_8$ při přípravě nového zásobního roztoku $ABTS^{\cdot+}$.

Všechny další roztoky připravených radikálů $ABTS^{\cdot+}$ byly dále uchovávány v temnu při laboratorní teplotě.

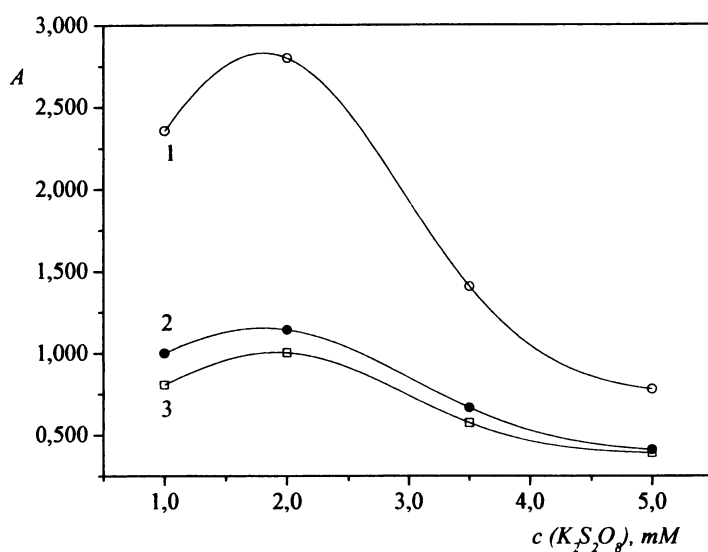


Obr. 4.1: Časová stabilita roztoků $ABTS^{\cdot+}$ (3,5 mM) připravených reakcí ABTS s různými koncentracemi $K_2S_2O_8$ v prostředí acetátového pufru ($pH=4,3$); $\lambda = 414$ nm
 1 - 1 mM $K_2S_2O_8$; 2 - 2 mM $K_2S_2O_8$; 3 - 3,5 mM $K_2S_2O_8$; 4 - 5 mM $K_2S_2O_8$

4.1.2 Nadbytek ABTS v reakční směsi

Po zjištění stability připravených roztoků $ABTS^{\cdot+}$ byla sledována reakce se standardem Troloxem. Byla proměřena spektra reakční směsi $ABTS^{\cdot+}$ (s několika různými koncentracemi $K_2S_2O_8$) s $0,01\mu M$ Troloxem. Spektra byla hodnocena při 3 vlnových délkách absorpčních maxim $ABTS^{\cdot+}$.

Jak je patrné z *Obr. 4.2*, Trolox poskytuje největší odezvu s $ABTS^{\cdot+}$ je-li připraven ve směsi s $K_2S_2O_8$ o koncentraci 2 mM. To potvrzuje fakt, že v reakční směsi pro přípravu $ABTS^{\cdot+}$ musí existovat nadbytek ABTS. Pro stanovení TAA studovaných vzorků byl tedy dále připravován radikál $ABTS^{\cdot+}$ z reakční směsi 2:1 ($ABTS:K_2S_2O_8$), což souhlasí s údaji uvedenými v literatuře [13].

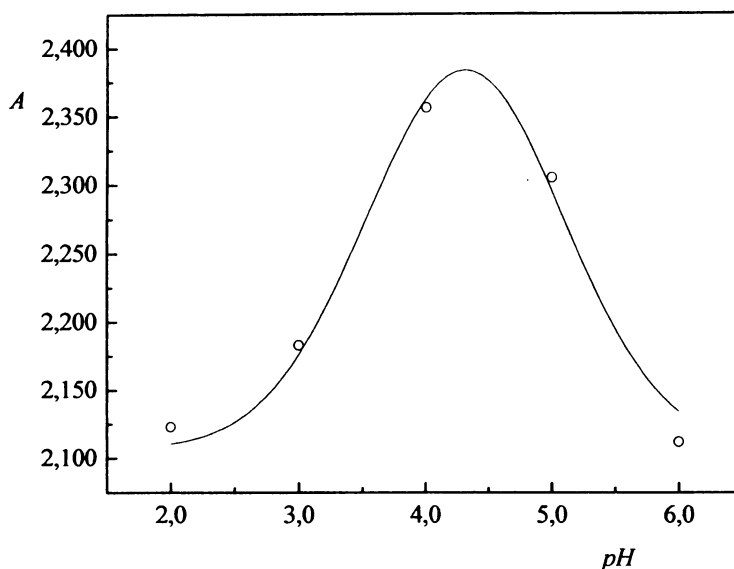


Obr. 4.2: Závislost výsledné absorbance roztoků $ABTS^+$ (3,5 mM) s $0,01 \mu M$ Troloxem na koncentraci $K_2S_2O_8$ ve směsi. Roztoky $ABTS^+$ byly připraveny reakcí ABTS s různou koncentrací $K_2S_2O_8$ v prostředí acetátového pufru ($pH=4,3$)

1 - $\lambda = 414$ nm, 2 - $\lambda = 734$ nm, 3 - $\lambda = 646$ nm

4.1.3 Vliv pH na stanovení TAA

V další části práce byl sledován vliv pH na stanovení TAA. Byla proměřena závislost absorbance $ABTS^+$ s již optimálním množstvím $K_2S_2O_8$ v závislosti na pH acetátového pufru v rozmezí hodnot 2 až 6. Jak je patrné z Obr. 4.3, maximum absorpce bylo dosaženo při $pH = 4,3$, které odpovídá hodnotě z literatury [13]. Analýza praktických vzorků byla tedy prováděna při této hodnotě pH.

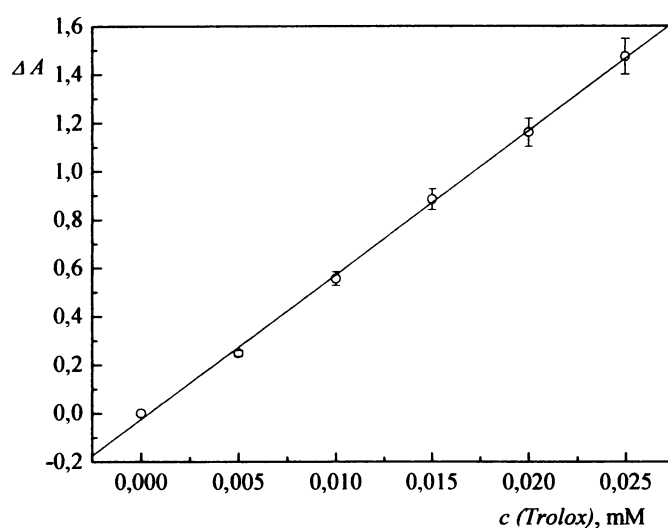


Obr. 4.3: Vliv pH na absorbanici reakční směsi $ABTS^+$; $c (ABTS) = 3,5 \text{ mM}$;
 $c (K_2S_2O_8) = 2 \text{ mM}$; $\lambda = 414 \text{ nm}$

4.1.4 Kalibrační závislost pomocí standardu Troloxu

Jak bylo uvedeno v teoretické části, je celková antioxidační aktivita (TAA) vzorku udávána jako ekvivalentní množství standardu – Troloxu. V další části práce proto byla sestrojena kalibrační závislost pro stanovení množství Troloxu. Ze zásobního 1mM roztoku Troloxu byla ředěním připravena kalibrační řada obsahující 5 μM – 25 μM Troloxu s $ABTS^+$ v konečném objemu 50 μl v prostředí acetátového pufru. Absorbance kalibračních roztoků byla měřena po půl hodině stání v temnu proti slepému vzorku ($ABTS^+$, acetátový pufr) (viz kapitola 4.2.) a z naměřených hodnot byla sestrojena kalibrační závislost.

Pro analyzované vzorky byly pozdější hodnoty absorbance přepočítány pomocí rovnice regrese kalibrační přímky na odpovídající koncentrace Troloxu a přepočteny na hodnotu TEAC, která byla vztažena na jednotku množství vzorku (1 g či 1 ml). Tyto hodnoty byly srovnávány s hodnotami uvedenými na obalech analyzovaných přípravků (Tab. 4.7).



Obr. 4.4: Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace Troloxu, prostředí acetátového pufru (pH=4,3); $c(\text{ABTS}) = 3,5 \text{ mM}$; $c(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8) = 2 \text{ mM}$; $\lambda = 414 \text{ nm}$

4.2 Optimální podmínky pro stanovení celkové antioxidační aktivity praktických vzorků

Na základě uvedených optimalizačních závislostí byly pro stanovení antioxidační aktivity vzorků nalezeny vhodné experimentální podmínky. Tyto podmínky shrnuje *Tab. 4.1.*

Tab. 4.1 Optimální podmínky stanovení antioxidační aktivity vzorků

koncentrace ABTS	3,5 mM
koncentrace $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	2 mM
koncentrace acetátového pufru	60 mM
pH acetátového pufru	4,3
vlnová délka	414 nm

4.3 Analýza praktických vzorků

Po ověření optimálních pracovních podmínek bylo přistoupeno k analýze vybraných vzorků, u kterých byla vysoká pravděpodobnost výskytu antioxidační aktivity.

Pro analýzu praktických vzorků byl připraven roztok radikálu $ABTS^{\cdot+}$ reakcí $ABTS$ s $K_2S_2O_8$ v poměru 2:1. $ABTS^{\cdot+}$ byl přidán ke 25 μ l vzorku, vhodně zředěnému (*Tab. 4.2; 4.3*) v prostředí acetátového pufru a byla proměřena absorpční spektra jednotlivých vzorků. Původně tmavě modrozelený roztok se odbarvil na světle zelený.

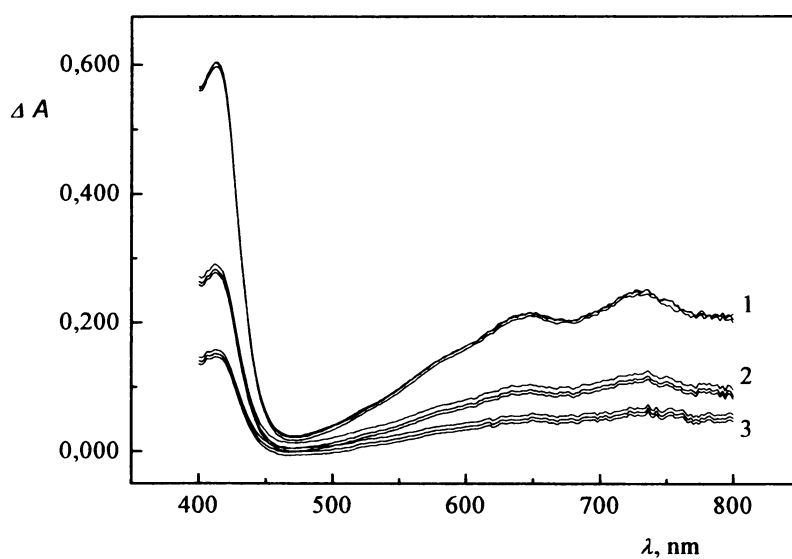
Měření reálných vzorků bylo prováděno proti slepému vzorku, který obsahoval pouze odpovídající množství $ABTS^{\cdot+}$ v prostředí acetátového pufru. Protože v tomto případě spektrofotometrického stanovení dochází účinkem antioxidantu k odbarvování reakční směsi, byla kyveta se slepým vzorkem umístěna do měrného svazku a kyveta s měřeným roztokem do srovnávacího svazku. Získané závislosti rozdílu absorbance slepého vzorku a vzorku na vlnové délce pro roztoky analyzovaných potravinových doplňků jsou znázorněny na *Obr. 4.5*; pro vzorky analyzovaných piv na *Obr. 4.6*; pro vzorky analyzovaných vín na *Obr. 4.7* a pro analyzované čaje (výluh dle návodu) na *Obr. 4.8*. Každé stanovení bylo 3 krát opakováno.

Tab. 4.2: *Seznam analyzovaných vzorků a jejich ředění*

<i>Analyzované vzorky (výrobce)</i>	<i>ředění</i>
Energy Drink (Penco)	5x
Form Drink (Nutrend)	5x
Regener (Nutrend)	5x
Světlé výčepní pivo (Budweiser)	–
Světlý ležák (Budweiser)	–
Tmavé pivo (Budweiser)	10x
Nealkoholické pivo (Budweiser)	–
Víno červené (Chateau Bzenec)	10x
Víno bílé (Chateau Bzenec)	10x
Čaj zelený (Pangea Tea, s.r.o.)	10x
Čaj černý (Ahmad Tea Ltd)	10x

Tab. 4.3: Doporučené dávkování analyzovaných potravinových doplňků

Přípravek	Doporučené dávkování
Form Drink	15 ml na 100 ml nápoje
Energy Drink	20 g na 300 ml nápoje
Regener	69 g na 450 ml nápoje

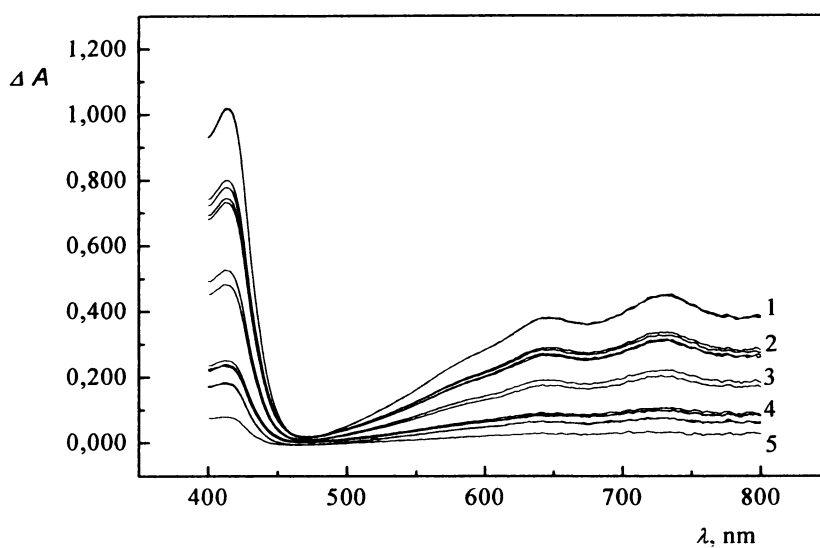


Obr. 4.5: Absorpční spektrum analyzovaných potravinových doplňků s reakční směsí (diferenční měření),

Podmínky měření: prostředí acetátového pufru ($pH=4,3$); $c(\text{pufr}) = 60 \text{ mM}$;

$c(\text{ABTS}) = 3,5 \text{ mM}$; $c(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8) = 2 \text{ mM}$

1 – Regener 5x zředěný; 2 – Energy Drink 5x zředěný; 3 – Form Drink 5x zředěný

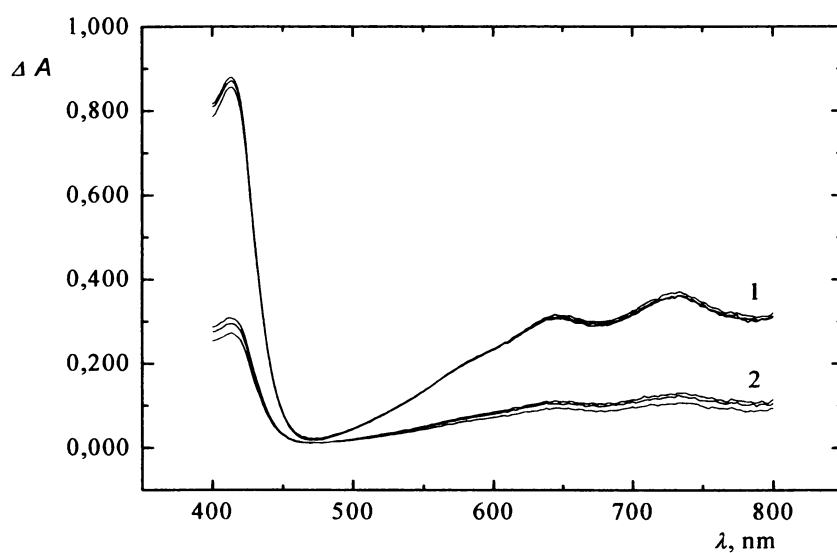


Obr. 4.6: Absorpční spektrum analyzovaných piv s reakční směsí (diferenční měření)

Podmínky měření: prostředí acetátového pufru ($pH=4,3$); c (pufr) = 60 mM;

c (ABTS) = 3,5 mM; c ($K_2S_2O_8$) = 2 mM

1 – pivo tmavé; 2 – pivo 10°; 3 – pivo 12°; 4 – pivo tmavé 10x zředě; 5 – pivo nealkoholické

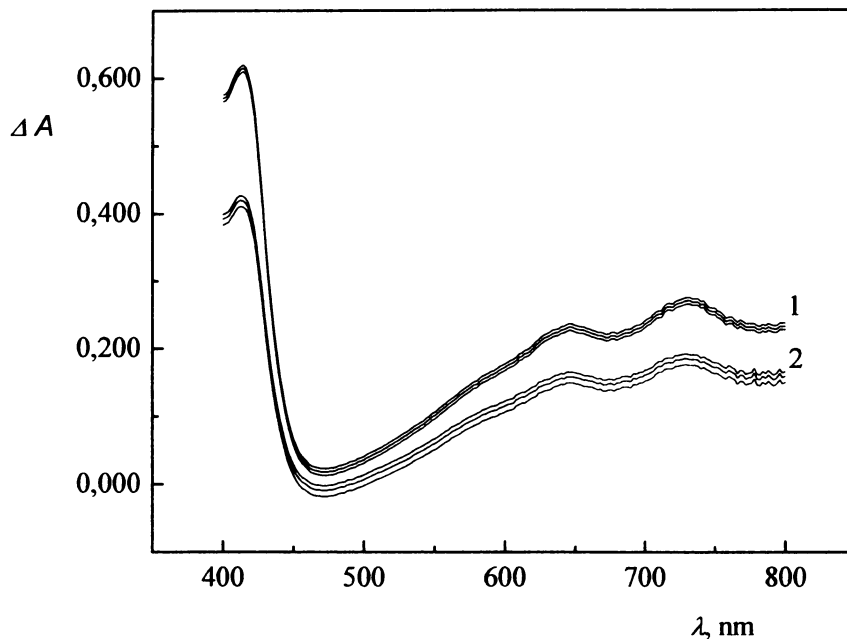


Obr. 4.7: Absorpční spektrum analyzovaných vín s reakční směsí (diferenční měření)

Podmínky měření: prostředí acetátového pufru ($pH=4,3$); c (pufr) = 60 mM;

c (ABTS) = 3,5 mM; c ($K_2S_2O_8$) = 2 mM

1 – víno červené 10x zředěné; 2 – víno bílé 10x zředěné



Obr. 4.8: Absorpční spektrum analyzovaných čajů s reakční směsí (diferenční měření)

Podmínky měření: prostředí acetátového pufru ($pH=4,3$); $c(\text{pufr}) = 60 \text{ mM}$;

$c(\text{ABTS}) = 3,5 \text{ mM}$; $c(\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8) = 2 \text{ mM}$

1 – čaj zelený 10x zředěný; 2 – čaj černý 10x zředěný

4.4 Mez detekce, mez stanovitelnosti, opakovatelnost

Mez detekce a mez stanovitelnosti byly určeny na základě 10 měření s roztokem o koncentraci Troloxu 0 mM. Hodnoty absorbance byly pomocí rovnice kalibrační přímky přepočítány na koncentrace a ze směrodatné odchylky σ byla vypočítána mez detekce (3σ) a mez stanovitelnosti (10σ). Opakovatelnost byla stanovena pro koncentraci roztoku Troloxu 0,01 mM.

Tab. 4.4: Základní charakteristiky spektrofotometrického stanovení TAA

Mez detekce [μM]	$7,246 \cdot 10^{-3}$
Mez stanovitelnosti [μM]	$2,415 \cdot 10^{-2}$
Opakovatelnost (%)	1,59

Nakonec byly ještě zjištěny hodnoty opakovatelnosti pro jednotlivé analyzované vzorky:

	Doplněk stravy (Regener)	Pivo (12°)	Víno (červené)	Čaj (zelený)
Opakovatelnost (%)	0,79	3,47	2,98	6,21

4.5 Vyhodnocení výsledků

U každého vzorku byla provedena tři měření a stanovena průměrná hodnota při všech třech absorpčních maximech (414 nm, 646 nm, 734 nm). Pomocí příslušné regresní rovnice kalibrační přímky byly hodnoty absorbancí přepočteny na koncentrace a vzájemně porovnány. Získané střední hodnoty, směrodatnou odchylku a relativní směrodatnou odchylku pro jednotlivé vzorky přehledně shrnuje *Tab. 4.5*. U studovaných potravinových doplňků byly hodnoty vztaženy na hmotnost Troloxu a porovnány s tabelovanými hodnotami od výrobce (*Tab. 4.6* a *Tab. 4.7*).

Tab. 4.5: Tabulka hodnot obsahů antioxidantů ve studovaných vzorcích

<i>A</i>	Průměrná koncentrace, <i>mM</i>				<i>SD</i>	<i>RSD (%)</i>
	<i>414</i>	<i>646</i>	<i>734</i>	\bar{x}		
<i>Energy Drink</i>	0,00515	0,00485	0,00523	0,0257	0,00100	3,9
<i>Form Drink</i>	0,00295	0,00273	0,00303	0,0148	0,00079	5,3
<i>Regener</i>	0,0105	0,0103	0,0105	0,0525	0,000737	1,4
<i>Pivo 10°</i>	0,0133	0,0133	0,0135	0,0133	0,000112	0,8
<i>Pivo 12°</i>	0,00919	0,00965	0,00987	0,00965	0,000349	3,6
<i>Pivo tmavé</i>	0,00453	0,00457	0,00471	0,0457	0,000959	2,1
<i>Pivo nealko</i>	0,00342	0,00360	0,00367	0,00360	0,000130	3,6
<i>Vino červené</i>	0,0150	0,0148	0,0151	0,150	0,00145	1,0
<i>Vino bílé</i>	0,00532	0,00513	0,00535	0,0532	0,00120	2,3
<i>Čaj zelený</i>	0,0109	0,0111	0,0113	0,111	0,00232	2,1
<i>Čaj černý</i>	0,00741	0,00767	0,00795	0,0767	0,00271	3,5

\bar{x} - střední hodnota, *SD* – směrodatná odchylka, *RSD* – relativní směrodatná odchylka

Na *Obr. 4.9* jsou graficky znázorněny (seřazeny) hodnoty koncentrací antioxidantů ve studovaných vzorcích. U vzorků potravinových doplňků (*Regener*, *Energy Drink* a *Form Drink*) jsou vyznačeny i výrobcem deklarované obsahy antioxidantů.

Tab. 4.6: Tabulka hodnot koncentrací antioxidantů ve studovaných doplňcích stravy převedených na hmotnost Troloxu

	TEAC, mM	TEAC, $\mu\text{mol.g}^{-1}$ * ¹	TEAC, $\mu\text{g Troloxu.g}^{-1}$ * ²
Energy Drink	0,0257	15,482	3875
Form Drink	0,0148	3,947	988
Regener	0,0525	13,816	3458

*¹ Navážky (dle doporučeného dávkování): Energy Drink 1,66 g

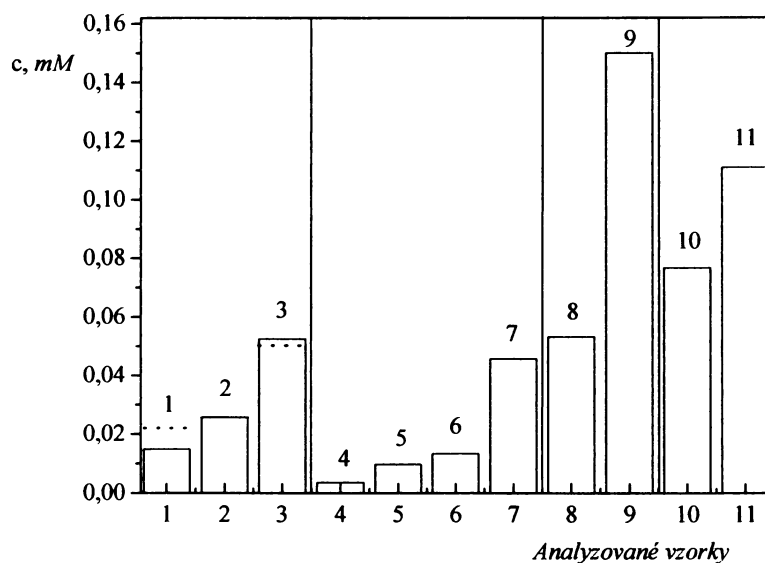
Form Drink 3,75 ml

Regener 3,8 g

*² $M_r(\text{Trolox}) = 250,3$

Tab. 4.7: Obsah vitamínu C a vitamínu E ve 100 g přípravku udávaný výrobcem (přepočteno na obsah v 1 g)

	Vitamín C, $\mu\text{g.g}^{-1}$	Vitamín E, $\mu\text{g.g}^{-1}$	Celk. množství nejvýznamnějších antioxidantů, $\mu\text{g.g}^{-1}$
Energy Drink	3600	275	3875
Form Drink	1500		1500
Regener	2467	833	3300



Obr. 4.9: Grafické znázornění a srovnání výsledků hodnot koncentrací antioxidantů ve studovaných vzorcích (u potravinových doplňků 1 – 3 vyznačena výrobcem deklarovaná hodnota obsahu antioxidantů)

1 - Form Drink

2 - Energy Drink

3 - Regener

4 - Pivo nealkoholické

5 - Pivo 12°

6 - Pivo 10°

7 - Pivo tmavé

8 - Víno bílé

9 - Víno červené

10 - Čaj černý

11 - Čaj zelený

5 DISKUSE A ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Metodou používající ABTS (metodou TEAC) bylo proměřeno celkem 11 vzorků, mezi nimiž byly potravinové doplňky (Energy Drink, Form Drink a Regener) a nápoje (pivo Budweiser 10°, 12°, tmavé a nealkoholické, červené a bílé víno, zelený a černý čaj).

Při porovnání všech studovaných vzorků vykazuje nejvyšší antioxidační aktivitu červené víno. Červené víno je významným zdrojem polyfenolů, které působí jako účinné antioxidanty. Již mnoho studií dokázalo, že přiměřená konzumace červeného vína má pozitivní účinek v boji proti kardiovaskulárním chorobám. Za toto je zodpovědná látka obsažená ve slupkách vinné révy – *resveratrol* [14]. Jeho nejhojnějším zdrojem je právě červené víno, vyskytuje se s menším obsahem i ve víně bílém. To odpovídá získaným hodnotám antioxidační aktivity červeného vína 3x větším oproti vínu bílému. Tento závěr souhlasí s výsledky získanými z literatury, kde v závislosti na druhu vína je antioxidační aktivita červeného vína 5-10x vyšší než u vína bílého [15].

Druhým nejhojnějším zdrojem antioxidantů je zelený čaj, jehož hlavní složkou je katechin – *epigalokatechingalát* (EGCG), který se vyskytuje v listech čajovníku a je velmi silným antioxidantem a v boji proti volným radikálům je podle výzkumů 100x silnější než vitamín C a 25x silnější než vitamín E. Proto lze očekávat mnohem vyšší antioxidační aktivitu u čaje zeleného než u čaje černého [15]. V této práci byla nalezena hodnota TAA u čaje zeleného jen zhruba 1,5x vyšší než u černého (což mohlo být způsobeno např. nesprávnou dobou louhování některého z čajů).

Dalším zdrojem antioxidantů jsou piva. Světlé ležáky a světlá výčepní piva vykazují antioxidační aktivitu přibližně stejnou, zatímco nejvyšší hodnoty dosahuje pivo tmavé, pro jehož výrobu se využívá jiný typ sladu a chmelu (mnichovský a karamelový slad). Nejmenší aktivitu má pivo nealkoholické, které se od ostatních piv zcela liší svým technologickým postupem výroby [16].

Hodnoty analyzovaných potravinových doplňků byly převedeny na množství Troloxu a následně porovnány. Nejmenší množství antioxidantů lze nalézt u přípravku Form Drink, který ale obsahuje extrakt ze zeleného čaje, jenž obsahuje velké množství polyfenolů a je zdrojem již zmiňovaného velmi silného antioxidantu EGCG, tudíž by se u něj daly očekávat nejvyšší hodnoty. Zbývající 2 přípravky vykazují podobnou antioxidační aktivitu. Při porovnání získaných hodnot metodou ABTS s hodnotami, které lze nalézt na obalech studovaných přípravků, je vidět velmi dobrá shoda, což může poukazovat nejen na přesnost metody, ale také na skutečný obsah antioxidantů, který je na daném přípravku tabelován.

6 ZÁVĚR

V této práci byla metodou používající ABTS stanovena celková antioxidační aktivita u celkem 11 vzorků, zahrnující potravinové doplňky a nápoje, a získané hodnoty byly následně porovnány. U potravinových doplňků se metoda ABTS se ukázala jako přesná, při porovnání získaných hodnot měřením s hodnotami udávanými na obalech je vidět shoda. Ovšem při celkovém srovnání potravinových doplňků, které byly vybrány vzhledem k „údajnému“ vysokému obsahu antioxidantů, s běžnými nápoji, je patrná nenahraditelnost přírodních antioxidantů.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Němcová, I.; Čermáková, L.; Rychlovský, P.: Spektrometrické analytické metody I. Praha, Nakladatelství Karolinum 2004
- [2] Štern, P.: Základy instrumentální analýzy v klinické biochemii. Praha, Institut postgraduálního vzdělání ve zdravotnictví
Dostupné na: <http://www1.lfl.cuni.cz/~kocna/biochem/text11.htm>
- [3] Zýka, J.: Analytická příručka, díl II. 3. přepracované a rozšířené vydání. Praha, SNTL 1980
- [4] Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychnovský, P.; Plzák, Z.: Základní analytická chemie. Praha, Nakladatelství Karolinum 2005
- [5] Štípek, S. a kolektiv: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci. Praha, Grada Publishing 2000
- [6] Campanella, L.; Bonanni, A.; Bellantoni, D.; Favero, G.; Tomassetti, M.: Comparison of fluorimetric, voltametric and biosensor methods for the determination of total antioxidant capacity of drug products containing acetylsalicylic acid.. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **36**, 91-99 (2004)
- [7] Bergendi, L.: Superoxid a iné bioreaktívne formy kyslíka. Vydavateľstvo slovenskej akademie vied. Bratislava 1988
- [8] Reilly, P.: Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Amer.J.Surg* **161**, 488-503 (1991)
- [9] Ozyurt, D.; Demirata, B.; Apak, R.: Determination of total antioxidant capacity by a new spectrophotometric Method based on Ce (IV) reducing capacity measurement. *Talanta* **71**, 1155-1165 (2007)
- [10] Paulová, H.; Bochořáková, H.; Táborská, E.: Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chem. Listy* **98**, 174-179 (2004)
- [11] Šulc, M.; Lachman, J.; Hamoun, K.; Orsák, M.; Dvořák, P.; Horáčková, V.: Výběr a zhodnocení vhodných metod pro stanovení antioxidační aktivity fialových a červených odrůd brambor. *Chem. Listy* **101**, 584 – 591 (2007)
- [12] Friedecký, B., Koruna, I., Kratochvíla, J., Plzák, Z.: Metrologická terminologie v analytické laboratoři. Pardubice, SEKK 2003
Dostupné na: <http://www.eqa.cz/terminologie/Index.htm>

- [13] Kolářová, L.; Fidler, M.: Analýza antioxidant v chmelu a pivu. Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice 2007
- [14] Corder, R.: Víno jako lék. Praha, IKAR 2007
- [15] Magalhaes, L.; Segundo, M.; Reis, S.; Lima, J.; Tóth, I.; Rangel, A.: Automatic flow system for sequential determination of ABTS scavenging capacity and Folin-Ciocalteu index: A comparative study in food products. *Analytica Chimica Acta* **592**, 193-201 (2007)
- [16] Chládek, L.: Pivovarnictví. Praha, Grada Publishing 2007

