

# OBSAH

Seznam použitých zkratk

Souhrn

Summary

<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>11</b>
<b>2. ANTIOXIDANTY.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1. Rozdělení antioxidantů .....</b>	<b>13</b>
2.1.1. Podle původu.....	13
2.1.1.1. Přírodní antioxidanty .....	13
2.1.1.2. Syntetické antioxidanty.....	14
2.1.2. Podle struktury .....	15
<b>2.2. Mechanismus působení antioxidantů .....</b>	<b>16</b>
<b>2.3. Antioxidanty a jejich vliv na zdraví člověka .....</b>	<b>16</b>
<b>3. METODY STANOVENÍ ANTIOXIDANTŮ .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1. Izolace antioxidantů .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2. Analýza antioxidantů .....</b>	<b>19</b>
3.2.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) .....	19
3.2.1.1. Základní části kapalinového chromatografu.....	21
3.2.1.2. HPLC ve spojení s detektorem CoulArray .....	22
3.2.2. Plynová chromatografie (GC) .....	22
3.2.2.1. Základní části plynového chromatografu .....	23
3.2.2.2. GC s plamenovým ionizačním detektorem (FID) .....	24
3.2.3. Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) .....	25
3.2.4. Kapilární zónová elektroforéza (CZE) .....	25
3.2.5. Spektrofotometrie.....	27
<b>4. ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA.....</b>	<b>28</b>
<b>4.1. Chemické metody .....</b>	<b>28</b>
4.1.1. ABTS metoda .....	28
4.1.2. DPPH metoda .....	29
4.1.3. ORAC metoda .....	31
4.1.4. FRAP metoda .....	31
4.1.5. Spektrofotometrie s Folin-Ciocalteovým činidlem.....	31

<b>4.1. Fyzikálně-chemické metody .....</b>	<b>32</b>
4.2.1. Elektronová spinová rezonance .....	32
4.2.2. Stanovení redox potenciálu .....	32
4.2.3. Chemiluminiscence .....	32
<b>5. ZÁVĚR .....</b>	<b>33</b>

## **Seznam použité literatury**

## Seznam použitých zkratek

NDGA	kyselina nordihydroguajaretová
BHA	terc.butylhydroxyanizol (E 320)
BHT	3,5-di-terc-butyl-4-hydroxytoluen (E 321)
TBHQ	terc.butylhydrochinon
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
DAD	detektor s diodovým polem
GC	plynová chromatografie
FID	plamenový ionizační detektor
ECD	detektor elektronového záchytu
TCD	tepelně vodivostní detektor
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
SDS	dodecyl sulfát sodný
CZE	kapilární zónová elektroforéza
TAA	celková antioxidační kapacita
ABTS	2,2.-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)
AAHP	2,2.-azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid
DPPH	2,2-difenyl-1-pikryl-hydrazyl
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina
ORAC	měření absorbance kapacity kyslíkového radikálu (Oxygen radical absorbance capacity)
β-PE	β-fykoerytrinu
AAPH	2,2.-azobis(isobutyrimidamid)-dihydrochlorid
FRAP	železitý redukční antioxidační potenciál (ferric reducing antioxidant potential)
TPTZ	2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin
DMPO	2,2-dimethyl-3,4--dihydro-2H-pyrrol-1-oxid
rH	redox potenciál vztažený k standardní vodíkové elektrodě

# 1. ÚVOD

V našem organismu neustále vznikají volné radikály, které pro nás představují trvalé potenciální nebezpečí. Mohou poškodit buňky, oslabit imunitní systém a napomáhat tak ke vzniku řady onemocnění. Proto je pro zdraví organismu nutné, aby tyto částice byly ihned po svém vzniku zachyceny a zničeny. Látky, které mají schopnost volné radikály zničit, popř. blokovat, se nazývají antioxidanty.

I když si lidské tělo produkuje vlastní účinné antioxidanty, ke zvýšení obranyschopnosti organismu, odolnosti vůči zátěži, zlepšení metabolismu a ochrany před jeho odpadními látkami, je nutné antioxidanty přijímat. Jsou přítomny v potravinách a v biologickém materiálu, také se mohou do potravin přidávat, protože prodlužují jejich údržnost, chrání je před znehodnocením a kažením způsobeným oxidací.

K nejvýznamnějším antioxidantům patří vitaminy C (kyselina L-askorbová), vitamin E ( tokoferol),  $\beta$ -karoten (provitamin A), minerály (selen, mangan, zinek), koenzym Q 10, flavonoidy a řada dalších.

Cílem této práce je popsat metody stanovení antioxidantů v potravinách. Před vlastním stanovením těchto antioxidantů je třeba nejprve provést izolaci, pro kterou se využívá zejména extrakční technika. Poté se už může provádět stanovení, a to celou řadou metod jako je například v dnešní době jedna z nejpoužívanějších vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Mezi další využívané metody patří plynová chromatografie (především s plamenovým ionizačním detektorem), ale i spektrofotometrie či kapilární zónová elektroforéza.

Důležitou vlastností antioxidantů je jejich aktivita, která je závislá na skladovacích podmínkách a zpracování potravin. Lze ji stanovit chemickými či fyzikálně-chemickými metodami.

## 2. ANTIOXIDANTY

Antioxidanty, neboli inhibitory oxidace, jsou látky, které svou přítomností zabraňují autooxidaci, jejímž projevem v potravinách je například žluknutí tuků nebo znehodnocení barvy, chuti i vůně potraviny.<sup>1</sup>

Antioxidanty reagují s volnými radikály a likvidují je tím, že jim dodávají chybějící elektron a zabraňují tak škodlivému poškození. Bylo zjištěno, že antioxidanty zpomalují, blokují a zabraňují oxidačním změnám v lidském těle a proto se záměrně přidávají do potravin, kde svým antioxidačním působením prodlužují jejich trvanlivost.<sup>1</sup> Hlavní zdroje antioxidantů v potravě jsou uvedeny v tabulce 1.

Antioxidanty jsou také schopny reagovat i se vzniklými hydroperoxidy nebo na sebe mohou vázat kovy, které katalyticky podporují radikálovou oxidaci.<sup>2</sup>

**Tab 1.** Použití, dávkování a zdroje antioxidantů<sup>3</sup>

<b>Antioxidant</b>	<b>Účinná dávka</b> <i>pro dospělého člověka</i> <i>(70 kg) / den</i>	<b>Zdroj v potravě</b>
Vitamin C	250 – 1000 mg dlouhodobě v závislosti na rizikových faktorech	ovoce (černý rybíz, citrusové plody), zelenina (papriky, brambory), šípek
β – karoten	10 – 30 mg, dlouhodobě ale jen okolo 10 mg	kiwi, citrusy, mrkev, rajčata, špenát, kukuřice, okurka, sojové klíčky
Vitamin E	100 – 400 mg dlouhodobě nebo v „kúrách“ v závislosti na riziku	ořechy, čerstvé pšeničné klíčky, zelená listová zelenina, luštěniny
Selen	50 – 150 mg dlouhodobě	celozrnná mouka, plody moře, játra, ledviny, para ořechy, ovesné vločky
Mangan	1 mg dlouhodobě	celozrnné obiloviny, ořechy, avokádo, hrách, řepa
Zinek	10 – 30 mg dlouhodobě	maso (telecí, skopové), vaječný žloutek, mléčné výrobky, cereálie
Bioflavonoidy	1000 – 2000 mg dlouhodobě	rajčata, bílá dužina citrusových plodů

## 2.1. Rozdělení antioxidantů

### 2.1.1. Podle původu

#### 2.1.1.1. Přírodní antioxidanty

Tyto antioxidanty se do potravy dostávají z přírodních zdrojů. Mezi tyto potravinářské suroviny patří především koření (jako je například majoránka, tymián, šalvěj, rozmarýna), obiloviny a olejniny (hlavně pšenice, žito, rýže, arašidy, řepka) nebo ovoce a zelenina (olivy nebo cibule a paprika). Ovlivňují charakteristické vlastnosti, barvu, chuť a vůni potravin.<sup>1</sup> Nevýhodou přírodních antioxidantů je jejich nízká odolnost proti kyslíku, a to zejména v rámci expozice světlu, vysoké teplotě a sušení.<sup>4</sup>

K nejčastějším přírodním antioxidantům lze zařadit:

##### *a) Jednoduché fenoly, fenolové kyseliny a jejich deriváty*

Fenoly jsou běžnou složkou koření, například v tymiánu se vyskytuje thymol a karvakrol. Některé jednoduché fenoly, jako jsou například hydrochinon, guajakol nebo salicylaldehyd mají kromě antioxidačních účinků také antimikrobní účinek. A k jejich hlavnímu využití spolu s fenolovými kyselinami patří uzení potravin, a to jako složky kouře.<sup>1</sup>

Mezi nejběžnější estery fenolových kyselin patří depsidy. Zástupcem depsidů je velmi rozšířená kyselina chlorogenová vyskytující se hlavně v kávě a v syrových bramborách.<sup>5</sup>

##### *b) Flavonoidy*

Flavonoidní látky jsou antioxidanty primární. Některé z nich (např. 5-hydroxysubstituované flakony) váží navíc kovy do neúčinných komplexů. Pro antioxidační aktivitu flavonoidů je důležitý počet hydroxylových skupin a jejich poloha.<sup>1</sup>

Flavonoidy chrání vitamin C před předčasným poškozením a zvyšují jeho účinnost někdy až dvacetinásobně. Tyto látky se často vyskytují především v zelenině (rajčatech, paprice, brokolici) a ovoci, především v bílé dužině citrusových plodů.<sup>6</sup>

### c) *Lignany*

Patří mezi fytoestrogeny, což jsou vícesytné fenoly strukturou podobné steroidním hormonům. Jedním z nejznámějších ligninů je NDGA (kyselina nordihydroguajaretová), která se z počátku používala jako antioxidant, ale pro její nepříznivé toxikologické hodnocení se dnes už nepoužívá.<sup>1</sup> Lignany jsou obsaženy hlavně v ovesných vločkách, lněných semínkách, ječmeni či žitě.<sup>6</sup>

### d) *Diterpeny a chinony*

K neaktivnějším patří tzv. fenolové diterpeny karnosové kyseliny, které se vyskytují nejčastěji v extraktech z rozmarýnu a šalvěje. Významnou skupinou diterpenů jsou chinony neboli deriváty fenantrenchinonů (s jiným biochemickým významem). Kromě antioxidantních účinků mají i sedativní, antimikrobní nebo protizánětlivý účinek.<sup>1</sup>

## 2.1.1.2. Syntetické antioxidanty

Jsou do potravy přidávány uměle. Nejdůležitější syntetické antioxidanty patří do skupiny gallátů. Přidávají se do rostlinných olejů a margarínů k inhibici žluknutí a zachování jejich chuti. K dalším důležitým syntetickým antioxidantům patří monofenolové antioxidanty BHA (terc. butylhydroxyanisol), BHT (3,5-di-terc-butyl-4-hydroxytoluen) a difenol TBHQ (terc. butylhydrochinon).<sup>1,2</sup>

### a) *BHA*

Butylhydroxyanisol je tvořen z 90 % 3-terc. butyl-4-hydroxyanisolem a 10 % 2-terc. butyl-4-hydroxyanisolem. Jeho účinky se využívají především k ochraně tuků (např. u olejů kokosových nebo palmojadrových – tedy u mastných kyselin, které mají kratší řetězce).<sup>1</sup>

### b) *BHT*

Butylhydroxytoluen, dříve také známý jako Ionol, je ve srovnání s BHA mnohem účinnější antioxidant, a to hlavně u živočišných tuků, ale je vhodný i pro rostlinné tuky. Stejně jako BHA se často používá do obalových materiálů, a tím se dostává do potravin.<sup>1,2</sup>

### c) *TBHQ*

2-terc. butylhydrochinon patří jako jediný antioxidant do skupiny difenolů. Lze ho používat v kombinaci s chelatačními činidly (např. citrónovou kyselinou), tím se zvýší antioxidační kapacita, což se používá speciálně pro ochranu rostlinných olejů. TBHQ obecně patří k nejlepším antioxidantům tuků, které se používají ke smažení.<sup>1</sup>

### d) *galláty*

Galláty, neboli estery kyseliny gallové, se vyskytující v malém množství v potravinách rostlinného původu. Proto byly dříve řazeny do přírodních antioxidantů, dnes jsou však řazeny pouze k syntetickým látkám. Spolu s BHA a BHT vykazují synergismus, avšak v kombinaci s TBHQ je jejich použití zakázáno.<sup>1</sup>

## 2.1.2. Podle struktury

Podle chemické struktury antioxidanty dělíme do tří hlavních skupin: na polyfenoly (jako jsou flavonoidy, anthokyany, fenolkarboxylové kyseliny, kumariny), karotenoidy (karoteny - prekursorů vitamínu A nebo xanthofyly) a tokoferoly (vitamin E).<sup>5</sup>

Vitamin E byl nazván „úžasnou molekulou“ pro svou mnohotvárnost, ovšem pouze ve své přírodní podobě, syntetický je tzv. mrtvá látka. Dosud je známo přinejmenším osm různých forem vitamínu E. Obsahuje-li strava příliš málo vitamínu E, tuk v lidském těle zežlukne – typické známky se pak projeví skvrnami na rukách.

U žen má velký význam při léčbě neplodnosti, zabraňuje taky například tvorbě křečových žil, srdečním a mozkovým mrtvicím, rakovině a mnoha jiným onemocněním. Potravinou bohaté na vitamin E jsou hlavně ořechy, celozrnné obilné výrobky, zelená listová zelenina, luštěniny nebo vaječný žloutek.<sup>6</sup>

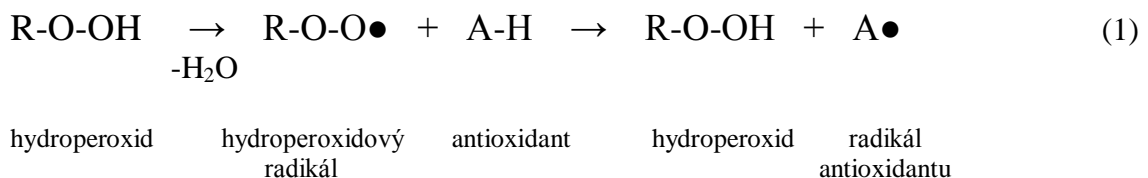


## 2.2. Mechanismus působení antioxidantů

Vlivem UV-záření, kyslíku a některých organických látek přítomných v ovzduší dochází k poškození vazeb u vyšších mastných aminokyselin a dalších látek. U potravin se tyto změny projeví změnou sensorických vlastností (barvy, chutě, vůně). Těmto změnám se říká „radikálová oxidace“ a dochází při nich ke vzniku volných radikálů.

Antioxidant se zapojuje do této reakce a proces vzniku nežádoucích radikálů zpomaluje tím, že zkracuje antioxidační řetězec a zvyšuje rychlost terminačních reakcí. Antioxidant se během reakce spotřebovává, takže když je veškerý vypotřebován, autooxidace probíhá dál jakoby žádné antioxidanty nebyly přítomny. Antioxidanty tedy nemohou radikálovou oxidaci úplně zastavit, pouze jí zpomalí.<sup>1,7</sup>

Mechanismus působení antioxidantů lze popsat reakcí (1):



## 2.3. Antioxidanty a jejich vliv na zdraví člověka

Antioxidanty v dnešní době vyvolaly značný zájem kvůli svým potenciálním nutričním a terapeutickým účinkům.

Přírodní antioxidanty přítomné v potravinách působí kladně na lidský organismus, protože ničí volné radikály, které mohou v organismu způsobovat oxidativní stres a které se podílejí na vzniku a progresi více jak 60 závažných onemocnění (např. kardiovaskulárních, neurodegenerativních, rakoviny, šedého zákalu) a poškozují DNA, lipidy a proteiny. Svoji významnou úlohu sehrávají volné radikály i při stárnutí.<sup>8</sup>

Obsah antioxidantů v potravinách zpomaluje ve značné míře atherosklerotické procesy, inhibuje akumulaci cholesterolu v krevním séru a zvyšuje rezistenci cévních stěn proti lámavosti. Mnohé antioxidanty snižují riziko onemocnění koronárních cév, které způsobuje volný radikál „peroxidovaný cholesterol“.<sup>3</sup>

Zelenina, ovoce a zemědělské plodiny představují v lidské výživě významný zdroj antioxidantů jak při přímé konzumaci, tak i ve formě zeleninových a ovocných šťáv.<sup>9</sup>

Jedním z nejbohatších zdrojů antioxidantů v lidské výživě jsou bramborové hlízy (*Solanum tuberosum* L.). Spolu s ovocem a zeleninou zajišťují denní příjem asi 64 mg polyfenolů na osobu a zauímají druhé místo v přísunu antioxidantů za rajčaty.<sup>10</sup> Z antioxidantů jsou nejbohatší na polyfenoly (1226 mg.kg<sup>-1</sup>) a L-askorbovou kyselinu (170 mg.kg<sup>-1</sup>). Z ostatních látek typu antioxidantů jsou v bramborách zastoupeny karotenoidy (až 4 mg.kg<sup>-1</sup>),  $\alpha$ -tokoferol (až 2,5 mg.kg<sup>-1</sup>) a v menší míře selen (0,01 mg.kg<sup>-1</sup>) a  $\alpha$ -lipoová kyselina.<sup>11</sup>

Strava má významný dopad na zdraví a pohodu během života. Část světového obyvatelstva trpí nedostatkem důležitých výživových skupin, zatímco jiná část trpí nemocemi způsobené nadměrnou spotřebou lipidů a sacharidů.<sup>12</sup>

## 3. Metody stanovení antioxidantů

### 3.1. Izolace antioxidantů

Před stanovením antioxidantů se musí nejprve vhodným způsobem antioxidanty izolovat z původního obvykle tuhého vzorku. K izolaci se nejčastěji používají různé druhy extrakce, jako jsou například extrakce v Soxhletově extraktoru, vysokotlaká extrakce rozpouštědlem, extrakce s využitím ultrazvuku nebo extrakce nadkritickou tekutinou.

Extrakce samotná je separační metoda, při které přechází složka ze směsi látek v kapalně či tuhé fázi do jiné kapalně fáze – rozpouštědla. Důležitá je volba vhodného rozpouštědla řídicí se charakterem látky, která má být extrahována.<sup>13</sup>

Zvolená extrakční metoda by měla být rychlá, jednoduchá, s minimální spotřebou organického rozpouštědla.<sup>14</sup> Podle způsobu provedení lze extrakční metody rozdělit na jednostupňovou, dvoustupňovou a kontinuální. A podle zúčastněných fází extrakční metody dělíme:<sup>15</sup>

- *L(S) - G extrakce* (extrakce plynem)
- *L(G) - S extrakce* (extrakce tuhým sorbentem)
- *L - L extrakce* (extrakce kapaliny kapalinou)
- *S - L extrakce* (extrakce tuhých látek kapalinou)

Při extrakci antioxidantů dochází ke koextrakci dalších látek, a proto se musí extrakt většinou přečistit (extrakce kapalina-kapalina, kolonová chromatografie, destilace s vodní parou). Z extraktu se pak antioxidanty následně reextrahují obvykle 75 % vodním roztokem methanolu nebo z acetonitrilu. K izolaci málo těkavých antioxidantů je možné využít destilace s vodní parou (terc. butylhydroxyanisol, di-terc. butylhydroxytoluen).<sup>16</sup>

## 3.2. Analýza antioxidantů

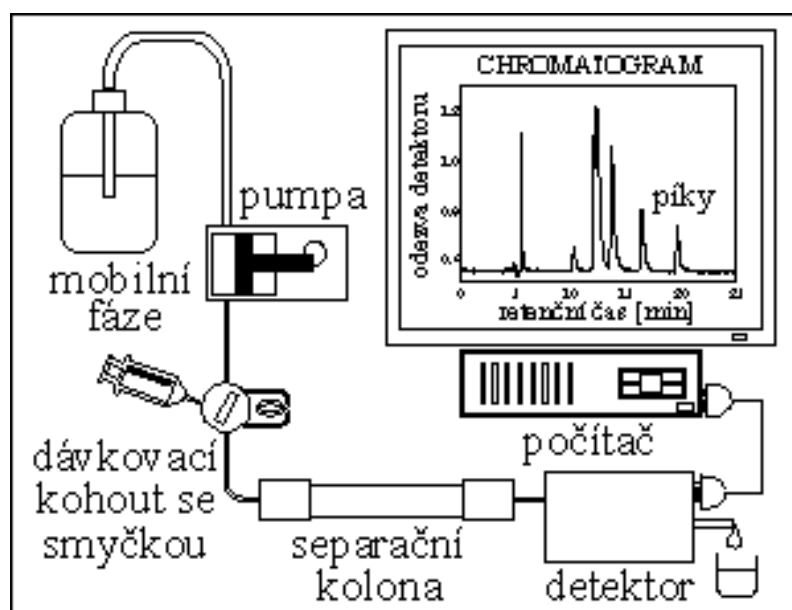
Ke stanovení antioxidantů se používají nejčastěji metody spektrofotometrické, HPLC a plynová chromatografie.

### 3.2.1. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Tato separační metoda je v analytické chemii v dnešní době jednou z dominantních. Vlastní separace probíhá v separační koloně, která obsahuje stacionární (nepohyblivou) fázi = sorbent a mobilní (pohyblivou) fázi = eluent. Tato kolona se vyznačuje vysokou hustotou a homogenitou náplně stacionární fáze a tedy i velkým hydrodynamickým odporem.<sup>17</sup> Schéma kapalinového chromatografu je na obrázku 1.

Kapalinová chromatografie je vhodná pro separaci nepolárních až iontových, tepelně nestálých a méně těkavých organických látek, neboť je možné pracovat za laboratorní teploty bez nutnosti zplyňování vzorku.<sup>13</sup>

Její hlavní výhodou je, že k dělení látek je možné využít všech vratných dvoufázových separačních mechanismů, jako je adsorpce, iontová výměna či rozdělování mezi dvě nemísitelné látky.<sup>18</sup> Aplikace HPLC metod na stanovení antioxidantů je uvedena v tabulce 2.



Obr 1. Schéma kapalinového chromatografu<sup>19</sup>

**Tab 2.** Aplikace HPLC metod na stanovení antioxidantů

<i>antioxidant</i>	<i>potravina extrakce</i>	<i>podmínky (rozpouštědlo, UV)</i>
BHA, BHT	máslo, maso <sup>20</sup> extrakce methanolem	ODS-Sil-X-I, methanol + voda (75 + 25 nebo 65 + 25), UV 280 nm
BHA, BHT, TBHQ	oleje <sup>21</sup> rozpuštění v chloroformu	mStyragel, chloroform, UV 280 nm
BHA, BHT, TBHQ, galláty	olej, potraviny <sup>20</sup> extrakce acetonitrilem, 72 % ethanolem, dimethylsulfoxidem	ODS-Sil-X-I, gradient acetonitril + voda (od 30+70 do 65+35), UV 280, 360 nm
BHA, BHT, TBHQ, galláty	sušené potraviny <sup>21</sup> extrakce hexanem a následně acetonitrilem	Supelcosil LC-18, kyselina octová + voda + methanol + acetonitril (isokratická nebo gradientová eluce), UV 280 nm
BHA, BHT, galláty	potraviny <sup>22</sup> extrakce acetonitrilem	Ultrasphere ODS, acetonitril + voda + methylterc.butylether, UV 230 nm

### 3.2.1.1. Základní části kapalinového chromatografu

- a) *Zásobník mobilní fáze* – hojně se využívá skleněné nebo nerezové nádoby. Zásobník musí být dobře uzavřen, aby kapalina v nich mohla dobře odtékat a její páry neunikaly do okolí.<sup>19</sup>
- b) *Vysokotlaké čerpadlo* – umožňuje práci s tlaky až do 60 MPa, což umožňuje poměrně velký průtok mobilní fáze (0,1 – 20 ml/min). Mezi nejčastěji používaná čerpadla patří membránová čerpadla a pístová čerpadla s malým pracovním tlakem.<sup>19</sup>
- c) *Dávkovač vzorku* – potíže způsobuje vliv velkého pracovního tlaku uvnitř kolony (až 60 MPa), který je třeba při vstříku vzorku překonat. Byla proto konstruována řada nástřikových zařízení, mezi nejefektivnější patří provádění nástřiku proti normálnímu tlaku nebo smyčkový dávkovač.<sup>18</sup>
- d) *Separční kolona* - rovné trubice z nerezové oceli o délce 10 až 25 cm a vnitřním průměru 3, 4 nebo 4,6 mm naplněné sorbentem o průměru zrn 3, 5 nebo 10  $\mu\text{m}$ , který je držen v kolně pomocí frit.<sup>19</sup>
- e) *Termostat* – udržuje teplotu kolony. Teplotní rozsah u moderního termostatu bývá od 10 °C pod okolní teplotou až do 140 °C. Zajišťuje distribuci tepla chromatografickou kolonou a současně přehřívá mobilní fázi před vstupem do kolony.<sup>19</sup>
- f) *Detektor* – nejčastěji používané jsou absorpční fotometrický detektor, fluorimetrický detektor, refraktometrický detektor, amperometrický detektor, vodivostní detektor, detektor s diodovým polem (DAD) nebo hmotnostní spektrometr jako detektor.<sup>19</sup>

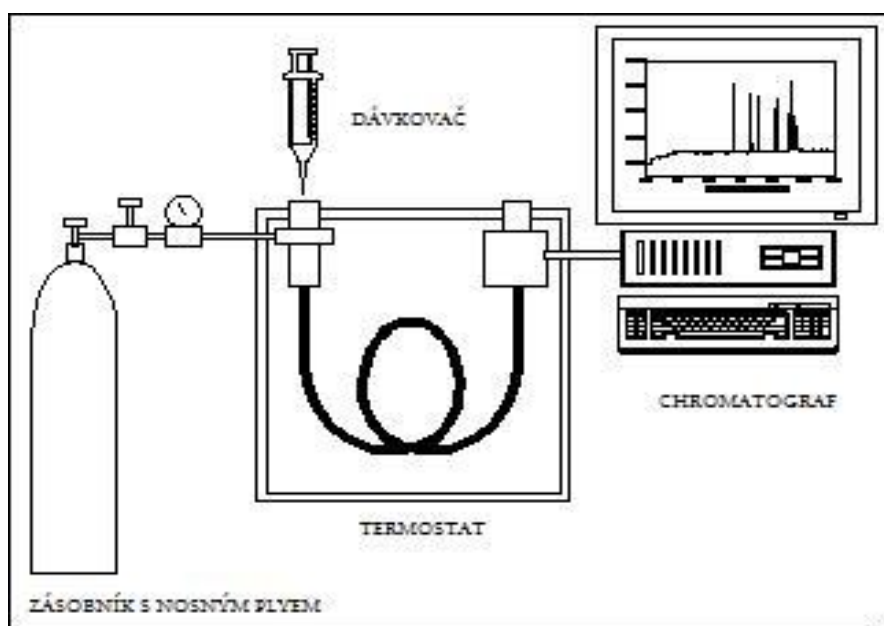
### 3.2.1.2. HPLC ve spojení s detektorem CoulArray

Vysokoučinná kapalinová chromatografie s coulometrickou detekcí je v současné době jedna z nejcitlivějších metod pro stanovení přírodních antioxidantů (hlavně fenolických látek a flavonoidů). K separaci se využívá systému obrácených fází, kdy stacionární fáze je nepolární a mobilní fází je polární rozpouštědlo. Vodivost mobilní fáze se zvyšuje přidávkem soli.<sup>23</sup>

Velkou výhodou CoulArray detektoru je jeho citlivost, selektivita, možnost práce s gradientovou elucí a využití poměru signálů z cel s různými vloženými potenciály k identifikaci látek. Při jeho použití často není třeba izolovat látky z kapalných matric, například nápojů, což je činnost velmi pracná a časově náročná.<sup>24,25</sup>

### 3.2.2. Plynová chromatografie (GC)

Tato separační analytická metoda umožňuje kvalitativní a kvantitativní analýzu plynů i kapalin, které lze před separací převést na páry. Mobilní fází je vždy vhodný nosný plyn, stacionární fází je buď zakotvená kapalná fáze nebo tuhý sorbent umístěný v koloně.<sup>19</sup> Schéma plynového chromatografu je na obrázku 2.



**Obr 2.** Schéma plynového chromatografu<sup>19</sup>

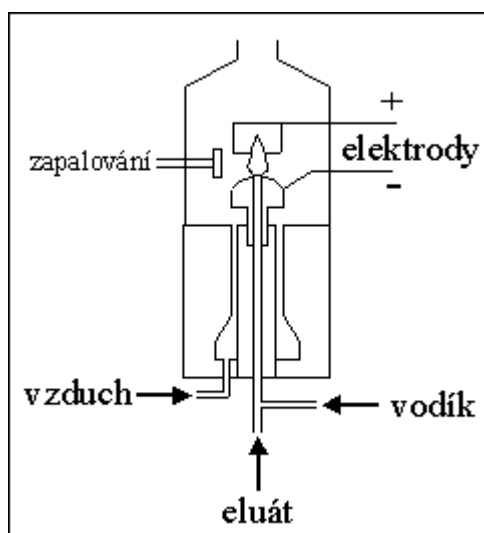
### 3.2.2.1. Základní části plynového chromatografu

- a) *Zásobník s nosným plynem* – obvykle tlakové láhve s plynem, který transportuje jednotlivé složky vzorku kolonou. Nejčastěji se používají plyny, které jsou inertní k náplni kolony i k analyzovanému vzorku (např. vodík, dusík, helium) <sup>17</sup>
- b) *Zařízení na dávkování vzorku* – dávkování se provádí do nástřikové hlavy opatřené septem, která je vyhřívána na zvolenou teplotu a proplachována nosným plynem. Plynný vzorek se dávkuje injekční stříkačkou o objemu 0,001 až 0,1 ml, kapalně 0,1 až 1  $\mu$ l a tuhý vzorek se nejprve rozpustí ve vhodném rozpouštědle. Dávkování se provádí pomocí děliče toku (*split injection*), které se používá u kapilárních kolon (na kolonu se přivádí jen část nastřikovaného vzorku). Nebo se dávkuje bez děliče toku (*splitless injection*). Zde se využívá zakoncentrování vzorku v kapalině tvořící film v hlavě kolony. Zvýšením teploty se pak složky vzorku odpaří a převedou na kolonu. <sup>19</sup>
- c) *Chromatografická kolona* – zde dochází k separaci látek. Kolony se vyrábí buď kovové nebo skleněné o průměru cca 0,1 – 0,5 mm a dosahují délky cca 25 – 100 m. Rozdělují se na náplňové nebo kapilární. <sup>19</sup>
- d) *Termostat* - jednou z kritických veličin v plynové chromatografii je teplota, na ní závisí přesnost a reprodukovatelnost měřených údajů. Je nutno udržovat zvolený konstantní teplotní režim nástřiku, kolony, detektoru a regulátoru tlaku a průtoku. <sup>19</sup>
- e) *Detektor* – neboli čidlo, které reaguje na přítomnost separovaných látek. Umisťuje se na výstupu z kolony v termostátovém prostoru. Ideální detektor pro všechny typy dělených látek, vysoce citlivý pro nízké koncentrace, avšak málo citlivý na změnu teploty v praxi neexistuje. K nejběžnějším detektorů patří: <sup>19</sup>
- plamenový ionizační detektor, FID - selektivní, destruktivní
  - detektor elektronového záchytu, ECD - selektivní, nedestruktivní
  - tepelně vodivostní detektor, TCD – univerzální, nedestruktivní
  - hmotnostně spektrometrický detektor, MS – univerzální, velmi citlivý
  - elektrochemické detektory – selektivní, velmi citlivý



### 3.2.2.2. GC s plamenovým ionizačním detektorem (FID)

Pracuje na principu ionizace chromatografované látky v mikroplameni směsi vodíku a vzduchu za daných podmínek. Spalováním vznikají vodivé částice, které se vedou mezi elektrody, kde jsou příčinou vzniku ionizačního proudu. Jednou elektrodou je přímo tryska (katoda) a anodou je sběrná elektroda nad plamenem.<sup>17</sup> Schéma plamenového ionizačního detektoru je na obrázku 3.



Obr 3. Schéma FID<sup>19</sup>

Jednou z možných aplikací metody GC-FID je analýza antioxidantů v tuku. Nejprve se antioxidanty oddělí od tuku rozpuštěného v chloroformu pomocí gelové permeační chromatografie (GPC) na koloně naplněné gelem Bio Beads S-X3 v acetonitrilu při laboratorní teplotě. Vlastní stanovení antioxidantů se provede na plynovém chromatografu vybaveném plamenovým ionizačním detektorem (FID).<sup>26</sup>

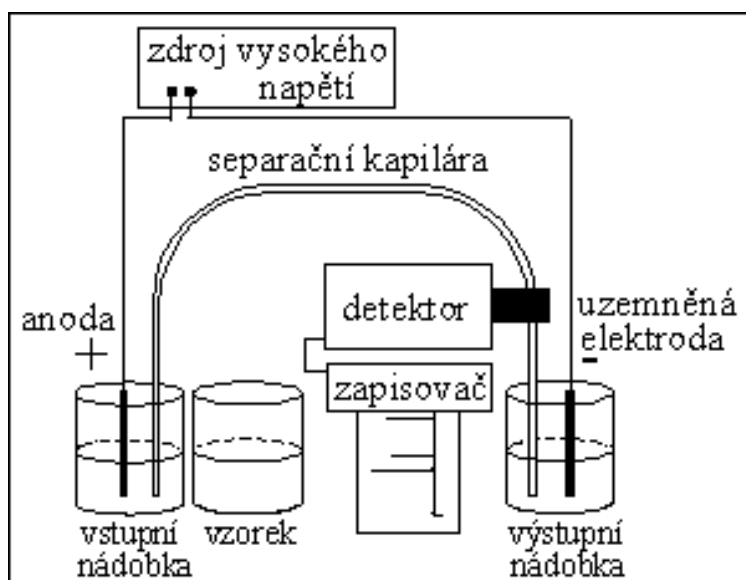
### 3.2.3. MEKC – micelární elektrokinetická chromatografie

Metoda MEKC (Micellar Electrokinetic Chromatography) umožňuje mimo jiné elektromigrační separaci neionogenních sloučenin. Použitím povrchově aktivní látky v elektrolytu (např. dodecyl sulfát sodný (SDS), žlučové kyseliny, neionogenní Triton X-100) vznikají koloidní shluky (micely) na povrchu polární a uvnitř nepolární. Metoda umožňuje separovat ionty s nízkou pohyblivostí.<sup>13</sup>

Jednou z možných aplikací metody MEKC je analýza antioxidantů ve víně. Ve vzorku vína byly stanovovány flavonoidy (katechin, naringenin, apigenin, myricetin, kvercetin a kaempferol) pomocí metody MEKC s UV detekcí. Vzorek byl nejprve extrahován diethyletherem a octanem ethylnatým. Vysušený extrakt byl poté rozpuštěn v roztoku propan-1-olu a vody (1:1). Separace byla provedena při pH = 9 po dobu 16 minut. Pracovní elektrolyt byl složen z 40 mmol.l<sup>-1</sup> boritanového pufru, 40 mmol.l<sup>-1</sup> dodecylsulfátu sodného a 20 % propan-1-olu. Informace získané touto metou se využívají k určení zemědělského původu zpracovaných vín.<sup>27</sup>

### 3.2.4. Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je vysoce účinná separační metoda. Výhody, jako jsou malá spotřeba vzorku, krátká doba analýzy či velká separační účinnost, z ní učinily jednu z nejprogresivnějších analytických metod. Nabité částice se v průběhu analýzy od sebe dělí účinkem elektrického pole podle různých rychlostí elektromigrace. Separace je ovlivněna mnoha faktory (druhem základního elektrolytu, jeho pH a koncentrací, separačním napětím, teplotou atd.).<sup>28</sup> Schéma kapilární zónové elektroforézy je na obrázku 4.



**Obr 4.** Schéma CZE <sup>19</sup>

Jednou z možných aplikací metody CZE je analýza antioxidantů v kakau. Kofink a kol. studovali flavonoidy (hlavně katechiny) v kakau a čokoládě chirální kapilární elektroforézou. Separace bylo dosaženo použitím  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$  boritanového pufru o  $\text{pH} = 8,5$  s  $12 \text{ mmol.l}^{-1}$  (2-hydroxypropyl)- $\alpha$ -cyklodextrinu. Bylo zjištěno, že kakao obsahovalo flavonoidy o středně vysoké koncentraci. <sup>29</sup>

### 3.2.5. Spektrofotometrie

Jde o optickou metodu stanovení látek absorbujících elektromagnetické záření (především z oblasti ultrafialové a viditelné, někdy z oblasti infračervené). Množství absorbovaného záření o určité vlnové délce závisí na charakteru a množství absorbující látky - vzorku. Měření se provádí při konstantní vlnové délce, která odpovídá maximu absorpce stanovovanou látkou. Pokud se neměří jen při jedné vlnové délce, ale hodnotí se určitý úsek spektra, jde o spektrofotometrii. Nejvíce využívaný vztah ve spektrofotometrii je Lambertův-Beerův zákon (viz vzorec 2), kde je absorbance přímo úměrná koncentraci absorbující látky.<sup>18</sup>

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (2)$$

A ... absorbance

l ... délka kyvety [cm]

c ... koncentrace [mol.dm<sup>-3</sup>]

$\varepsilon$  ... molární absorpční koeficient [dm<sup>3</sup>.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>]

## 4. Antioxidační aktivita

Antioxidační aktivita je definována jako schopnost sloučeniny (směsi látek) inhibovat oxidační degradaci různých sloučenin (např. zabraňovat peroxidaci lipidů). Pro vzájemné porovnávání antioxidačních účinků různých směsí byl v souvislosti s analýzou potravinových vzorků zaveden pojem celková antioxidační aktivita TAA (total antioxidant activity), která kvalifikuje kapacitu vzorku biologického materiálu eliminovat radikály.<sup>30</sup>

Rovněž byl prokázán vztah mezi antioxidační aktivitou látek přijímaných v potravě či v nápojích a prevencí některých onemocnění, např. kardiovaskulárních chorob, neurologických poruch nebo procesů stárnutí.<sup>31</sup>

Antioxidační aktivitu látek lze měřit metodami chemickými a fyzikálně-chemickými. Chemické metody mohou být založeny na použití činidel poskytujících s volnými radikály barevné produkty, jejichž vzniku brání ve vzorku obsažené antioxidanty. Intenzita zbarvení se většinou měří spektrofotometricky. Naproti tomu fyzikálně-chemické metody nesledují bezprostředně chemickou reakci nebo změny obsahů jednotlivých látek. Zabývají se změnou fyzikálních vlastností, které tyto procesy doprovází.<sup>31</sup>

### 4.1. Chemické metody

#### 4.1.1. ABTS metoda

ABTS metoda, někdy též označována jako TEAC metoda (Trolox equivalent antioxidant capacity), patří mezi základní metody pro stanovení antioxidační aktivity. Principem ABTS testu je sledování zhášení radikálového kationu  $ABTS^{\bullet+}$  vznikajícího oxidací ABTS [2,2.-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonátu)], kde aktivačním činidlem je AAHP [2,2.-azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid],  $H_2O_2$  v přítomnosti peroxidasy,  $K_4[Fe(CN)_6]$  či  $K_2S_2O_8$ .  $ABTS^{\bullet+}$  má silnou absorbanci ve viditelné oblasti 600–750 nm (roztok je zelený), antioxidační aktivitu lze stanovit spektrofotometricky. TEAC potom vyjadřuje počet radikálových kationů  $ABTS^{\bullet+}$  inaktivovaných jednou

molekulou antioxidantu. Metoda je závislá na čase, množství vzorku a koncentraci ABTS<sup>•+</sup>. Je vhodná pro měření hydrofilních i lipofilních antioxidantů.<sup>30</sup>

Při vlastním experimentálním měření se užívají dva postupy. V prvním se antioxidant přidává do reakční směsi, ve které byl již vytvořen radikál ABTS<sup>•+</sup>, při druhém postupu je antioxidant v reakční směsi přítomen při generování radikálu ABTS<sup>•+</sup>.<sup>31</sup>

#### 4.1.2. DPPH metoda

DPPH test je založen na schopnosti stabilního volného radikálu 2,2-difenyl-1-pikryl-hydrazylu reagovat s donory vodíku.<sup>36</sup> DPPH vykazuje silnou absorpci v UV a VIS spektru. Při vlnové délce 517 nm se sleduje úbytek absorbance, přičemž dochází k odbarvování fialového roztoku DPPH radikálu vlivem antioxidačních látek obsažených ve vzorku. Měření se provádí po uplynutí dané doby spektrofotometricky. Antioxidační aktivita se pak vyjádří jako procentický úbytek absorbance podle vzorce (3) nebo pomocí kalibrační řady je přepočtena na ekvivalentní množství Troloxu.<sup>32</sup>

$$I(\%) = \frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}} \cdot 100 \quad (3)$$

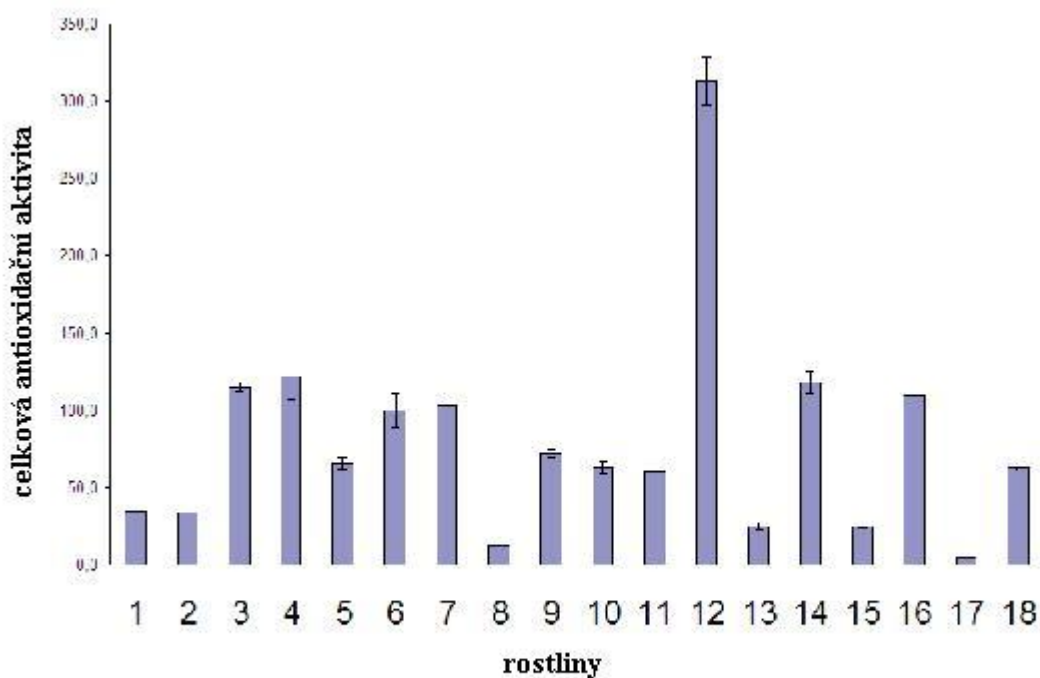
I ..... inhibice DPPH

A<sub>blank</sub> ..... absorbance slepého pokusu

A<sub>sample</sub> ..... absorbance vzorku

Porovnání přírodních antioxidantů na základě jejich celkové antioxidační aktivity. Mezi bohaté zdroje přírodních antioxidantů patří i léčivé rostliny. Pro 18 z nich byla jejich antioxidační aktivita stanovena metodou zhášení radikálu DPPH na přístroji Oxipres ve vodných a ethanolových extraktech za laboratorní teploty. Zjištěné celkové antioxidační aktivity jsou uvedeny v grafu 1.

**Graf 1.** Celková antioxidační aktivita v mg askorbové kyseliny na 1 g sušené rostliny



1-heřmánek (květ), 2-borůvka (plod), 3-ostružina (plod), 4-jahoda (list), 5-hluchavka (květ), 6-meduňka (nať), 7-maliník (list), 8-čekanka (kořen, nať), 9-máta (nať), 10-lípa (květ), 11-černý bez (květ), 12-zelený čaj, 13-jeřáb (červený plod), 14-dobromysl (nať), 15-rakytník (plod), 16-mateřídouška (nať), 17-fenykl (plod), 18-šípek (plod)

Významnou antioxidační aktivitu (stanovenou jak ve vodném, tak v ethanolovém extraktu) vykazovaly list jahodníku lesního, list maliníku a list ostružiníku, dále pak nať meduňky, nať mateřídoušky, nať máty peprné, nať dobromysli a květ hluchavky spolu s květem lípy a květem černého bezu. I když tyto rostliny měly nižší antioxidační aktivitu než zelený čaj, mohou být považovány za dobré zdroje antioxidantů vhodné nejen pro přímou konzumaci, ale také pro obohacování potravin.<sup>33</sup>

#### 4.1.3. ORAC metoda

ORAC metoda (oxygen radical absorbance capacity) narozdíl od předcházejících metod, které byly založeny na eliminaci syntetických radikálů, generuje kyslíkové radikály a hodnotí schopnost testované látky zpomalit nebo zastavit radikálovou reakci. Detekce je založena na sledování úbytku fluorescence  $\beta$ -fykoerytrinu ( $\beta$ -PE) po ataku radikály. Pro generaci hydroxylových radikálů se používá  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cu}^{2+}$  a pro peroxalové radikály AAPH [2,2.-azobis(isobutyrimidamid)-dihydrochlorid]. Vzhledem k tomu, že tyto radikály patří k nejreaktivnějším, patří test ORAC k důležitým parametrům charakterizujícím antioxidanty.<sup>34</sup>

#### 4.1.4. FRAP metoda

Tato metoda je založena na principu redoxní reakce, kde se využívá schopnost antioxidantů ve vzorku redukovat železité komplexy [např.  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin)], které jsou téměř bezbarvé a po redukcí na  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ vytváří barevné produkty, které se měří při vlnové délce 593 nm po určené době. Výsledek se poté vyjádří pomocí kalibrační křivky na ekvivalentní množství Troloxu. Metoda je nevhodná pro polyfenolické látky, které reagují s komplexem pomalu, a pro měření vzorků s velmi nízkou hodnotou pH. Naproti tomu je vhodná pro měření ve vodném prostředí.<sup>31</sup>

#### 4.1.5. Metoda s Folin-Ciocalteovým činidlem

Metoda se uplatňuje především k celkovému stanovení fenolických látek. Je založena na reakci s činidlem dle Folin-Ciocalteua (kyselý roztok fosforečnanu molybdenového a wolframového – žluté zbarvení). V přítomnosti činidla dochází v alkalickém prostředí k rychlé oxidaci fenolických látek za vzniku modře zbarveného molybdeno-wolframového komplexu. Výsledky jsou udávány jako ekvivalent kyseliny gallové.<sup>35</sup>



## 4.2. Fyzikálně-chemické metody

### 4.2.1. Elektronová spinová rezonance

Principem je schopnost určit přítomnost iontů, které obsahují nepárové elektrony. To je vhodné pro stanovení volných kyslíkových radikálů, popř. jejich komplexů. Jako činidla se nejčastěji používají *N-terc-butyl- $\alpha$ -fenylnitron* a 2,2-dimethyl-3,4--dihydro-2*H*-pyrrol-1-oxid (DMPO). Byl prokázán fakt, že k tvorbě hydroxylového radikálu nedochází ihned po započetí testu, ale až po určitém časovém posunu. Tento čas pak může být využit jako indikátor endogenní antioxidační aktivity vzorku.<sup>36</sup>

### 4.2.2. Stanovení redox potenciálu

Toto stanovení se uplatňuje především v pivovarském průmyslu. Nejprve se stanovovalo s pomocí kolorimetrické detekce, postupem času se výzkum soustředil výhradně na elektrochemické stanovení rH (redox potenciál vztažený ke standardní vodíkové elektrodě). Byly určeny tři skupiny látek, které zásadně ovlivňují hodnotu redox potenciálu, a to rozpuštěný kyslík (hodnota rH je lineárně závislá na jeho koncentraci), těžké kovy a jejich komplexy (zejména železo a měď) a látky povahy reduktonů.

Bylo rovněž prokázáno, že měřené potenciály vyjadřují pouze okamžitý oxidačně-redukční vliv zmiňovaných látek ve vzorku, proto hodnoty nemohou být použity pro kvantifikaci obecných antioxidačních vlastností vzorku, neboť na něm se podílejí i další, elektrochemicky neaktivní látky. Výzkum se proto pouze omezil na sledování obsahu rozpuštěného kyslíku.<sup>36</sup>

### 4.2.3. Chemiluminiscence

Chemiluminiscence, jinak též chemické světlo vzniká přímou přeměnou chemické energie na světelnou. Uvolněná chemická energie převádí atomy nebo molekuly do energeticky bohatšího, tzv. excitovaného stavu, které takto získanou energii uvolňují ve formě světelných kvant (fotonů). Tato metoda se především používá pro stanovení intenzity oxidace lipidů s použitím luminiscenčních činidel isoluminol a pyrazin-3-on.<sup>36</sup>

## 5. ZÁVĚR

Cílem této práce byla charakteristika antioxidantů, jejich rozdělení na přírodní a syntetické, dále jejich mechanismus působení a příznivý vliv na zdravý člověka. Antioxidanty omezují aktivitu kyslíkových radikálů, tím omezují proces oxidace v organismu nebo směsích, kde se vyskytují. Z tohoto důvodu se přidávají do potravin, které by byly jinak oxidací nadměrně poškozovány. Mezi nejhlavnější antioxidanty patří vitaminy C a vitamin E,  $\beta$  - karoten, flavonoidy nebo také celá řada minerálů (např. selen, mangan, zinek).

Analýzu antioxidantů předchází nejprve jejich izolace, která se provádí hlavně extrakčními technikami. Pro samotné stanovení je v dnešní době nejvíce využívána vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Dále se používá plynová chromatografie, často ve spojení s plamenovým ionizačním detektorem, micelární elektrokinetická chromatografie, kapilární zónová elektroforéza nebo také často využívaná spektrofotometrie.

Důležitou vlastností antioxidantů je jejich antioxidační aktivita, která má dominující úlohu mezi příznivými biologickými účinky potravin na zdraví člověka. Mezi nejčastěji používané metody stanovení antioxidační aktivity patří ABTS, DPPH, ORAC, FRAP. Tyto metody se řadí k metodám chemickým. Mezi metody fyzikálně-chemické patří elektronová spinová rezonance, stanovení redox potenciálu a chemiluminiscence.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY :

1. Velišek J.: *Chemie potravin 3*. OSSIS, Tábor (1999)
2. Davídek J., Hajšlová J., Pokorný J.: *Chemie potravin*. SNTL, Praha (1991)
3. Fořt P.: *Zdraví a potravní doplňky*, Euromedia Group, Praha (2005)
4. Schmidt S., Pokorný J., Sekretár S.: *Chem. listy* 100, 723 (2006)
5. Lachman J., Hamoun K., Orsák M.: *Chem. listy* 99, 474 (2005)
6. Jordán V., Hemzalová M.: *Antioxidanty zázračné zbraně*. JOTA, Brno (2001)
7. Pospíšil J.: *Antioxidanty*. Academia, Praha (1968)
8. Palace V. P., Khaper N., Qin Q., Singal P. K.: *Free Rad. Biology Med.* 26, 746 (1990)
9. Justesen U., Knuthsen P., Leth T.: *Cancer Lett.* 114, 167 (1997)
10. Vinson J. A.: *U.S. per capita polyphenol consumption from common fruits, vegetables & beverages*. Am. Chem. Soc. Annual Meeting, Orlando (1996)
11. Jang J., Song K. B.: *J. Food Sci.* 69, C648 (2004)
12. Holst B., Williamson G.: *Biotechnik.* 19, 1 (2008)
13. Klouda P.: *Moderní analytické metody 2*, nakladatelství Klouda Pavel, Ostrava (2003)
14. Ventura K.: *Příprava vzorku ve stopové analýze organických látek*. Univerzita Pardubice, Pardubice (1995)
15. Opekar F. a kolektiv: *Základní analytická chemie*, nakladatelství Karolinum, Praha (2002)
16. Halot D.: *Chim. Anal.* 53, 776 (1991)
17. Renger F., Kalous J.: *Analytická chemie I*, Univerzita Pardubice, Pardubice (1991)
18. Volka K.: *Analytická chemie II*, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha (1995)
19. Štulík K., Ševčík J., Pacáková V., Jelínek I., Coufal P., Bosáková Z.: *Analytické separační metody*, nakladatelství Karolinum, Praha (2005), dotisk 1. vydání
20. Pujol Forn M., López Sabater M.C.: *Circ. Farm.* 42, 3 (1984)
21. Irache J.M., Díaz-García J.M., Vega F.A.: *Pharm. Acta Helv.* 68, 135 (1993)
22. Galensa R., Z.Lebensm.: *Unter.-Forsch.* 178, 475 (1984)
23. Škeříková V., Grynová L., Jandera P.: *Chem. listy* 343 (2004)
24. Achilli G., Cellierino G. P., Gamache P.: *J. Chromatogr.* 632, 111 (1993)

25. Gamache P., Ryan E., Acworth I. N.: *J. Chromatogr.* 635, 143 (1993)
26. Holadová K., Poustka J.: *Laboratoř z chemické nezávadnosti potravin*, VŠCHT Praha (2005)
27. Sun Y., Fang N., Chen D.D.Y., Donor K.K.: *Food Chem.* 106, 435 (2008)
28. Župan J., Gasteiger J.: *Anal. Chim. Acta* 248, 1 (1991)
29. Kofink M., Papagiannopoulos M., Galensa R.: *Molecules* 12, 1274 (2007)
30. Šulc M., Lachman J., Hamouz K., Orsák M., Dvořák P., Horáčková V.: *Chem. listy* 101, 591 (2007)
31. Fidler M., Kolářová L.: *Chem. listy* 103, 232 (2009)
32. Tepe B., Sokmen M., Akpulat H.A., Yumrutas O., Sokmen A.: *Food Chem.* 98, 9 (2006)
33. Buřičová L., Réblová Z.: *Chem. listy* 101, 425 (2007)
34. Paulová H., Bochoráková H., Táborská E.: *Chem. listy* 98, 174 (2004)
35. Gulluce M., Sahin F., Sokmen M., Ozer H., Daferera D., Sokmen A., Polissiou M., Adiguzel A., Ozkan H.: *Food Chem.* 103, 1449 (2007)
36. Karolín P., Dostálek P., Hofta P.: *Chem. listy* 100, 184 (2006)

## ÚDAJE PRO KNIHOVNICKOU DATABÁZI

Název práce	METODY ANALÝZY ANTIOXIDANTŮ V POTRAVINÁCH
Autor práce	Andrea Čížková
Obor	Hodnocení a analýza potravin
Rok obhajoby	2009
Vedoucí práce	Ing. Martin Adam, Ph.D.
Anotace	Tato práce se zabývá popisem antioxidantů, jejich výskytem v potravinách, rozdělením, mechanismem a vlivem na zdraví člověka. Dále se zabývá popisem nejčastěji používaných metod pro jejich analýzu. Na závěr je popsána antioxidační aktivita a metody jejího stanovení.
Klíčová slova	antioxidanty, metody analýza, antioxidační aktivita
Anotace v angličtině	This work deals with the description of antioxidants, their occurrence in food, classification, mechanism and effect on the human health. The description of the most widely used methods of their analysis is presented as well. Finally, antioxidant activity and methods of its measurement are described.
Klíčová slova v angličtině	antioxidants, methods of analysis, antioxidant activity