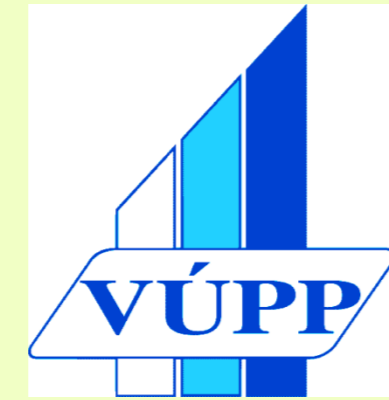


ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA ZELENINOVÝCH A OVOCNÝCH ŠŤÁV – POROVNÁNÍ METOD STANOVENÍ



Fiedlerová V., Holasová M., Gabrovská D.
Výzkumný ústav potravinářský Praha v.v.i.



Cíl

Hodnocení antioxidační aktivity jednoduchých zeleninových a ovocných šťáv metodami DPPH, FRAP a PCL a porovnání výsledků jednotlivých metod.

Úvod

Složky potravin s antioxidačními vlastnostmi, přijímané potravou, se podílí na eliminaci oxidačního stresu, který je dáván do přímé souvislosti s řadou onemocnění. Mezi typické antioxidanty ovoce a zeleniny patří flavonoidy a fenolické kyseliny, tokoferoly, karotenoidy, fosfatidy, polyfunkční organické kyseliny, kyselina askorbová, některé stopové prvky a enzymy.

Pro stanovení antioxidační aktivity (AOA) existuje řada analytických metod. Většina používaných metod je založena na eliminaci radikálů – metoda DPPH, TEAC, ORAC, PCL nebo na hodnocení redoxních vlastností - FRAP, voltametrie, HPLC-ECD. Při hodnocení AOA je posuzováno působení látek různé chemické povahy s odlišnými reakčními mechanismy a používají se metody založené na různém principu. K charakterizaci potravinového materiálu z hlediska antioxidačních vlastností je proto vhodné použít více metod.

Materiál a metody

Suroviny

mrkev, červená řepa, celer, červené zelí - dovoz z Beskydu Fryčovice
bílé zelí, okurky, rajčata, hrušky - zakoupeno v obchodní síti Interspar
brokolice - z pokusného pozemku ČZU, Praha 7

jablka - zakoupeno v Sady Tucharaz, s.r.o., odrůda Golden Delicious

Použité přístroje

vylišování a příprava šťáv - lis CHAMPION (Mipam bio s.r.o., ČR)

měření AOA - PHOTOCHEM (Analytik Jena AG), spektrofotometr Helios α (Thermo Spectronic, UK)

Postup přípravy šťáv

omytí, oloupání, případně nakrájení, lisování, skladování v sáčcích PA/PE při -40°C do vlastního stanovení AOA

Příprava extraktů

vodný extrakt: odstředěná šťáva přímo nebo 1-3 g doplněné na 10 ml vodou, třepání 10 min, odstředění (7000 rpm, 10 min, 15°C), případně zředění
metanolový extrakt: 1-3g šťávy doplněné na 10 ml MeOH, třepání 10 min, odstředění (7000 rpm, 10 min, 15°C), případně filtrace (0,45 μ m) a zředění MeOH

Metoda DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) - zhášení radikálového kationtu DPPH⁺.

4 ml roztoku DPPH a 100 ml vodného nebo metanolového extraktu; reakční doba 2 h při laboratorní teplotě; měření poklesu absorbance při 515 nm; $A_{kontrola} - A_{vzorek}$ byl vyjádřen v μ g kyseliny askorbové (AK) nebo μ g Troloxu /1 g šťávy, které mají stejnou AOA jako antioxidanty přítomné ve vzorku; kalibrace pro 3,2 – 16 μ g AK/100 ml H₂O ($R^2 = 0,998$) a pro 5 – 25 μ g Troloxu/100 ml MeOH ($R^2 = 0,999$); opakovatelnost RSD = 3,64% pro n = 9

Metoda FRAP (ferric reducing antioxidant power) - hodnocení redoxních vlastností - redukce komplexu Fe³⁺ s 2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazinem.

4 ml činidla FRAP a 100 ml vodného nebo metanolového extraktu; reakční doba 30 min při 37°C; měření nárůstu absorbance při 593 nm; $A_{vzorek} - A_{kontrola}$ byl vyjádřen v μ g AK nebo μ g Troloxu /1 g šťávy, které mají stejnou AOA jako antioxidanty přítomné ve vzorku; kalibrace pro 1,6 – 12,8 μ g AK/100 ml H₂O ($R^2 = 1,00$) a pro 5 – 25 μ g Troloxu/100 ml MeOH ($R^2 = 1,00$); opakovatelnost RSD = 4,05% pro n = 10

Metoda PCL (photochemiluminescence method)

kombinace rychlé fotochemické generace superoxidových radikálů s citlivou luminometrickou detekcí, měří luminiscenci zbylého luminolu po reakci radikálů s antioxidanty vzorku. Umožňuje měření AOA hydrofilních (ACW) a lipofilních složek (ACL), metoda používá komerční kity.

ACW - vodný extrakt; kalibrace pro roztoky 0,5-4,0 nmol AK/10 μ l

ACL - metanolový extrakt; kalibrace pro roztoky 0,5-4,0 nmol Troloxu/10 μ l
opakovatelnost RSD = 9,8 % pro n = 6

Výsledky

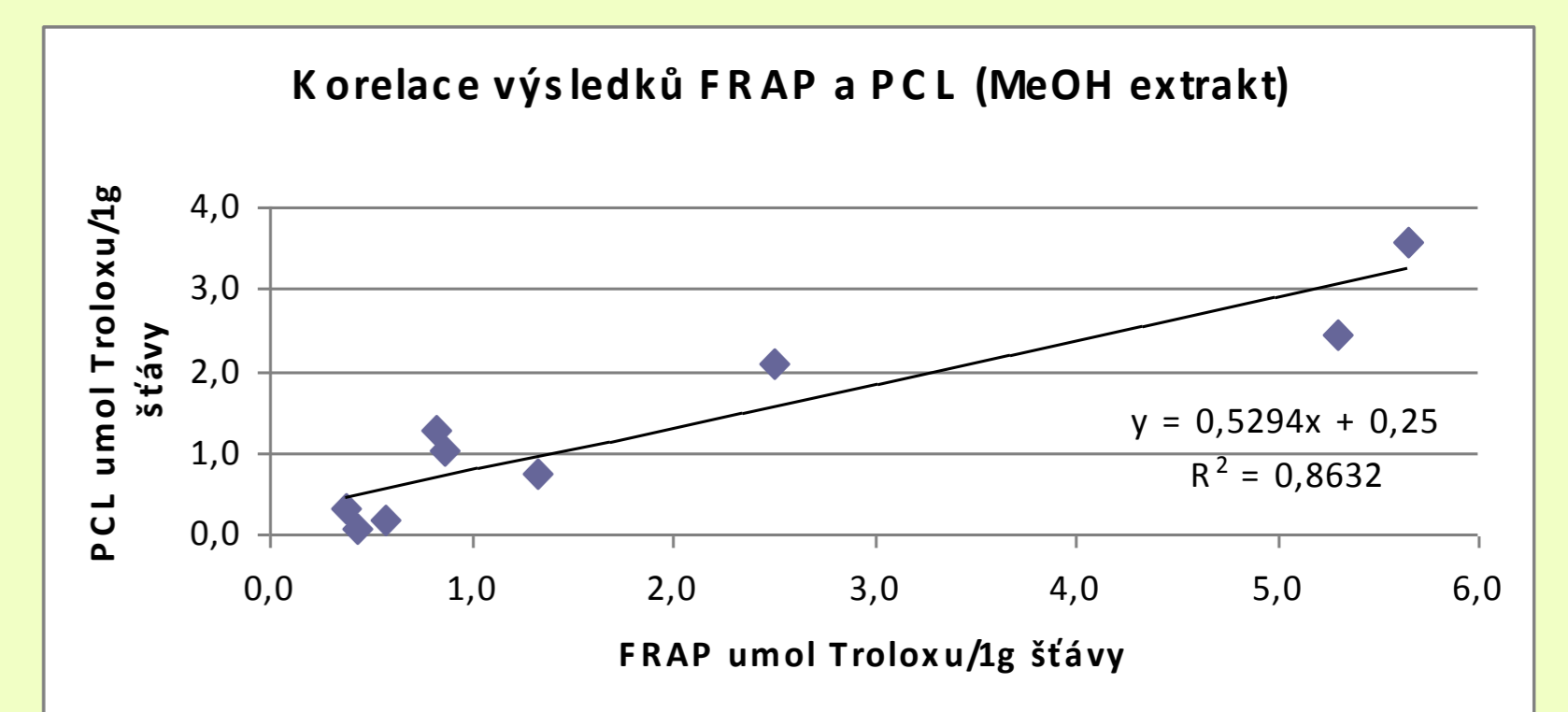
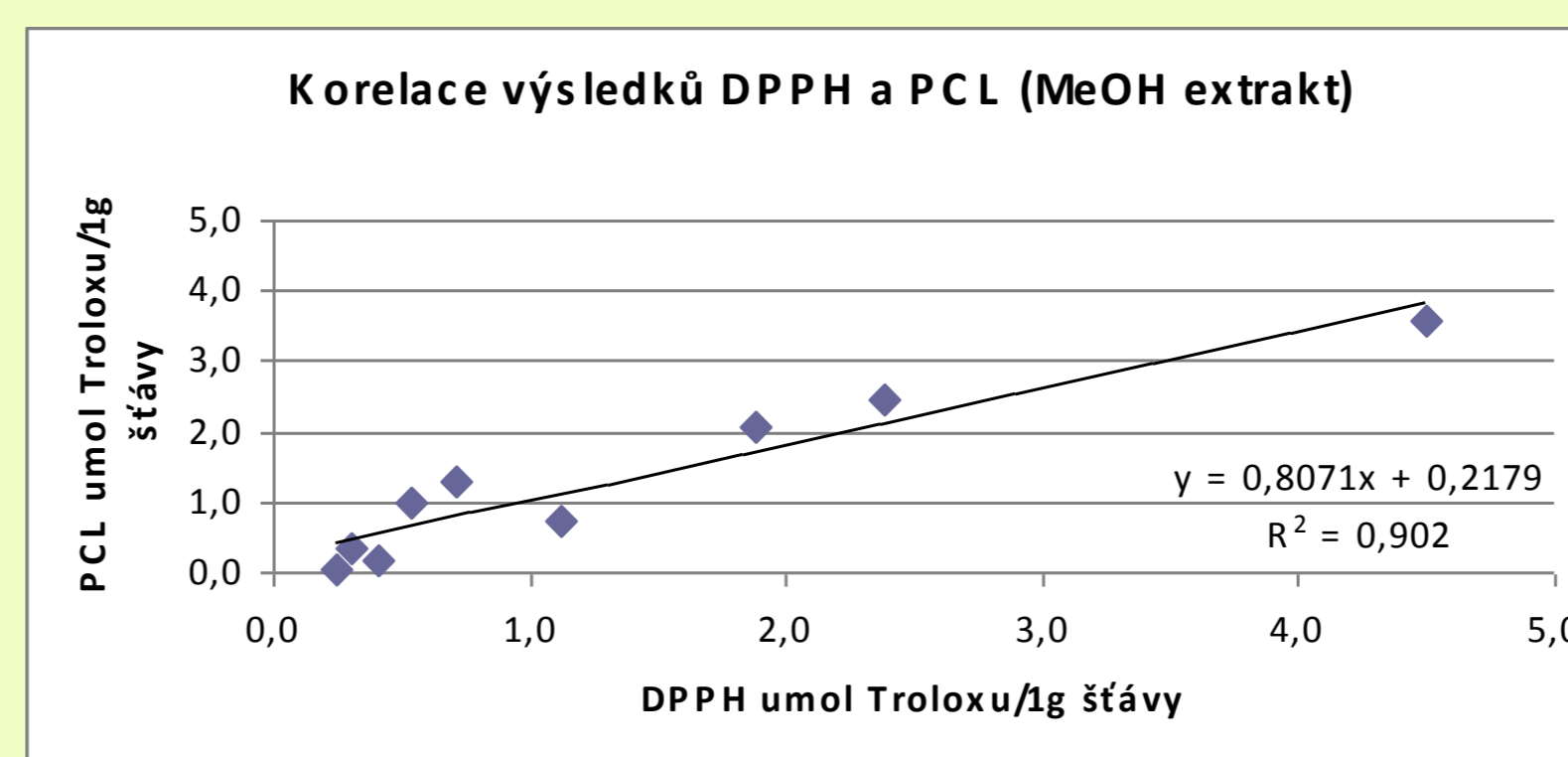
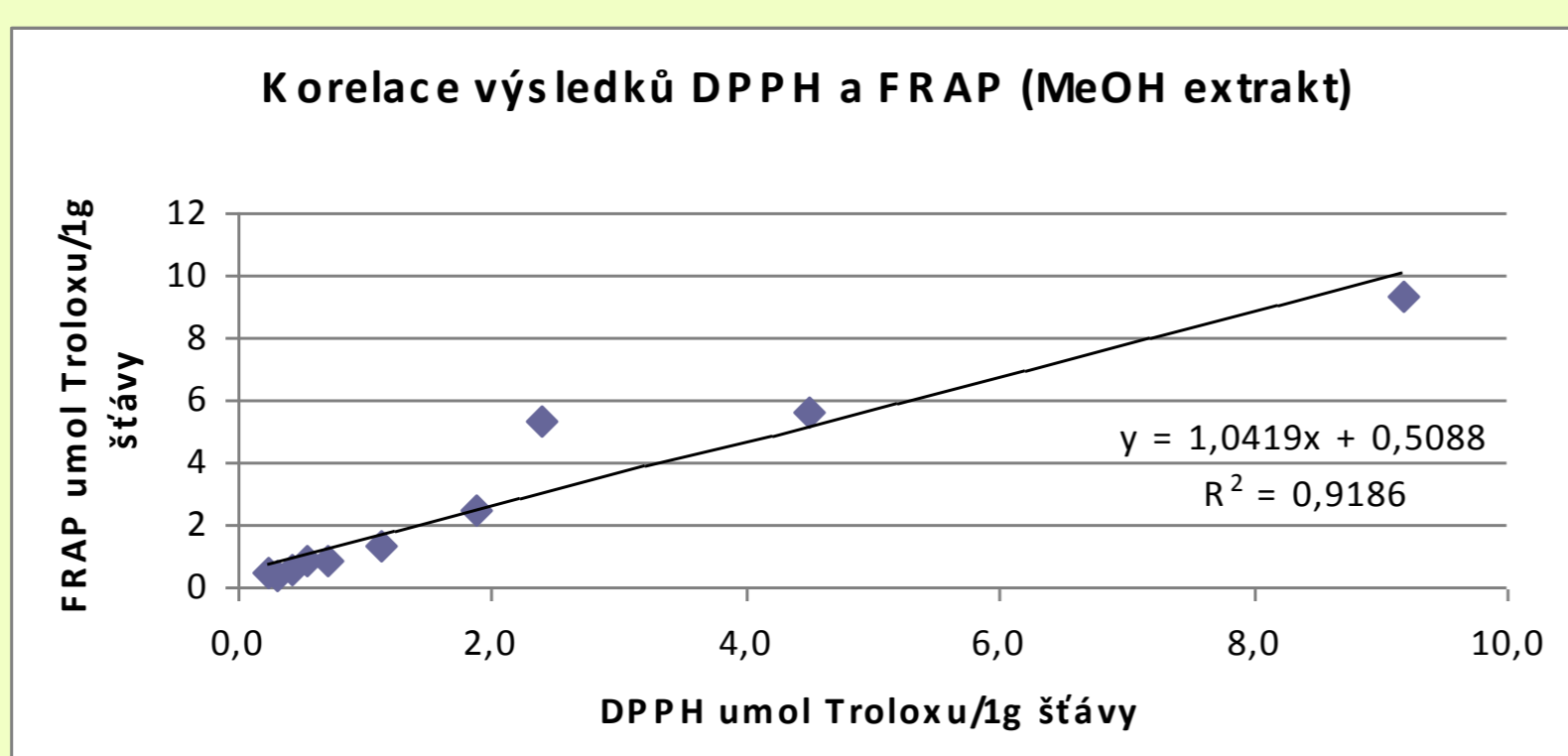
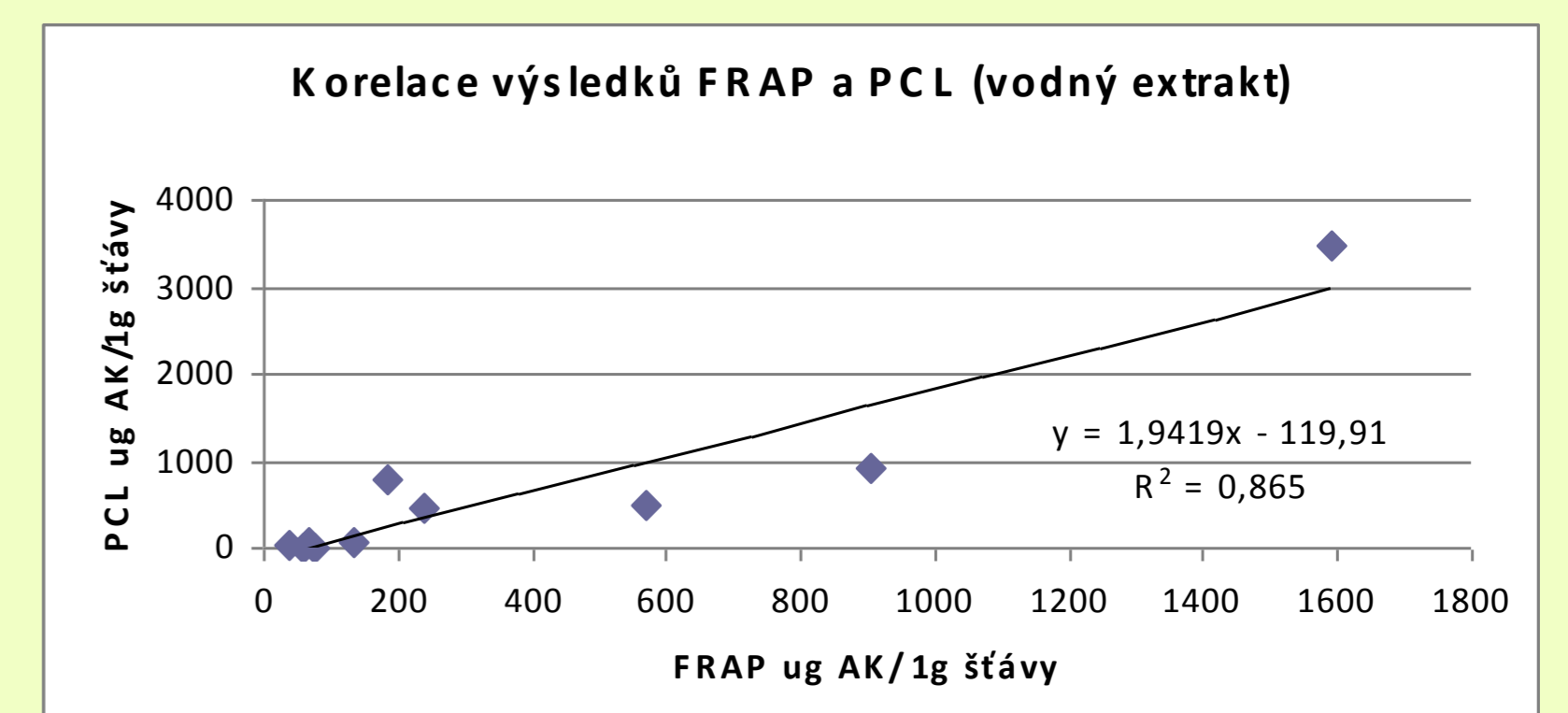
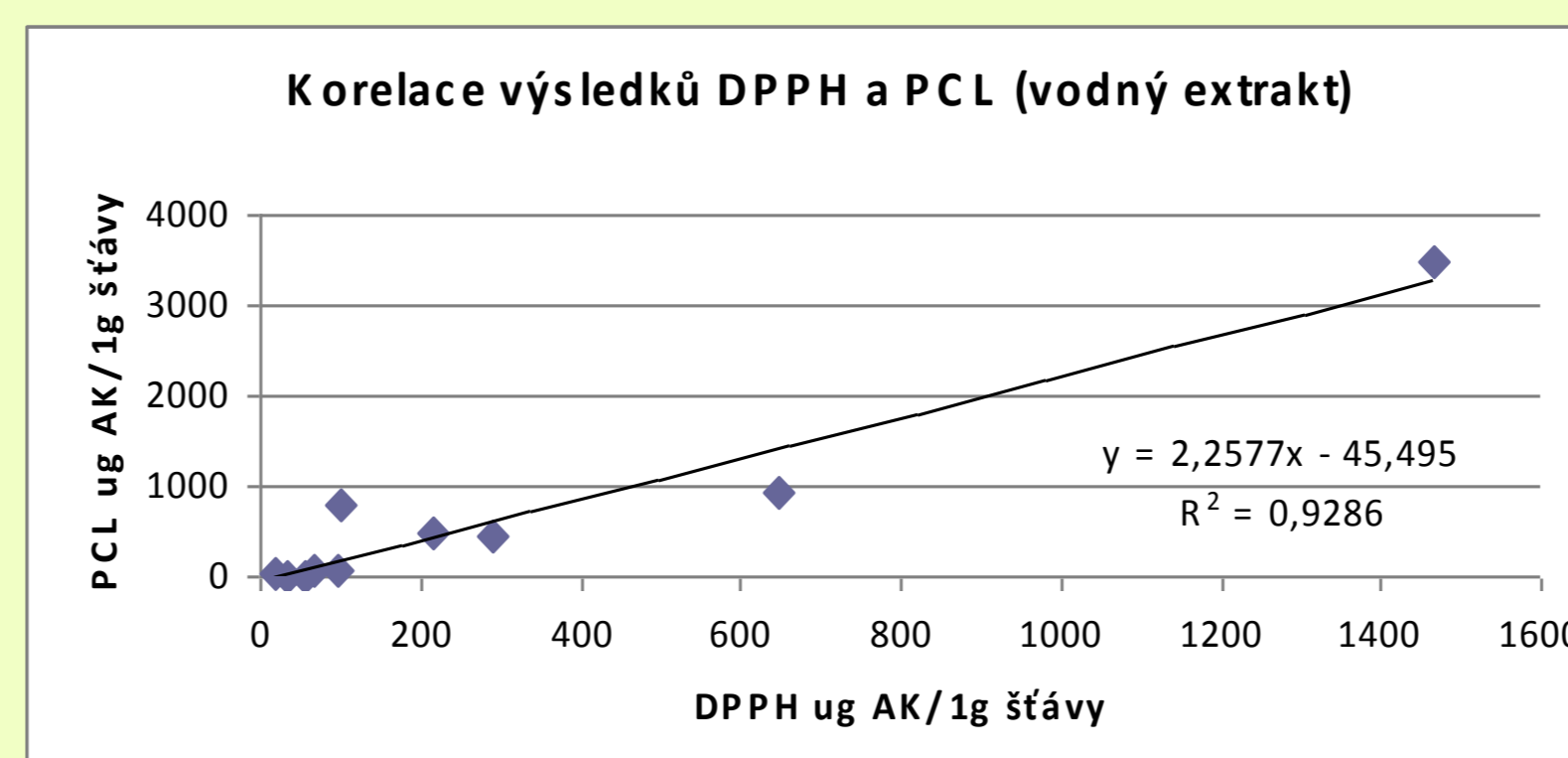
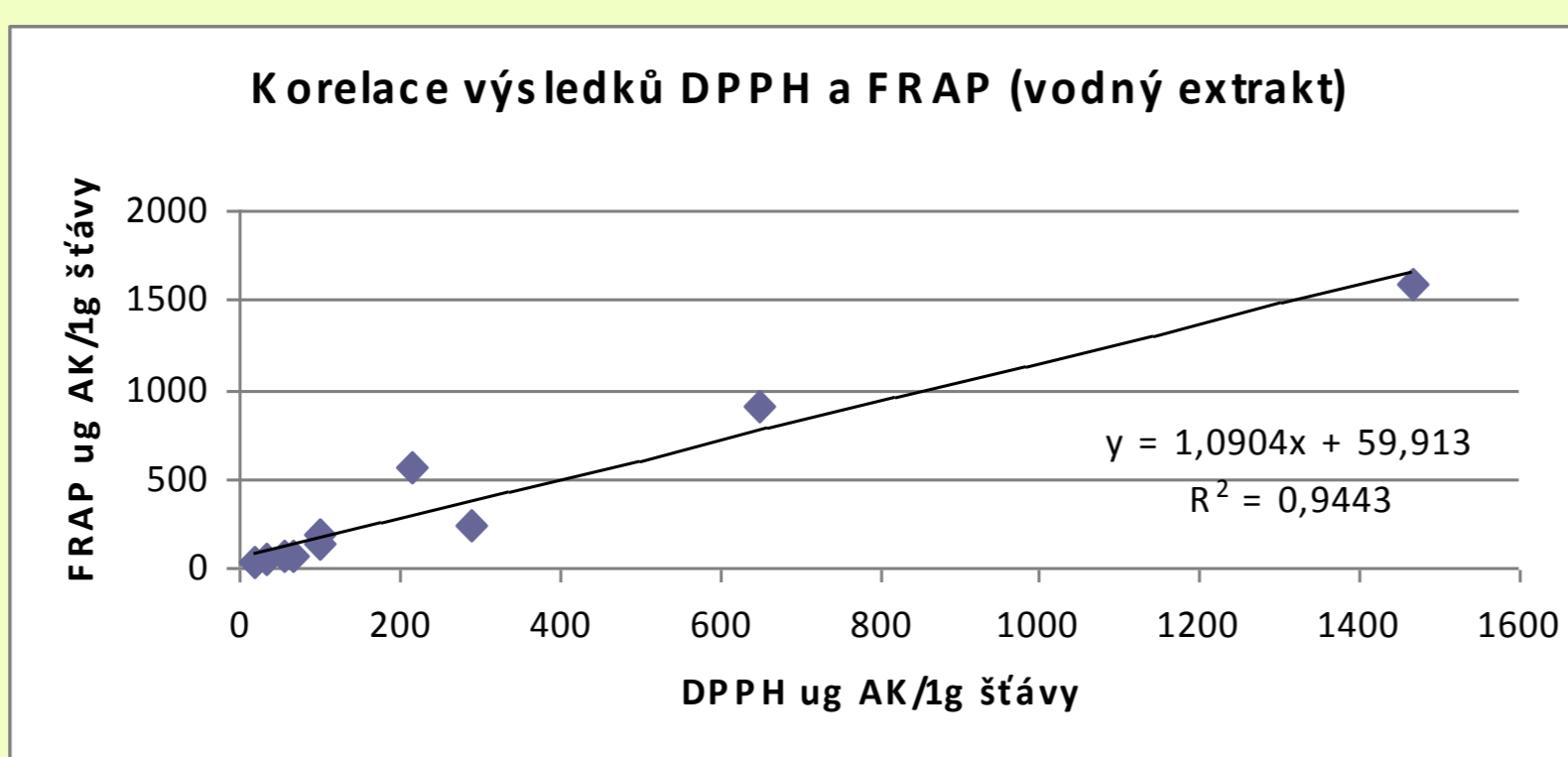
AOA vodných extraktů (μ g AK/1g šťávy)

vzorek	DPPH	FRAP	PCL
mrkev	32,3	58,3	10,6
bílé zelí	100,6	185,8	789,1
jablko	68,3	67,8	61,7
hruška	98,6	131,9	68,7
okurka	17,5	36,1	37,0
červená řepa	649,0	903,0	917,6
celer	56,4	76,3	7,1
brokolice	214,3	570	479,1
rajče	288,6	240	445,6
červené zelí	1465,5	1591,5	3481,7

AOA metanolových extraktů (μ mol Troloxu/1 g šťávy)

vzorek	DPPH	FRAP	PCL
mrkev	0,30	0,38	0,33
bílé zelí	1,12	1,33	0,73
jablko	0,71	0,83	1,28
hruška	0,54	0,87	1,01
okurka	0,24	0,43	0,06
červená řepa	4,50	5,65	3,57
celer	0,41	0,57	0,18
brokolice	2,38	5,30	2,46
rajče	1,88	2,51	2,09
červené zelí	9,18	9,37	54,07

Porovnání dvojic metod



Vyhodnocení korelace metod stanovení AOA, vodné extrakty (hodnoty R)

	DPPH	FRAP	PCL
FRAP	0,971	1	
PCL	0,964	0,930	1

R_{krit} pro 8 hodnot je 0,632; $\alpha=0,05$

Vyhodnocení korelace metod stanovení AOA, metanolové extrakty (hodnoty R)

	DPPH	FRAP	PCL
FRAP	0,958*	1	
PCL	0,950**	0,929**	1

* $n=10$; ** $n=9$ (bez vzorku červené zelí)

R_{krit} pro 8 hodnot je 0,632; $\alpha=0,05$; R_{krit} pro 7 hodnot je 0,666; $\alpha=0,05$

Závěr

- Metodami DPPH, FRAP a PCL byla stanovena AOA ve vodných a metanolových extraktech 10 vzorků jednoduchých zeleninových a ovocných šťáv. Šťávy z mrkve, jablka, hrušky, okurky a celeru vykazují AOA ve vodných extraktech řádově 10 μ g AK/1g, v metanolových extraktech <1 μ mol Troloxu/1g. Šťávy z bílého zelí, červené řepy, brokolice a rajčete vykazují AOA ve vodných extraktech řádově 10² μ g AK/1g, v metanolových extraktech <6 μ mol Troloxu/1g. Nejvyšší hodnoty AOA byly nalezeny pro šťávu z červeného zelí - ve vodných extraktech řádově 10³ μ g AK/1g, v metanolových extraktech byly metodami DPPH a FRAP nalezeny hodnoty 9 μ mol Troloxu/1g, metoda PCL vykazuje hodnotu 54 μ mol Troloxu/1g šťávy.
- U vodných extraktů jsou hodnoty AOA pro všechny tři metody v těsné korelaci.
- U metanolových extraktů je těsná korelace mezi hodnotami AOA získanými metodami DPPH a FRAP, korelace hodnot všech tří metod byla prokázána jen po vyloučení hodnoty AOA šťávy z červeného zelí.
- Vzhledem k tomu, že korelace výsledků metod DPPH, FRAP a PCL nebyla prokázána pro celý soubor zeleninových a ovocných šťáv, je k charakterizaci této matrice z hlediska antioxidačních vlastností vhodné použít více metod.