

VÝBĚR A ZHODNOCENÍ VHODNÝCH METOD PRO STANOVENÍ ANTI-OXIDAČNÍ AKTIVITY FIALOVÝCH A ČERVENÝCH ODRŮD BRAMBOR

MILOSLAV ŠULC^a, JAROMÍR LACHMAN^a,
KAREL HAMOUZ^b, MATYÁŠ ORSÁK^a, PETR
DVOŘÁK^b a VENDULKA HORÁČKOVÁ^c

^a Katedra chemie, ^b Katedra rostlinné výroby, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýčká 129, 165 21 Praha 6,

^c Výzkumný ústav bramborářský, Dobrovského 2366, 580 01 Havlíčkův Brod
lachman@af.czu.cz

Došlo 22.3.07, přijato 11.6.07.

Klíčová slova: brambory, fialové, červené, žlutomasé odrůdy, antioxidační aktivita, ABTS, FRAP, DPPH

Úvod

Bramborové hlízy s červeně nebo fialově zbarvenou dužninou vykazují významnou antioxidační aktivitu stejně jako jiné druhy zbarvené zeleniny (červené zelí, červeně zbarvené odrůdy cibule aj.)¹. Jsou to především anthokyaniny a karotenoidy, které zejména přispívají k antioxidační aktivitě barevných odrůd brambor². Bylo zjištěno, že u odrůd s červeně nebo fialově zbarvenou dužninou hlíz přispívá askorbová kyselina pouze ze 13 % k hydrofilní antioxidační aktivitě, zatímco převážná část připadá na acylované anthokyanové glykosidy^{3–5}.

Barevné odrůdy brambor jsou velkou novinkou pro spotřebitele nejen v ČR, ale i v zahraničí. Zákazníkům jsou ještě prakticky neznámé. Cílem této práce bylo zjistit antioxidační aktivitu zbarvených odrůd brambor vypěstovaných v České republice pro šlechtitelské účely a porovnat je se vzorkem standardně používaných konzumních (žlutomasých) odrůd brambor. Pro dosažení relevantních údajů byly vybrány tři nejběžnější metody pro měření antioxidační aktivity, které jsme se snažili na reálném vzorku též mezi sebou porovnat. Ke srovnání byly vybrány metody ABTS, FRAP a DPPH.

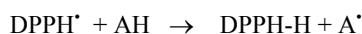
Antioxidační aktivita je definována jako schopnost sloučeniny (směsi látek) inhibovat oxidační degradaci různých sloučenin (např. zabraňovat peroxidaci lipidů). Měly by se rozlišovat dva pojmy – antioxidační kapacita a reaktivita. Antioxidační kapacita poskytuje informaci o délce trvání antioxidačního účinku, reaktivita charakterizuje počáteční dynamiku průběhu antioxidačního procesu při určité koncentraci antioxidantu. V oblasti chemické analýzy a biologického hodnocení jakosti rostlinných

produktů byly v posledních letech vypracovány četné metody⁶, které umožňují stanovit tzv. celkovou antioxidační aktivitu vzorku (TAC tj. total antioxidant capacity). Jsou principiálně značně navzájem odlišné a postupně se vyvíjejí jejich různé modifikace.

Principem ABTS testu⁷ je sledování inaktivace radikálového kationu ABTS^{•+} vznikajícího oxidací 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonátu), kde aktivačním činidlem je AAHP, tj. 2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid, H₂O₂ v přítomnosti peroxidasy, hexakynoželeznatanu tetradraselného K₄[Fe(CN)₆] či peroxidisíranu draselného K₂S₂O₈. ABTS^{•+} má silnou absorpční ve viditelné oblasti 600–750 nm (roztok je zelený) a antioxidační aktivita může být snadno stanovena spektrofotometricky. TEAC vyjadřuje počet radikálových kationtů ABTS^{•+} inaktivovaných jednou molekulou antioxidantu. Stanovení TEAC je závislé na čase inkubace jakož i na poměru množství vzorku a koncentrace ABTS^{•+}. Jedním z omezení této metody je její malá selektivita při reakci s donory vodíkových atomů. ABTS test je vhodný pro měření hydrofilních i lipofilních antioxidantů. Radikálový kationt ABTS^{•+} může být v DMPD testu nahrazen levnějším stabilním radikálovým kationtem DMPD^{•+} (*N,N*-dimethyl-*p*-fenyldiamindihydrochlorid), který však vyžaduje pro svoji stabilitu nízké pracovní teploty⁸.

Metoda FRAP – (Ferric reducing antioxidant power) je založena na redukci železitých komplexů⁹, např. TPTZ (2,4,6-tripyridyl-*s*-triazinu) s hexakynoželezitanem draselným K₃[Fe(CN)₆] nebo chloridem železitým FeCl₃, které jsou téměř bezbarvé (popř. slabě nahnědlé) a po redukci se tvoří modře zbarvený železnatý komplex (λ=593 nm).

DPPH test je založen na schopnosti stabilního volného radikálu 1,1'-difeny-2-pikrylhydrazylu reagovat s donory vodíku¹⁰. DPPH vykazuje silnou absorpci v UV-VIS spektru. DPPH test je při reakci s donory H selektivnější než ABTS^{•+}. Při tomto testu se po redukci antioxidantem (AH) nebo radikálem (R[•]) roztok odbarví:



Experimentální část

Chemikálie

ABTS (CAS: 30931-67-0), DPPH (CAS: 1898-66-4), TPTZ (CAS: 3682-35-7) Sigma, askorbová kyselina, chlorid železitý, oxid manganičitý (Lachner), methanol GR (Penta).

Rostlinný materiál

Vzorky pocházely z hlíz *Solanum tuberosum* (L.), které byly vypěstovány v ČR (sadbové brambory) v roce 2006 na stanovištích Suchdol, Přerov n/Labem, Valečov, Lípa a Havlíčkův Brod (Banka genetických zdrojů bram-

boru, VÚB Havlíčkův Brod, s.r.o.) a vzorek odrůdy Blaue St. Galler pocházel ze Švýcarska. Pro měření byly použity pouze mechanicky a fyziologicky nepoškozené brambory o hmotnosti 20–80 g (barevně zbarvené odrůdy mívají menší hlízy než standardní žlutomasé konzumní odrůdy). Na poli byl odebrán polní vzorek (procházel hlavním náhodným vzorkováním) o velikosti asi 20 kg, ze kterého byl v laboratoři pořízen laboratorní průměrný vzorek, který byl použit k analýzám. Laboratorní vzorek se sestával ze čtvrtek náhodně vybraných hlíz o hmotnosti asi 1 kg. Všechny operace při přípravě laboratorního vzorku byly prováděny rychle a takovým způsobem, aby bylo zamezeno degradaci vzorku s velmi rychlým zmražením.

Studie je zaměřena na barevné odrůdy brambor (27 vzorků) a pro srovnání byly vybrány čtyři vzorky typických konzumních žlutomasých odrůd.

Příprava vzorků

Polní vzorky brambor byly uchovány v boxu při teplotě +6 °C ve tmě a následně během jednoho měsíce zpracovány. Všechny vzorky byly analyzovány paralelně jak lyofilizované, tak i v čerstvém stavu. Hlízy brambor byly zmrazeny a lyofilizovány na lyofilizátoru Lyovac GT 2 (Leybold-Heraeus, Německo). Vzorky (1 g lyofilizátu) byly pro analýzu 15–25× extrahovány methanolem (4 ml, s 0,01 % HCl) v centrifugační kyvetě s usnadněním extrakce v ultrazvukové lázni (5 min), následně centrifugovány (5 min) a supernatanty byly spojeny. Po ukončení extrakce byl supernatant odpařen do sucha ve vakuu (45 °C) a před stanovením antioxidantní aktivity rozpuštěn v 50% methanolu na ultrazvukové vodní lázni a centrifugován (5 min, 14 000 ot.). Efektivita a ukončení extrakce byla kontrolována reakcí fenolových látek s Folin-Ciocalteuovým činidlem¹.

Čerstvé vzorky (asi 150 g) byly rozmixovány a šťáva vytlačena na lisu a následně centrifugována (18 000 ot., 4 °C, 15 min v kyvetách s N₂ atmosférou) a takto připravený vzorek byl neprodleně použit k analýze. Od přípravy vzorku do analýzy nesmělo uplynout více jak 30 minut.

Analytické metody

Spektrofotometrické stanovení antioxidantní aktivity

Po přípravě roztoků jednotlivých radikálů (viz níže) byla antioxidantní aktivita stanovena dle následujícího jednotného postupu: Ve 2 ml roztoku radikálu v kyvetě (10 mm) byla změřena absorbance v čase t_0 . Poté bylo přidáno 5 μ l vzorku, roztok byl promíchán a ponechán reagovat 20 min a následně byla změřena absorbance v čase t_{20} na spektrofotometru He λ ios Gamma (Unicam, GB). Antioxidantní aktivita byla vypočtena jako úbytek/přírůstek absorbance obecně podle vzorce (zde pro úbytek absorbance): $\text{antioxidantní aktivita (\%)} = 100 - [(A_{t_{20}}/A_{t_0}) \times 100]$ a takto vyjádřená antioxidantní aktivita byla převedena podle kalibrační křivky standardu (askorbová kyselina, $R^2 > 0,9945$) zhotovené pro danou absorbanci v t_0 , aby bylo možné jednotlivé metody a výsledky porovnat, pokud nevycházely

stále ze stejných počátečních podmínek. Každý vzorek byl měřen v pěti paralelních stanoveních.

Stanovení antioxidantní aktivity DPPH testem

Pro měření byla použita metodika Pareja a spol.¹¹. Byl připraven metanolický roztok DPPH o absorbanci (t_0) $0,200 \pm 0,01$. Absorbance byla měřena při vlnové délce $\lambda = 515$ nm.

Stanovení antioxidantní aktivity ABTS testem

54,9 mg ABTS bylo rozpuštěno ve 20 ml fosfátového pufru (pH 7,0; 5 mM) a aktivováno na kationt radikálu ABTS⁺ přidáním 1 g MnO₂ za občasného míchání a doby aktivace 30 min (cit.¹²). Následně byl roztok centrifugován (5 min, 7000 ot.), zfiltrován přes stříkačkový filtr (PTFE 0,25 μ m, \varnothing 13 mm, Teknokroma) a naředěn fosfátovým pufrům na absorbanci (t_0) $0,500 \pm 0,01$. Absorbance roztoku byla měřena při vlnové délce $\lambda = 734$ nm.

Stanovení antioxidantní aktivity FRAP testem

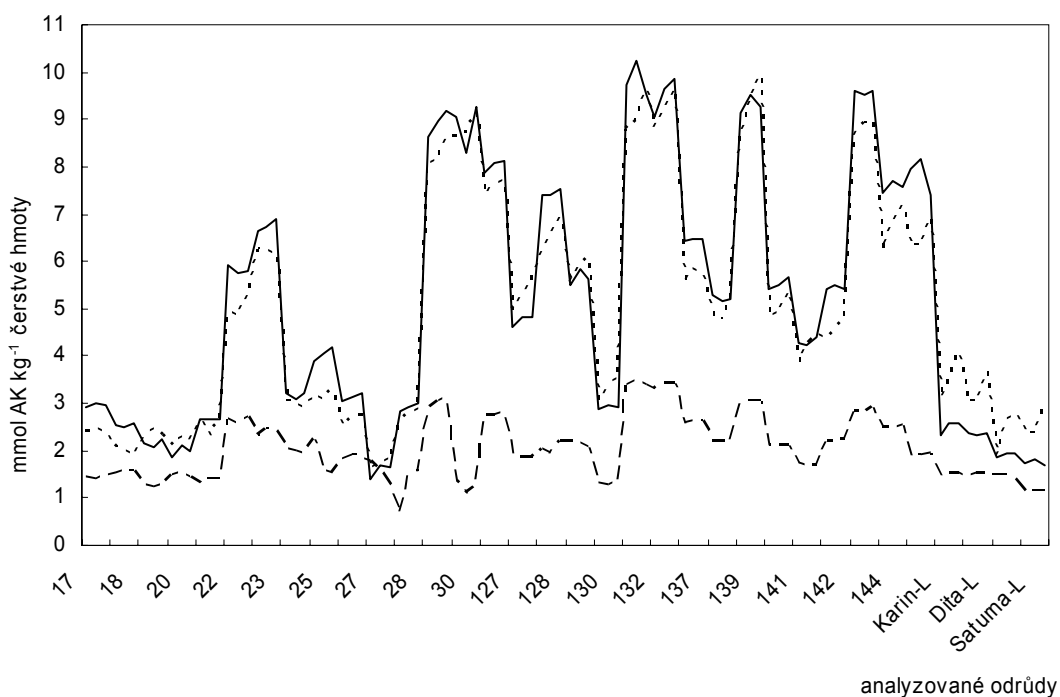
Pracovní roztok FRAP (cit.¹³) byl připraven smícháním 10 objemových dílů acetatového pufru (300 mM, pH 3,6) s 1 dílem roztoku TPTZ (10 mM, rozpuštěného ve 40 mM HCl) a s 1 dílem roztoku FeCl₃ (20 mM). Absorbance byla měřena při vlnové délce $\lambda = 593$ nm.

Statistická analýza

Všechny naměřené antioxidantní aktivity byly přepočteny a vyjádřeny v mmol askorbové kyseliny na 1 kg čerstvé hmoty brambor. Statistická analýza byla provedena za použití softwaru Statistica 7.0 (StatSoft, USA) pomocí parametrických a neparametrických testů na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Výsledky a diskuse

Vzhledem ke složení komplexu antioxidantů v daném biologickém materiálu je nutné vždy vybrat soubor vhodných metod. V olivovém oleji byly např. pro sledování antioxidantní aktivity použity metody ABAP, DPPH a stanovení antioxidantní aktivity modelovým systémem s linoleátem β -karotenu a ABTS (cit.¹⁴) a z těchto metod bylo jako nejvhodnější vybráno stanovení s linoleátem β -karotenu. U brambor byly v literatuře popsány pouze výsledky stanovení antioxidantní aktivity lyofilizovaných vodných extraktů bramborových slupek metodou DPPH, kde byla zjištěna jejich značná antioxidantní aktivita¹⁵. Antioxidantní komplex brambor je tvořen především hydrofilními antioxidanty¹⁶ (polyfenoly, anthokyany, askorbová kyselina), a proto na základě kritérií, jako je ekonomika stanovení, dostupnost reakčních činidel a laboratorní vybavení, byly pro stanovení antioxidantní aktivity v analyzovaném souboru brambor vybrány metody ABTS, DPPH a FRAP. Tyto metody byly také použity ke stanovení antioxidantní aktivity v ovoci¹⁷, jehož antioxidantní komplex se vyznačuje nízkými hodnotami pH a nízkou lipofili-



Obr. 1. Průměrné hodnoty antioxidační aktivity lyofilizátů analyzovaných vzorků brambor stanovené třemi různými metodami; na ose x jsou čísla označené analyzované vzorky barevných odrůd brambor (viz. tab. I), --- DPPH, — ABTS, FRAP

tu. Při grafickém srovnání hodnot antioxidační aktivity (obr. 1) získaném každou metodou je patrné, že ABTS a FRAP testy poskytují výrazně odlišné výsledky v porovnání s DPPH testem, který poskytuje nižší odezvu, a to jak v čerstvé šťávě z brambor, tak i po extrakci fenolových antioxidantů z lyofilizovaného materiálu (tab. I–III). Z grafu je též patrné, že výsledky poskytnuté jednotlivými testovanými metodami mají stejný trend u celého souboru analyzovaných dat. Shodnost výsledků poskytnutých jednotlivými metodami byla testována lineární regresí, kde v lyofilizovaných vzorcích byla zjištěna shoda naměřených hodnot mezi ABTS a FRAP testem $R^2=0,94$ (obr. 2). Srovnání metod u lyofilizovaných vzorků přineslo shodnost naměřených údajů jen kolem $R^2=0,61$, což naznačuje, že každá metoda bude vykazovat jinou citlivost nebo jejich vztah bude ovlivněn další (prozatím neznámou) veličinou (např. typem radikálu, reakčními podmínkami). Srovnání výsledků testovaných metod při zkoumání antioxidační aktivity šťávy brambor je méně uspokojivé. Nejlepší shodnost výsledků poskytly testy ABTS a DPPH ($R^2=0,80$), ostatní porovnání již měla $R^2 \leq 0,42$. Antioxidační aktivita u lyofilizátu měřená DPPH testem vykazovala rozmezí od 0,67 do 3,46 ($\bar{x}=1,91$) mmol AK v kg čerstvé hmoty v porovnání s čerstvou šťávou (0,34 až 7,69; $\bar{x}=1,30$), což je průměrný rozdíl asi 31 %. U lyofilizovaných vzorků nebyl prokázán žádný statisticky významný rozdíl mezi odrůdami, u vzorků šťávy brambor byly jako nejvíce se

odlišující odrůdy vyhodnoceny Vittelotte, Violette a Shetland Black. Rozdíl mezi žlutomásými a zbarvenými odrůdami činil v průměru asi 27 % ve prospěch zbarvených odrůd.

Antioxidační aktivita měřená pomocí ABTS testu vykazovala v průměru o 13 % nižší obsah v čerstvé šťávě ($\bar{x}=4,30$ mmol AK kg^{-1} čerstvé hmoty) ve srovnání s lyofilizátem ($\bar{x}=5,00$ mmol AK kg^{-1} čerstvé hmoty). Toto konstatování není ale jednoznačné, jak vyplývá z obr. 3. Je vidět, že asi třetina vzorků má vyšší antioxidační aktivitu v lyofilizátu, což je zřejmě dáno zastoupením jednotlivých antioxidantů v odrůdách, kde způsob přípravy vzorku k analýze je může degradovat. Žlutomásé odrůdy vykazaly v průměru jen asi 40% antioxidační aktivitu v porovnání s barevnými odrůdami, pokud byla antioxidační aktivita měřena v lyofilizátu (u šťávy z čerstvých brambor to bylo více, 73 %). U lyofilizovaných vzorků nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi odrůdami, u šťávy brambor bylo dosaženo stejných rozdílů mezi odrůdami jako u DPPH testu.

FRAP test poskytl nejmarkantnější rozdíly mezi žlutomásými ($\bar{x}=3,00$ mmol AK kg^{-1} čerstvé hmoty) a barevnými odrůdami ($\bar{x}=4,95$ mmol AK kg^{-1} čerstvé hmoty) u lyofilizovaných vzorků. FRAP test mimo jiné prokázal nejmenší rozdíl v hodnotách antioxidační aktivity v závislosti na testované matici vzorku (v průměru pouze 9 %). Odrůdy, které se nejvíce odlišovaly od ostatních,

Tabulka I

Průměrné hodnoty antioxidační aktivity v lyofilizátech a šťávě z čerstvých analyzovaných odrůd brambor [mmol askorbové kyseliny kg⁻¹ čerstvé hmoty]

Oblast pěstování	Odrůda	Číslo vzorku	DPPH ^{a,b}	ABTS ^{a,b}	FRAP ^{a,b}
	<i>barevná</i>				
Lípa	Valfi	78	2,76 ± 0,03 1,43 ± 0,07	8,02 ± 0,12 4,58 ± 0,09	7,58 ± 0,12 5,83 ± 0,34
Přerov nad Labem	Blue Congo	17	1,44 ± 0,04 0,96 ± 0,04	2,97 ± 0,04 3,29 ± 0,05	2,43 ± 0,01 2,65 ± 0,08
	Highland Burgundy Red	18	1,74 ± 0,04 0,89 ± 0,04	2,54 ± 0,05 3,88 ± 0,13	2,01 ± 0,09 2,63 ± 0,13
	Salad Blue	19	1,25 ± 0,03 1,18 ± 0,03	2,17 ± 0,08 3,23 ± 0,04	2,36 ± 0,09 2,37 ± 0,08
	Shetland Black	20	1,47 ± 0,05 0,77 ± 0,03	1,99 ± 0,12 2,91 ± 0,04	2,21 ± 0,09 2,41 ± 0,15
	Valfi	21	1,37 ± 0,04 1,04 ± 0,04	2,67 ± 0,01 3,36 ± 0,05	2,57 ± 0,20 2,25 ± 0,07
	Vittelotte	22	2,65 ± 0,07 6,82 ± 0,59	5,82 ± 0,08 6,89 ± 0,19	5,02 ± 0,22 6,54 ± 0,38
	Violette	23	2,40 ± 0,07 2,34 ± 0,09	6,76 ± 0,13 8,77 ± 0,24	6,23 ± 0,04 6,26 ± 0,21
	Suchdol	Blue Congo	24	1,98 ± 0,04 1,42 ± 0,09	3,16 ± 0,06 5,08 ± 0,07
Highland Burgundy Red		25	1,77 ± 0,40 1,06 ± 0,04	4,06 ± 0,14 5,67 ± 0,37	3,18 ± 1,19 4,48 ± 0,15
Salad Blue		26	1,85 ± 0,05 1,10 ± 0,04	3,13 ± 0,07 4,43 ± 0,14	2,67 ± 0,10 3,39 ± 0,08
Shetland Black		27	1,56 ± 0,26 0,76 ± 0,04	1,59 ± 0,15 3,59 ± 0,05	1,73 ± 0,09 2,69 ± 0,08
Valfi		28	1,23 ± 0,49 1,13 ± 0,04	2,91 ± 0,09 4,30 ± 0,06	2,76 ± 0,12 3,15 ± 0,12
Vittelote		29	3,00 ± 0,11 2,00 ± 0,05	8,92 ± 0,28 7,01 ± 0,24	8,30 ± 0,29 4,55 ± 0,08
Violette		30	1,24 ± 0,13 2,23 ± 0,12	8,88 ± 0,51 7,95 ± 0,19	8,84 ± 0,27 5,38 ± 0,14
Švýcarsko		Blaue St. Galler	137	2,60 ± 0,01 1,61 ± 0,07	6,45 ± 0,02 5,07 ± 0,08
	Havlíčkův Brod	Blaue Hindel Bank	138	2,20 ± 0,01 1,22 ± 0,06	5,20 ± 0,06 4,02 ± 0,08
Blaue Ludiano		139	3,03 ± 0,04 1,77 ± 0,10	9,31 ± 0,21 6,75 ± 0,49	9,34 ± 0,65 9,02 ± 0,27
Blaue Mauritius		140	2,12 ± 0,01 0,98 ± 0,03	5,53 ± 0,12 3,75 ± 0,12	5,06 ± 0,28 5,64 ± 0,24
Blaue Schweden		141	1,71 ± 0,01 1,20 ± 0,05	4,30 ± 0,10 4,16 ± 0,17	4,18 ± 0,02 6,98 ± 0,25
British Columbia Blue		142	2,21 ± 0,02 1,05 ± 0,05	5,45 ± 0,06 2,48 ± 0,08	4,58 ± 0,20 6,49 ± 0,46
Farbe Kartoffel		143	2,84 ± 0,07 1,52 ± 0,06	9,57 ± 0,05 6,98 ± 0,08	8,86 ± 0,16 9,47 ± 0,95
Hafija		144	2,51 ± 0,03 1,66 ± 0,06	7,57 ± 0,12 6,83 ± 0,13	6,76 ± 0,46 10,89 ± 0,77
Salad Red		145	1,91 ± 0,03 1,50 ± 0,06	8,04 ± 0,10 6,88 ± 0,06	6,53 ± 0,34 7,12 ± 0,67

Tabulka I
pokračování

Oblast pěstování	Odrůda	Číslo vzorku	DPPH ^{a,b}	ABTS ^{a,b}	FRAP ^{a,b}
	<i>barevná</i>				
Valečov	Blue Congo	127	1,88 ± 0,05 1,57 ± 0,07	4,75 ± 0,13 4,05 ± 0,17	5,31 ± 0,34 6,37 ± 0,23
Valečov	Highland Burgundy Red	128	2,06 ± 0,12 1,58 ± 0,12	7,44 ± 0,09 5,98 ± 0,11	6,57 ± 0,37 7,68 ± 0,34
Valečov	Salad Blue	129	2,14 ± 0,07 1,04 ± 0,04	5,65 ± 0,18 3,61 ± 0,04	5,86 ± 0,28 4,81 ± 0,19
Valečov	Shetland Black	130	1,33 ± 0,05 0,39 ± 0,00	2,91 ± 0,04 2,63 ± 0,03	3,34 ± 0,27 6,18 ± 0,51
Valečov	Violette	131	3,41 ± 0,05 2,65 ± 0,05	9,84 ± 0,38 8,33 ± 0,17	9,14 ± 0,43 11,05 ± 0,70
Valečov	Vittelotte	132	3,40 ± 0,07 2,38 ± 0,14	9,52 ± 0,42 7,49 ± 0,43	9,23 ± 0,41 10,00 ± 0,81
	<i>žlutomasá</i>				
Lípa	Karin		1,51 ± 0,05 1,79 ± 0,04	2,50 ± 0,16 2,95 ± 0,27	3,58 ± 0,48 5,32 ± 0,06
	Ditta		1,49 ± 0,05 1,83 ± 0,08	2,36 ± 0,03 3,35 ± 0,01	3,26 ± 0,36 4,75 ± 0,10
	Impala		1,45 ± 0,03 0,36 ± 0,02	1,91 ± 0,06 2,75 ± 0,01	2,45 ± 0,48 2,41 ± 0,05
	Saturna		1,14 ± 0,02 1,08 ± 0,07	1,75 ± 0,05 4,15 ± 0,03	2,58 ± 0,34 4,20 ± 0,18

^a Antioxidační aktivita v lyofilizátu brambor je uvedena v prvním řádku u každé odrůdy; ^b antioxidační aktivita v čerstvých bramborách je uvedena ve druhém řádku u každé odrůdy

Tabulka II

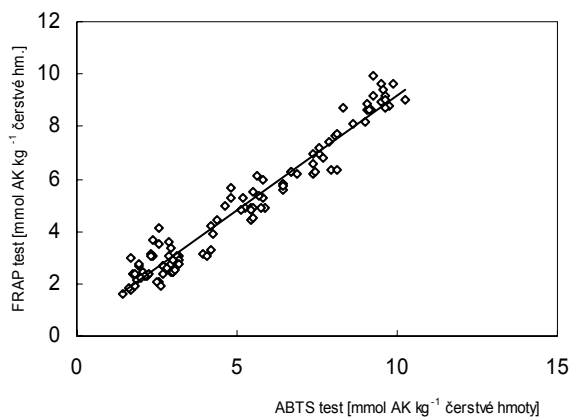
Statistické hodnoty antioxidační aktivity [mmol askorbové kyseliny kg⁻¹] v lyofilizátu barevných a žlutomasých odrůd a jednotlivých lokalit

	DPPH			ABTS			FRAP		
	medián	min.	max.	medián	min.	max.	medián	min.	max.
Všechny vzorky	1,91	0,67	3,46	5,00	1,41	10,25	4,80	1,63	9,94
Barevné ^a	2,03	0,67	3,46	5,46	1,41	10,25	4,95	1,63	9,94
Žlutomasé	1,46	1,12	1,54	2,14	1,71	2,59	3,00	1,90	4,09
Přerov	1,49	1,23	2,69	2,66	1,68	6,90	2,42	1,92	6,27
Suchdol	1,78	0,67	3,07	3,20	1,41	9,26	3,02	1,63	9,15
Lípa	2,76	2,73	2,78	8,07	7,89	8,12	7,62	7,45	7,68
Valečov	2,11	1,28	3,46	6,61	2,88	10,25	6,14	3,08	9,65
Havlíčkův Brod	2,35	1,70	3,06	6,80	4,22	9,60	6,22	3,88	9,94

^a Barevné – odrůdy s červeně nebo fialově zbarvenou dužninou

jsou: Salad Blue, Shetland Black, Valfi, Violette a Vitelotte. Nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi odrůdami, pokud byl matricí lyofilizát.

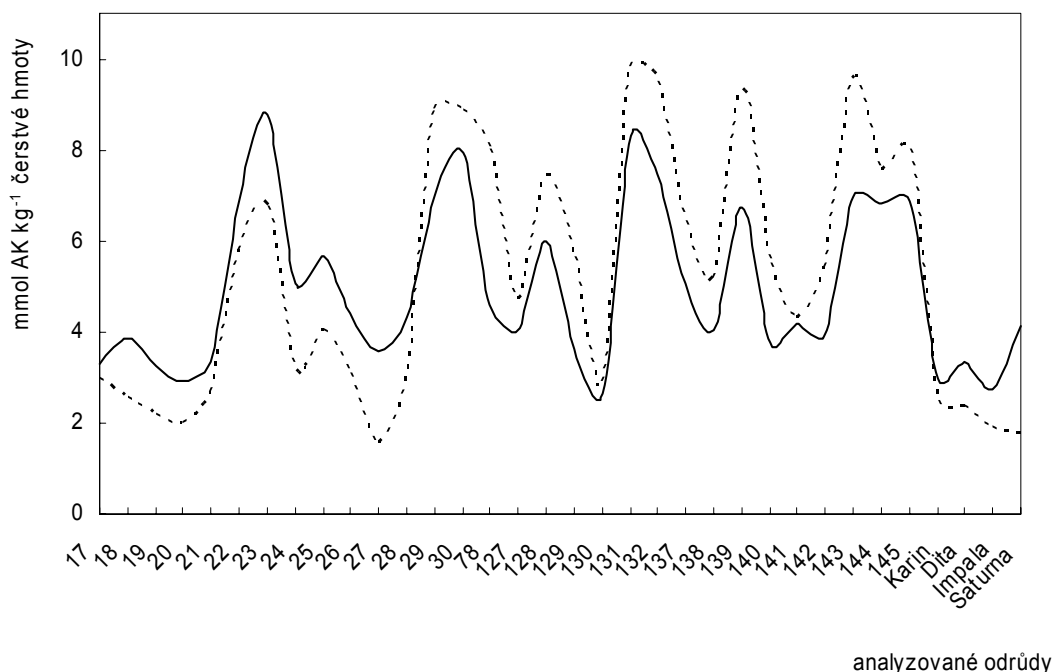
Ze získaných výsledků vyplývá, že pro sledování antioxidační aktivity má velký význam vliv matrice. Úprava vzorku lyofilizací ukázala, že je možno obdržet výsledky s vyšší reprodukovatelností, neboť dochází k inhibici polyfenoloxidás, které způsobují enzymatické hnědnutí¹⁸.



Obr. 2. Korelace mezi metodami ABTS a FRAP v lyofilizátu brambor ($R^2=0,9389$)

Nutno ale upozornit na skutečnost, že lyofilizací může docházet k inaktivaci nebo degradaci látek s antioxidačními účinky (např. askorbové kyseliny nebo antioxidačních enzymů). Manipulace s čerstvě vymačkanou šťávou z brambor se ukázala jako velmi problematická a navíc při zkoušce na stabilitu šťávy se prokázalo, že tento materiál je velmi nestabilní. Byly zaznamenány velké výkyvy (až 60 %) v antioxidační aktivitě v závislosti na čase od vymačkání šťávy, což velmi snižuje reprodukovatelnost výsledků a ukazuje, že šťáva z brambor je nestabilní matricí nevhodnou pro stanovení antioxidační aktivity. V lyofilizátu jsme zaznamenali kolísání hodnot v rozmezí 4–7 %.

Jedním z hlavních cílů této práce bylo zjistit rozdíly mezi žlutomasými a zbarvenými odrůdami, proto jsme testovali hypotézu, zda barevné odrůdy brambor budou mít vyšší antioxidační aktivitu a zda získané výsledky jsou ovlivněny matricí, ve které se antioxidační aktivita sleduje. Výsledky tohoto testování nejsou jednoznačné a závisejí na tom, v jaké matrici je antioxidační aktivita sledována. U lyofilizovaných brambor se podařilo za použití Mannova-Whitneyova U-testu prokázat, že antioxidační aktivita měřená DPPH a ABTS se statisticky významně liší mezi barevnými a žlutomasými odrůdami ($P=0,0309$ resp. $0,002$). V případě, že je antioxidační aktivita měřena v čerstvě šťávě, bylo možno prokázat rozdíl mezi barevnými a žlutomasými odrůdami pouze při použití ABTS testu ($P=0,026$). Intenzivněji zbarvené odrůdy (zejména temně



Obr. 3. Ukázka vztahu mezi hodnotami antioxidační aktivity měřených ABTS testem mezi lyofilizátem a čerstvou šťávou ($R^2=0,691$); na ose x jsou čísla označené analyzované vzorky barevných odrůd brambor (viz. tab. I), — šťáva, ···· lyofilizát

Tabulka III

Statistické hodnoty antioxidační aktivity [mmol askorbové kyseliny kg^{-1} čerstvé hmoty] ve šťávě čerstvých hlíz barevných a žlutomasých odrůd z jednotlivých lokalit

	DPPH			ABTS			FRAP		
	medián	min.	max.	medián	min.	max.	medián	min.	max.
Všechny vzorky	1,18	0,31	6,99	3,91	2,35	8,16	4,85	1,98	10,10
Barevné ^a	1,18	0,35	6,99	4,12	2,35	8,16	4,94	1,98	10,10
Žlutomasé	1,32	0,31	1,71	2,99	2,48	3,80	4,10	2,14	4,91
Přerov	0,93	0,66	6,99	3,06	2,61	8,16	2,36	1,98	6,40
Suchdol	1,02	0,65	2,21	4,63	3,20	7,40	3,58	2,36	5,06
Lípa	1,25	1,25	1,40	4,20	4,03	4,22	5,33	4,84	5,70
Valečov	1,42	0,35	2,45	4,58	2,35	7,81	6,50	4,07	10,10
Havlíčkův Brod	1,32	0,85	1,75	4,57	3,28	6,45	6,35	3,62	10,65

^a Barevné – odrůdy s červeně nebo fialově zbarvenou dužninou

fialově) vykazují vyšší antioxidační aktivitu v porovnání se žlutomasými i červenými odrůdami (kde je barvivo lokalizováno mnohdy pouze ve slupce či v úzké vrstvě pod slupkou). Potvrzuje se tak skutečnost, že především intenzivně červeně nebo fialově zbarvené brambory vykazují vysokou antioxidační aktivitu díky přítomným anthokyanům a kromě přímé konzumace mohou být pro jejich vysoký antioxidační potenciál využity i ve formě vloček¹⁹.

Většina autorů stanovuje antioxidační aktivitu v biologickém materiálu pouze jednou metodou – např. metodou DPPH (cit.¹) nebo CUPRAC (cit.¹⁰). Pozornost je věnována kinetice a různým výsledkům získaným na základě chemicky odlišných principů stanovení⁹. Každá z těchto metod má své výhody, ale má také svá omezení, např. náklady na provedení analýzy, dostupnost reakčních činidel apod.²⁰ Vzhledem k zajištění objektivnosti získaných výsledků se proto v poslední době autoři snaží aplikovat několik metod současně pro sledování antioxidační aktivity v biologických materiálech a také se snaží o srovnání použitých metodik²¹. Naše výsledky (obr. 1) získané z pěti paralelních stanovení potvrzují dostačující reprodukovatelnost všech tří použitých metod (ABTS, DPPH, FRAP) a jsou shodné se závěry Thaiponga a spol.²², kteří našli rozdíly pouze mezi metodami ABTS a ORAC, zatímco metody ABTS, DPPH a FRAP poskytly srovnatelné výsledky. Průměrné hodnoty ABTS byly 2–3× vyšší ve srovnání s hodnotami získanými metodami DPPH a FRAP.

Závěr

Ze získaných výsledků je možné konstatovat, že červeně a fialově zbarvené odrůdy brambor vykazují vyšší antioxidační aktivitu ve srovnání s bramborami žlutomasými. Toto tvrzení je ovšem ovlivněno výběrem matrice, ve

kteří byla antioxidační aktivita stanovena. Šťáva se ukázala být nevhodnou matricí. Nejlepší lineární korelace byla nalezena mezi metodami ABTS a FRAP ($R^2=0,94$) při stanovení antioxidační aktivity v lyofilizátu brambor. Lineární korelace mezi DPPH a ABTS ($R^2=0,66$) a DPPH a FRAP ($R^2=0,62$) byly podstatně nižší. Tyto výsledky potvrzují shodnost metod ABTS a FRAP a naopak jejich rozdílnost oproti DPPH metodě, která může být považována spíše za orientační test. V dalších pracích by měla být pozornost věnována především dalším alternativám zpracování matrice.

Práce je řešena v rámci Výzkumného záměru MŠMT 6046070901 a grantových projektů MZe ČR NAZV 1G46058 a MZe CR E-97/01-3160-0200MZe.

Seznam použitých zkratk

AAHP	2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid
ABTS	2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin)-6-sulfonát
AK	askorbová kyselina
CUPRAC	cupric reducing antioxidant capacity
DMPD	<i>N,N</i> -dimethyl- <i>p</i> -fenyldiamindihydrochlorid
FRAP	ferric reducing antioxidant power
ORAC	oxygen radical antioxidant capacity
DPPH	1,1'-difenyl-2-pikrylhydrazyl
TAC	total antioxidant capacity
TEAC	trolox equivalent antioxidant capacity
TPTZ	2,4,6-tripyridyl- <i>s</i> -triazin
TRAP	total reactive antioxidant potential

LITERATURA

- Lachman J., Hamouz K., Čepl J., Pivec V., Šulc M., Dvořák P.: Chem. Listy 100, 522 (2006).
- Čopíková J., Uher M., Lapčík O., Moravcová J., Dra-

- šar P.: Chem. Listy 99, 802 (2005).
3. Stratil P., Klejduš B., Kubáň V.: J. Agric. Food Chem. 54, 607 (2006).
 4. Brown C. R.: Am. J. Pot. Res. 82, 163 (2005).
 5. Brown C. R., Culley D., Yang C. P., Durst R., Wrolstad R.: J. Am. Soc. Hortic. Sci. 130, 174 (2005).
 6. Roginsky V., Lissi E. A.: Food Chem. 92, 235 (2005).
 7. Lachman J., Šulc M.: Bornim. Agrartech. Ber. 55, 161 (2006).
 8. Fogliano V., Verde V., Randazzo G., Ritieni A.: J. Agric. Food Chem. 47, 1035 (1999).
 9. Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M., Flanagan J. A., Deemer E. K.: J. Agric. Food Chem. 50, 3122 (2002).
 10. Molyneux P.: Songkl. J. Sci. Technol. 26, 211 (2004).
 11. Parejo L., Codina C., Petrakis C., Kefalas P.: J. Pharm. Toxicol. Methods 44, 507 (2000).
 12. Pennycooke J.C., Cox S., Stushnoff C.: Environ. Experiment. Bot. 53, 225 (2005).
 13. Politeo O., Jukic M., Milos M.: Food Chem. 101, 379 (2007).
 14. Gorinstein S., Martin-Beloso O., Katrich E., Lojek A., Číž M., Gligelmo-Miguel N., Haruenkit R., Park Y. S., Jung S. T., Trakhtenberg S.: J. Nutr. Biochem. 14, 154 (2003).
 15. Singh N., Rajini P. S.: Food Chem. 85, 611 (2004).
 16. Reyes L. F., Miller J. C., Cisneros-Zevallos L.: Am. J. Pot. Res. 81, 187 (2004).
 17. Ozgen M., Reese R. N., Tulio A. Z., Scheerens J. C., Miller A. R.: J. Agric. Food Chem. 54, 1151 (2006).
 18. Urrutia-Beret G., Balogh T., Schneider J., Knorr D.: J. Food Eng. 78, 375 (2007).
 19. Han K. H., Sekikawa M., Shimada M., Hashimoto M., Hashimoto N., Noda T., Tahala H., Fukushima M.: Brit. J. Nutr. 96, 1125 (2006).
 20. Mc Analle S., Koepke C. M., Le L., Vennum E., Mc Annaley B.: GlycoSci. Nutr. 4, 1 (2003).
 21. Fogliano V., Verde V., Randazzo G., Ritieni A.: J. Agric. Food Chem. 47, 1035 (1999).
 22. Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L., Byrne D. H.: J. Food Comp. Anal. 19, 669 (2006).

M. Šulc^a, J. Lachman^a, K. Hamouz^b, M. Orsák^a, P. Dvořák^b, and V. Horáčková^c (^a Department of Chemistry, ^b Department of Plant Production, Faculty of Agrobiology, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences in Prague, Czech Republic, ^c Potato Research Institute Havlíčkův Brod, Czech Republic): **Selection and Evaluation of Methods for Determination of Antioxidant Activity of Purple- and Red-Fleshed Potato Varieties**

Antioxidant activity of red-, purple- and yellow-fleshed potato varieties by the ABTS, DPPH and FRAP methods was investigated. Purple- and red-fleshed potatoes showed 1.5–2.6 times higher antioxidant activity compared with the yellow-fleshed ones. However, the choice of matrix in which antioxidant activity was determined affected the obtained results. Significant differences between varieties and the localities on which the potatoes were cultivated were determined. The highest linear correlation between ABTS and FRAP arrays was found ($R^2=0.94$); these arrays appear to be useful for the determination of antioxidant activity of potatoes. Statistically significant differences between the antioxidant activity of lyophilizate and juice of fresh potato tubers were found in some varieties.

OPRAVA

V článku Vítejte v nanosvětě (Chem. Listy 101, 262 (2007)), kapitola 9, první odstavec, byla nesprávně uvedena věta: „Například fullerén C₆₀ se skládá z 60 vzájemně propojených atomů uhlíku a z 60 atomů vodíku. Každý atom uhlíku je spojen se třemi jinými atomy uhlíku.“

Uvádím správné znění: „Fullerén C₆₀ se skládá výlučně z atomů uhlíku vzájemně propojených tak, že každý atom uhlíku je vázaný k jednomu sousednímu atomu uhlíku dvojnou vazbou a k dalším dvěma sousedním atomům jednoduchou vazbou.“

Petr Klusoň