

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

**Fakulta přírodovědecká
Katedra analytické chemie**



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Olomouc 2010

Vladimíra Kubištová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

**Fakulta přírodovědecká
Katedra analytické chemie**

SPEKTROFOTOMETRICKÉ STUDIUM ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce:

Vladimíra Kubištová

Studijní obor:

Chemie

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. David Milde, Ph. D.

Olomouc 2010

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury. Souhlasím s tím že, práce je prezenčně zpřístupněna v Knihovně katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne.....

.....

Podpis

Mé upřímné poděkování patří Ing. Davidu Mildemu, Ph.D. za jeho profesionální vedení, za obětavou spolupráci při zpracování výsledků, za cenné připomínky, rady a za čas, který mi věnoval při konzultacích.

Dále bych velice ráda poděkovala RNDr. Janě Skopalové, Ph.D. za její odbornou pomoc, vstřícnost a četné konzultace.

SOUHRN

Cílem této práce bylo stanovit celkovou antioxidační aktivitu u vybraných vzorků pív, mezi kterými byli zástupci světlých ležáků, světlých výčepních pív, tmavých pív a pív nealkoholických. Pro samotné měření antioxidační aktivity byla použita spektrální metoda (konkrétně UV/VIS spektrofotometrie) založená na principu zhášení stabilního volného syntetického radikálu 1,1-difeny-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazylu (DPPH). Dále byla provedena validace metody a získané výsledky byly porovnány s dalšími třemi metodami: průtokovou coulometrií, cyklickou voltametrií a chemiluminiscencí.

SUMMARY

The aim of this work was to determine the total antioxidant activity of selected samples of beer, among whom were representatives of the pale lagers, light draft beers, dark beers, non-alcoholic beer. The spectral method (specifically UV/VIS spectrophotometry) was used to measure antioxidant activity alone. This method based on the principle of scavenging the stable free synthetic radical 1,1-diphenyl-2-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl (DPPH). The validation of the method was performed and the results obtained were compared with three other methods: flow coulometry, cyclic voltammetry and chemiluminiscence.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	2
2.1 Absorpční spektrometrie v UV/VIS oblasti spektra.....	2
2.1.1 Princip UV/VIS spektrometrie.....	2
2.1.2 Veličiny používané v UV/VIS spektrometrii.....	3
2.1.3 Elektronová absorpční spektra.....	6
2.1.4 Instrumentace v UV/VIS spektrometrii.....	10
2.2 Volné radikály a antioxidanty.....	14
2.2.1 Volné radikály.....	14
2.2.2 Antioxidanty.....	15
2.2.3 Polyfenolické sloučeniny v pivu.....	15
2.3 Metody stanovení antioxidační aktivity.....	16
2.3.1 Antioxidační aktivita.....	16
2.3.2 Chemické metody stanovení antioxidační aktivity.....	16
2.3.3 Metoda využívající DPPH.....	17
2.3.4 Fyzikální metody stanovení antioxidační aktivity.....	18
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	19
3.1 Použité chemikálie a přístrojová vybavení.....	19
3.1.1 Chemikálie.....	19
3.1.2 Přístrojová vybavení.....	20
3.2 Přípravy roztoků a úprava vzorků.....	21
3.2.1 Přípravy roztoků.....	21
3.2.2 Úprava vzorků.....	22
3.3 Pracovní postupy.....	22
3.3.1 Volba vhodného tlumivého roztoku.....	22
3.3.2 Kalibrační závislost Troloxu.....	24
3.3.3 Nalezení vhodných podmínek pro měření modelového vzorku piva.....	24
4. VÝSLEDKY A DISKUSE.....	26
4.1 Optimalizace metody.....	26

4.1.1 Volba vhodného tlumivého roztoku.....	26
4.1.2 Vliv ředění piva na celkovou antioxidační aktivitu.....	26
4.1.3 Závislost na době inkubace.....	27
4.1.4 Přesnost měření.....	28
4.2 Souhrn naměřených výsledků.....	29
4.2.1 Kalibrační křivka Troloxu.....	29
4.2.2 Stanovení celkové antioxidační aktivity metodou DPPH.....	30
4.2.3 Porovnání výsledků TAA naměřených metodou DPPH s cyklickou voltametrií a průtokovou coulometrií.....	31
5. ZÁVĚR.....	32
6. PŘÍLOHY.....	33
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	36
8. LITERATURA.....	37

1. ÚVOD

Naše tělo je každodenně vystavováno potenciálně nebezpečným sloučeninám obsahujícím jeden nebo více nepárových elektronů, tzv. volným radikálům. Díky své vysoké reaktivitě mohou být iniciátory celé kaskády reakcí, vedoucí k následným změnám ve struktuře buněk, k poškození celých tkání, orgánů a důležitých funkcí v organismu.

Jednou z možností, jak chránit lidský organismus před nežádoucími vlivy volných radikálů, je dostatečný přísun antioxidantů. Antioxidanty totiž dokáží zabránovat nebo alespoň částečně eliminovat oxidační destrukci látek[1]. Proto se během posledních deseti let dostaly právě látky s antioxidačními účinky do popředí zájmu odborníků v řadě potravinářských oborů, pivovarství nevyjímaje.

Pivo je jedním z nejstarších nápojů pocházejících již z doby před 7000 lety, které se původně připravovalo jako velmi významná potravina. Rozdílné druhy pív vznikaly již v samém počátku jeho výroby v závislosti na lokalitě, pěstovaných surovinách a klimatických podmínkách[2]. Vzhledem k tomu, že je u nás pivo velice oblíbeným a vyhledávaným nápojem, patří tak mezi jeden z nejvýznamnějších zdrojů přírodních antioxidantů v potravě. Velký význam se přikládá zejména polyfenolickým sloučeninám, které patří mezi nejširší skupinu antioxidantů v pivovarství.

V řadě experimentálních studií bylo prokázáno, že antioxidační aktivita mnoha rostlinných fenolických látek je vyšší než účinek tzv. antioxidačních vitamínů[3]. A právě také díky těmto důvodům vzrůstá zájem stanovit antioxidační aktivitu různých látek rostlinného původu v potravinách a nápojích. Jelikož však většinu přírodních antioxidantů přijímáme potravou jako součást složitých směsí, snažíme se charakterizovat antioxidační aktivitu směsných vzorků i jako celku. Proto byl také zaveden pojem celková antioxidační aktivita (total antioxidant activity – TAA). Celková antioxidační aktivita je parametr, který kvantifikuje schopnost biologického vzorku vychytávat volné radikály[4].

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Absorpční spektrometrie v UV/VIS oblasti spektra

Molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti je dnes velmi běžnou spektrální metodou používanou především v kvantitativní analýze. Zabývá se měřením a interpretací elektronových spekter molekul látek, které absorbují elektromagnetické záření v blízké ultrafialové (200 – 400 nm) a nebo ve viditelné oblasti (400 – 800 nm) spektra. Za své široké využití vděčí jednak tomu, že se jedná o metodu s vysokou mezí detekce, vhodnou pro stanovení obsahu stopových množství látek v nejrůznějších prostředích, ale také tomu, že příslušné spektrometry jsou relativně levné. Velmi často se tato metoda používá jako koncová metoda stanovení, po předchozí aplikaci např. některých ze separačních metod[5].

2.1.1 Princip UV/VIS spektrometrie

Celkovou energii molekuly E_0 v základním elektronové stavu, kde se molekula látky nachází za normálních podmínek, lze vyjádřit jako součet tří energetických členů: energie elektronů E_e , vibrační energie E_v a rotační energie E_r :

$$E_0 = E_e + E_v + E_r \quad (1)$$

Pohlcením fotonů záření z ultrafialové či viditelné oblasti elektromagnetického spektra přechází molekula do excitovaného stavu. Její setrvání v tomto energeticky bohatším stavu je krátké (řádově 10^{-9} s), následně přechází různými deexcitačními přechody (zářivými i nezářivými) za předání energie zpět do základního stavu.

Množství absorbované energie ΔE , které je rovno rozdílu energie stavu excitovaného E_1 a energie stavu základního E_0 , musí být rovno přijatému kvantu záření v soulase s rovnicí:

$$\Delta E = E_1 - E_0 = h\nu = h\frac{c}{\lambda} = \Delta E_e + \Delta E_v + \Delta E_r \quad (2)$$

kde je h Planckova konstanta ($h = 6,626 \cdot 10^{-34}$ J·s), ν je frekvence, λ je vlnová délka záření a c rychlost světla ve vakuu ($c = 3 \cdot 10^8$ m·s⁻¹).

Interakce molekul s viditelným a ultrafialovým zářením je důsledkem přechodů vnějších (valenčních) elektronů mezi vazebnými a antivazebnými orbitály molekul[5]. Tyto vazebné a antivazebné molekulové orbitály se tvoří lineární kombinací z příslušných orbitalů atomových při vzniku molekuly, přičemž vazebné molekulové orbitály mají nižší energii než původní atomové orbitály a antivazebné molekulové orbitály energii vyšší.

Elektrony, které se podílejí na tvorbě kovalentních vazeb, označujeme jako vazebné a v molekule nacházející se v základním stavu jim přísluší již zmíněné vazebné molekulové orbitály. V molekulách obsahujících heteroatomy mohou být přítomny i elektrony, které se na tvorbě kovalentních vazeb nepodílejí – volné elektronové páry, těmto nevazebným elektronům odpovídají nevazebné molekulové orbitály[6].

2.1.2 Veličiny a vztahy používané v UV/VIS spektrometrii

Transmittance, absorbance a absorptance

Zeslabení toku elektromagnetického záření při průchodu vzorkem, neboli intenzitu absorpce, popisují tři oddělené, ale související veličiny: transmittance T , absorbance A a absorptance α .

Transmittance T (propustnost) je definována jako poměr intenzity záření vzorkem prošlého P_T a intenzity záření dopadající na vzorek P_0 a udává se nejčastěji v procentech.

$$T = \frac{P_T}{P_0} \quad \%T = \frac{P_T}{P_0} \times 100\% \quad (3)$$

Pokud je $T = 100\%$ k absorpci záření nedochází, jestliže je ale $T = 0\%$ dochází k absorpci úplné.

Alternativní veličinou pro vyjádření zeslabení toku elektromagnetického záření vlivem absorpce je **absorbance** A (starším názvem extinkce). Je definovaná jako záporný dekadický logaritmus transmitance.

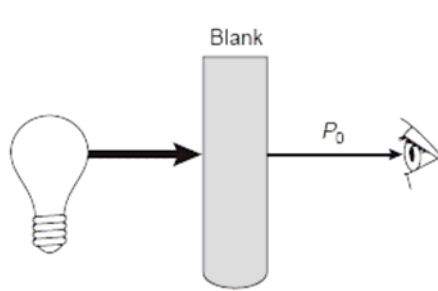
$$A = -\log T = -\log \frac{P_T}{P_0} = \log \frac{P_0}{P_T} \quad (4)$$

Je-li absorpce záření nulová je nulová i absorbance. S rostoucí absorpcí záření tedy roste i absorbance. Blíží-li se transmitance nule, blíží se absorbance nekonečnu[7]. Obecně je absorbance běžnější veličinou pro vyjádření oslabení toku záření, protože jak bude uvedeno v následující sekci, je lineární funkcí koncentrace analytu[8].

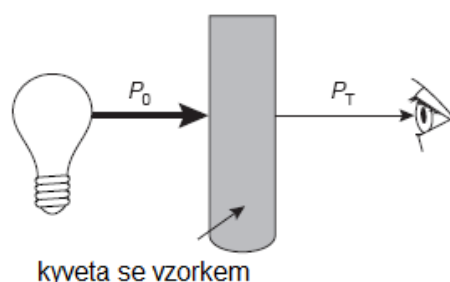
Absorptance α je vyjádřením podílu toku absorbovaného monochromatického záření k toku záření vstupujícího. Hodnoty absorptance se opět často uvádějí v procentech[9].

$$\alpha = \frac{P_0 - P_T}{P_0} = 1 - T \quad (5)$$

Experimentálně se dá transmitance či absorbance zjistit tak, že porovnáваме tok záření prošlý srovnávacím roztokem (blank) a získáme tedy odezvu detektoru úměrnou hodnotě P_0 , a poté zařadíme kyvetu s měřeným vzorkem a odečteme hodnotu odpovídající P_T [10] (viz. Obr. 1. a Obr. 2.)



Obr. 1. Schématický diagram, ukazující, že P_0 je předefinována jako zářivý tok procházející blankem, upravující T v Obr.2. vzhledem k jakýmkoliv možným ztrátám záření způsobeným rozptylem, odrazem, absorpcí kyvety, či absorpcí matrice[8]



Obr. 2. Schématický diagram zobrazující útlum záření procházejícího vzorkem, kde P_0 je zářivý tok pocházející od zdroje a P_T je zářivý tok vzorkem prošlý[8]

Absorbance a koncentrace: Lambertův-Beerův zákon

Prochází-li monochromatické záření infinitezimálně tenkou vrstvou látky o tloušťce dx , dochází k zeslabení intenzity zářivého toku o dP , vlivem absorpce přítomných částic. Toto zeslabení intenzity zářivého toku dP je přímo úměrné koncentraci analytu C . Tento fakt se dá následovně vyjádřit jako:

$$-\frac{dP}{P} = \alpha C dx \quad (6)$$

kde α je konstanta úměrnosti a P je intenzita záření vstupující do vrstvy o tloušťce dx . Integrací levé strany rovnic od $P = P_0$ do $P = P_T$ a pravé strany rovnice od $x = 0$ do $x = b$, kde b je celková tloušťka vzorku

$$-\int_{P=P_0}^{P=P_T} \frac{dP}{P} = \alpha C \int_{x=0}^{x=b} dx$$

získáme:

$$\ln\left(\frac{P_0}{P_T}\right) = \alpha b C \quad (7)$$

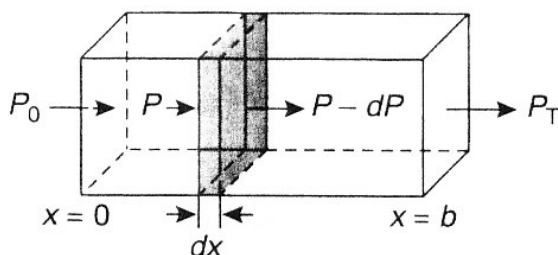
Úpravou přirozeného logaritmu $\ln$ na dekadický log a nahrazením rovnicí (4) dostaneme konečný vztah pro vyjádření Lambertova-Beerova zákona

$$A = \alpha b C \quad (8)$$

kde α je tzv. absorptivita vzorku[8]. Pokud je koncentrace vzorku vyjádřena pomocí látkové koncentrace, může být α nahrazena běžnější veličinou a to tzv. molární

absorptivitou (tedy molárním absorpčním koeficientem) ϵ_λ při vlnové délce λ , udávaném nejčastěji v jednotkách $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Rovnice (8) tak nabude známého tvaru:

$$A = \epsilon_\lambda b C \quad (9)$$



Obr. 3. Veličiny používané při odvozování Lambertova-Beerova zákona [8]

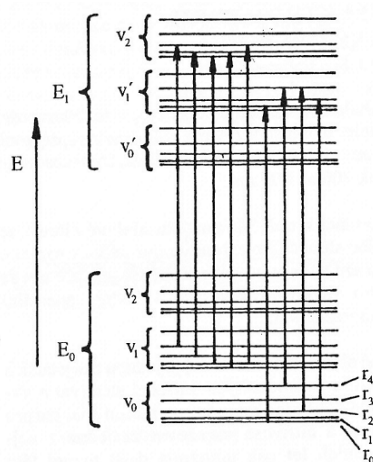
2.1.3 Elektronová absorpční spektra

Elektronové absorpční spektrum představuje závislost absorbance A či transmitance T na vlnové délce λ , na vlnočtu $\tilde{\nu} = 1/\lambda$ nebo na frekvenci $\nu = c/\lambda$ (c – rychlost světla ve vakuu). Vzhledem k závislosti absorbance na koncentraci se pro účely srovnávání spekter používá také závislosti logaritmu molárního absorpčního koeficientu $\log \epsilon$ na vlnové délce λ .

Původ elektronových absorpčních spekter

K vyvolání přechodů valenčních elektronů mezi různými energetickými hladinami je zapotřebí energie z ultrafialové a viditelné oblasti. Absorpční přechody mohou probíhat z různých vibračních a rotačních stavů základního elektronového stavu do různých vibračních a rotačních stavů excitovaného stavu. Protože jsou energetické přechody mezi elektronovými hladinami v molekule energeticky mnohem náročnější než je tomu u přechodů mezi hladinami vibračními a rotačními, je tedy každý takovýto elektronový přechod doprovázen řadou přechodů vibračních a rotačních. Proto se tyto přechody označují někdy též jako vibronické[6]. Na Obr. 4. je zobrazena základní

elektronová hladina E_0 a její vibrační v_0, v_1, v_2 a rotační r_0, r_1, r_2, r_3, r_4 podhladiny a první excitovaná elektronová hladina E_1 a její vibrační podhladiny v'_0, v'_1 a v'_2 .

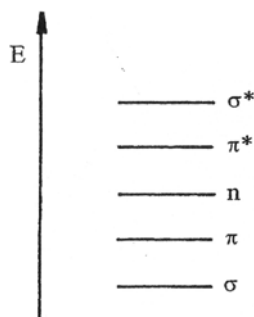


Obr. 4. Schéma energetických hladin a elektronového přechodu pro diatomickou molekulu[9]

Výsledné absorpční spektrum látky je tedy pásové, protože při jeho registraci jednotlivé přechody zpravidla splývají. Při měření v plynné fázi, lze v absorpčním spektru rozlišit jemnou vibrační a někdy i rotační strukturu.

Typy elektronových přechodů v molekulách a jejich projevy ve spektrech

Absorpce v UV nebo VIS oblasti je způsobena přechody vazebných elektronů v molekule z molekulových orbitalů σ nebo π , příp. nevazebných n , do antivazebných molekulových orbitalů σ^* nebo π^* (podle LCAO Hückelovy teorie)[9]. Jak je schématicky znázorněno na Obr. 5., roste energie hladin v molekule obecně v pořadí: $\sigma < \pi < n < \pi^* < \sigma^*$.



Obr. 5. Schématické znázornění energetických hladin jednotlivých typů elektronů v molekule [12]

Za absorpci záření v UV/VIS oblasti jsou odpovědné funkční skupiny, které nazýváme *chromofory*. Obecně lze říci, že skupiny obsahující π elektrony jsou chromofory pro ultrafialovou a viditelnou oblast a skupiny obsahující pouze σ elektrony jsou chromofory pro dalekou ultrafialovou oblast. *Auxochromy* jsou funkční skupiny, které způsobují posun vlnových délek absorpčních maxim chromoforů k delším vlnovým délkám a zvyšují intenzitu pásu (např. $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$). Toto zvýšení intenzity absorpce se označuje jako *hyperchromický efekt*. *Hypochromní efekt* naopak představuje snížení intenzity absorpce.

Podle toho, mezi kterými obsazenými a volnými energetickými hladinami molekuly dochází k přechodům elektronů, rozlišujeme šest typů přechodů. Tyto přechody jsou označeny symboly orbitalů hladin, mezi nimiž dochází k přechodu a směr přechodu je zpravidla označen šipkou: **1.** $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ($\sigma\sigma^*$); **2.** $\sigma \rightarrow \pi^*$ ($\sigma\pi^*$); **3.** $\pi \rightarrow \sigma^*$ ($\pi\sigma^*$); **4.** $\pi \rightarrow \pi^*$ ($\pi\pi^*$); **5.** $n \rightarrow \pi^*$ ($n\pi^*$); **6.** $n \rightarrow \sigma^*$ ($n\sigma^*$).

Přechody $\sigma \rightarrow \pi^*$ a $\pi \rightarrow \sigma^*$ nemají valný význam, jsou symetricky zakázané a projevíly by se ve vzdálené ultrafialové oblasti[6].

Přechody $\sigma \rightarrow \sigma^*$ vyžadují vysokou energii (díky vysokému energetickému rozdílu mezi vazebným orbitalem σ a antivazebným orbitalem σ^*) a lze je očekávat ve vzdálené (vakuové) ultrafialové oblasti. K těmto přechodům dochází ve sloučeninách obsahujících jednoduché vazby, tedy např. u nasycených uhlovodíků, které mají absorpční pásy s maximem při vlnových délkách kratších než 150 nm, a proto jsou s výhodou používány jako rozpouštědla pro měření spekter jiných látek v blízké UV a VIS oblasti (n-hexan, n-heptan, isooktan atd.). Obecně však tyto přechody nemají v praxi většího významu.

Přechody $n \rightarrow \sigma^*$ vyžadují poněkud menší energii než přechody $\sigma \rightarrow \sigma^*$ a mohou se projevit i v blízké ultrafialové oblasti. Tyto přechody jsou možné u sloučenin obsahujících ve svých molekulách heteroatomy (O, S, N, halogeny) s nevazebnými elektronovými páry, tj. s elektrony v nevazebných orbitalech. Energie těchto přechodů a poloha absorpčního pásu zde závisí na elektronegativitě heteroatomu (tedy na pevnosti, s jakou jsou volné elektronové páry poutány k danému atomu). Zvyšující se elektronegativita heteroatomu posunuje maxima absorpce ke kratším vlnovým délkám. Naopak s klesající elektronegativitou atomu jsou elektrony

v nevazebných orbitalech vázány volněji a jejich excitace vyžaduje menší energii, což se projeví posunem maxima absorpčního pásu směrem k delším vlnovým délkám.

Přechody $\pi \rightarrow \pi^*$ jsou charakteristické pro sloučeniny s násobnými vazbami (dvojnými a trojnými). Například olefinické uhlovodíky s izolovanou dvojnou vazbou poskytují absorpční pásy příslušející $\pi \rightarrow \pi^*$ přechodům s absorpčním maximem ve vzdálené ultrafialové oblasti. Při konjugaci většího počtu dvojných vazeb se ale absorpční maximum výrazně posouvá k delším vlnovým délkám do blízké ultrafialové oblasti nebo až viditelné oblasti (látky se pak jeví jako barevné).

Přechody $n \rightarrow \pi^*$ se projevují u sloučenin, které obsahují dvojný nebo trojný vazby, na nichž se podílí alespoň jeden atom s volným elektronovým párem, tedy např. u látek s funkčními skupinami $-\text{C}=\text{O}$, $-\text{C}=\text{S}$, $-\text{N}=\text{S}$, apod. Jak ukazuje Tabulka I. zatímco u $\pi \rightarrow \pi^*$ přechodů není poloha pásu citelně ovlivňována druhem atomu, tak u $n \rightarrow \pi^*$ přechodů je silně ovlivňována nejen poloha, ale i hodnota ϵ . Dále je intenzita pásů odpovídající $\pi \rightarrow \pi^*$ přechodům mnohokrát vyšší než intenzita pásů $n \rightarrow \pi^*$ (viz. Tabulka I.) [13].

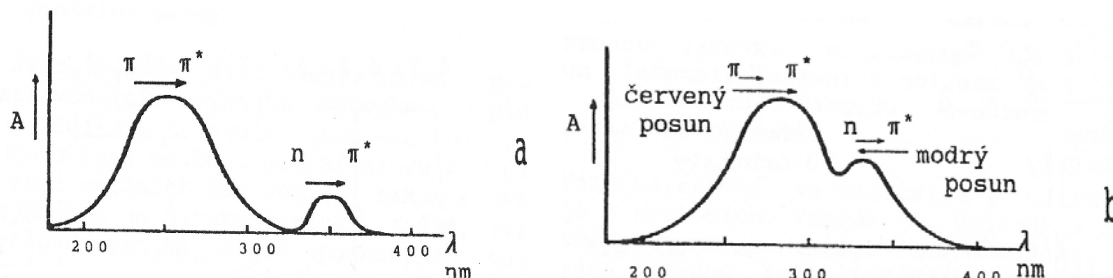
Tabulka I. Absorpční maxima λ_{max} některých funkčních skupin a vazebných seskupení [12]

Skupina	$\pi \rightarrow \pi^*$ (intenzivní)	$n \rightarrow \pi^*$ (slabý)
$>\text{C}=\text{C}<$	170	-
$-\text{C}\equiv\text{C}-$	170	-
$-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}-$	220	-
$-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{C}-$	260	-
$\text{C}=\text{C}-$		
$>\text{C}=\text{O}$	166	280
$>\text{C}=\text{N}-$	190	300
$-\text{N}=\text{N}-$	-	340
$>\text{C}=\text{S}$		500

Vliv rozpouštědla na $\pi \rightarrow \pi^$ a $n \rightarrow \pi^*$ přechody*

Tyto přechody mohou být rozlišeny působením různě polárních rozpouštědel. Zvyšováním polaritý rozpouštědla u $n \rightarrow \pi^*$ přechodu se posouvá absorpční maximum

směrem ke kratším vlnovým délkám (*modrý – hypsochromní posun*), zatímco u $\pi \rightarrow \pi^*$ přechodu se posunuje absorpční maximum směrem k delším vlnovým délkám (*červený – bathochromní posun*) (viz. Obr. 6).

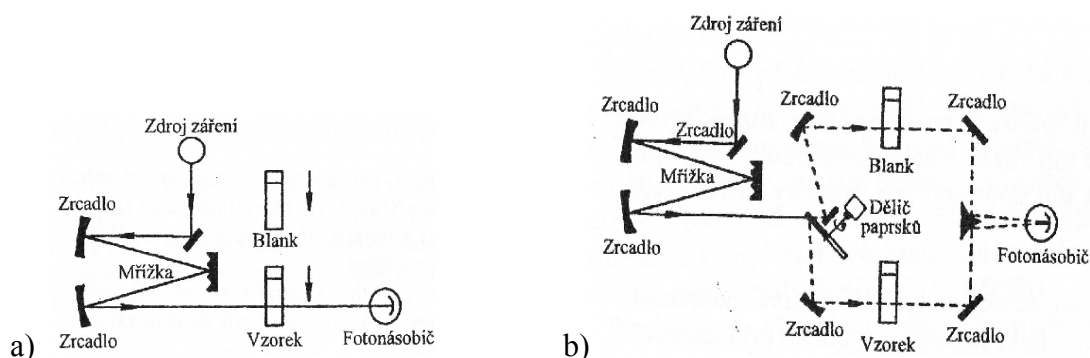


Obr. 6. Příklad absorpčního spektra molekuly v různých rozpouštědlech[12]

a – nepolární rozpouštědlo; b – polární rozpouštědlo

2.1.4 Instrumentace v UV/VIS spektrometrii

Optické přístroje, jimiž objektivně měříme absorpční spektra látek, se obecně skládají z několika následujících prvků: *zdroje záření*, *zařízení pro spektrální rozklad záření*, *kyvetového prostoru*, *detektoru záření prošlého kyvetami*, který přeměňuje zářivý tok na elektrický signál a *zařízení pro zapsání a zpracování signálu* (PC). Základní prvky spektrofotometrů pak mohou být uspořádány způsobem jednopaprskovým či dvoupaprskovým (viz. Obr. 7.)



Obr. 7. a) Schéma jednopaprskového přístroje; b) Schéma dvoupaprskového přístroje[9]

Zdroje primárního záření

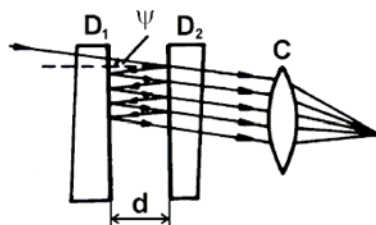
Jako zdroj spojitého primárního záření se ve spektrofotometrech pro blízkou ultrafialovou oblast používá *vodíková* nebo častěji *deuteriová výbojka* (150 – 380 nm), která má mnohem vyšší intenzitu. Popřípadě lze v UV oblasti využít též jako zdroje záření *vysokotlaké výbojky* naplněné inertním plynem (Xe, Ar) (200 – 1000 nm), či velmi intenzivní *rtuťové výbojky*. Ve viditelné oblasti spektra slouží jako zdroje záření *wolframová žárovka* (320 – 2400 nm) s vláknem žhaveným na $T \sim 2800$ K nebo *halogenová žárovka*, které poskytují spojité spektrum.

Disperzní systémy

Disperzní systém (zařízení pro spektrální rozklad záření) slouží k vymezení záření o určitém intervalu vlnových délek. K výběru vlnové délky můžeme použít *filtru* nebo *monochromátoru*, v závislosti na tom, jak velký rozsah vlnových délek chceme vymežit.

Absorpční filtry jsou zpravidla barevné skleněné destičky (popř. destičky z želatiny nebo plastu), které propouští pouze požadované vlnové délky elektromagnetického záření a ostatní absorbují. Rozlišujeme absorpční filtry pásové a hranové.

Interferenční filtry jsou přístroje využívající jevu interference světla k měření vlnových délek či některých dalších veličin. Jedná se většinou o tenkou destičku (o určitém indexu lomu n) z SiO_2 příp. z MgF_2 , pokrytou z obou stran (polopropustným) stříbrným filmem. Příkladem takového zařízení může být tzv. *Fabryho-Perotův interferometr* (viz. Obr. 8.), který má vysokou rozlišovací schopnost.

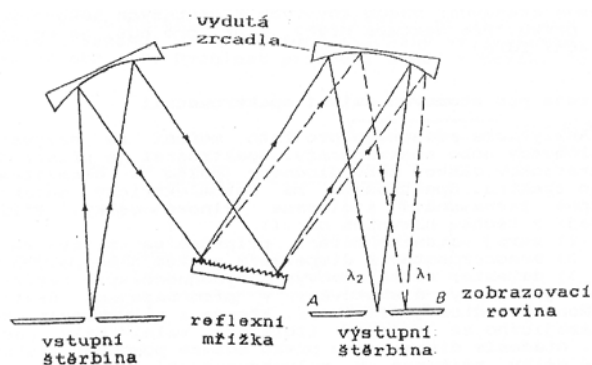


Obr. 8. *Fabryho–Perotův interferometr, D_1 a D_2 jsou rovnoběžné skleněné desky opatřené zrcadlicí vrstvou; d je vzdálenost vnitřních stěn; ψ je úhel dopadu paprsku na odrážející vrstvu; C je objektiv dalekohledu (čočka)[14]*

Nejčastěji se ale k výběru vlnové délky používají *monochromátory*. Monochromátor rozdělí vstupující záření na řadu monochromatických paprsků, z nichž je následně vybrána požadovaná vlnová délka. Skládá se ze vstupní štěrbin, disperzního prvku (hranol nebo reflexní mřížka), výstupní štěrbin a zaostřovací pomocné optiky (čočky, zrcadla).

K rozkladu záření *hranolem* dochází v důsledku různého indexu lomu záření o různých λ . Platí, že záření s menší vlnovou délkou se láme více, než záření s větší vlnovou délkou. Materiál hranolu musí propouštět záření ve spektrální oblasti, pro kterou je určen. Monochromátor s hranolem je v současných přístrojích výjimkou. Důvodem je jednak vyšší pořizovací cena tohoto prvku, tak i některé nežádoucí vlastnosti.

Rozklad (disperze) záření *mřížkou* je důsledkem odrazu nebo difrakce (ohyb) záření a interference odražených či ohnutých paprsků. Mřížka je plocha z transparentního materiálu (většinou syntetická pryskyřice) opatřená řadou rovnoběžných čar neboli vrypů. Počet vrypů na mřížce závisí na oblasti vlnových délek, ve které má mřížka pracovat. Pro UV/VIS oblast je to asi 1200 vrypů na 1 mm [12]. Aby mohl ohyb na mřížce nastat, musí být vzdálenost vrypů (mřížková konstanta) řádově blízká vlnové délce záření. Nakláněním mřížky lze plynule měnit vlnovou délku. Schéma monochromátoru s reflexní mřížkou je na Obr. 9.



Obr. 9. Monochromátor s reflexní mřížkou, uspořádání Czerny – Turner ($\lambda_1 > \lambda_2$) [12]

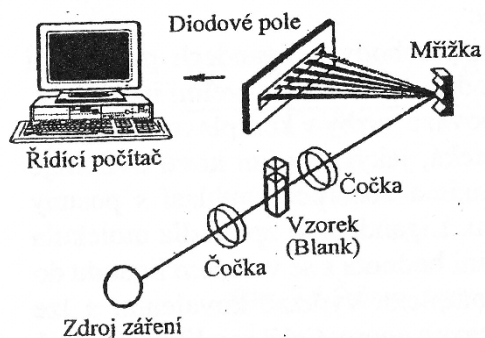
Kyvetový prostor

Absorbující prostředí je realizováno prostřednictvím kyvet, které jsou umístěny mezi monochromátorem a detektorem. Pro ultrafialovou oblast je využíváno *kyvet křemenných* a pro viditelnou oblast *kyvet skleněných*. Při měření látek v roztoku,

se do jedné kyvety umístí vzorek sledované látky, a do druhé pak roztok srovnávací, tj. čisté rozpouštědlo nebo slepý roztok (blank), který obsahuje všechny složky kromě analytu. Vnitřní tloušťka absorbující vrstvy kyvet se pohybuje v rozmezí 0,2 – 5 cm. Pro běžná měření se používají kyvety o vnitřní tloušťce 1 cm. Pro speciální měření se pak užívá zvláštních typů kyvet: kyvety s větší délkou absorpční vrstvy pro měření absorpce plynů, průtokové kyvety, kyvety s proměnlivou tloušťkou absorbující vrstvy aj.[9]

Detektory používané v UV/VIS spektrometrii

K detekci záření se v UV/VIS spektrometrii nejčastěji využívá fotoelektrické detekce pomocí *fotonásobiče* nebo jeho jednodušší podoby – *fotonky*. V případě diode – array spektrofotometru (spektrofotometru s diodovým polem) je jeden univerzální detektor nahrazen řadou *fotodiod* (viz. Obr. 10.)



Obr. 10. Schéma diode – array spektrofotometru[9]

Fotonky a *fotonásobiče* pracují na principu vnějšího fotoelektrického jevu, což znamená, že po dopadu světelného kvanta na katodu dojde k emisi elektronů, které se díky vloženému napětí mezi katodu a anodu pohybují směrem k anodě a to se detekuje jako elektrický proud[15]. U *fotonásobičů* je proud zesilován zařazením dynod mezi katodu a anodu, z nichž každá má vůči té předcházející zvyšující se kladný potenciál.

Fotodiody (tvořené krystalem Si) patří mezi polovodičové fotoelektrické články využívající tzv. vnitřního fotoelektrického jevu. Dopadající záření uvolňuje elektrony uvnitř materiálu polovodiče a umožňuje vést elektrický proud, který se měří.

Diodové pole (DAD) představuje seskupení řady (200 a více) fotodiod, umístěných vedle sebe na křemíkové destičce o délce několika cm, pevně nastavených v celé spektrální oblasti na jednotlivé vlnové délky dopadajícího záření.

2.2 Volné radikály a antioxidanty

2.2.1 Volné radikály

Volné radikály (VR) jsou atomy, molekuly či ionty schopné samostatné existence, které mají ve svém elektronovém obalu jeden nebo více nepárových elektronů. Snaží se proto získat další elektron a doplnit si tak pár do stabilní elektronové konfigurace. Z toho pramení jejich velká reaktivita a omezená doba existence. Reagují nejen s dalšími VR, ale i s intaktními molekulami a tím vytvářejí další volný radikál. Tento děj má pak tendenci pokračovat formou řetězové reakce[16]. Pro organismus nejdůležitější jsou volné radikály kyslíku a dusíku, označované též jako reaktivní formy kyslíku (ROS – reactive oxygen species) či reaktivní formy dusíku (RNS – reactive nitrogen species). Na jedné straně organismy využívají VR ve svůj prospěch, na druhé straně však mohou tyto VR organismus poškodit. Působí totiž na biologicky významné sloučeniny, především lipidy, bílkoviny a nukleové kyseliny, pozměňují jejich strukturu a tím modifikují jejich funkci[3]. Nemoci, stres, kouření, či nadměrné vystavení vlivům znečištěného prostředí přispívají k intenzivnější tvorbě VR. Proto organismus vyvinul účinné mechanismy obrany proti VR, obecně pak hovoříme o tzv. antioxidační ochraně tedy o antioxidační aktivitě látek.

2.2.2 Antioxidanty

Jednou z možností, jak organismus chránit před vlivem exogenních a endogenních volných radikálů, je dostatečný přísun antioxidantů. Antioxidanty totiž mají schopnost eliminovat negativní účinky volných radikálů v krvi. Kupříkladu inhibují oxidaci lipidů tím, že reagují s hydroperoxidovým volným radikálem na málo reaktivní hydroperoxid a přerušují tak řetězovou radikálovou reakci[17]. Tyto látky příznivě ovlivňují i procesy regulace tlaku krve a hladiny glukosy v krvi a mají protinádorové, antimikrobiální a protizánětlivé vlastnosti[18]. Přírodní antioxidanty získáváme potravou hlavně z ovoce, zeleniny, obilovin a nápojů. Můžeme je nalézt jak v nealkoholických nápojích např. ve dřeních, šťávách, džusech a čajích, tak i v alkoholických nápojích a to ve vínech a pivech. Tradičně se mezi přírodní antioxidanty získávaných potravou řadí tzv. antioxidační vitamíny C, E a karotenoidy. V dnešní době se však větší pozornost věnuje dalším přírodním látkám, a to polyfenolickým sloučeninám.

2.2.3 Polyfenolické sloučeniny v pivu

Polyfenolické sloučeniny jsou nejširší skupinou antioxidantů v pivovarství, mající prokazatelně antikancerogenní účinky. Hrají navíc významnou úlohu i v bránění procesu oxidačních změn během chmelovaru a skladování[19]. Do piva se dostávají z ječmene, resp. sladu, chmele a chmelových výrobků jako přírodní složky, které dalekosáhle ovlivňují jeho senzorické vlastnosti i celkovou trvanlivost[20]. Patří mezi ně např. flavonoidy, katechiny a fenolické kyseliny. Fenolické sloučeniny mohou tedy v lidském těle působit jako antioxidanty, a to například jako ochranné prostředky proti oxidaci kyseliny askorbové a některých nenasycených mastných kyselin[21].

2.3 Metody stanovení antioxidační aktivity

2.3.1 Antioxidační aktivita

Antioxidační aktivita je definovaná jako schopnost sloučeniny (směsi látek) inhibovat oxidační degradaci různých sloučenin. Pro vzájemné porovnávání antioxidačních účinků, byl v souvislosti s analýzou potravinových vzorků zaveden pojem celková antioxidační aktivita (*total antioxidant activity/capacity* – TAA/TAC). 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[22].

Metody stanovení antioxidačních účinků v pivovarských materiálech je možno rozdělit do dvou základních skupin, na metody chemické a fyzikální. K metodám chemickým lze dále přiřadit metody elektrochemické. Následující text, se věnuje převážně metodám chemickým, fyzikální metody budou zmíněny pouze okrajově.

2.3.2 Chemické metody stanovení TAA

Metody chemické spočívají v použití činidel, která poskytují s volnými kyslíkovými radikály barevné produkty, jejichž vzniku brání ve vzorku obsažené antioxidanty. Intenzita zabarvení se měří nejčastěji spektrofotometricky a rozdíl v hodnotách absorbancí měřeného a slepého vzorku pak udává obsah látek s antioxidačními účinky.

TAA vzorků se hodnotí parametrem TEAC (The Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)[23]. Představuje antioxidační kapacitu vzorku ekvivalentní definovanému množství syntetického derivátu Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8,-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina). Pro čisté látky je TEAC definována jako

milimolární koncentrace Troloxu vykazující stejnou antioxidační aktivitu jako testovaná látka při koncentraci $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro směsi TEAC udává koncentraci Troloxu ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), která je rovna antioxidační aktivitě vzorku[3].

Při použití metody ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) se v testovaném systému generují kyslíkové radikály a hodnotí se schopnost testované látky zpomalit nebo zastavit radikálovou reakci. Detekce je založena na sledování úbytku fluorescence β -fykoerytrinu (β -PE).

Na principu redoxní reakce založena metoda FRAP (Ferric Reducting Antioxidant Power), kde se využívá schopnosti antioxidantů redukovat železité komplexy (např. Fe^{III} – TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin), které jsou téměř bezbarvé a po redukci vytváří barevné produkty[1].

Metoda využívající schopnost antioxidantů zhaset radikálový kation $\text{ABTS}^{+\cdot}$ patří mezi jednu ze základních metod stanovení TAA. Základem této metody je generování radikálu kationu $\text{ABTS}^{+\cdot}$. Jeho následné zhasení antioxidanty, které se chovají jako donory vodíku, se sleduje spektrofotometricky na základě změn absorpčního spektra $\text{ABTS}^{+\cdot}$. Výsledná antiradikálová aktivita je srovnávána s antiradikálovou aktivitou syntetické látky Troloxu[1,3].

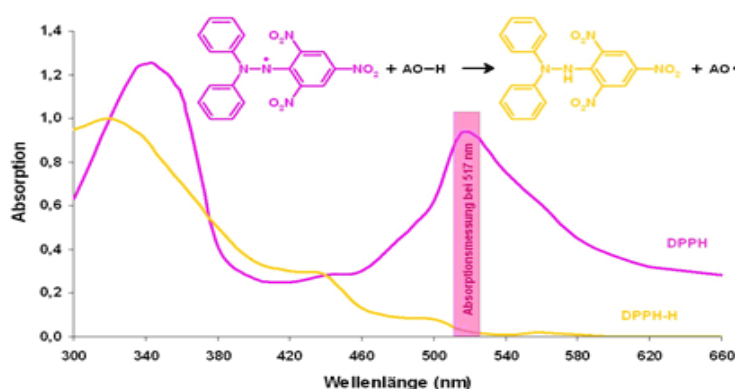
Další metodou založenou na zhasení stabilního syntetického radikálu je metoda využívající DPPH. Této metodě bude věnována následující samostatná kapitola.

2.3.3 Metoda využívající DPPH

Metoda využívající zhasení stabilního volného radikálu DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl) je považována za jednu ze základních metodik pro posouzení antiradikálové aktivity čistých látek ale i různých směsných vzorků. Je technicky velmi jednoduchá, protože v podstatě vyžaduje pouze použití UV/VIS spektrofotometru. Nicméně v případě barevných antioxidantů jako jsou např. karotenoidy, které mají spektra překrývající DPPH v jeho maximu absorbance, je výhodnější použití ESR (elektronová spinová rezonance). Neboť právě tato metoda je schopná přímo určit koncentraci volných radikálů[24].

U směsných vzorků se radikálová aktivita někdy vyjadřuje v ekvivalentech askorbové kyseliny[25] nebo s využitím kalibrační řady v jednotkách standardu Troloxu[3].

DPPH (difenylpikrylhydrazyl) je stabilní syntetický volný radikál, který se vyznačuje svým typickým intenzivně fialovým zbarvením, které je způsobeno nepárovým elektronem na dusíku hydrazylu, a maximální měřitelnou absorbancí v rozmezí 515 – 520 nm. Díky své struktuře může být akceptorem atomu vodíku a přejít tak do formy stabilní diamagnetické molekuly DPPH-H (difenylpikrylhydrazin). Testovaná látka (antioxidant) tedy reaguje s tímto radikálem, redukuje ho a současně snižuje jeho zabarvení. V literatuře je tato metoda označována též jako tzv. DPPH – test. Vzorec a absorpční spektrum DPPH je znázorněno na Obr. 11.



Obr. 11. Absorpční spektrum DPPH

2.3.4 Fyzikální metody stanovení TAA

Fyzikální metody nesledují bezprostředně chemickou reakci nebo změny obsahů jednotlivých látek. Namísto toho sledují změny fyzikálních vlastností, které tyto procesy doprovázejí. Příkladem takovýchto fyzikálních metod je např. elektronová spinová rezonance (ESR), stanovení redoxního potenciálu či chemiluminiscence, které bylo využito japonskými vědci jako metody pro stanovení intenzity oxidace lipidů.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie a přístrojová vybavení

3.1.1 Chemikálie

Tato práce byla zaměřena na sledování antioxidační aktivity u osmi vybraných vzorků pív (viz. Tabulka II.).

Tabulka II. *Seznam studovaných vzorků pív*

Název	Popis	Obsah alkoholu [% obj.]	Šarže
Bernard Free	nealkoholické pivo, nepasterizované	max. 0,5	29. 11. 08-09:57-T56
Bernard 12°	světlý ležák, nepasterizovaný	4,7	30.01. 09-09:26-T04
Budweiser Budvar 12°	světlý ležák	5,0	3.4.2009
Litovel Dark	výčepní tmavé pivo	3,8	14.01.10 7 08:01
Litovel Moravan 11°	výčepní světlé pivo	4,6	15.05.09 3 15:59
Litovel Premium 12°	světlý ležák	5,0	15.05.09 13 11:18

Litovel 13°	sváteční speciál	6,0	04.08.09 4 22:15
Krušovice 12°	světlý ležák, pasterizovaný	5,0	19.3.10 L2206092152

Při měření byly použity tyto chemikálie:

- 1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl – DPPH
(SIGMA-ALDRICH®, Steinheim, Německo)
- 6-hydroxy-2,5,7,8,-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina – Trolox
(FLUKA, Buchs, Švýcarsko)
- methanol – CH₃OH
(čistota p.a., PENTA, Chrudim, ČR)

Pro přípravu tlumivých roztoků byly použity následující chemikálie:

- kyselina fosforečná (85%) – H₃PO₄
(čistota p.a., LACH – NER, Neratovice, ČR)
- hydroxid sodný – NaOH
(čistota p.a., LACH – NER, Neratovice, ČR)
- kyselina octová (99%) – CH₃COOH
(čistota p.a., LACH – NER, Neratovice, ČR)
- octan sodný – CH₃COONa
(čistota p.a., LACH – NER, Neratovice, ČR)

3.1.2 Přístrojová vybavení

Sledování antioxidační aktivity bylo prováděno spektrofotometricky pomocí UV/VIS spektrofotometru Lambda 25 (Perkin Elmer, USA) v křemenných kyvetách tloušťky 1 cm. Naměřená data byla vyhodnocena pomocí software UV WinLab a následně graficky a matematicky zpracována programem MS Excel popř. QC Expert.

Tlumivé roztoky byly připraveny titračně pomocí pH–metru inoLab 720 s kombinovanou skleněnou elektrodou SenTix 21 (WTW, Německo).

Chemikálie byly váženy na elektronických analytických vahách značky KERN 770/GS/GJ, Max 220 g, d = 0,0001 g (Kern & Sohn GmbH, Německo).

3.2 Přípravy roztoků a úprava vzorků

3.2.1 Přípravy roztoků

Pracovní roztok volného radikálu DPPH

Pracovní roztoky volného radikálu DPPH o koncentracích $1,16 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $2,32 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byly připraveny rozpuštěním navážky pevného DPPH v methanolu. Pro dosažení úplného rozpuštění látky byla použita ultrazvuková lázeň.

Kalibrační řada standardu Troloxu

Standardní roztok Troloxu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním navážky pevného standardu v destilované vodě. Pro dosažení úplného rozpuštění látky byl roztok ponořen na cca. 5 minut do ultrazvukové lázně. Zředěné roztoky (koncentrace $5 \cdot 10^{-4}$; $3 \cdot 10^{-4}$; $2,5 \cdot 10^{-4}$; $2,25 \cdot 10^{-4}$; $1,5 \cdot 10^{-4}$; $0,75 \cdot 10^{-4}$; $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) byly získány postupným ředěním destilovanou vodou.

Tlumivé roztoky

Acetátový tlumivý roztok o pH = 4,3 byl připraven titrací $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku octanu sodného $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ kyselinou octovou na pH metru. Fosfátový tlumivý roztok o pH = 7,03 byl připraven titrací $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ kyseliny fosforečné připraveným 50% roztokem hydroxidu sodného na pH metru. Tlumivý roztok o pH = 11,03 byl následně připraven dotitrováním fosfátového tlumivého roztoku připraveným 50% roztokem hydroxidu sodného.

3.2.2 Úprava vzorků

Reálné vzorky piva byly ředěny danými tlumivými roztoky (acetátový tlumivý roztok pH = 4,3, fosfátový tlumivý roztok pH = 7,03, tlumivý roztok o pH = 11,03) vždy před měřením v následujících objemových poměrech (pivo : tlumivý roztok) 1:1, 1:2, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20. Měřeny byly také neředěné vzorky daných piv.

3.3 Pracovní postupy

3.3.1 Volba vhodného tlumivého roztoku

Před samotným měřením vzorků piv bylo potřeba zjistit, ve kterém ze tří nabízených tlumivých roztoků o různých hodnotách pH vykazuje methanolický roztok DPPH, vodný roztok standardu Troloxu a modelový vzorek piva nejvyšší stabilitu. Měření bylo provedeno metodou UV/VIS spektrometrie.

Sledování stability methanolického roztoku DPPH v tlumivých roztocích o různém pH

Sledování stability methanolického roztoku DPPH o koncentraci $1,16 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ bylo prováděno ve třech následujících tlumivých roztocích: acetátovém tlumivém roztoku o pH = 4,3, fosfátovém tlumivém roztoku o pH = 7,03 a tlumivém roztoku o pH = 11,03. Srovnávací kyveta (blank) obsahovala 2 ml MeOH a 1 ml příslušného tlumivého roztoku. Měrná kyveta obsahovala 2 ml methanolického roztoku DPPH a 1 ml příslušného tlumivého roztoku. Výsledná absorpční spektra byla sestrojena jako závislost absorbance na vlnové délce záření a jsou zobrazena v části Přílohy (viz. Příloha 1, 2, 3).

Parametry měření:

Rozsah vlnových délek: 200 – 770 nm

Počet cyklů: 10

Délka trvání jednoho cyklu: 15 min

Sledování stability vodného roztoku Troloxu v tlumivých roztocích o různém pH

Sledování stability methanolického roztoku DPPH o koncentraci $1,16 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ s přidavkem vodného roztoku standardu Troloxu o koncentraci $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ bylo prováděno opět ve třech nabízených pufrách: acetátovém tlumivém roztoku o $\text{pH} = 4,3$, fosfátovém tlumivém roztoku o $\text{pH} = 7,03$ a tlumivém roztoku o $\text{pH} = 11,03$. Srovnávací kyveta (blank) obsahovala 2 ml MeOH a 1 ml příslušného tlumivého roztoku. Měrná kyveta obsahovala 2 ml methanolického roztoku DPPH, 0,2 ml vodného roztoku standardu Troloxu a 0,8 ml příslušného tlumivého roztoku. Výsledná absorpční spektra byla sestrojena jako závislost absorbance na vlnové délce záření a jsou zobrazena v části Přílohy (viz. Příloha 4, 5, 6).

Parametry měření:

Rozsah vlnových délek: 200 – 770 nm

Počet cyklů: 18

Délka trvání jednoho cyklu: 5 min

Volba vhodného tlumivého roztoku pro měření modelového vzorku piva

Bylo proměřeno absorpční spektrum modelového vzorku piva v pracovním roztoku DPPH o koncentraci $1,16 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a v tlumivých roztocích o dvou různých hodnotách pH – acetátovém tlumivém roztoku o $\text{pH} = 4,3$ a fosfátovém tlumivém roztoku o $\text{pH} = 7,03$. Srovnávací kyveta obsahovala 2 ml MeOH a 1 ml příslušného tlumivého roztoku. Měrná kyveta obsahovala 2 ml methanolického roztoku DPPH, 0,2 ml vzorku piva a 0,8 ml daného tlumivého roztoku. Vzorek piva byl následně zředěn danými tlumivými roztoky v objemových poměrech 1:1 a 1:4 a opět bylo proměřeno jeho absorpční spektrum. Naměřená data byla zpracována jako závislost absorbance na čase.

Parametry měření:

Měřeno při vlnové délce: 519 nm

Počet cyklů: 30

Délka trvání jednoho cyklu: 1 min

3.3.2. Kalibrační závislost Troloxu

Trolox byl vybrán jako standardní antioxidační látka, ke které se obvykle vztahují hodnoty celkové antioxidační aktivity. Kalibrační řada Troloxu v koncentračním rozsahu $3 \cdot 10^{-5} - 3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byla proměřena v pracovním roztoku DPPH o koncentraci $1,16 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v acetátovém tlumivém roztoku o $\text{pH} = 4,3$ a následně fosfátovém tlumivém roztoku o $\text{pH} = 7,03$. Měření bylo provedeno pro konečnou dobu inkubace 30 a 60 min. Srovnávací kyveta obsahovala 2 ml MeOH a 1 ml příslušného tlumivého roztoku. Měrná kyveta obsahovala 2 ml methanolického roztoku DPPH, 0,2 ml vodného roztoku standardu Troloxu příslušné koncentrace a 0,8 ml daného tlumivého roztoku. Naměřená data byla zpracována jako závislost absorbance na čase pro danou koncentraci Troloxu a absorbance na koncentraci Troloxu v čase $t = 10 \text{ min}$, $t = 20 \text{ min}$, $t = 30 \text{ min}$ (popř. $t = 20 \text{ min}$, $t = 40 \text{ min}$ a $t = 60 \text{ min}$).

Parametry měření:

Měřeno při vlnové délce: 519 nm

Počet cyklů: 30

Délka trvání jednoho cyklu: 1 min/2 min

3.3.3 Nalezení vhodných podmínek pro měření modelového vzorku piva

Volba vhodné doby inkubace a sledování závislosti hodnoty TAA na ředění piva

Byla proměřena absorpční spektra modelových vzorků piv různých ředění (1:2, 1:5, 1:10, 1:20) v pracovním roztoku DPPH o koncentraci $2,32 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a fosfátovém tlumivém roztoku o $\text{pH} = 7,03$. Na základě nalezení maxima v absorpčním spektru byla zvolena pro měření konstantní vlnová délka 519 nm, která byla následně použita při všech měřeních reálných vzorků piv.

Do 10 ml odměrných baněk bylo napipetováno vždy 6,5 ml methanolického roztoku DPPH, 2,5 ml tlumivého roztoku a 1 ml piva (popř. 1 ml standardu Troloxu o příslušné koncentraci). Odměrné baňky byly promíchány a ponechány na tmavém místě.

Po uplynutí požadované doby inkubace ($t = 60$ min) byly vzorky proměřeny v křemenných kyvetách při nastavené vlnové délce 519 nm spolu s kalibrační řadou standardu Troloxu. Pro dobu inkubace $t = 60$ min byla s využitím naměřených absorbancí a rovnice lineární regrese standardu Troloxu vypočtena antioxidační aktivita neřaděných i řaděných modelových vzorků pív.

Při měření modelového vzorku piva Krušovice 12° byla doba inkubace pro srovnání postupně zkrácena o 10 minutový interval (tedy na $t = 40$ min, $t = 30$ min, $t = 20$ min, $t = 10$ min). Naměřená data byla zpracována obdobně jako v případě doby inkubace $t = 60$ min.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Optimalizace metody

4.1.1 Volba vhodného tlumivého roztoku

Z absorpčních spekter methanolického roztoku DPPH a vodného roztoku standardu Troloxu zobrazených v Příloze 1 – 6 vyplývá, že se v tlumivém roztoku o pH = 11,03 ztrácí intenzita námi sledovaného absorpčního maxima DPPH a z toho důvodu byl z dalších měření vyloučen. Další měření prokázala, že se pro měření jeví jako nejvhodnější fosfátový tlumivý roztok o pH = 7,03, který byl dále používán při měření reálných vzorků pív.

4.1.2 Vliv ředění piva na celkovou antioxidační aktivitu

Byl studován vliv ředění piva na hodnotu celkové antioxidační aktivity (vztažené na standard Trolox). Z naměřených dat vyplývá, že hodnota celkové antioxidační aktivity piva mírně vzrůstá s rostoucím ředěním piva (viz Tabulka III.)

Tabulka III. *Hodnoty TAA modelového vzorku piva Bernard Free pro různá ředění změřené metodou UV/VIS spektrometrie, doba inkubace činila 60 min.*

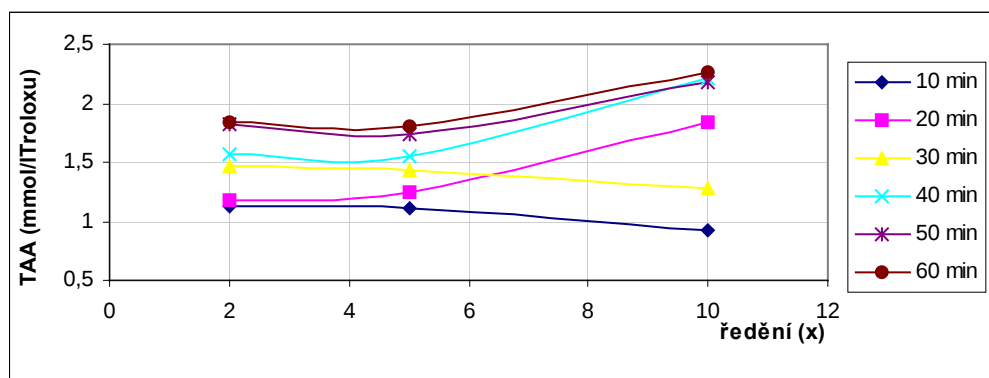
		TAA [mmol·l ⁻¹ Troloxu]	
Ředění piva	Absorbance	Ředěné pivo	Přepočet na neředěné pivo
neředěné	0,5221	0,73497	0,73497
1:2	0,7814	0,57236	1,14472
1:5	1,0852	0,38191	1,90952
1:10	1,2605	0,27199	2,71992
1:20	1,4081	0,17945	3,58894

4.1.3 Závislost na době inkubace

Byl sledován vliv doby inkubace na hodnotu TAA vybraného vzorku piva Krušovice 12°. TAA zde bylo určeno z kvadratického kalibračního modelu standardu Troloxu vypočteného pomocí programu QC Expert. Z výsledků tohoto měření zobrazených v Tabulce IV. vyplývá, že s rostoucí dobou inkubace nadále probíhá chemická reakce vedoucí k odbarvování roztoku, což by mohlo být mylně interpretováno jako nárůst celkové antioxidační aktivity piva. Grafické znázornění je uvedeno na Obr. 14.

Tabulka IV. *Vliv doby inkubace na TAA piva Krušovice 12° světlý ležák pro různá ředění piva. Hodnoty označené kurzívou byly určeny extrapolací*

Ředění	TAA [mmol·l ⁻¹ Troloxu]					
	(TAA určeno z kvadratického kalibračního modelu Troloxu)					
	Doba inkubace [min]					
	t = 10	t = 20	t = 30	t = 40	t = 50	t = 60
neředěné	1,2520	1,03160	1,2962	1,0560	0,9152	0,9178
1:2	1,1255	1,1737	1,4708	1,5747	1,8304	1,8356
1:5	1,1038	1,2479	1,4346	1,5476	1,7350	1,8092
1:10	0,9201	1,8313	1,2766	2,2075	2,1736	2,2699



Obr. 14. *Graf závislosti TAA piva Krušovice 12° světlý ležák na jeho ředění (1:2, 1:5, 1:10) pro různé doby inkubace*

4.1.4 Přesnost měření

Z naměřených hodnot absorbancí pro jednotlivá ředění modelových vzorků piva byla vypočtena relativní směrodatná odchylka RSD, odrážející přesnost metody za podmínek opakovatelnosti (viz Tabulka V.). RSD byla vypočtena podle následujícího vzorce:

$$RSD = \frac{S}{\bar{x}} \times 100 \quad (10)$$

kde S je směrodatná odchylka a $\bar{x}$ je aritmetický průměr ze sedmi opakování.

V případě piva Litovel 13° bylo provedeno paralelní stanovení (viz. Tabulka VI.).

Tabulka V. Přesnost měření určená pomocí výpočtu relativní směrodatné odchylky RSD pro počet opakování sedm a ředění 1:2, 1:5, 1:10, 1:20

Název piva	Ředění piva [v/v]	Počet opakování	Relativní směrodatná odchylka [%]
Bernard Free	1:2	7	4,52
Litovel Premium 12°	1:5	7	1,81
Litovel Moravan 11°	1:10	7	2,03
Litovel Dark	1:20	7	1,24

Tabulka VI. Paralelní stanovení piva Litovel 13° pro ředění 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, doba inkubace činila 60 minut

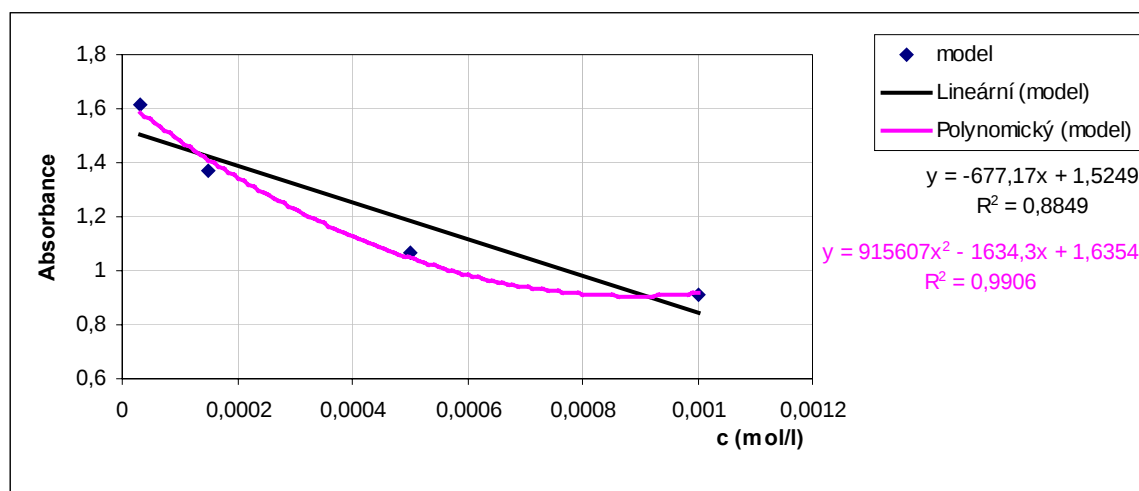
Název piva	Ředění piva [v/v]	Počet opakování	Absorbance	
Litovel 13°	1:2	2	0,7090	0,7136

Litovel 13°	1:5	2	0,9872	1,0131
Litovel 13°	1:10	2	1,3518	1,3296
Litovel 13°	1:20	2	1,5206	1,5051

4.2 Souhrn naměřených výsledků

4.2.1 Kalibrační křivka Troloxu

Kalibrační křivka standardu Troloxu byla měřena při konstantní vlnové délce 519 nm v tlumivém roztoku o pH = 7,03. Doba inkubace činila 60 minut.



Obr. 15. Kalibrační křivka standardu Troloxu v tlumivém roztoku o pH = 7,03

Kalibrační křivka standardu Troloxu je lineární v koncentračním rozsahu $3 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Rovnice lineární regrese $y = -677,17x + 1,5249$, koeficient spolehlivosti $R^2 = 0,8849$. Rovnice polynomicke regrese je $y = 915607x^2 - 1634,3x + 1,6354$, koeficient spolehlivosti $R^2 = 0,9906$.

4.2.2 Stanovení celkové antioxidační aktivity metodou DPPH

U osmi vybraných vzorků pív byla stanovena celková antioxidační aktivita (vztažená na standard Trolox) metodou DPPH. Souhrn získaných výsledků TAA jednotlivých vzorků pív pro ředění 1:2, 1:5 a 1:10 je zobrazen v Tabulce VII. Doba inkubace při měření činila 60 min.

Tabulka VII. *Hodnoty TAA určené metodou DPPH pro osm vybraných vzorků pív*

Název piva	Ředění [v/v]	TAA [mmol·l ⁻¹ Troloxu]	
		Ředěné pivo	Přepočít na neředěné pivo
Bernard Free	1:2	0,572	1,144
	1:5	0,382	1,910
	1:10	0,272	2,720
Bernard 12°	1:2	0,361	0,722
	1:5	0,333	1,665
	1:10	0,233	2,332
Budweiser Budvar 12°	1:2	0,303	0,606
	1:5	0,228	1,142
	1:10	0,171	1,710
Litovel Dark	1:2	0,538	1,076
	1:5	0,521	2,605
	1:10	0,492	4,920
Litovel Moravan 11°	1:2	0,749	1,498
	1:5	0,448	2,240
	1:10	0,257	2,567
Litovel Premium 12°	1:2	0,713	1,426
	1:5	0,449	2,245
	1:10	0,305	3,050
Litovel 13°	1:2	0,995	1,990

	1:5	0,695	3,475
	1:10	0,341	3,410
Krušovice 12°	1:2	0,951	1,902
	1:5	0,520	2,600
	1:10	0,307	3,070

4.2.3 Porovnání výsledků TAA piv naměřených metodou DPPH s cyklickou voltametrií a průtokovou coulometrií.

Výsledky TAA získané spektrofotometrickou metodou založenou na zhášení stabilního volného radikálu DPPH byly porovnány se dvěma dalšími metodami – průtokovou coulometrií a cyklickou voltametrií[26] (viz. Tabulka VIII.).

Tabulka VIII. *Hodnoty TAA určené třemi metodami pro ředění piva 1:10 (v/v), přepočítané na neředěné pivo, doba inkubace 60 minut*

Název piva	TAA [mmol·l ⁻¹ Troloxu]		
	Metoda DPPH	Průtoková coulometrie	Cyklická voltametrie [800 mV]
Bernard Free	2,72	0,42	0,92
Bernard 12°	2,33	1,63	1,16
Budweiser Budvar 12°	1,71	3,42	1,21
Litovel Dark	4,92	3,61	1,48
Litovel Moravan 11°	2,57	2,92	1,36
Litovel Premium 12°	3,05	5,19	1,48
Litovel 13°	2,96	4,30	1,73
Krušovice 12°	3,07	0,32	-

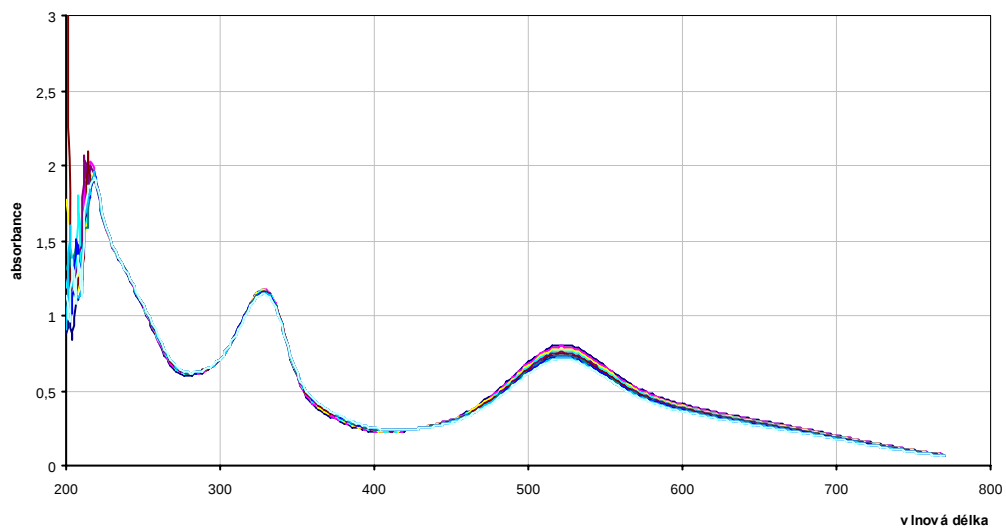
5. ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na studium antioxidační aktivity v pivu pomocí spektrofotometrické metody založené na zhášení volného radikálu DPPH. Po nalezení vhodných parametrů metody (volba vhodného tlumivého roztoku, vhodné doby inkubace a ředění piva) byla stanovena celková antioxidační aktivita osmi vybraných vzorků piva. Hodnoty TAA byly vztaženy na standardní látku Trolox a vyjádřeny v $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Troloxu (kvůli porovnatelnosti jednotlivých vzorků a metod). Získané výsledky byly porovnány s dalšími dvěma metodami – cyklickou voltametrií a průtokovou coulometrií.

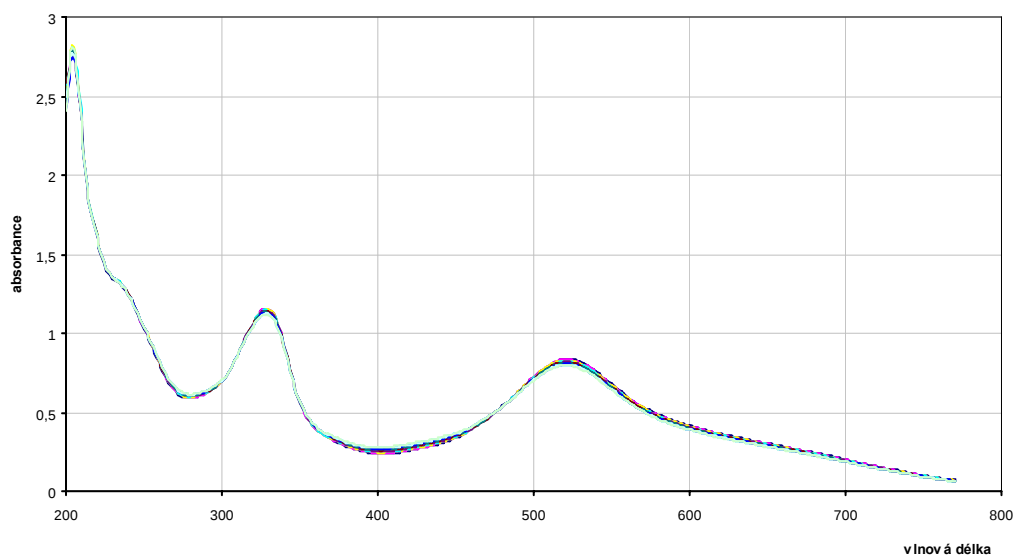
Výsledky TAA získané metodou DPPH ukazují, že s rostoucím ředěním piva a s rostoucí dobou inkubace roste mírně i hodnota celkové antioxidační aktivity. Přesnost měření metodou DPPH byla v rozsahu $\text{RSD} = 0,45 - 4,52 \%$.

Dalším možným postupem při stanovování TAA piva by mohlo být porovnání získaných výsledků naměřených metodou DPPH s metodou ABTS, která je založena na podobném principu jako metoda DPPH, konkrétně tedy na zhášení radikálového kationtu $\text{ABTS}^{+\cdot}$. Zajímavým by též bylo zjištění, zda-li by se námi používaná metoda DPPH dala použít i při měření jiných alkoholických či nealkoholických nápojů známých svými antioxidačními účinky, jako je například víno, čaj a káva.

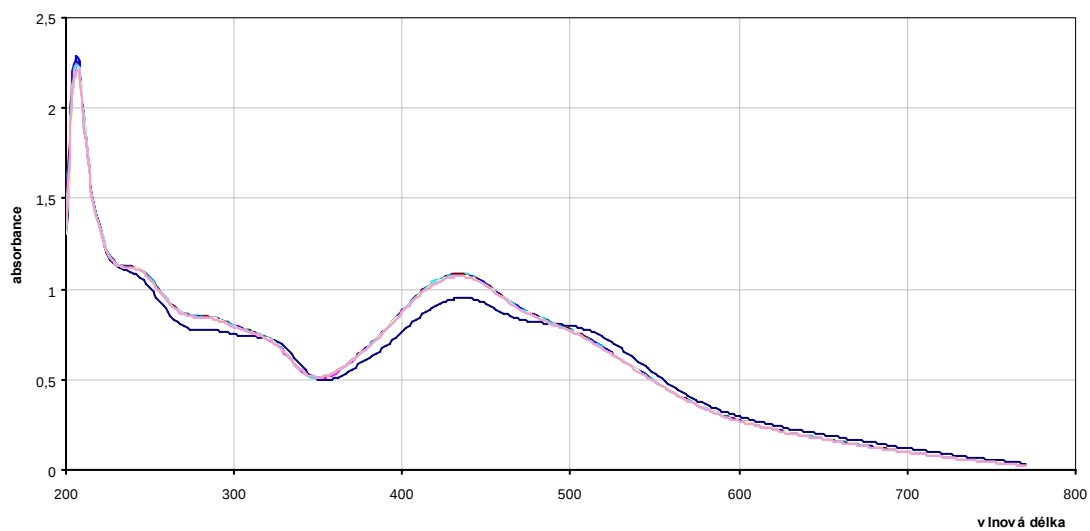
6. PŘÍLOHY



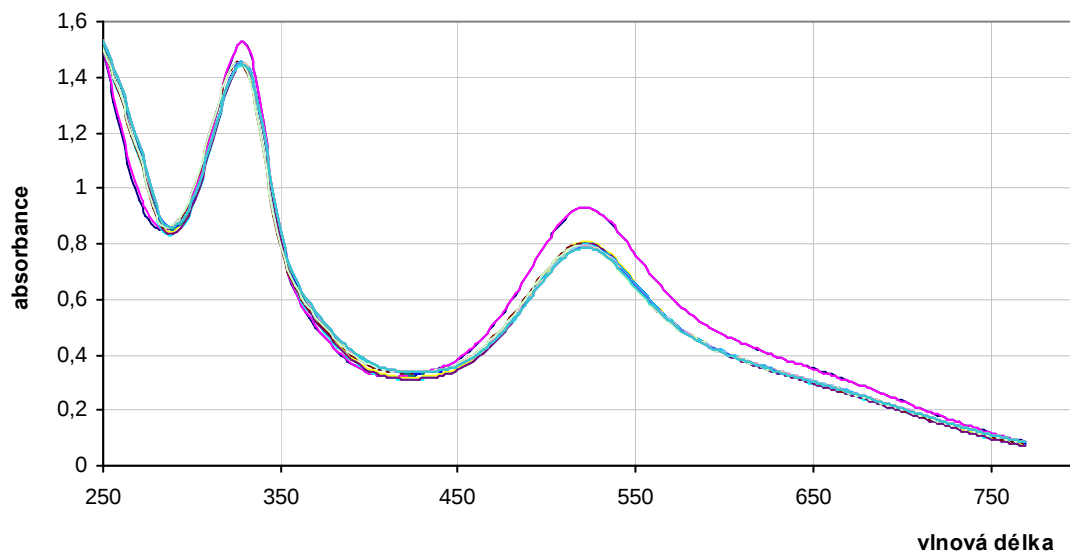
Příloha 1. *Absorpční spektrum methanolického roztoku DPPH v tlumivém roztoku o pH = 4,3*



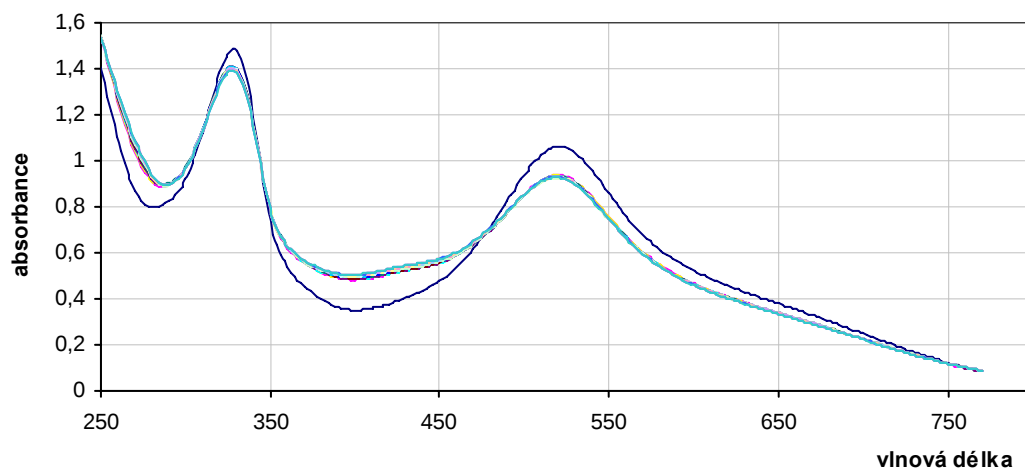
Příloha 2. *Absorpční spektrum methanolického roztoku DPPH v tlumivém roztoku o pH = 7,03*



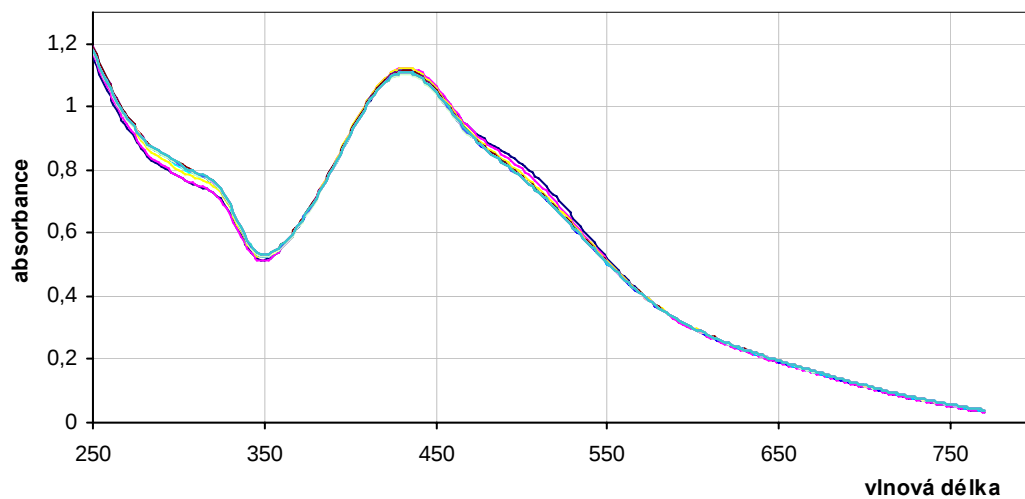
Příloha 3. Absorpční spektrum methanolickeho roztoku DPPH v tlumivém roztoku
o $pH = 11,03$



Příloha 4. Absorpční spektrum methanolickeho roztoku DPPH s přidavkem vodného
roztoku standardu Troloxu v tlumivém roztoku o $pH = 4,3$



Příloha 5. Absorpční spektrum methanolickeho roztoku DPPH s přidavkem vodného roztoku standardu Troloxu v tlumivém roztoku o $pH = 7,03$



Příloha 6. Absorpční spektrum methanolickeho roztoku DPPH s přidavkem vodného roztoku standardu Troloxu v tlumivém roztoku o $pH = 11,03$

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABTS	2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin)-6-sulfonát
DAD	detektor s diodovým polem (diode – array detektor)
DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl radikál
ESR	elektronová spinová rezonance (electron paramagnetic resonance)
FRAP	ferric reducing antioxidant power
LCAO	lineární kombinace atomových orbitalů (linear combination of atomic orbitals)
ORAC	absorpční kapacita kyslíkového radikálu (oxygen radical absorbance capacity)
β-PE	β-fykoeritrin
RSD	relativní směrodatná odchylka (relative standard deviation)
TAA	celková antioxidační aktivita (total antioxidant activity)
TAC	celková antioxidační kapacita (total antioxidant capacity)
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TPTZ	2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
RNS	reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species)
UV/VIS	ultrafialová a viditelná oblast spektra (ultraviolet and visible spectrum)
VR	volné radikály

8. LITERATURA

- [1] Fidler M., Kolářová L.: Chem. Listy **103**, 232 – 235 (2009).
- [2] Velíšek J., Hajšlová J.: *Chemie potravin II*. Osis, Tábor (2009).
- [3] Paulová H., Bochořáková H., Táborská E.: Chem. Listy **98**, 174 – 179 (2004).
- [4] Arnao M. B., Cano A., Acosta M.: Agric. Food Chem. **2**, 893 (1998).
- [5] Bekárek V., Wiedermannová I.: *Optické metody v chemické analýze*. UP Olomouc, Olomouc (2003).
- [6] Jandera P.: *Atomová a molekulová spektroskopie se zaměřením na stopovou analýzu kontaminantů. Díl B – Molekulová spektroskopie v organické analýze*. Univerzita Pardubice, Pardubice (1999).
- [7] Klouda P.: *Moderní analytické metody*. Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava (2003).
- [8] Harvey D.: *Modern Analytical Chemistry*. 1 st Ed., De Pauw University, Greencastle (2000).
- [9] Němcová I., Čermáková L., Rychlovský P.: *Spektrometrické analytické metody I*. UK, Praha (2004).
- [10] Volka K. a kolektiv: *Analytická chemie II*. VŠCHT, Praha (1995).
- [11] Skoog D. A., West D. M., Holler F. J., Crouch S. R.: *Analytical Chemistry An Introduction*. 7 th Ed., Saunders college Publishing, New York (2000).
- [12] Volka K. a kolektiv: *Analytická chemie I*. VŠCHT, Praha (1995).
- [13] Stránský Z. a kolektiv: *Analýza organických sloučenin*. UP Olomouc, Olomouc (1981).
- [14] http://physics.mff.cuni.cz/vyuka/zfp/mereni_308.pdf; staženo 23.3. 2010.
- [15] <http://projektalfa.ic.cz/fotonky.htm>; staženo 24.3. 2010.
- [16] Racek J., Holeček V.: Chem. Listy **93**, 774 – 780 (1999).
- [17] Pospíšil J.: *Antioxidanty*, Academia, Praha (1968).
- [18] Škeříková V., Grynová L., Jandera P.: Chem. Listy **98**, 343 – 348 (2004).
- [19] Karabín M., Dostálek P., Hofta P.: Chem. Listy **100**, 184 – 189 (2006).
- [20] Čepička J., Karabín M.: Chem. Listy **96**, 90 – 95 (2002).
- [21] Montanari L., Perretti G., Natella F., Guidi A., Fantozzi P.: Lebensm.-Wiss.

- U-Technol., **32**, 535 – 539 (1999).
- [22] Šulc M., Lachman J., Hamouz K., Orsák M., Dvořák P., Horácková V.:
Chem. Listy **101**, 584 – 591 (2007).
- [23] Arts M. J. T. J., Dallinga J. S., Voss H. P., Haenen G. R. M. M., Bast A.:
Food Chem. **88**, 567 – 570 (2004).
- [24] Locatelli M., Gindro R., Travaglia F., Coisson J. D., Rinaldi M., Arlorio M.:
Food Chem. **114**, 889 – 897 (2009).
- [25] Du Toit R., Volsteadt Y., Apostolides Z.: Toxicology **166**, 63 – 69 (2001).
- [26] Čevorová M.: *Sledování antioxidační aktivity průtokovou coulometrií*. Diplomová práce, UP Olomouc, Olomouc (2009).