

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2017

Veronika Lorencová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká
Katedra analytické chemie

ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA ZELENÉHO JEČMENE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce:	Veronika Lorencová
Studijní obor:	Chemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí bakalářské práce:	RNDr. Baizová Pavlína, Ph.D. RNDr. Skopalová Jana, Ph.D.

Olomouc 2017

Anotace

Cílem bakalářské práce bylo určit celkovou antioxidační aktivitu extraktu z listů mladého zeleného ječmene. Jedná se o doplněk stravy s vysokým obsahem enzymů, vitamínů, minerálů a stopových prvků v přirozené organické formě. Teoretická část se zabývá současnými poznatky o zeleném ječmeni, popisuje antioxidanty a volné radikály včetně jejich vlastností a působení v lidském organismu. Definiuje pojem celková antioxidační aktivita a uvádí přehled metod jejího určování. Experimentální část je zaměřena na zjištění celkové antioxidační aktivity vzorku zeleného ječmene Green Ways. Metodou průtokové coulometrie byl sledován vliv teploty a doby stání po přípravě vzorku na jeho celkovou antioxidační aktivitu. Maximální celkovou antioxidační aktivitu vykazoval roztok připravený při 30 °C. S rostoucí dobou od přípravy roztoku jeho celková antioxidační aktivita klesala. Nezávislé měření spektrofotometrickou metodou DPPH poskytlo výsledky srovnatelné s průtokovou coulometrií.

Annotation

The purpose of the bachelor theses was to determine total antioxidant activity of the extract from green barley leaves. It is a food supplement with high content of enzymes, vitamins, minerals and trace elements in natural organic form. Theoretical part brings current knowledge on green barley, describes antioxidants and free radicals, including their properties and influence on human organism. The concept of total antioxidant activity is explained and methods of its determination are summarized in this part. Experimental part is focused on the determination of the total antioxidant activity of Green Ways green barley samples prepared under different conditions. Two analytical methods were used: flow-through coulometry and DPPH spectrophotometric method. The first method was used to study influence of temperature and time from the preparation of green barley solution on its total antioxidant activity. Maximum total antioxidant activity was determined in the solution prepared at 30 °C. The total antioxidant activity decreased with increasing time from preparation of the solution. Independent measurement by DPPH spectrophotometric method gave results comparable to those obtained using flow-through coulometry.

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora:	Veronika Lorencová
Název práce:	Antioxidační aktivita zeleného ječmene
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce:	RNDr. Pavlína Baizová, Ph.D. RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.
Rok obhajoby:	2017
Počet stran:	39
Jazyk:	Český

Klíčová slova: zelený ječmen, antioxidační aktivita, průtoková coulometrie,
spektrofotometrie

Bibliographic information

Author's full name:	Veronika Lorencová
Title:	Antioxidant activity of green barley
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Department of Analytical Chemistry
Supervisor:	RNDr. Pavlína Baizová, Ph.D. RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.
The year of presentation:	2017
Number of pages:	39
Language:	Czech

Keywords: green barley, antioxidant activity, flow-through coulometry,
spectrophotometry

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala zcela samostatně. Veškeré literární prameny a další zdroje informací jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že tato bakalářská práce bude prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala paní RNDr. Pavlíně Baizové, Ph.D. za odborné vedení mě bakalářské práce a cenné rady během práce v laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat paní RNDr. Janě Skopalové, Ph.D. za připomínky a rady v průběhu sepisování samotné bakalářské práce.

Obsah

1 ÚVOD	1
2 TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1 ZELENÝ JEČMEN.....	2
2.2 ANTIOXIDANTY	3
2.2.1 <i>Vitamín C</i>	3
2.2.1.1 Zdroje vitamínu C.....	4
2.2.1.2 Historie vitamínu C	4
2.2.2 <i>Glutathion</i>	5
2.3 VOLNÉ RADIKÁLY	6
2.3.1 <i>Vznik volných radikálů</i>	6
2.3.2 <i>Volné radikály uvnitř lidského organismu</i>	7
2.3.2.1 Vliv volných radikálů na lidské zdraví.....	7
2.3.3 <i>Dělení volných radikálů</i>	7
2.3.3.1 <i>Reaktivní formy kyslíku</i>	8
2.3.3.1.1 <i>Hydroxylový radikál</i>	8
2.3.3.1.2 <i>Superoxidový radikál</i>	8
2.3.3.1.3 <i>Singletový kyslík</i>	9
2.3.3.2 <i>Reaktivní formy dusíku</i>	9
2.3.3.2.1 <i>Oxid dusnatý</i>	9
2.4 METODY MĚŘENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY LÁTEK	9
2.4.1 <i>Metody hodnotící schopnost eliminovat volné radikály</i>	10
2.4.1.1 <i>Metoda ABTS</i>	10
2.4.1.2 <i>Metoda DPPH</i>	11
2.4.1.3 <i>Metoda ORAC</i>	11
2.4.2 <i>Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek</i>	12
2.4.2.1 <i>Metoda FRAP</i>	12
2.4.2.2 <i>Coulometrie</i>	12
2.4.2.2.1 <i>Coulometrické titrace</i>	13
2.4.2.2.2 <i>Potenciostatická coulometrie</i>	14

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	15
3.1 PRŮTOKOVÁ COULOMETRIE	15
3.1.1 Příprava roztoků a vzorků.....	15
3.1.1.1 Příprava základního elektrolytu.....	15
3.1.1.2 Příprava zásobního roztoku L–askorbové kyseliny.....	16
3.1.1.3 Příprava kalibračního roztoku L–askorbové kyseliny	16
3.1.1.4 Příprava roztoku zeleného ječmene	16
3.1.2 Analytická laboratorní technika.....	18
3.1.3 Postup provedení experimentu	19
3.1.4 Chemikálie a pomůcky	20
3.2 METODA DPPH	21
3.2.1 Příprava roztoků a vzorků.....	21
3.2.1.1 Příprava zásobního roztoku L–askorbové kyseliny.....	21
3.2.1.2 Příprava kalibračních roztoků L–askorbové kyseliny	21
3.2.1.3 Příprava roztoku syntetického radikálu DPPH.....	22
3.2.1.4 Příprava vzorků ječmene	22
3.2.2 Postup provedení experimentu	22
3.2.3 Chemikálie a pomůcky	23
3.2.4 Analytická laboratorní technika.....	24
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	25
4.1 VÝSLEDKY COULOMETRICKÉHO MĚŘENÍ.....	25
4.1.1 Kalibrace.....	25
4.1.2 Měření vzorků.....	26
4.2 VÝSLEDKY METODY DPPH.....	31
5 ZÁVĚR	34
6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	36
7 SEZNAM LITERATURY A ZDROJŮ	37

1 Úvod

V několika posledních desetiletích se exponenciálně zvýšil výskyt civilizačních chorob. Lidské zdraví je ohrožováno mnoha nepříznivými vnějšími faktory. Inhalace znečištěného vzduchu, nedostatek pohybu, cigaretový kouř, konzumace alkoholu a nadměra stresu vede k nahromadění škodlivých volných radikálů v lidském těle.

Volné radikály, jakožto částice obsahující nepárové elektrony se vyznačují velkou reaktivností a značnou mírou tak mohou narušovat nejrůznější biologické procesy lidského organismu. Jejich účinek na lidské zdraví je negativní a mají destruktivní vliv na buňky, tkáně i celé orgány. Způsobují celou řadu chorob počínaje rakovinou. Výčet pokračuje infarktem myokardu, cévními mozkovými příhodami, nejrůznějšími srdečními chorobami, předčasným stárnutím a celkovým chátráním organismu.

Velkým trendem třetího tisíciletí se proto staly takzvané zelené potraviny. Mnoho odborníků na zdravou výživu a zdravý životní styl doporučuje zahrnout co možná nejvíce rostlinné stravy v syrovém stavu do jídelníčku. Tato strava je bohatá na nejrůznější vitamíny, minerály a především antioxidanty, které dokáží bojovat proti účinkům volných radikálů.

V tomto ohledu je velmi dobře hodnocen, zejména pro vysoký obsah zmíněných antioxidantů, zelený (mladý) ječmen. Tato plodina má celou řadu blahodárných účinků na lidské zdraví od celkového posílení imunity až po optimalizování tělesných funkcí a odkyselení organismu.

Cílem práce je stanovit jakou antioxidační aktivitu vykazuje extrakt z mladého ječmene. Zkoumány jsou také vnější vlivy: teplota a doba stání od přípravy roztoku. Respektive jak tyto vnější podmínky ovlivní koncentraci antioxidantů ve vzorku. Jako adekvátní analytická metoda pro tyto účely byla vybrána průtoková coulometrie, ke které byla po uvážení zvolena jako srovnávací spektrofotometrická metoda DPPH.

2 Teoretická část

2.1 Zelený ječmen

Pojem zelený neboli mladý ječmen (*Obr. 1*) označuje ranou fázi běžně pěstované kulturní rostliny ječmene setého (*lat. Hordeum vulgare*). Nezralá forma této obiloviny je zcela zelená a její sklizeň by z hlediska výroby potravin postrádala smysl, ale vzhledem k tomu, že obsahuje mnoho zdraví prospěšných látek, využívá se k výrobě potravinových doplňků a řadí se tak mezi tzv. zelené potraviny, které si našly široké uplatnění v přírodní medicíně. Mezi zelené rostliny dále patří např. mladá pšenice, spirulina nebo chlorella. ¹



Obr. 1: Nezralá forma ječmene setého.

Zelený ječmen je bohatý především na obsah vitamínů. Konkrétně lze zmínit vitamíny typu B, vitamín C (L-askorbová kyselina), E (tokoferol) nebo vitamín K (fylochinon). Mimo to obsahuje mladý ječmen i celé spektrum minerálních látek, jako je draslík, vápník, železo, měď, fosfor, mangan nebo hořčík. Neméně důležitý je i obsah α -aminokyselin, včetně 8 esenciálních, které si lidské tělo není schopno syntetizovat samo a je tedy nezbytné tyto látky přijímat formou potravy. Aminokyseliny tohoto typu podporují například hojení ran a jsou nezbytné i pro správnou funkci imunitního systému, kdy se uplatňují mimo jiného při tvorbě erytrocytů. ²

Důležitý je vysoký obsah chlorofylu. Jedná se o zelený pigment přítomný ve všech zelených rostlinách, který významně ovlivňuje oxysličení tkání, zlepšuje funkci srdce i cév, urychluje hojení popálenin, snižuje bolest při poraněních kůže a díky svým antiseptickým vlastnostem pomáhá bojovat proti zánětlivým onemocněním.^{3,4}

V neposlední řadě je ceněnou vlastností zeleného ječmene schopnost alkalizovat organismus, čímž pomáhá udržovat acido–alkalickou rovnováhu vnitřního prostředí lidského organismu. Díky tomu se snižuje možnost výskytu kvasinek, zánětů, ale i rakovinotvorného bujení.^{3,4}

2.2 Antioxidanty

Antioxidanty jsou molekuly, které jsou schopny rušit účinky oxidační destrukce látek, či tento jev v určité míře potlačovat. Na nechtěné oxidaci samostatných látek, ale i celých buněk uvnitř lidského organismu se největší měrou podílí tzv. volné radikály. Antioxidanty dokáží převést volné radikály do méně reaktivní formy či zcela předcházet jejich vzniku.⁵

Existuje velké množství přírodních antioxidantů, z nichž většinu přijímáme do organismu spolu s potravou. Mezi látky, které disponují velkým antioxidačním potenciálem patří polyfenolické sloučeniny. Ty se ve velké míře vyskytují v ovoci, zelenině, čaji, vínu nebo chmelu. Dalším významným zdrojem antioxidantů jsou některé vitamíny. Řadíme mezi ně vitamín A, E, C nebo B3. V neposlední řadě má velkou antioxidační aktivitu peptid glutathion a další.⁶

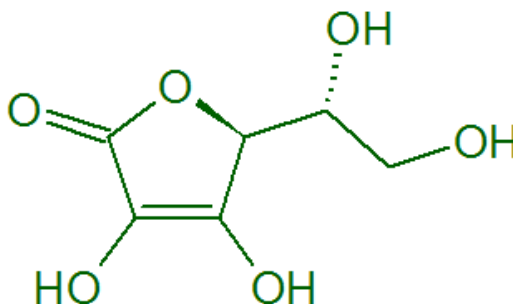
Tyto látky jsou mezi sebou porovnávány prostřednictvím tzv. celkové antioxidační aktivity (Total Antioxidant Activity – TAA), což je veličina, která definuje vzorek dle míry, jakou dokáže eliminovat účinky volných radikálů či jejich existenci a stal se tak měřítkem pro srovnávání antioxidačních schopností všech antioxidantů.^{7,8}

2.2.1 Vitamín C

Vitamín C patří mezi ve vodě rozpustné vitamíny. Jeho nadbytek v lidském organismu je vyloučen močí, a proto se u něj nesetkáváme s předávkováním. Málo obvyklá je v tomto

případě pouze mírná hypervitaminóza, která se projevuje slabým podrážděním zažívacího ústrojí. Na druhou stranu dlouhodobý nedostatek vitamínu C v potravě lidí způsobuje kurděje. Latinský název pro tuto nemoc zní skorbut, odkud pochází i označení vitamínu C jako askorbová kyselina (Ascorbic Acid– AA). Jedná se o onemocnění spojené s poruchou krvetvorby a snížením imunity. Vede ke krvácení z dásní, do nehtových lůžek, tkání či svalů. Tato choroba je dnes již téměř vymýcena a vyskytuje se výjimečně v zemích třetího světa.^{9,10}

Vitamín C (*Obr. 2*) posiluje obranyschopnost organismu, umožňuje využití železa z potravy, napomáhá správné činnosti mozku a pružnosti kůže a má protizánětlivé účinky. Je nezbytný pro správné fungování imunitního systému a chrání tkáň, především centrální nervovou soustavu, před vlivem volných radikálů, čemuž odpovídá jeho vysoká antioxidační aktivita.¹¹



Obr. 2: Vitamín C (L–askorbová kyselina).

2.2.1.1 Zdroje vitamínu C

Významnými zdroji vitamínu C jsou plody rakytníku, šípek, syrová i vařená brokolice, citrusové plody, brambory vařené ve slupce, syrové zelí, růžičková kapusta, květák, zelený hrášek, rajčata, banány, ananas a další ovoce a zelenina.¹²

2.2.1.2 Historie vitamínu C

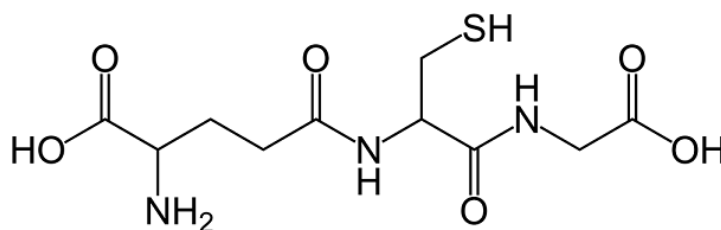
Jedná se o úplně první vitamín, který byl objeven. Stalo se tak roku 1928 a o jeho objevení se zasloužil maďarský biochemik Albert Szent-Györgyi. V této době byl označen jako hexuronická kyselina. Fakt, že se jedná o stejnou látku, která zabraňuje kurdějím byl prokázán

až o několik let později. Askorbová kyselina byla navíc ze všech vitamínů jako první uměle připravena v laboratoři (Haworth, Reichstein, 1933).^{9,13}

Člověk, jako jeden z mála savců, si nedokáže vitamín C syntetizovat v těle a musí se tak spolehnout pouze na přísun vitamínu v potravě. Rozsáhlé vědecké výzkumy prokázaly, že naši předkové také disponovali schopností vytvářet vitamín C z jednodušších látek přijímaných spolu s potravou. Postupem času tuto schopnost, z dosud nejasných příčin, lidé ztratili. Jedna z teorií uvádí, že dříve byly rostliny mnohem bohatější na obsah vitamínu C než dnešní kultivované rostliny, a proto lidský organismus v průběhu evoluce o tuto svoji schopnost, nejspíše následkem sledu mutací, přišel.^{11,14}

2.2.2 Glutathion

V mnohé odborné literatuře zabývající se lékařstvím je látka glutathion (*Obr. 3*) popisována jako jeden z hlavních antioxidantů v lidském těle. Četné vědecké výzkumy potvrdily blahodárný účinek této látky na zdraví člověka. Byl potvrzen jeho kladný vliv při léčbě srdečních chorob či demence. Mluví se o něm i jako o podpůrné látce při zvládnutí Alzheimerovy choroby a vyloučen není ani jeho podpůrný vliv při zvládnutí těžkých stavů autismu.¹⁵



Obr. 3: Glutathion.

Jedná se o tripeptid, je to tedy látka složená ze tří aminokyselin. Jsou jimi glutamová kyselina, cystein a glycin. Lidské tělo si dokáže glutathion samo syntetizovat v játrech, ale je

obsažen i v některých potravinách jako je brokolice, květák a jiná košťálová zelenina. V neposlední řadě se vyrábí i doplňky stravy s obsahem glutathionu.¹⁶

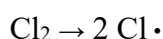
Důležitou roli sehrává glutathion v metabolismu xenobiotik. Mění je na ve vodě rozpustné formy a tím výrazně usnadňuje jejich vyloučení z těla. Navíc glutathion funguje jako koenzym enzymu galathion peroxidázy, který dokáže přeměnit jedovatý peroxid vodíku na vodu a molekulární kyslík.^{16,17}

2.3 Volné radikály

Volný radikál je takový atom, ion či molekula, jež má v některém ze svých orbitalů jeden (či více) nepárových elektronů. Většinou jsou značeny tečkou u chemického vzorce, např. methylový radikál $\text{CH}_3\cdot$. Jsou to částice schopné samostatné existence, ale kvůli přítomnosti nepárových elektronů podléhají velice snadno chemickým reakcím ve snaze získat další elektrony, díky čemuž přejdou do stabilnější elektronové konfigurace. Jsou to tedy částice disponující velkou reaktivností a tím pádem nevelkou dobou existence a značnou mírou přispívají k oxidačně-redukčním dějům v prostředí, ve kterém se nacházejí. Volné radikály reagují jednak spolu navzájem, většinou za vytvoření elektroneutrální molekuly, nebo reagují právě s neutrální molekulou za vzniku nového volného radikálu. Tento děj je řízen řetězovým reakčním mechanismem.¹⁸⁻²¹

2.3.1 Vznik volných radikálů

Volné radikály mohou vznikat několika způsoby. Nejčastější příčinou jejich vzniku je rovnoměrné rozvolnění vazby mezi dvěma vazebnými partnery. Vazba je rozrušena v polovině a každý z přítomných vazebných partnerů si ponechá jeden elektron. Molekula se rozpadá za vzniku dvou volných radikálů. Tento jev se nazývá homolýza, popř. homolytické štěpení a je nejčastěji vyvolána ozářením molekuly, např. molekuly chloru, elektromagnetickým zářením o vhodné energii.



Dále je vznik možný redukcí, kdy dochází k přidání jednoho elektronu, nebo naopak chemickou oxidací, tedy odebráním jednoho elektronu z elektronového obalu.^{19,21}

2.3.2 Volné radikály uvnitř lidského organismu

Přítomnost volných radikálů uvnitř lidského těla může být způsobena jejich přijetím z vnějšího prostředí. Děje se tak jednak jejich konzumací, pokud jsou přítomny v jídle či pitné vodě. To bývá způsobeno přepalováním tuků a olejů při přípravě jídla či používáním nevhodných plastových obalů při jeho uchování. Do lidského těla se mohou dostat i jako chemické látky, které byly používány při pěstování plodin a ty byly před konzumací špatně umyty. Velmi častá je i jejich inhalace při pobytu v znečištěném prostředí.²²

Ke vzniku volných radikálů dochází i uvnitř lidského organismu, a to především vlivem kouření, dopadem ionizujícího nebo ultrafialového záření na pokožku či přemírou stresu.^{22, 23}

2.3.2.1 Vliv volných radikálů na lidské zdraví

Působení volných radikálů je ve většině případů negativní a jejich přítomnost v organismu nechtěná. Mezi nejčastější projevy jejich destruktivního vlivu patří vznik nádorových onemocnění, kdy podporují rakovinou tvorné bujení, nebo větší riziko vzniku neurodegenerativních onemocnění mozku. Volné radikály poškozují buňky i celé tkáně, narušují stavbu buněčných membrán. Rozsáhlé výzkumy potvrdily jejich vliv na vznik srdečních a plicních onemocnění. Jsou příčinou celkového chátrání organismu spojeného s jeho předčasným stárnutím.^{24, 25}

2.3.3 Dělení volných radikálů

Velká pozornost se v dnešní době upíná především na látky, které nazýváme reaktivní formy kyslíku (ROS– Reactive Oxygen Species) a reaktivní formy dusíku (RNS– Reactive Nitrogen Species) souhrnně označované jako RONS (Reactive Oxygen and Nitrogen Species). Tato skupina látek zahrnuje volné radikály, ale i látky neradikálové, které snadno oxidují jiné atomy či molekuly nebo se na volné radikály přeměňují. Proto používáme pojem reaktivní formy namísto nepřesného označení kyslíkové a dusíkové radikály.^{21, 26}

2.3.3.1 Reaktivní formy kyslíku

Z volných radikálů jsou pro biologický systém nejvíce škodlivé radikály kyslíkové. Jedná se zejména o volný radikál superoxidu ($\cdot O_2^-$), hydroxyly ($\cdot OH$) a hydroperoxyly ($\cdot O_2H$). Řadíme sem i radikály peroxylové ($ROO\cdot$) či alkoxylové ($RO\cdot$). Tyto skupiny volných radikálů vznikají při oxidaci nenasycených mastných kyselin. Poškození způsobené kyslíkovými radikály označujeme jako oxidativní destrukce. Mezi reaktivní formy kyslíku patří peroxid vodíku (H_2O_2), ozon (O_3) či kyselina chlorná ($HClO$).²⁷

2.3.3.1.1 Hydroxylový radikál

V mnohé odborné literatuře bývá jako nejreaktivnější forma kyslíku označován hydroxylový radikál ($\cdot OH$). Byl potvrzen jeho devastující vliv na všechny biologicky významné molekuly v lidském těle jako jsou proteiny, lipidy či deoxyribonukleová kyselina. Tento radikál působí oxidační poškození v místě svého vzniku, což odpovídá jeho poločasu životnosti uvnitř buněk (10^{-9} s). V živých organismech může vznikat několika způsoby. Mezi běžné patří vznik radiačním zářením či reakcí kyseliny chlorné se superoxidem. Velmi častý je i vznik tzv. Fentonovou reakcí – redukcí peroxidu vodíku v přítomnosti iontů tranzitních kovů (např. Fe^{2+}).²⁸

2.3.3.1.2 Superoxidový radikál

Superoxidový radikál ($\cdot O_2$) vzniká z molekuly kyslíku přijetím jednoho elektronu. Tento proces se dá označit jako jednoelektronová redukce. Sama molekula kyslíku O_2 se řadí mezi diradikály (obsahuje dva nepárové elektrony), ale díky zvláštnímu uspořádání elektronů v obalu se jedná o částici poměrně stabilní. V biologických systémech může procházet přes buněčné membrány. V lidském organismu bývá účinně odstraňován enzymem superoxidodismutase. Tento enzym je schopen rozložit dva superoxidové radikály za vzniku dvou molekul kyslíku a jedné molekuly peroxidu vodíku, který bývá odstraněn jiným řetězcem reakcí. Superoxid je produkován mitochondriemi jako nechtěný vedlejší produkt jejich činnosti.^{28, 29}

2.3.3.1.3 Singletový kyslík

Singletový kyslík se vyznačuje jiným uspořádáním valenčních elektronů oproti kyslíku v tripletovém stavu. Jedná se o excitovanou formu kyslíku, ve které je excitace molekuly doprovázená spárováním dvou elektronů v protivazebném π^* orbitalu, které se před tím vyskytovaly jako elektrony nepárové v protivazebných orbitalech. Singletový kyslík je tedy méně stálý a je silnějším oxidačním činidlem než kyslík v základním stavu.²⁸

2.3.3.2 Reaktivní formy dusíku

Mezi reaktivní formy dusíku patří kyselina dusitá (HNO_2), oxid dusičný (N_2O_5) či nitrosyl NO^+ . Skupina volných radikálů dusíku poté zahrnuje částice jako oxid dusnatý $NO\cdot$ nebo oxid dusičitý $NO_2\cdot$.²⁸

2.3.3.2.1 Oxid dusnatý

Oxid dusnatý vzniká při reakci katalyzované nitroxidsynthasou, ve které dochází k přeměně argininu na citrullin. Oxid dusnatý v lidském organismu dopomáhá šíření nervových vzruchů v centrální nervové soustavě a má protizánětlivý účinek. Jistou měrou působí jako antagonist a vůči superoxidu. Zatímco oxid dusnatý napomáhá rozšiřování cév, superoxid má účinky vazokonstrikční.²¹

2.4 Metody měření antioxidační aktivity látek

Antioxidační aktivita látek je v posledních letech velmi atraktivním tématem pro celou řadu vědeckých disciplín, a proto se vyvinulo, a stále vyvíjí, mnoho analytických metod pro stanovení této vlastnosti látek. Různorodost těchto metod vyplývá z množství různých mechanismů, kterými antioxidanty mohou v organismu působit. Nejběžnějším typem reakce je přímá reakce s volnými radikály, tedy jejich vychytávání či zhášení.^{7, 8}

2.4.1 Metody hodnotící schopnost eliminovat volné radikály

Tyto metody jsou založeny na vycytávání volných radikálů složkami vzorku, což je většinou umožněno donací protonu. Radikály jsou do reakční směsi přidávány nebo mohou být generovány přímo reakční směsí. Nejčastěji se využívá eliminace kyslíkových nebo syntetických stabilních radikálů. ⁷

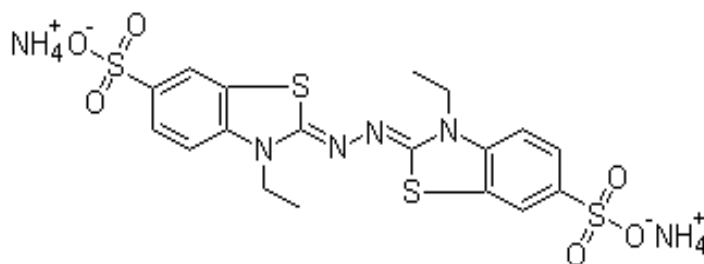
2.4.1.1 Metoda ABTS

Metoda ABTS je hojně využívána při analýze v oblasti studia antioxidační aktivity a je založena na schopnosti antioxidantů zhaset radikálový kation $ABTS^{\cdot+}$ (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát) radikál). ⁸

V této metodě se používá přímé generování volných radikálů oxidací ABTS (Obr. 4), což lze provést např. MnO_2 nebo systémem H_2O_2 /peroxidáza. ⁵

Někdy se také můžeme setkat s označením metody ABTS jako ABTS-TEAC, a to z toho důvodu, že se zde zjišťuje zhasací schopnost antioxidantů, což se porovnává se zhasací schopností TROLOXU (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina). Odtud poté označení TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity). ^{30,31}

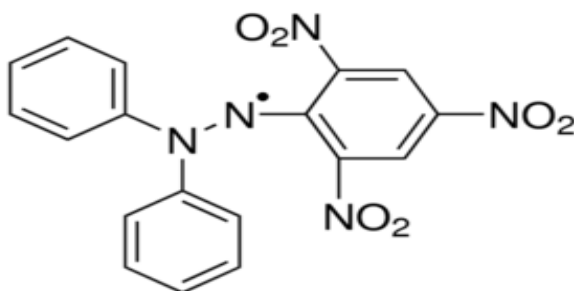
Pro stanovení antioxidační aktivity se zde nabízí stanovení spektrofotometrické, neboť radikál $ABTS^{\cdot+}$ silně absorbuje elektromagnetické záření ve viditelné oblasti spektra (absorpční maximum při 734 nm). Po proběhnutí reakce se inaktivace barevného radikálu antioxidanty projeví snížením absorbance. ³²



Obr. 4: Molekula ABTS

2.4.1.2 Metoda DPPH

Metoda DPPH je označována za základní metodu při měření antioxidační aktivity čistých látek i směsí obecně. Tento test je založen na faktu, že volný stabilní radikál DPPH (Obr. 5) (2,2'-difenyl-1-pikrylhydrazyl) je schopen reagovat s částicemi, které zde vystupují jako dárci atomu vodíku, jedná se tedy o redukční proces za vzniku systému DPPH-H (difenylpikrylhydrazin). Tato reakce vykazuje větší selektivitu než výše zmíněná metoda ABTS. Pro sledování této reakce se nejčastěji používají spektrofotometrické metody. Roztok DPPH má tmavě fialové zbarvení s absorpčním maximem při vlnové délce 515 nm. Při reakci s antioxidanty se sleduje úbytek absorbance při této vlnové délce. Reakci je možné sledovat též jinou metodou, např. HPLC, což je výhodné zejména u barevných vzorků.^{6, 32, 33}



Obr. 5: Radikál DPPH.

2.4.1.3 Metoda ORAC

Při metodě ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) se zjišťuje schopnost testované látky zpomalit či zcela zastavit tvorbu volných radikálů. Ty se do reakční směsi nepřidávají, ale jsou v ní přímo generovány. Jedná se o kyslíkové radikály, nejčastěji hydroxylové nebo peroxylové. Oba typy patří k nejreaktivnějším radikálům, proto se stala metoda ORAC velmi významnou analytickou metodou, která poskytuje cenné informace o antioxidační kapacitě širokého spektra vzorků. S omezením, která se stýkají polyfenolových sloučenin, kde je problém menší fotostabilita.^{7, 8, 34}

Základem analýzy je sledování fluorescence β -fykoerythrinu (β -PE), která v čase klesá kvůli reakcím s radikály. Jako generátory radikálů se nejčastěji využívají AAPH (2,2'-azobis(isobutyrimidamid)-dihydrochlorid) u radikálů peroxylových nebo systém H_2O_2 obohacený o měďnaté kationty při generaci radikálů hydroxylových.^{7, 8, 34}

2.4.2 Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek

Antioxidanty využívané v těchto reakcích lze popsat jako chemická činidla s redukčními vlastnostmi, které reagují s oxidanty, redukuje je a tím dochází k inaktivaci oxidantů. Můžeme tedy hovořit o posuzování antioxidační aktivity látek z hlediska redukčních schopností těchto látek.⁷

2.4.2.1 Metoda FRAP

Tato metoda je založena na redukci železitého, téměř bezbarvého, komplexu TPTZ [2,4,6-tri-(2-pyridyl-1,3,5-triazin)] na barevné komplexy železnaté. Vyhodnocení testu FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) je nevýhodné potřebou pracovat ve velmi nízkých nefyziologických hodnotách pH. Metoda je nevýhodná i kvůli tomu, že nejsou v reakci zachyceny látky, které reagují s komplexem pomalu, např. polyfenoly. Proto tato metoda nemusí poskytovat přesné informace o celkové antioxidační aktivitě vzorku jako celku, ale charakterizuje pouze schopnost látek redukovat železitý komplex TPTZ. Jako zdroj železitých iontů se zde používá hexakyanoželezitan draselný, popřípadě chlorid železitý.^{5, 7, 32}

2.4.2.2. Coulometrie

Coulometrie je jednou ze základních elektroanalytických metod, která využívá měření elektrického náboje, jenž je potřebný k úplné přeměně stanovované látky. Přeměnou látky rozumíme transformaci na jinou formu této látky v odlišném oxidačním stupni v důsledku procesu elektrolýzy, která probíhá na pracovní elektrodě. Zjištěný náboj se pomocí Faradayova zákona přepočte na hmotnost látky. Pro bezchybné uplatnění Faradayova zákona požadujeme, aby na pracovní elektrodě probíhala vždy pouze jediná reakce se 100% proudovým výtěžkem,

jinými slovy veškerý náboj, který projde elektrodou, musí být použit jen na příslušnou přeměnu analytu. Rušivou vedlejší reakcí, která by zkreslila výsledky měření, by mohl být např. rozklad rozpouštědla nebo rozpouštění elektrody, k čemuž dochází při nevhodné volbě pH.³⁵⁻³⁷

2.4.2.2.1 Coulometrické titrace

Při coulometrických titracích je hodnota elektrického proudu předem zvolena a po celou dobu analýzy se tato hodnota udržuje konstantní. Jsou dvě možné varianty, jak může stanovovaná složka reagovat. Pokud reakce probíhá přímo na elektrodě, hovoříme o tzv. titracích primárních. Jejich využití v praxi ale není příliš široké, jelikož se tímto způsobem dá stanovit pouze malé množství látek. Druhou, běžnější variantou jsou titrace sekundární, při kterých reaguje analyzovaná složka s činidlem, které bylo generováno na jedné z elektrod.³⁵

Metoda nese název coulometrické titrace, neboť připomíná klasické titrace, ale s tím rozdílem, že se titrační činidlo generuje přímo v roztoku na elektrodě, polarizované konstantním proudem. Látka, ze které je titrační činidlo generováno, musí být v daném roztoku rozpuštěna, a to ve velké přebytku. Vzniklé činidlo poté okamžitě reaguje s analyzovanou látkou. Přímá generace přináší několik zjednodušení, např. odpadá nutnost standardizovat činidla, titraci lze provést i těkavými či nestálými činidly a může být i snadno zautomatizována.^{35, 37}

Hlavní výhodou je ale přesnost. Prošlý náboj se stanoví přesněji než spotřeba činidla z byrety, proto jsou meze detekce nižší u coulometrických titrací než u titrací klasických. Ke stanovení bodu ekvivalence se využívají jako obvykle barevné indikátory, nebo se tak děje pomocí instrumentálních metod jako jsou potenciometrie nebo amperometrie. Coulometrické titrace našly uplatnění u neutralizačních, srážecích, komplexotvorných i redoxních metod odměrných stanovení.^{35, 36}

2.4.2.2.2 Potenciostatická coulometrie

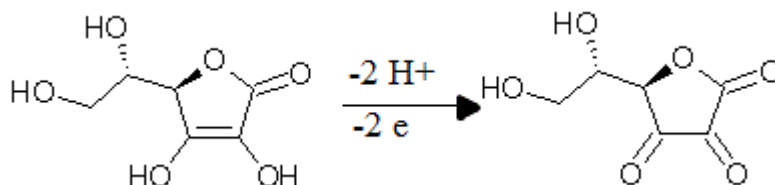
Metoda potenciostatické coulometrie je vlastně elektrolýza za konstantního potenciálu na pracovní elektrodě. Ten je na své neměnné hodnotě udržován pomocí potenciostatu. Volí se taková hodnota potenciálu, při které teče elektrodou limitní proud elektrolyzované látky, takže v průběhu reakce proud exponenciálně klesá v souladu s tím, jak v systému ubývá stanovované látky. Celkový elektrický náboj, který byl potřebný k úplné přeměně analyzované složky, se poté vypočte integrací křivky, která vznikne v grafu závislosti proudu na čase. Součástí moderních přístrojů bývá elektronický integrátor, který tento výpočet provede již automaticky.^{35,36,38}

3 Experimentální část

V experimentální části této bakalářské práce bylo cílem zjistit jakou celkovou antioxidační aktivitou disponuje vzorek zeleného ječmene Ječmen Green Ways. Laboratorní měření bylo provedeno dvěma analytickými metodami. První metodou bylo elektrochemické měření roztoku zeleného ječmene pomocí průtokové coulometrie, při které byla pozornost zaměřena na zkoumání vnějších vlivů, tedy na teplotu a čas. Jako srovnávací metoda byla využita metoda DPPH, která se realizuje pomocí spektrofotometrického měření.

3.1 Průtoková coulometrie

Metoda je založena na kvantitativní redoxní přeměně analytu konstantním proudem. Jako standardní látka, s níž se srovnávala antioxidační aktivita vzorku, byla použita L-askorbová kyselina. Ta se konstantním proudem oxiduje na povrchu pracovní elektrody na dehydroaskorbovou kyselinu (*Obr. 6*).



Obr. 6: Oxidace askorbové kyseliny na dehydroaskorbovou kyselinu.

3.1.1 Příprava roztoků a vzorků

3.1.1.1 Příprava základního elektrolytu

Základní elektrolyt pro coulometrické měření byl připraven navážením 1 g šťavelové kyseliny a 5,844 g chloridu sodného a kvantitativním převedením obou těchto látek do jedné litrové odměrné baňky. Po jejich rozpuštění v malém objemu vody byl přidán 1 ml tritonu X- 100. Po vymizení pěny byla odměrná baňka opatrně doplněna destilovanou vodou po rysku.

3.1.1.2 Příprava zásobního roztoku L–askorbové kyseliny

Zásobní roztok, jehož výsledná koncentrace byla 10 g/l byl připraven navážením 0,25 g L-askorbové kyseliny a následným kvantitativním převedením této navážky do baňky o objemu 25 ml. Kyselina byla nejprve rozpuštěna v malém množství destilované vody a až poté byl roztok vodou doplněn po rysku.

3.1.1.3 Příprava kalibračního roztoku L–askorbové kyseliny

Před každým coulometrickým měřením byl ze zásobního roztoku připraven nový roztok kalibrační. Pomocí automatické pipety bylo odpipetováno 50 μ l zásobního roztoku do čisté 25 ml odměrné baňky a tento obsah byl následně doplněn po rysku základním elektrolytem. Výsledná koncentrace kalibračního roztoku tedy byla 20 mg/l.

3.1.1.4 Příprava roztoku zeleného ječmene

Pro každé elektrochemické měření bylo nezbytné připravit si vzorek zeleného ječmene. Nejprve byl na analytických vahách navážen 1 g ($\pm 0,0010$ g) ječmene. Ječmen Green Ways je prodáván v práškové formě, případné hrudky byly rozmělněny lžičkou na jemný prášek. Poté byla tato navážka kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 25 ml a doplněna po rysku základním elektrolytem. Ječmen byl v elektrolytu rozmíchán. Následně byl pevný podíl zfiltrován přes filtrační papír a získaný filtrát byl filtrován znovu, a to protlačení přes mikrofiltr pomocí injekční stříkačky. Vzorek v této podobě už byl připraven k analýze.

Pro sledování vnějších vlivů na ječmen byly připraveny vzorky různými postupy. Pro sledování časové závislosti byly měřeny vzorky jednak ihned po filtraci, což odpovídá cca 30 minutám od rozpuštění ječmene v elektrolytu, dále po dvou a dvaceti čtyřech hodinách od rozpuštění. Vzorek nebylo možno měřit okamžitě, neboť přítomnost nerozpustných suspendovaných částic by způsobila ucpání porézní uhlíkové elektrody. Půlhodinová prodleva mezi rozpuštěním a měřením byla potřebná pro filtraci vzorku. Pro toto měření byl vždy použit elektrolyt o stejné teplotě (25 °C), aby nedocházelo k ovlivnění výsledků změnou teploty. Pro každý časový údaj byly měřeny tři vzorky a každý z těchto vzorků byl měřen třikrát (*Tab. I*).

Tab. I: Série vzorků pro měření časové závislosti antioxidační aktivity ječmenného roztoku

Vzorek	Doba mezi přípravou a měřením
1a 1b 1c	30 minut
2a 2b 2c	2 hodiny
3a 3b 3c	24 hodin

Dalším sledovaným vnějších vlivem byla teplota. Pro měření této závislosti byl použit stejný postup přípravy, lišila se pouze teplota elektrolytu, ve kterém se navážený ječmen rozpouštěl. Pro každou teplotu byly připraveny opět tři různé vzorky a každý z nich byl měřen celkem třikrát. Použité teploty uvádí následující tabulka (*Tab. II*).

Tab. II: Teplota elektrolytu použitého k přípravě jednotlivých vzorků

Vzorek	Teplota elektrolytu
4a 4b 4c	25 °C
5a 5b 5c	30 °C
6a 6b 6c	50 °C
7a 7b 7c	80 °C

3.1.2 Analytická laboratorní technika

K coulometrickému měření byl využit elektroanalytický přístroj EcaFlow 150 GLP (*Obr. 7*) od slovenské firmy Istran (Istran, Bratislava). Tento analyzátor je řízený počítačem pomocí programu EcaFlow Autosampler. Byla použita kompaktní průtoková měřicí cela s pracovní porézní uhlíkovou elektrodou E56C. Tato elektroda je lehce vyměnitelná za novou. V měřicí cele se dále nachází platinová pomocná a referentní argentschloridová elektroda. Před měrnou celou byl připojen stříkačkový mikrofiltr.



Obr. 7: Analyzátor EcaFlow 150 GLP.

U přístroje EcaFlow 150 GLP se nachází tři přívodné teflonové hadičky, které jsou opatřeny různě barevnými kroužky (červená, žlutá, modrá) a slouží k nasávání základního elektrolytu, kalibračního roztoku i vzorku samotného. Dle potřeby a druhu analýzy se potom tyto hadičky vkládají do příslušných kádinek. Nasávání kapaliny je umožněno peristaltickým čerpadlem, které vede roztoky přes ventil do měřicí cela.

Pro odebrání malých objemů během přípravy kalibračního roztoku byly využity automatické pipety Eppendorf Research (Eppendorf, Německo) s příslušnými špičkami od stejné firmy.

Další využitou technikou byly analytické váhy (RADWAG, AS 220.R2, Polsko).

3.1.3 Postup provedení experimentu

Před samotným měřením byl nejprve zapnut počítač a přístroj EcaFlow. Před měrnou celou byl zapojen čistý mikrofiltr a rameno čerpadla bylo přitlačeno do pracovní polohy, aby mohlo docházet k plynulému nasávání roztoků. Poté následovalo spuštění programu EcaFlow Autosampler, pomocí kterého se provedlo propláchnutí všech tří přívodních hadiček, ponořených do kádinky s destilovanou vodou. Poté byly v programu nastaveny parametry v metodě č. 36 (analýza askorbové kyseliny) vhodné pro naši analýzu. Průtoková rychlost byla určena tak, že do suché a předem zvážené kádinky byla po dobu pěti minut jímána z výtokové hadičky voda. Z přírůstku hmotnosti kádinky byl vypočítán objemový průtok a tato hodnota byla nastavena v parametrech ovládacího programu spolu s dalšími parametry (*Tab. III*).

Tab. III: Hodnoty nastavení coulometrického průtokového analyzátoru

číslo metody	36
objemový průtok	8,5 - 9 ml/min
koncentrace kalibračního roztoku	20 mg/l
počet opakování měření	3
počáteční potenciál	0 mV
konečný potenciál	800 mV
hodnota proudu	100 μ A

Po nastavení všech parametrů byl změřen kalibrační roztok. Modrá a červená hadička byly pro toto měření ponořeny v roztoku základního elektrolytu, žlutá zasahovala do kádinky s kalibračním roztokem (20 mg/l). Po skončení měření se žlutá hadička propláchla destilovanou vodou, osušila buničinou a vložila se do roztoku analyzovaného vzorku. Po skončení analýzy byly píky naměřených signálů zintegrovány. Pro měření dalšího vzorku byla žlutá hadička nejprve propláchnuta destilovanou vodou a opět osušena buničinou. Po skončení měření všech vzorků byly teflonové hadičky vloženy do kádinky s destilovanou vodou a řádně propláchnuty, každá z nich se tak vymývala alespoň 2 minuty. Rameno čerpadla bylo uvolněno z pracovní polohy a nakonec byl vypnut přístroj i počítač.

3.1.4 Chemikálie a pomůcky

Chemikálie, jež byly použity při coulometrickém měření, jsou zaznamenány níže (Tab. IV).

Tab. IV: Chemikálie použité pro coulometrické měření

název sloučeniny	sumární vzorec	výrobce
chlorid sodný	NaCl	PENTA, Praha
šřavelová kyselina	C ₂ H ₂ O ₄	Lachema a.s., odštěpný závod Neratovice
L-askorbová kyselina	C ₆ H ₈ O ₆	PENTA, Praha
TRITON X-100 (Polyethylenglykol oktylfenyl ether)	C ₁₄ H ₂₂ O(C ₂ H ₄ O) _n (n=9–10)	Fluka, Buchs, Švýcarsko
destilovaná voda	H ₂ O	Aqual, Brno

Mezi další použité laboratorní pomůcky se řadí kádinky (50, 100, 200 ml), odměrné baňky (25, 1000 ml), kompletní filtrační aparatura– stojan s držáky, filtrační kruh, nálevka, filtrační papír. Dále lžice, pinzeta, špachtle, zkumavky, váženky, hodinová sklíčka, teploměr s gumovým držákem, LUT stříkačkový mikrofiltr (25 mm, 0,45 μm) Syringe Filters Nylon, injekční stříkačka, skleněná tyčinka, vařič.

3.2 Metoda DPPH

3.2.1 Příprava roztoků a vzorků

3.2.1.1 Příprava zásobního roztoku L-askorbové kyseliny

Zásobní roztok askorbové kyseliny byl připraven stejným způsobem popsaným v odstavci 3.1.1.2, tj. navážením 0,25 g L-askorbové kyseliny na analytických vahách a následným kvantitativním převedením tohoto množství kyseliny do odměrné baňky o objemu 25 ml. Po rozpuštění pevné látky v malém objemu vody byl roztok doplněn vodou po rysku. Vznikl roztok o výsledné koncentraci 10 g/l.

3.2.1.2 Příprava kalibračních roztoků L-askorbové kyseliny

Ze zásobního roztoku askorbové kyseliny ($c = 10 \text{ g/l}$) byla připravena sada roztoků kalibračních ($c = 50; 60; 70; 80; 90; 100 \text{ mg/l}$) pomocí automatických pipet. Roztoky byly připravovány do 50 ml odměrných baněk. Vždy byl odpipetován odpovídající objem zásobního roztoku a následně byl tento roztok doplněn po rysku vodou. Výsledné koncentrace kalibračních roztoků a množství použitého zásobního roztoku na jejich přípravu uvádí následující tabulka (Tab. V).

Tab. V: Objemy zásobního roztoku pro přípravu sady kalibračních roztoků

askorbové kyseliny

koncentrace kalibračního roztoku (mg/l)	objem použitého zásobního roztoku (μl)
50	250
60	300
70	350
80	400
90	450
100	500

Pro samotné měření na spektrofotometru byly kalibrační roztoky připraveny do vialek o objemu 5 ml. Odpipetováno bylo 2,7 ml methanolu, 300 μ l methanolového roztoku syntetického radikálu DPPH a 10 μ l odpovídajícího kalibračního roztoku askorbové kyseliny.

3.2.1.3 Příprava roztoku syntetického radikálu DPPH

Pro přípravu roztoku syntetického radikálu DPPH (2,2–difenyl–1–pikrylhydrazyl) bylo naváženo 39,5 mg pevné látky. Navážka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 100 ml a po rozpuštění v malém množství methanolu byl roztok doplněn methanolem po rysku. V případě potřeby byl roztok naředěn přidáním 2,7 ml methanolu k 0,3 ml roztoku DPPH.

3.2.1.4 Příprava vzorků ječmene

Stejně jako u coulometrického měření byl i u této metody pro přípravu vzorků navážen vždy 1 g ($\pm 0,0010$ g) ječmene. Toto množství pevné látky bylo kvantitativně převedeno do 25 ml odměrné baňky, doplněno po rysku vodou a dobře rozmícháno. Následně se obsah baňky zfiltraval přes filtrační papír a poté přes mikrofiltr. Pro potřeby spektrofotometrického měření bylo do tří vialek o objemu 5 ml odpipetováno pomocí automatických pipet 10 μ l filtrátu, 300 μ l roztoku DPPH a 2,7 ml methanolu.

3.2.2 Postup provedení experimentu

Veškeré nachystané vzorky byly ponechány po dobu 30 minut ve tmě. Mezitím byl zapnut počítač a UV–VIS spektrofotometr. Na počítači byl spuštěn program Wavelength 2.85.04. a bylo změřeno absorpční spektrum methanolového roztoku DPPH v rozmezí vlnových délek 380–750 nm. Maximální absorbance radikálu DPPH odpovídala vlnové délce 515 nm. Další měření bylo prováděno při jedné vlnové délce (515 nm). Postupně byla proměřena kalibrační sada roztoků a vzorky vodného roztoku zeleného ječmene.

Spektrofotometrické měření se provádělo v plastové kyvetě ($d=1$ cm), mezi měřeními jednotlivých roztoků byla kyveta vždy propláchnuta čistým methanolem a následně dalším

měřeným roztokem. Měření probíhalo proti methanolu ve druhé kyvetě. Po naměření všech roztoků byly obě kyvety propláchnuty methanolem a destilovanou vodou, přístroj i počítač byly vypnuty.

3.2.3 Chemikálie a pomůcky

Chemikálie, které byly používány pro měření antioxidační aktivity při metodě DPPH, jsou zaznamenány v následující tabulce (Tab. VI).

Tab. VI: Chemikálie použité při metodě DPPH

název sloučeniny	sumární vzorec	výrobce
L-askorbová kyselina	$C_6H_8O_6$	PENTA, Praha
destilovaná voda	H_2O	Aqual, Brno
methanol	CH_3OH	PENTA, Praha
2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH)	$C_{18}H_{12}N_5O_6$	Sigma Aldrich, Německo

Kromě plastových vialek o objemu 5 ml byly použity stejné laboratorní pomůcky jako u stanovování antioxidační aktivity pomocí průtokové coulometrie.

3.2.4 Analytická laboratorní technika

K metodě DPPH byl využit UV–VIS spektrofotometr Lambda 25 (Perkin Elmer, USA) (Obr. 8). Jedná se o dvoupraskový spektrofotometr, jehož jeden paprsek prochází slepým vzorkem a druhý paprsek prochází příslušným měřeným vzorkem. Celkový rozsah vlnových délek tohoto přístroje je 190–1100 nm. Pro naše potřeby byl vybrán rozsah vlnových délek viditelného spektra a následně jedna vlnová délka s nejvyšší absorbancí pro syntetický radikál DPPH. Tento přístroj byl řízený počítačem pomocí programu Wavelength 2.85.04.



Obr. 8: UV–VIS spektrofotometr Lambda 25.

Při přípravě roztoků potřebných k analýze byly využívány automatické pipety Eppendorf Research (Eppendorf, Německo). Navažování přesných hmotností látek probíhalo s využitím analytických vah RADWAG (RADWAG, AS 220.R2, Polsko).

4 Výsledky a diskuze

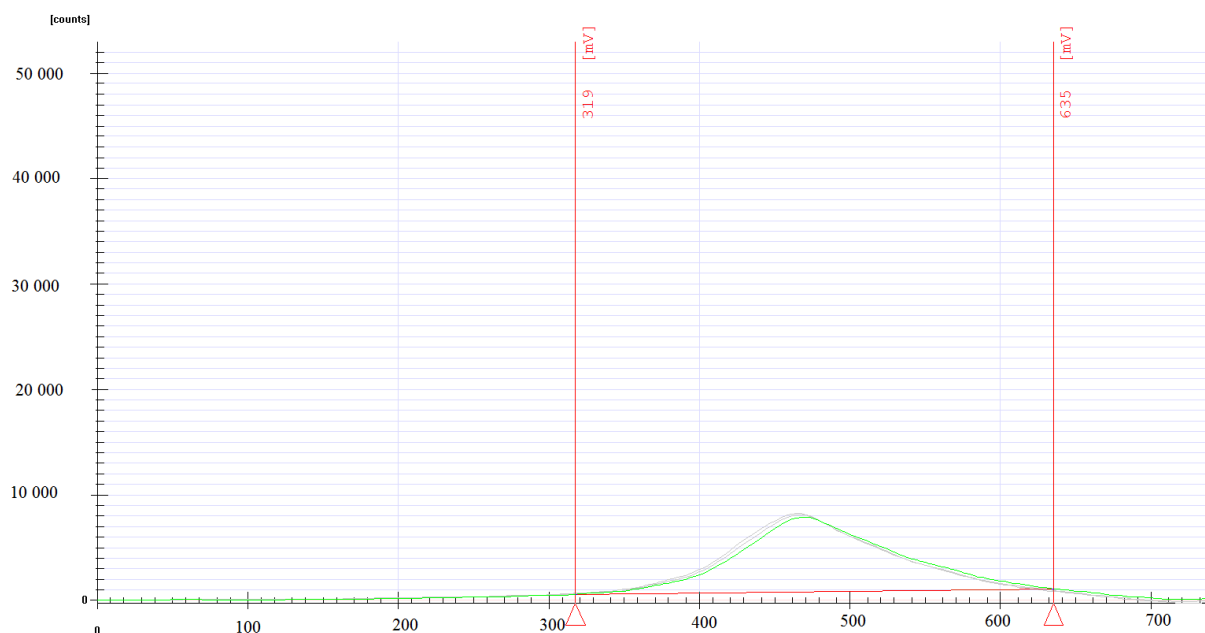
Cílem této bakalářské práce bylo zjištění antioxidační aktivity mladého ječmene a její závislosti na vnějších podmínkách – teplotě a době stání připraveného roztoku. Konkrétně byl použit produkt Zelený ječmen značky Green Ways. Sledování vnějších podmínek mělo odhalit vhodnou teplotu nápoje ze zeleného ječmene a čas mezi přípravou nápoje a jeho konzumací k dosažení maximální účinnosti tohoto potravinového doplňku, kdy budou mít antioxidanty obsažené v nápoji nejvyšší antioxidační aktivitu.

Hlavní metodou k tomuto účelu byla průtoková coulometrie za konstantního proudu a jako srovnávací metody bylo využito spektrofotometrického měření metodou DPPH.

4.1 Výsledky coulometrického měření

4.1.1 Kalibrace

Kalibrační roztok askorbové kyseliny o přesně známé koncentraci (20 mg/l) byl změřen vždy před měřením vlastních vzorků. Kalibrační roztok byl měřen vždy třikrát. Odezvy L–askorbové kyseliny tvaru píku na zaznamenaných chronopotenciogramech (*Obr. 9*) byly vyhodnoceny integrací v nastavených mezích. K takto získané ploše píku odpovídající koncentraci standardu L–askorbové kyseliny byly poté vztahovány plochy píků měřených vzorků.



Obr. 9: *Tři opakovaná měření standardního roztoku L–askorbové kyseliny ($c=20\text{mg/l}$) s nastavenými mezemi integrace (hodnoty na ose x jsou v mV, hodnoty na ose y udávají bezrozměrnou intenzitu signálu).*

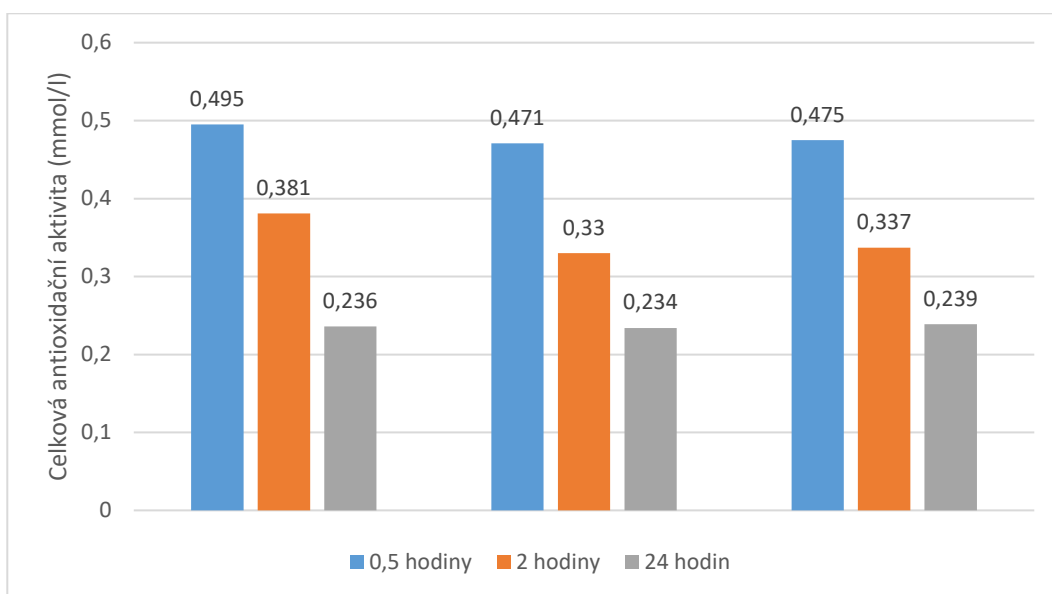
4.1.2 Měření vzorků

Po změření kalibračního roztoku L–askorbové kyseliny byly měřeny připravené vzorky roztoku zeleného ječmene. Nejprve byly měřeny časové závislosti, a aby se předešlo ovlivnění výsledků jiným vnějším faktorem (teplotou), byla teplota základního elektrolytu použitého k rozpuštění pevné formy vzorku vždy stejná, a to $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mezi zalitím vzorku elektrolytem, a tedy jeho rozpuštěním, a analýzou pomocí průtokového coulometru byly časové prodlevy 30 minut, 2 hodin 24 hodiny. Pro každý časový interval byly připraveny 3 vzorky, jehož každá analýza proběhla ve třech opakováních. Naměřené hodnoty koncentrace antioxidantů vyjádřené v mg/l L–askorbové kyseliny, hodnoty celkové antioxidační aktivity vyjádřené ekvivalentní látkovou koncentrací L–askorbové kyseliny v mmol/l a jejich směrodatnou odchylku vypočtenou ze tří opakovaných měření, uvádí následující tabulka (*Tab. VII*).

Tab. VII: Výsledky coulometrického měření pro časovou závislost

vzorek	koncentrace antioxidantů (mg/l)	průměrná koncentrace antioxidantů (mg/l)	celková antioxidační aktivita (mmol/l)	s (směrodatná odchylka) (mmol/l)	časová prodleva
1a	79,17	80,8	0,459	0,007	30 minut
	81,73				
	81,56				
1b	83,71	82,9	0,471	0,004	30 minut
	82,97				
	82,14				
1c	84,21	83,7	0,475	0,004	30 minut
	84,15				
	82,83				
2a	58,13	59,5	0,381	0,006	120 minut
	60,35				
	60,14				
2b	56,15	58,1	0,330	0,008	120 minut
	58,76				
	59,51				
2c	60,03	59,4	0,337	0,003	120 minut
	59,29				
	58,76				
3a	40,35	41,5	0,236	0,005	24 hodin
	42,06				
	42,03				
3b	41,57	41,2	0,234	0,002	24 hodin
	41,34				
	40,66				
3c	43,15	42,1	0,239	0,006	24 hodin
	42,44				
	40,74				

Při měření časové závislosti byla zjištěna nepřímá úměra mezi časovou prodlevou a koncentrací antioxidantů ve vzorku, respektive celkovou antioxidační aktivitou (Graf 1). Z tohoto jasně vyplývá, že s časem klesá koncentrace antioxidantů ve vzorku zeleného ječmene (vztažená na odpovídající koncentraci L-askorbové kyseliny), a tím klesá i celková antioxidační aktivita roztoku zeleného ječmene.



Graf 1: Vliv doby stání roztoku zeleného ječmene na jeho celkovou antioxidační aktivitu.

Po naměření časové závislosti byla zaměřena pozornost na zkoumání teplotní závislosti. K přípravě vzorků zeleného ječmene byl využit elektrolyt o různých teplotách. Konkrétně se jednalo o teploty 25, 30, 50 a 80 °C, přičemž výsledky měření pro teplotu 25 °C byly převzaty z měření časové závislosti. Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, při jaké teplotě dosahuje zelený ječmen nejvyšší antioxidační aktivity. Výsledky z měření teplotní závislosti jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. VIII).

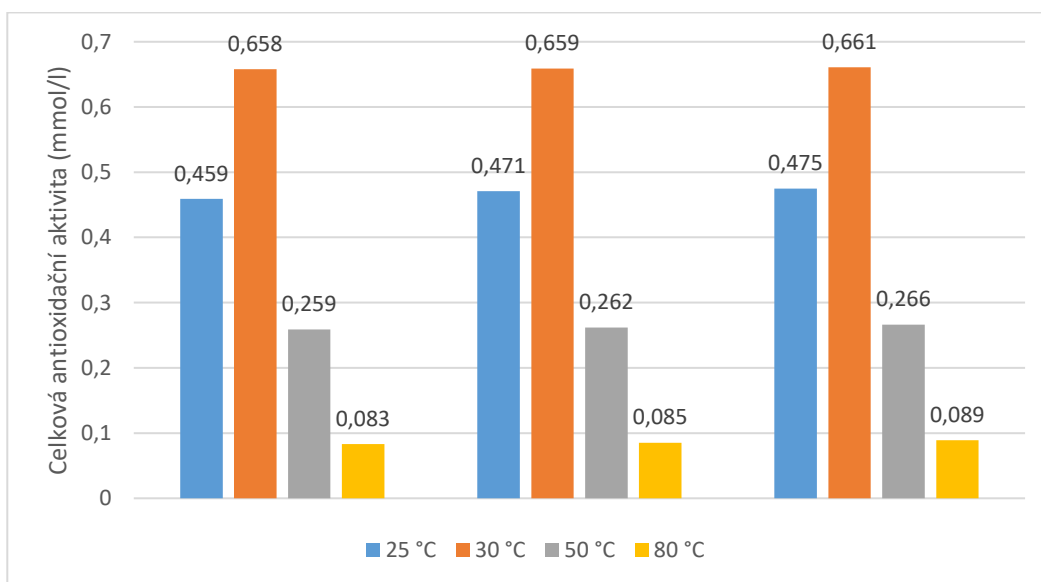
Tab. VIII: Výsledné hodnoty coulometrického měření pro teplotní závislost

vzorek	koncentrace antioxidantů (mg/l)	průměrná koncentrace antioxidantů (mg/l)	celková antioxidační aktivita (mmol/l)	s (směrodatná odchylka) (mmol/l)	teplota elektrolytu
4a	79,17	80,8	0,459	0,007	25 °C
	81,73				
	81,56				
4b	82,14	82,9	0,471	0,004	25 °C
	82,97				
	83,71				
4c	82,83	83,7	0,475	0,004	25 °C
	84,15				
	84,21				
5a	114,29	115,9	0,658	0,007	30 °C
	116,15				
	117,23				
5b	115,23	116,1	0,659	0,006	30 °C
	115,44				
	117,63				
5c	114,75	116,4	0,661	0,007	30 °C
	116,62				
	117,83				
6a	44,91	45,7	0,259	0,006	50 °C
	45,03				
	47,13				
6b	45,32	46,3	0,262	0,004	50 °C
	46,58				
	46,85				
6c	45,11	46,9	0,266	0,008	50 °C
	47,09				
	48,47				

Tab. VIII– pokračování: Výsledné hodnoty coulometrického měření pro teplotní závislost

vzorek	koncentrace antioxidantů (mg/l)	průměrná koncentrace antioxidantů (mg/l)	celková antioxidační aktivita (mmol/l)	s (směrodatná odchylka) (mmol/l)	teplota elektrolytu
7a	13,59	14,7	0,083	0,005	80 °C
	14,89				
	15,56				
7b	13,56	14,9	0,085	0,006	80 °C
	15,13				
	15,98				
7c	14,81	15,7	0,089	0,005	80 °C
	15,5				
	16,79				

Celková antioxidační aktivita roztoků zeleného ječmene vztažená na ekvivalentní látkovou koncentraci (mmol/l) askorbové kyseliny je zobrazena pomocí grafu (Graf 2).



Graf 2: Vliv teploty na celkovou antioxidační aktivitu roztoku zeleného ječmene

Z naměřených výsledků vyplývá, že extrakt ze zeleného ječmene dosahuje nejvyšší antioxidační aktivity, pokud je připravený při teplotě 30 °C. Při vyšších teplotách již antioxidační schopnost slábne.

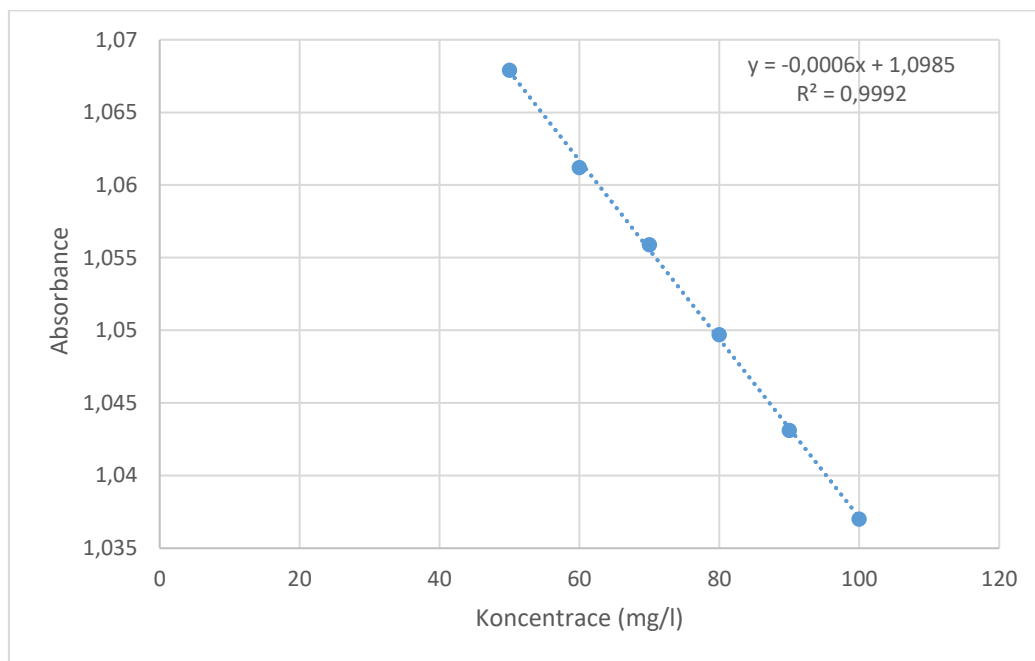
4.2 Výsledky metody DPPH

Antioxidační aktivita roztoku ječmene byla pro porovnání změřena ještě jinou, nezávislou metodou využívající zhášení volného radikálu DPPH antioxidanty ze vzorku. Úbytek koncentrace tohoto radikálu se sledoval spektrofotometricky při vlnové délce $\lambda = 515\text{nm}$. Při této vlnové délce byly nejprve změřeny kalibrační závislosti pro askorbovou kyselinu jako standardní látku, a to ve třech sadách kalibračních roztoků. Koncentrace kalibračních roztoků a odpovídající absorbance jsou uvedeny v *Tabulce IX*.

Tab. IX: Naměřené hodnoty absorbance při měření třech kalibračních sad standardu askorbové kyseliny

	koncentrace kalibračního roztoku (mg/l)	absorbance		
		1. měření	2. měření	3. měření
1.	50	1,0679	1,0823	1,0663
2.	60	1,0612	1,0761	1,0603
3.	70	1,0559	1,0705	1,0547
4.	80	1,0497	1,0641	1,0483
5.	90	1,0431	1,0583	1,0423
6.	100	1,0370	1,0520	1,0375

Kalibrační závislosti byly lineární v rozsahu 50–100 mg/l. Ukázka kalibrační přímky změřené v první sadě kalibračních roztoků včetně regresní rovnice kalibrační přímky je v *Grafu 3*. Následně byla změřena absorbance vzorků zeleného ječmene (*Tab. X*).



Graf 3: Kalibrační závislost askorbové kyseliny z měření č. 1.

Tab. X: Naměřené hodnoty absorbance vzorků ječmene

	absorbance	průměrná absorbance
1. měření	1,0506	1,0496
	1,0489	
	1,0493	
2. měření	1,0576	1,0575
	1,0571	
	1,0579	
3. měření	1,0471	1,0473
	1,0469	
	1,0479	

Z regresních rovnic kalibračních přímek byla vypočítána celková antioxidační aktivita (TAA) roztoků zeleného ječmene, která byla vyjádřena jako ekvivalentní hmotnostní koncentrace (mg/l) i jako ekvivalentní látková koncentrace (mmol/l) askorbové kyseliny (Tab. XI).

Tabulka XI: Vypočtené hodnoty ze spektrofotometrického měření

měření	hodnota spolehlivosti R^2	regresní rovnice kalibrační přímky	výsledná koncentrace (mg/l)	průměrná koncentrace $\pm s$ (mg/l)	TAA $\pm s$ (mmol/l)
1.	0,9992	$y = -0,0006x + 1,0985$	81,5	81,2 \pm 0,8	0,461 \pm 0,004
2.	0,9998	$y = -0,0006x + 1,1125$	82,0		
3.	0,9988	$y = -0,0006x + 1,0954$	80,2		

s – směrodatná odchylka.

Výsledky měření celkové antioxidační aktivity roztoků zeleného ječmene získané spektrofotometrickou metodou DPPH (0,461 \pm 0,004 mmol/l) se shodují s výsledky získanými coulometrickou analýzou (0,468 \pm 0,007 mmol/l) za stejných podmínek (teplota 25 °C, doba stání vzorku 30 minut). Minimální odchylka výsledků, která nepřesahuje rámeček statistického rozptýlení opakovaně měřených hodnot, může být způsobena různým principem obou metod, kdy metoda DPPH využívá přenosu protonů v homogenní fázi, kdežto coulometrická metoda využívá přenosu elektronů v heterogenním systému elektroda/roztok.

5 Závěr

Experimentální část této bakalářské práce se zabývá stanovením antioxidační aktivity roztoku mladého zeleného ječmene. K analýze byl vybrán produkt Ječmen od firmy Green Ways. Jedná se o výživový doplněk prodávaný ve formě jemného prášku, který vznikl usušením mladých rostlinek ječmene setého. Tento doplněk stravy se rozpouští ve vodě a následně konzumuje pro jeho vysoký obsah nejrůznějších enzymů, minerálů, vitamínů a stopových prvků. Pomocí chemické analýzy bylo zjišťováno, jakou antioxidační aktivitou tento doplněk stravy disponuje. K tomuto účelu byla využita metoda průtokové coulometrie. Metoda je založena na kvantitativní přeměně analytu konstantním proudem. Jako srovnávací látka byla vybrána L-askorbová kyselina. Během analýzy docházelo k její oxidaci na dehydroaskorbovou kyselinu. Hodnoty koncentrace antioxidantů byly vyjádřeny jakožto ekvivalentní množství L-askorbové kyseliny.

Cílem práce bylo sledovat časovou a teplotní závislost obsahu antioxidantů, tedy optimalizovat vnější podmínky tak, aby byl maximálně využit antioxidační potenciál přípravku. Maximální antioxidační aktivity dosahoval roztok zeleného ječmene připravený při 30 °C. Roztoky měřené při vyšších teplotách vykazovaly s rostoucí teplotou klesající antioxidační aktivitu. Tento jev by mohl být objasněn například tím, že mnoho antioxidantů obsažených v zeleném ječmeni je enzymatického charakteru. Aktivita enzymů bývá značně ovlivňována teplotou. Dalším důvodem může být oxidace antioxidantů vzdušným kyslíkem, kterou zvýšení teploty urychluje.

Roztoky měřené v různých časových prodlevách od přípravy vykazovaly pokles antioxidační aktivity s rostoucí dobou stání. To opět svědčí o samovolné oxidaci přítomných antioxidantů vzdušným kyslíkem.

Z experimentální části práce tedy jasně vyplývá, že nejvýhodnější pro lidský organismus je konzumace nápoje připraveného ze zeleného ječmene ihned po jeho přípravě. Zároveň je vhodné pro přípravu použít vlažnou vodu o teplotě 30 °C. Tím docílíme maximálního využití potenciálu tohoto potravinového doplňku.

Po uvážení byla jako srovnávací měření zvolena metoda DPPH, která je realizována pomocí UV/VIS spektrofotometru. Využito zde bylo schopnosti antioxidantů reagovat s volným radikálem 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylem. Vzájemnou reakcí dojde ke zhášení radikálu, a tedy postupnému odbarvení roztoku z tmavě fialové barvy do zabarvení žlutého. Zhášením radikálu se rozumí redukce (hydrogenace) DPPH na systém DPPH-H (difenylopikrylhydrazin). To se projeví poklesem absorbance ve viditelné části elektromagnetického spektra, respektive při vlnové délce $\lambda = 515$ nm. Při této vlnové délce vykazuje radikál DPPH maximální absorbanci.

Výsledky získané prostřednictvím metody DPPH potvrdily koncentraci antioxidantů, která byla naměřena průtokovou coulometrií. Výsledná antioxidační aktivita při coulometrickém měření (25 °C) se rovnala $0,468 \pm 0,007$ mmol/l a při spektrofotometrickém měření byla $0,461 \pm 0,004$ mmol/l. Výsledky jsou srovnatelné. Minimální odchylka může vycházet z různé podstaty obou metod, případně může být způsobena jinými rozpouštědly použitými během příprav vzorků.

6 Seznam použitých zkratek

AA– Ascorbic Acid

AAPH– 2,2′-azobis(isobutyrimidamid)–dihydrochlorid

ABTS^{•+} – 2,2′-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát) radikál

DPPH– 2,2′-difenyl-1-pikrylhydrazyl

DPPH-H– difenylpikrylhydrazin

FRAP– Ferric Reducting Antioxidant Power

HPLC– High Performance Liquid Chromatography (Vysokoučinná kapalinová chromatografie)

ORAC– Oxygen Radical Absorbance Capacity

RNS– Reactive Nitrogen Species

RONS– Reactive Oxygen and Nitrogen Species

ROS– Reactive Oxygen Species

TAA– Total Antioxidant Activity

TEAC– Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

TPTZ– 2,4,6-tri-(2-pyridyl-1,3,5-triazin)

TRITON X-100– polyethylenglykol oktylfenyl ether

TROLOX– 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina

β-PE– β-fykoerythrin

7 Seznam literatury a zdrojů

1. Arndt T.: Mladý ječmen–zelený zdroj zdraví v jedné sklenici. Celostní medicína. [online]. 23.04.2015 [cit. 2017-01-19]. Dostupné z: <https://www.celostnimedicina.cz/mlady-jecmen-zeleny-zdroj-zdravi-v-jedne-sklenici>
2. Víte vůbec proč pít mladý ječmen? Zelené zdravíčko. [online]. 1.06.2014 [cit. 2017-01-19]. Dostupné z: <http://www.zelene-zdravicko.cz/mlady-jecmen-proc>
3. <http://www.zelenemenu.cz/mlady-jecmen>. Mladý ječmen–informace. Zelené menu. [online], staženo 12. ledna 2017
4. Hornišer P.: Zázračný chlorofyl. Zelený obchod. [online]. © 2008-2017 [cit. 2017-01-19]. Dostupné z: <http://www.zelenyobchod.cz/products/zazracny-chlorofyl/>
5. Fidler M., Kolářová L.: Analýza oxidantů v chmelu a pivu. *Chemické listy*. 2009, **103**: 232–235.
6. Hemzalová M, Jordán V.: Antioxidanty, zázračné zbraně: Vitamíny, aminokyseliny, stopové prvky, minerály a jejich využití pro zdravý život. První. Brno: Jota, 2001. ISBN 80-7217-156-9.
7. Paulová H., Bochořáková H., Táborská E.: Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*. 2004, **98**: 174–179.
8. Ježková K., Pavlíková P, Dobiáš P., Adam M., Ventura K.: Analýza kyseliny L-askorbové v nápojích s využitím techniky MEPS. *Chemické listy*. 2010, **104**: 17–19.
9. Mlčoch Z.: Nedostatek vitamínu C – příznaky, projevy, symptomy. Příznaky-projevy. [online]. 15.2.2012 [cit. 2017-01-20]. Dostupné z: <http://www.priznaky-projevy.cz/laboratorni-hodnoty/nedostatek-vitaminu/nedostatek-vitaminu-c-priznaky-projevy-symptomy>
10. Agus David B.: Konec nemocem, nový pohled na zdraví a nemoc. Praha: Fortuna Libri, 2012. ISBN 978-80-7321-679-5.
11. Tepperwein K.: Pryč s kyselostí. Bratislava: NOXI, 2011. ISBN 978-80-8111-054-2.
12. Bukovský I.: Miniencyklopedie přírodní léčby. Ostrava: BOOKMEDIA s.r.o., 2016. ISBN 978-80-88036-28-9.

13. Caha J. Vitamín C – kyselina askorbová. Aktin. [online]. © 2017 [cit. 2017-01-20]. Dostupné z: <https://aktin.cz/1345-vitamin-c-kyselina-askorbova>
14. Jaroslav Petr. Kdo všechno má kurděje? Český rozhlas. [online]. 26.12.2011 [cit. 2017-01-20]. Dostupné z: http://m.rozhlas.cz/leonardo/priroda/_zprava/978855
15. Glutathion–matka všech antioxidantů. SYMBIVITA: Lékařská poradna [online]. [cit. 2017-02-06]. Dostupné z: <http://www.symbivita.cz/Glutathion-matka-vsech-antioxidantu-clanek-1853.html>
16. Glutathion. Celostní medicína [online]. 2011 [cit. 2017-02-06]. Dostupné z: <https://www.celostnimedicina.cz/glutathion.htm>
17. Nejsilnější antioxidant glutathion vám vylepší imunitu. Tajemství zdraví [online]. 2015 [cit. 2017-02-06]. Dostupné z: <http://tajemstvizravi.cz/nejsilnejsi-antioxidant-glutathion-vam-vylepsi-imunitu/>
18. Housecroft C.E., A.G. Sharpe.: Anorganická chemie. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2014. ISBN 978-80-7080-872.
19. McMurry J.: Organická chemie. První. Brno: VUTIUM, 2007. ISBN 978-80-214-3291-8.
20. Atkins P., De Paula J.: Fyzikální chemie. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2013. ISBN 978-80-7080-830-6.
21. Racek J. Holeček V.: Enzymy a volné radikály. Chemické Listy. 1999, **93**: 774–780.
22. Škarecká I.: Antioxidanty a volné radikály. Výživová poradna Viviente. [online]. 11.11.2012 [cit. 2017-01-23]. Dostupné z: <http://www.viviente.cz/antioxidanty/>
23. Toufar M.: Volné radikály. Přírodní zdraví. [online]. © 2006 [cit. 2017-01-23]. Dostupné z: <http://www.prirodni-zdravi.cz/clanky/volne-radikaly/>
24. Grycová L.: Volné radikály, antioxidanty. Gate2Biotech. [online]. 31.1.2013 [cit.2017-01-23]. Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/volne-radikaly-antioxidanty/>
25. Holeček V.: Volné radikály a antioxidanty. Celostní medicína. [online]. 31.1.2013 [cit. 2005-01-31]. Dostupné z: <https://www.celostnimedicina.cz/volne-radikaly-a-antioxidanty-mudr-vaclav-holecek-csc.htm>
26. Štípek S. a kol.: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. Praha: Grada, 2000. ISBN 8071697044.
27. Murray R.K. a kol.: Harperova ilustrovaná biochemie. Český Těšín: Galén, 2012. ISBN 978-80-7262-907-7.

28. Zima, T. Laboratorní diagnostika. Český Těšín: Galén, 2002. ISBN 978-80-7492-062-2.
29. Koolman, J. a K.H. Röhman.: Barevný atlas biochemie. Praha: Grada Publishing, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
30. Karabín M., Dostálek P., Hofta P.: Přehled metod pro stanovení antioxidační aktivity v pivovarství. Chemické listy. 2006, **100**: 184–189.
31. Holasová M., Fiedlerová V.: Porovnání metod stanovení antioxidační aktivity v ovocných a zeleninových šťávách. Chemické listy. 2011, **105**: 766–772.
32. Šulc M., Jaromír Lachman J., Hamouz K., Orsák M., Dvořák P., Horáčková V.: Výběr a zhodnocení vhodných metod pro stanovení antioxidační aktivity fialových a červených odrůd brambor. Chemické listy. 2007, **101**: 584–591.
33. Lachman J., Hamouz K., Čepl J., Pivec V., Šulc M., Dvořák P.: Vliv vybraných faktorů na obsah polyfenolů a antioxidační aktivitu hlíz brambor. Chemické listy. 2006, **100**: 522–527.
34. Lachman J., Hamouz K., Orsák M.: Červeně a modře zbarvené brambory– významný zdroj antioxidantů v lidské výživě. Chemické listy. 2005, **99**: 474–482.
35. Klouda P.: Moderní analytické metody. Druhé. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
36. Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z.: Základní analytická chemie. Praha: Karolinum, 2010. ISBN 978-80-246-1775-6.
37. J., Zýka. Analytická příručka Díl I. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1979. ISBN 04-612-79.
38. Berčík J.: Fyzikálne a fyzikálno-chemické analytické metódy. První. Bratislava: Alfa, 1977.