

Luminometrické stanovenie antioxidačnej aktivity koncentrátov prírodných farbív

TOMÁŠ KUČTA - IVAN HAPALA - MAGDA MÁRIÁSSYOVÁ
- DANIELE CANTAGALLI - STEFANO GIROTTI

SÚHRN. Vypracovala sa luminometrická metóda na stanovenie antioxidačnej aktivity, založená na kvantifikácii prerušenia luminiscencie systému peroxid vodíka - peroxidáza z chrenu - luminol po prídavku antioxidantov. Ako štandard sa použila kyselina askorbová, pomocou ktorej sa zostrojila kalibračná čiara. Metóda bola vhodná na hodnotenie antioxidačnej aktivity koncentrátov antokyánových a betalaínových farbív.

KĹÚČOVÉ SLOVÁ: antioxidačná aktivita; luminiscencia; prírodné farbivo

K dôležitým reakciám, ktoré prebiehajú pri výrobe a skladovaní potravín, patrí oxidácia. Jej dôsledkom je zmena chemického zloženia potravín, ktorá má spravidla negatívny vplyv na ich kvalitu. Jednou z možností spomalenia oxidačných reakcií je použitie antioxidantov. Antioxidanty brzdia oxidačné reakcie tým, že reagujú s hydrogénperoxidovým voľným radikálom na menej reaktívny hydrogénperoxid. K najčastejšie používaným potravinárskym antioxidantom patrí kyselina askorbová, propylgalát, butylhydroxytoluén a iné. V poslednej dobe sa viac používajú tiež prírodné zmesné antioxidanty, napríklad extrakty z niektorých bylín, ktoré obsahujú predovšetkým flavonoidné zlúčeniny [1,2].

K atraktívnym prírodným antioxidantom patria aj prírodné farbivá antokyaníny [3-5]. Aby bolo možné porovnávať antioxidačnú účinnosť koncentrátov pripravených z rôznych zdrojov, resp. rôznymi technologickými po-

RNDr. Tomáš KUČTA, CSc., Ing. Magda MÁRIÁSSYOVÁ, CSc., Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava.

RNDr. Ivan HAPALA, CSc., Ústav biochémie a genetiky živočíchov SAV, Moyzesova 61, 900 28 Ivanka pri Dunaji.

Dr. Daniele CANTAGALLI, Prof. Stefano GIROTTI, Unitá Complessa di Scienze Chimiche Radiochimiche e Metallurgiche, Università di Bologna, Via San Donato 15, 401 27 Bologna, Taliansko.

stupmi, je potrebná objektívna, rýchla a ekonomická analytická metóda na stanovenie antioxidačnej aktivity. Na tento účel sa vypracovala nižšie opísaná luminometrická metóda. Táto metóda je založená na enzýmovo katalyzovanej tvorbe hydrogénperoxidových radikálov, ktoré reagujú s luminiscenčným činidlom za vyžarovania svetla, luminiscencie. Vo vhodných reakčných podmienkach je intenzita luminiscencie prakticky stála počas niekoľkých minút. Prídavok antioxidantu, ktorý reaguje s radikálmi prednostne pred luminiscenčným činidlom, vedie k prerušeniu luminiscencie. Prerušenie luminiscencie je úmerné množstvu pridaného antioxidantu. Prakticky sa uvedený princíp realizuje tak, že reakčná zmes obsahuje peroxid vodíka, enzým peroxidázu z chrenu a luminol, pričom prebieha reakcia [6]:



Na základe prídania štandardných množstiev kyseliny askorbovej a kvantifikácie prerušenia luminiscencie sa zostrojí kalibračná čiara. Pomocou nej sa potom antioxidačná aktivita meranej vzorky vyjadří ako hmotnostný ekvivalent kyseliny askorbovej.

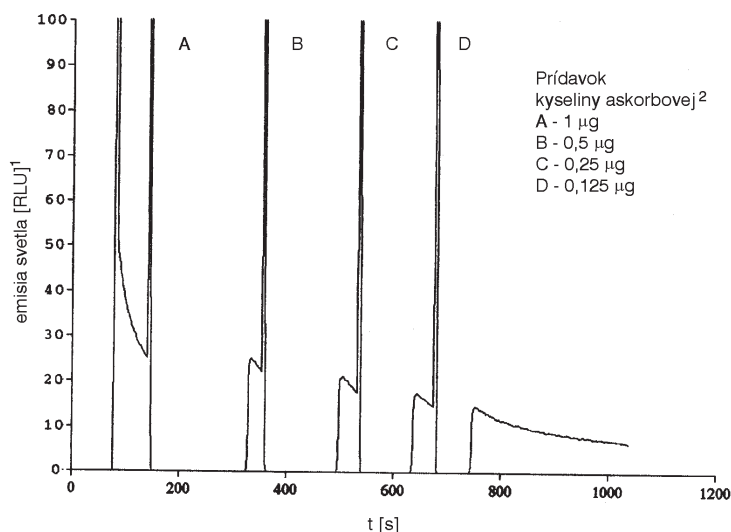
Materiál a metódy

Koncentráty antokyánových farbív z bazy čiernej a slnečnicových šupiek a betalainových farbív z červenej repy sa získali trojstupňovou extrakciou 50 %-ným etanolom [7,8]. Spojené prefiltrované extrakty sa zahustili za vákua pri teplote do 35 °C. V takto pripravených koncentrátoch farbív sa antioxidačná aktivita stanovila luminometricky. Na meranie sa použil luminiscenčný spektrofotometer Perkin Elmer LS50B. Do semimikrokyvety sa pipetoval 1 ml 1,2 mmol.l⁻¹ sodnej soli luminolu (Sigma) v 0,1 mol.l⁻¹ fosforečnanovom tlmivom roztoku, pH 7,5, a 12,5 µl 30 % H₂O₂ (Lachema). Meranie prebiehalo v kinetickom luminiscenčnom režime pri vlnovej dĺžke 425 nm (šírka štrbiny 20 nm), za permanentného miešania, pri teplote 25 °C udržiavanej ultratermostatom. Reakcia sa spustila prídavkom 50 µl roztoku peroxidázy z chrenu (Serva), pripraveného v objemovej aktivite 200 U.ml⁻¹ a inkubovaného pred meraním 7 dní pri 4 °C. Po ustálení luminiscencie sa pridalo 10 µl vhodne nariadených vzoriek antioxidantov. Prerušenie luminiscencie sa kvantifikovalo ako násobok intenzity luminiscencie po návrate na plateau a doby prerušenia luminiscencie na úrovni 5 % tejto intenzity. Kalibračná čiara sa zostrojila pomocou prídavku 10 µl štandardných rozto-

kov $0,0125 \text{ g.l}^{-1}$; $0,025 \text{ g.l}^{-1}$; $0,05 \text{ g.l}^{-1}$ a $0,1 \text{ g.l}^{-1}$ kyseliny askorbovej (Fluka). Na kvantifikáciu antioxidačnej aktivity vzoriek koncentrátov farbív sa použilo riedenie ekvivalentné $0,0125 \text{ g.l}^{-1}$ až $0,025 \text{ g.l}^{-1}$ kyseliny askorbovej.

Výsledky a diskusia

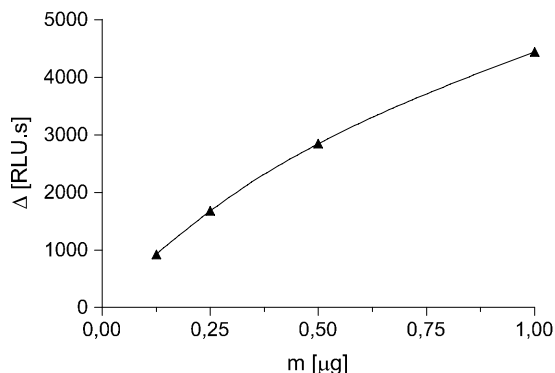
Použitý reakčný systém poskytoval mierne klesajúcu luminiscenciu v časovom intervale 1 min až 20 min. Prídavok štandardných roztokov kyseliny askorbovej spôsoboval okamžitý pokles luminiscencie na nulu a po určitom čase rýchly návrat luminiscencie na úroveň minimálne 90 % pôvodnej. Vzhľadom na stabilitu systému a jeho dostatočnú kapacitu bolo možné uskutočniť niekoľko po sebe nasledujúcich meraní (obr. 1). Prerušenie luminiscencie bolo nelineárne závislé na množstve pridanej kyseliny askorbovej (obr. 2).



OBR. 1. Meranie prerušenia luminiscencie po prídavku štandardných roztokov kyseliny askorbovej. Krátky nárast intenzity svetla mimo rozsah bol spôsobený otvorením kyvetového priestoru pri každom prídavku vzorky. RLU - relatívna jednotka emisie svetla.

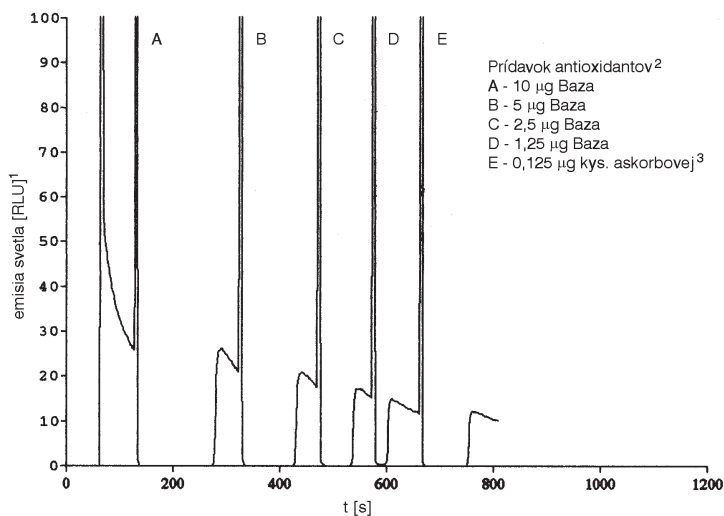
FIG. 1. Measurement of the interruption of luminescence after the addition of standard solutions of ascorbic acid.

A transient increase in the light intensity was caused by opening the cuvette compartment at each addition of the sample. RLU - relative light unit. 1 - light emission, 2 - addition of ascorbic acid.



OBR. 2. Kalibračná čiara vyjadrujúca závislosť prerušenia luminiscencie na množstve pridanej kyseliny askorbovej.
RLU - relatívna jednotka emisie svetla.

FIG. 2. Calibration curve expressing the interruption of luminescence versus amount of ascorbic acid added.
RLU - relative light unit.



OBR. 3. Meranie prerušenia luminiscencie po prídavku rôznych množstiev koncentráту prírodných farbív Baza.

Krátky nárast intenzity svetla mimo rozsah bol spôsobený otvorením kyvetového priestoru pri každom prídavku vzorky. RLU - relatívna jednotka emisie svetla.

FIG. 3. Measurement of the interruption of luminescence after the addition of various amounts of the colour concentrate Elderberry.

A transient increase in the light intensity was caused by opening the cuvette compartment at each addition of the sample. RLU - relative light unit. 1 - light emission, 2 - addition of antioxidants, 3 - ascorbic acid.

V prípade prídavku roztoku koncentráту farbív Baza bol priebeh luminiscencie analogický, avšak strmosť návratu luminiscencie bola o niečo nižšia (obr. 3). Podobný priebeh sa pozoroval tiež v prípade ďalších koncentrátov farbív. Toto bolo pravdepodobne spôsobené zmesným charakterom vzoriek. Pri každom meraní bol na záver zaradený tiež štandardný roztok kyseliny askorbovej, čo umožnilo korekciu nameraných hodnôt pred ich vyhodnotením pomocou kalibračnej čiary. Antioxidačnú aktivitu jednotlivých vzoriek koncentrátov prírodných farbív vyjadrenú vo forme ekvivalentu kyseliny askorbovej uvádza tabuľka 1. Napriek tomu, že nešlo o stanovenie antioxidačnej aktivity čistých antokyanínov, z tabuľky je zrejmé, že koncentrát antokyanínov z bazy čiernej má vyššiu antioxidačnú aktivitu ako koncentrát antokyanínov zo slnečnicových šupiek. Je to možné vysvetliť prítomnosťou sprievodných látok, ale aj rozdielnym zložením antokyanínov prítomných v koncentrátoch. V baze čiernej bola zistená prítomnosť kyanidín-3-glukozidu (65,7 %), kyanidín-3-sambubiozidu (32,4 %), kyanidín-3-glukozidu-5-glukozidu (0,8 %) a kyanidín-3-sambubiozid-5-glukozidu (1,1 %) [9], v extraktoch zo slnečnicových šupiek kyanidín-3-glukozidu (35 %), kyanidín-3-dimalonylglukozidu (15 %), kyanidín-3-xylozidu (14 %), kyanidín-3-malonylxylozidu (29 %) [10,11]. Antioxidačná aktivita koncentrátu betalaínových farbív bola veľmi nízka, v súlade so stanoveným nízkym obsahom farbív.

Vypracovaná luminiscenčná metóda je rýchla, spoľahlivá a pomerne jednoduchá. Nevyžaduje náročné prístrojové vybavenie, namiesto luminiscenčného spektrofotometra je možné na meranie použiť jednoduchý luminometer so zapisovačom. Metóda sa ukázala vhodnou na hodnotenie antioxidačnej aktivity koncentrátov antokyanínových a betalaínových farbív, avšak pri určitej modifikácii, resp. použití iných štandardov, ju bude možné použiť aj na stanovenie antioxidačnej aktivity iných látok.

TABUĽKA 1. Antioxidačná aktivita koncentrátov prírodných farbív.

TABLE 1. Antioxidative activity of natural colour concentrates.

Vzorka ¹	Účinná zložka ²	c [g.kg ⁻¹]	a	a na 1 g farbiva ³
Baza ⁴	antokyány ⁵	90	0,056	0,62.10 ⁻³
Slnečnica ⁶	antokyány ⁵	15	0,029	1,33. 10 ⁻³
Červená repa ⁷	betanín ⁸	1,3	0,003	2,31. 10 ⁻³

a - antioxidačná aktivita ako hmotnostný ekvivalent kyseliny askorbovej.

a - antioxidative activity expressed as a mass equivalent of ascorbic acid. 1 - sample, 2 - active component, 3 - antioxidative activity of 1 g of the colour concentrate, 4 - elderberry, 5 - anthocyanins, 6 - sunflower, 7 - red beet, 8 - betanin.

Literatúra

1. DAVÍDEK, J. - JANÍČEK, G. - POKORNÝ, J.: Chemie potravin. Praha : SNTL 1983. 630 s.
2. MACRAE, R. - ROBINSON, R. K. - SADLER, M. J.: Encyclopedia of food science, food technology and nutrition. Vol. 1. London : Academic Press 1993. 743 s.
3. WANG, H. - CAO, G. - PRIOR, L. R.: Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 1997, s. 304-309.
4. WANG, H. - CAO, G. - PRIOR, L. R.: Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 1996, s. 701-705.
5. SARMA, A. D. - YELLAMRAJU, S. - RAMESHWAR, S.: Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation. *Phytochemistry*, **45**, 1997, s. 671-674.
6. GIROTTI, S. - FERRI, E. - GHINI, S. - RODA, A. - PASINI, P. - CARREA, G. - BOVARA, R. - LODI, S. - LASI, G. - NAVARRO, J. - RAUCH, P.: Luminescent techniques applied to food analysis. *Química Analítica*, **16** (Suppl 1), 1997, s. S111-S117.
7. VÝSKUMNÝ ÚSTAV POTRAVINÁRSKY: Spôsob výroby farbiaceho preparátu z červenej repy. Autori: Šilhár, S. - Kintlerová, A. - Kováč, M. - Sodomová, E. - Klimková, R. - Drdák, M. Československá federatívna republika. Prihláška vynálezu, PV 3262-92. 30.10.1992.
8. VÝSKUMNÝ ÚSTAV POTRAVINÁRSKY: Koncentrát antokyánových farbív z výliskov plodov bazy čiernej. Autori: Šilhár, S. - Kintlerová, A. - Polívka, L. - Kováč, M. Slovenská republika. Prihláška úžitkového vzoru, PUV 32/98. 10.6.1998.
9. BRONUM-HANSEN, K. - HANSEN, S. H.: HPLC separation of anthocyanins of *Sambucus nigra* L. *Journal of Chromatography*, **262**, 1983, s. 385-392.
10. MAZZA, G. - MINIATI, E.: Malonyl anthocyanins in purple sunflower seed. *Phytochemistry*, **35**, 1994, s. 237-239.
11. HOLM, E. I. T.: Extraction and characterization of the pigment in the purple-hulled sunflower. *Dissertation Abstracts International*, -B, **48**, 1988, č. 8, Order no. DA8723825, 125 s.

Do redakcie došlo 20.4.1999.

Luminometric determination of the antioxidative activity of natural colour concentrates

KUCHTA, T. - HAPALA, I. - MÁRIÁSSYOVÁ, M. - CANTAGALLI, D. - GIROTTI, S.:
Bull. potrav. Výsk., **38**, 1999, p. 103-108.

SUMMARY. A luminometric method for the determination of antioxidative activity was developed. The method is based on the quantification of the interruption of luminescence of the system hydrogen peroxide - horseradish peroxidase - luminol following the addition of antioxidants. Ascorbic acid was used as a standard in order to construct the calibration curve. The method proved to be suitable for the determination of the antioxidative activity of anthocyanin and betalain colour concentrates.

KEYWORDS: antioxidative activity; luminescence; natural colour