

STANOVENÍ FENOLICKÝCH LÁTEK S ANTIOXIDAČNÍMI VLASTNOSTMI V OBILOVINÁCH

HOFMEISTER PAVEL, ŠILAROVÁ PETRA a ČESLOVÁ LENKA*

Katedra analytické chemie

* *Garant*

ÚVOD

Obiloviny tvoří základní složku lidské stravy. V rozvojových zemích tvoří více než dvě třetiny příjmu energie, v průmyslových zemích zabezpečují zhruba polovinu energetického příjmu¹. Technologickým zpracováním obilných zrn vznikají dvě třídy produktů, a to výrobky celozrnné a výrobky plně vymleté, které neobsahují povrchové vrstvy. Na základě mnoha výzkumů je prokázána výhodnost konzumace celozrnných výrobků a to zejména u snížení výskytu onemocnění cukrovkou, kardiovaskulárního systému či rakovinou. Kladný účinek na lidské zdraví je připisován chemickým látkám obsaženým v celozrnných výrobcích². Mezi zdraví prospěšné látky vyskytující se v obilovinách patří zejména fenolické látky. Nejčastěji jsou obsaženy fenolické kyseliny a flavonoidy, dále stilbeny, kumariny a taniny. Fenolické sloučeniny se v zrně vyskytují jako volné, rozpustné vázané a nerozpustné vázané na buněčnou stěnu³. Volné lze extrahovat do vodně organického rozpouštědla a po okyselení přechází do ethylacetátu či diethyléteru. Vázané fenolické látky je nutné před extrakcí nejdříve uvolnit pomocí kyselé či alkalické hydrolyzy². Na posouzení celkového obsahu fenolických látek se používají spektrofotometrické metody založené na reakci Folin-Ciocalteu činidla se vzorkem a výsledek se udává v ekvivalentním množství kyseliny galové⁴. Další spektrofotometrická metoda, která byla v této práci využita k posouzení celkové antioxidační kapacity je reakce založená na zhášení barevného ABTS radikálu. Tyto metody jsou ovšem nespecifické a mohou s nimi interferovat různé složky matrice. Pro kvantitativní analýzu jednotlivých fenolických látek byla proto využita vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS)⁵.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Obsah fenolických látek byl stanoven v běžně komerčně dostupných obilných produktech zakoupených v místní obchodní síti (tab. 1). Vybrané vzorky byly podrobeny tepelnému působení, které simulují běžné kuchyňské úpravy jako je vaření a pečení. Na simulaci tepelné úpravy byl vybrán vzorek ovesných a pšeničných vloček a loupané a pololoupané rýže. Vločky byly jak vařeny tak pečené, rýže pouze vařena. Na vaření bylo naváženo 20 g vzorku, přidáno 40 ml vody a vzorek byl vařen ve vodní lázni po dobu 20 min. Na pečení bylo také odměřeno 20 g vzorku a 40 ml vody a vzorek byl pečen při teplotě 180 °C po dobu 15 min.

Tabulka 1: Seznam použitých vzorků.

| Č. vz | Druh | Č. vz | Druh |
|-------|-----------------------------|-------|-------------------------|
| 1 | Pšeničná mouka plnohodnotná | 10a | Ovesné vločky pečené |
| 2 | Chlebová mouka pšeničná | 10b | Ovesné vločky vařené |
| 3 | Chlebová mouka žitná | 11 | Pšeničné vločky |
| 4 | Otruby ovesné | 11a | Pšeničné vločky pečené |
| 5 | Otruby pšeničné | 11b | Pšeničné vločky vařené |
| 6 | Hladká mouka pšeničná | 12 | Rýže loupaná |
| 7 | Špaldová mouka | 12a | Rýže loupaná vařená |
| 8 | Žitná mouka celozrnná | 13 | Rýže pololoupaná |
| 9 | Ovesná celozrnná mouka | 13a | Rýže pololoupaná vařená |
| 10 | Ovesné vločky | | |

Celkový obsah fenolických látek a antioxidační kapacita byly měřeny s využitím spektrofotometru Shimadzu (Kyoto, Japonsko). Jednotlivé fenolické látky byly stanoveny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem QTRAP 4500 (ABSCIEX, USA) a ionizací elektrosprejem (ESI). Použitý kapalinový chromatograf byl složen z čerpadel mobilní fáze LC-20AD, směšovače mobilní fáze, autosampleru SIL-20A (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) a termostatu kolony LCO 102 single (Ecom, Praha). Na separaci byla použita kolona Ascentis Express C18 (150x3 mm, 2,7 µm).

Extrakce fenolických látek

Vzorek byl nejprve zbaven tuků pomocí hexanu a pevný podíl byl vysušen pod proudem dusíku. Vysušený podíl byl extrahován 70% acetonem a pevný podíl byl opět vysušen.

Extrakt 1: Extrakt získaný pomocí 70% acetonu byl okyselen HCl na pH 2 a vyextrahován etylacetátem. Odsátá organická fáze byla vysušena pod proudem dusíku. Látky obsažené ve vodné fázi byly uvolněny pomocí alkalické (Extrakt 2) a kyselé hydrolyzy (Extrakt 3).

Extrakt 2: K vodnému podílu z první extrakce bylo přidáno 15 ml NaOH, EDTA a kyselina askorbová. Vzorek byl třepán 4 hodiny. Po protřepání byl vzorek okyselen na pH 2 a extrahován pomocí ethylacetátu. Organická fáze byla odsáta a odpařena.

Extrakt 3: K vodnému podílu z druhé extrakce byl přidán 1 ml 1M HCl a směs byla zahřívána ve vodní lázni při teplotě 90 °C po dobu 45 minut. Po ochlazení byl vzorek extrahován pomocí ethylacetátu a organická fáze byla odsáta a vysušena.

Extrakt 4: Vysušený pevný podíl zbylý po první extrakci byl hydrolyzován stejným způsobem jako extrakt 2.

Před analýzou byly vysušené extrakty rozpuštěny ve 2 ml 20% acetonitrilu, přefiltrovány přes filtr s póry o velikosti 0,45 µm a vhodně naředěny dle použité analytické metody.

ABTS metoda

Pevná tableta ABTS byla rozpuštěna v 5 ml vody a byl přidán roztok peroxidisíranu draselného a po minimálně 16 hodinách stání bylo činidlo bylo vhodně naředěno, aby absorbance výsledného roztoku byla kolem 0,8. Ke 3 ml naředěného činidla bylo přidáno 50 μ l vhodně naředěného extraktu a po 10 minutách byla měřena absorbance při vlnové délce 734 nm a vypočítán procentuální úbytek. Antioxidační aktivita byla vyjádřena v ekvivalentním množství Troloxu.

Celkový obsah fenolických látek

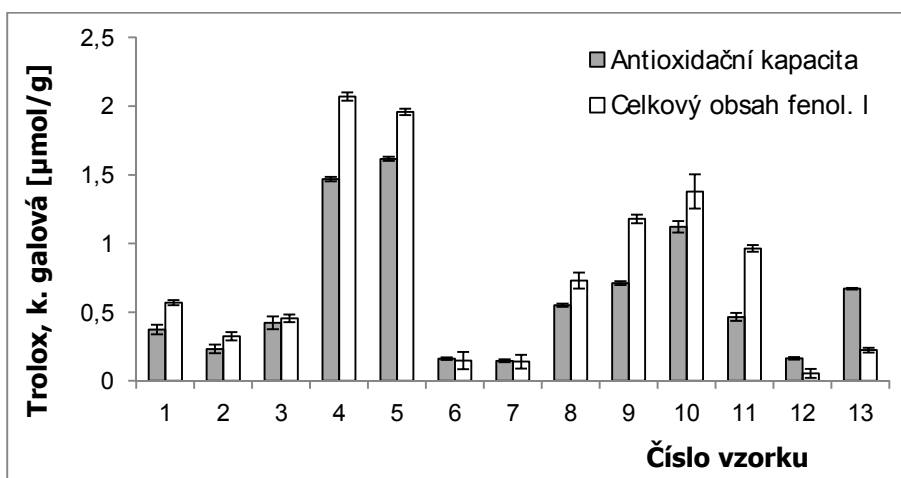
Celkový obsah fenolických látek byl stanoven reakcí s Folin-Ciocalteu činidlem. Komerčně dostupné činidlo bylo 10x naředěno a na měření byl použit 1 ml. K 1 ml činidla byl přidán 1 ml destilované vody a 50 μ l vhodně naředěného extraktu. Směs byla nechána v temnu po dobu 5 min a poté byl přidán 1 ml 7,5% roztoku uhličitanu sodného a po 30 min byla změřena absorbance při vlnové délce 750 nm a výsledek přepočítán na množství kyseliny galové.

Identifikace a kvantifikace jednotlivých fenolických látek

Identifikace a kvantifikace jednotlivých fenolických látek byla provedena pomocí HPLC-MS. Separace probíhala při teplotě 30 °C za gradientové eluce 0 min – 13% B, 4 min – 13% B, 12 min – 70% B. Složka A se skládala z redestilované vody s přísadkou 0,3 % kyseliny mravenčí, složka B byl acetonitril. Použitý gradient je znázorněn na obrázku 1. Použitý průtok kolonou byl 0,5 ml/min a množství dávkovaného vzorku 1 μ l.

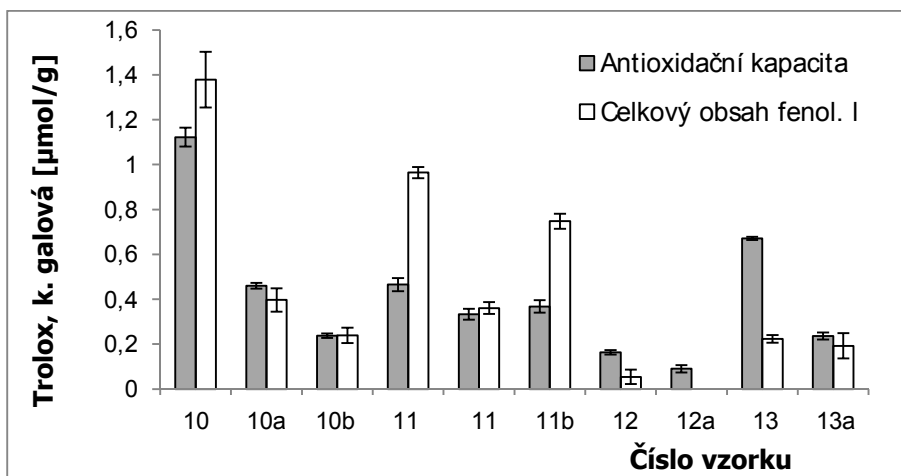
VÝSLEDKY A DISKUZE

Výsledky získány spektrofotometrickými metodami jsou prezentovány pro volné fenolické látky (extrakt 1) u jednotlivých studovaných vzorků na obrázku 1. Z naměřených hodnot byl na základě kalibračních závislostí vypočítán celkový obsah fenolických látek a antioxidační kapacita. Výsledky jsou vyjádřeny jako molární množství troloxu či kyseliny galové na 1 gram sušiny vzorku.



Obrázek 1: Celkový obsah fenolických látek a antioxidační kapacita extraktu 1 připraveného z obilovin bez tepelné úpravy.

Z grafu je patrné, že nejvíce antioxidačních látek obsahují vzorky 4 a 5 což jsou ovesné a pšeničné otruby. Toto zjištění koresponduje s předpokladem, že nejvíce antioxidačních látek se nachází v obalových vrstvách zrn. Vyšší obsah antioxidačních látek byl dále nalezen u vzorku 8, 9, 10 a 11 což je ovesná celozrnná a žitná celozrnná mouka a ovesné a pšeničné vločky. Nejnižší množství antioxidačních látek je ve vzorcích 6, 7 a 12. Jedná se o vzorky hladké bílé mouky, špaldové bílé mouky a loupané rýže. Pololoupaná rýže, vzorek 13 obsahuje více antioxidačních látek než rýže loupaná. Z uvedeného vyplývá, že obsah antioxidačních látek je určen technologickým zpracováním zrna, a to hlavně ponecháním obalových vrstev, než druhem obiloviny.



Obrázek 2: Porovnání celkového množství fenolických látek a antioxidační kapacity před a po tepelné úpravě.

Další část této práce je zaměřena na změnu obsahu antioxidačních látek kuchyňskými úpravami. Naměřené výsledky jsou znázorněny na obrázku 2, kde bylo potvrzeno, že tepelnou úpravou dochází k úbytku antioxidačních vlastností vzorku. Vyšší úbytek antioxidačních vlastností je zaznamenán u ovesných vloček než u vloček pšeničných.

V syrovém stavu obsahují ovesné vločky více antioxidantů, než vločky pšeničné. Po tepelné úpravě je obsah těchto látek buď vyrovnaný, nebo jich je více ve prospěch vloček pšeničných. Z uvedeného vyplývá, že každá obilovina obsahuje jiné antioxidanty, které jsou různě odolné vůči tepelným úpravám. V případě rýže je potvrzeno, že i po tepelné úpravě obsahuje rýže pololoupaná více antioxidantů než rýže loupaná.

Stanovení vybraných fenolických látek

Obsah pěti nejvíce zastoupených fenolických látek vyskytujících se jak ve volné tak vázané formě je uveden pro dva vybrané vzorky (chlebová mouka pšeničná, vzorek 2 a žitná mouka celozrnná, vzorek 8) v tabulce 2. Z uvedených dat je patrné, že extrakt D obsahuje nejvyšší koncentrace fenolických látek a to zejména v případě kyseliny ferulové, z čehož lze usuzovat, že nejvyšší množství antioxidantů se v zrně nachází pevně navázáno na nerozpustný podíl.

Tabulka 2: Porovnání extraktů.

| | Kys. vanilová | Kys. kávová | Vanilin | Kys. ferulová | Kys. sinapová |
|------------------|----------------------|--------------------|----------------|----------------------|----------------------|
| Vzorek 2 | | | | | |
| Extrakt A | 1,163±0,014 | 0,233±0,002 | 0,315±0,004 | 3,237±0,599 | 0,476±0,003 |
| Extrakt B | 1,639±0,118 | 0,712±0,006 | <LOD | 5,338±0,057 | 3,906±0,065 |
| Extrakt C | 1,292±0,014 | 1,274±0,005 | 0,152±0,003 | 2,470±0,024 | 0,953±0,019 |
| Extrakt D | 0,768±0,096 | 1,351±0,142 | 0,539±0,033 | 73,8±5,6 | 0,360±0,011 |
| Vzorek 8 | | | | | |
| Extrakt A | <LOD | 0,009±0,003 | <LOD | 0,341±0,030 | 0,077±0,008 |
| Extrakt B | <LOD | 0,096±0,005 | 0,223±0,048 | 1,756±0,116 | 4,151±0,285 |
| Extrakt C | 2,30±0,96 | 0,174±0,004 | 0,132±0,003 | 0,827±0,022 | 1,032±0,034 |
| Extrakt D | 15,7±3,1 | 1,600±0,054 | 12,76±0,44 | 97,5±2,5 | 8,626±0,210 |

Koncentrace jsou uvedeny v $\mu\text{g/g}$ sušiny

Změny v zastoupení fenolických látek tepelnou úpravou jsou znázorněny v tabulce 3. Pro porovnání byl vybrán vzorek pšeničných vloček (vzorek 11). Z experimentálních dat je patrné, že vlivem tepelné úpravy dochází k významnému snížení obsahu fenolických látek. Dále je patrné, že během vaření (vzorek 11b) dochází k vyššímu úbytku antioxidantů než během pečení (vzorek 11a) a to přesto, že pečení probíhá při vyšší teplotě. Tento fakt může být způsobem, že během pečení teplo působí pouze na okraje těsta a uprostřed může zůstat chladnější jádro, zatímco během vaření, při kterém se potravina míchá, dochází k rovnoměrnému ohřevu v celém objemu.

Tabulka 3: Porovnání obsahu fenolických látek před a po tepelné úpravě.

| | Kys.vanilová | Kys. kávová | Vanilin | Kys. ferulová | Kys.sinapová |
|-------------------|--------------|-------------|-------------|---------------|--------------|
| Vzorek 11 | | | | | |
| Extrakt A | 0,630±0,024 | 0,574±0,006 | 0,156±0,003 | 0,898±0,038 | 0,367±0,006 |
| Extrakt B | 1,314±0,039 | 0,727±0,011 | < LOD | 2,317±0,021 | 5,308±0,034 |
| Extrakt C | 1,255±0,150 | 0,232±0,026 | < LOD | 0,950±0,034 | 0,927±0,106 |
| Extrakt D | 15,91±0,40 | 22,6±0,55 | 2,050±0,062 | 259,7±5,7 | 62,9±1,2 |
| Vzorek 11a | | | | | |
| Extrakt A | 0,216±0,022 | 0,279±0,015 | 0,162±0,004 | 0,885±0,024 | 0,214±0,005 |
| Extrakt B | 1,040±0,092 | 0,496±0,047 | < LOD | 1,885±0,102 | 2,181±0,060 |
| Extrakt C | < LOD | < LOD | < LOD | 0,072±0,017 | 0,008±0,006 |
| Extrakt D | 2,083±0,064 | 6,132±0,115 | 0,683±0,007 | 51,745±1,360 | 7,281±0,154 |
| Vzorek 11b | | | | | |
| Extrakt A | 0,406±0,016 | 0,002±0,001 | < LOD | 0,541±0,019 | 0,064±0,005 |
| Extrakt B | 0,344±0,181 | 0,051±0,30 | < LOD | 0,896±0,332 | 0,953±0,356 |
| Extrakt C | 0,450±0,117 | 0,061±0,015 | < LOD | 0,271±0,088 | 0,601±0,096 |
| Extrakt D | 0,965±0,037 | 2,517±0,082 | 0,514±0,007 | 31,95±0,91 | 3,591±0,119 |

Koncentrace jsou uvedeny v µg/g sušiny

ZÁVĚR

Antioxidační kapacita a celkový obsah fenolických látek se velmi liší v závislosti na druhu obilovin. Zároveň byl pozorován pokles v obsahu fenolických látek vlivem kuchyňské úpravy vybraných obilovin. Bylo potvrzeno, že většina antioxidačních látek se nachází v obalových vrstvách a proto lze doporučit konzumaci celozrnných výrobků. Z konkrétního stanovení vybraných fenolických látek lze usoudit, že většina antioxidantů se v zrně nachází ve vázané formě. Nejvýznamněji je v obilovinách zastoupena kyselina ferulová, vanilinová, p-kumarová a syringová, přičemž kyselina ferulová je nejvíce obsažená jako vázaná na buněčné stěny.

LITERATURA

1. Salunkhale D.K., Deshpande S.S. (Eds.): *Food of plants origin, production, technology, and human nutrition*. Van Nostrand Reinhold, New York 1991, p. 6-13.
2. Li I., Shewry S., Ward J.L.: *J. Agric. Food. Chem.* 56, 9732 (2008).
3. Dinelli G., Carretero A.S., Di Silvestro R., Marotti I., Fu A., Benedettelli S., Ghiselli L., Gutierrez A.F.: *J. Chromatogr. A* 1216, 7229 (2009).
4. Nicoletti I., Martini D., de Rossi A., Taddei F., D' Egidio M.G., Corradini D.: *J. Agric. Food. Chem.* 61, 11800 (2013).
5. Decker E.A., McClements R.J., McClements D.J.: *Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications: Understanding Mechanisms of Oxidation and Antioxidant Activity*. Woodhead Publishing, Cambridge 2010, p. 332-363.