

## Új mérési eljárás fejlesztése a növényi antioxidáns státusz meghatározására

<sup>1</sup>Nemes Andrea – <sup>2</sup>Stefanovitsné Bányi Éva – <sup>1</sup>Remenyik Judit

<sup>1</sup>Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar,  
Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet, Debrecen

<sup>2</sup>Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar,  
Alkalmazott Kémia Tanszék, Budapest

andrea.nemes83@gmail.com

### ÖSSZEFOGLALÁS

Meghatároztuk 12 db 2014-ben termesztett meggyfajta antioxidáns kapacitását FRAP (a plazma vasredukáló képességén alapuló antioxidáns kapacitás), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl gyökfogó aktivitás) TEAC (Troloxra vonatkoztatott Antioxidáns Kapacitás) és kemiluminometriás módszerrel. A meggyben az antioxidáns tulajdonságú vegyületek közül legnagyobb mennyiségben az antocianinok vannak jelen. Mérési eredményeink azt mutatják, hogy az alkalmazott mérési módszerek közül a kemiluminometriás technika a legalkalmasabb a magas antocianin tartalmú meggy antioxidáns kapacitásának meghatározására.

**Kulcsszavak:** meggy, antioxidáns, antocianin, ACL, ACW

### SUMMARY

The antioxidant capacity of 12 cultivar that were harvested in 2014, were determined by FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical-scavenging activity) TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) and photochemiluminescence method. In sour cherry, the most antioxidant effects of natural bioactive compounds are anthocyanins. Our results show that the photochemiluminescence method is the most suitable to determine the antioxidant capacity of red soft fruits and tart cherries.

**Keywords:** sour cherry, Antioxidant, Antocyanin, ACL, ACW

### BEVEZETÉS

Az antioxidánsok az elmúlt években egyre inkább a figyelem középpontjába kerültek, megsokszorozódtak a publikációk az antioxidánsok és az oxidatív stressz témájában. Ezekből ma már tudjuk, hogy élettani szempontból igen kedvező a friss gyümölcs fogyasztása, hiszen vitamin- és ásványi anyag tartalmuk az emberi szervezet számára létfontosságú.

Azonban, bár számos módszert kifejlesztettek már a bennük előforduló antioxidáns hatású vegyületek komplex vagy bizonyos tulajdonságok alapján szelektíven történő meghatározására, továbbra sincs szabvány módszer e komponensek mérésére.

### Antioxidánsok

Az antioxidánsok olyan elsődleges illetve másodlagos növényi metabolitok, melyek az oxidálható szubsztráthoz képest kis koncentrációban vannak jelen, és szignifikánsan lassítják, vagy teljesen meggátolják annak oxidációját.

Az antioxidáns vegyületeket elsőrendű (láncmegszakító) és másodrendű (preventív) antioxidánsokra oszthatjuk (Lugasi et al., 1999), de feloszthatók enzimes, illetve nem enzimikus folyamatokra is (Halliwell és Gutteridge, 1989; Vaya és Aviram, 2001).

### Szabadgyökök

A szabadgyökök olyan molekulák, amelyek legkülső elektronhéján párosítatlan elektron foglal helyet. Mivel ezen komponensek belső energiája nagy, a szabadgyökök nagy reakciókészséggel rendelkeznek, rövid az

élettartamuk, és gyorsan reakcióba lépnek a közelükben lévő molekulákkal, a sejt alkotóelemeivel, a fehérjékkel, zsírokkal vagy akár a DNS-sel is (Cadenas, 1989; Vaya és Aviram, 2001; Biró, 2003; Lugasi és Blázovics, 2004).

A szabadgyökök – mivel károsítják a sejteket –, számos betegség kockázatát megnövelik: például a szív- és érrendszeri betegségeket, a rosszindulatú daganatokat, okozhatnak idegrendszeri betegségeket, tüdőbetegségeket, autoimmunbetegségeket és szembetegségeket (Langseth, 1995; Lachance et al., 2001).

A szabadgyökök létrejöhetnek egyrészt a normál sejtanyagcsere során. Ezek olyan reaktív oxigén származékok (ROS), mint a hidroxil gyök (OH<sup>•</sup>), szuperoxid anion gyök (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), nitrogén-monoxid (NO<sup>•</sup>) és peroxil (RO<sub>2</sub><sup>•</sup>) gyökök. A peroxinitrit (ONOO<sup>-</sup>), a hipoklórossav (HOCl), a hidrogén-peroxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), valamint a szingulett dioxid (O<sub>2</sub><sup>•</sup>) (Halliwell és Gutteridge, 1989). Másrészt létrejöhetnek a külső környezetben a molekuláris oxigén redukciójával, vagy gerjesztéssel, illetve más molekulákból nagyenergiájú (UV, radioaktív, elektromágneses) sugárzás, hő, egyes gyógyszerek, vegyszerek, ipari oldó- és tisztítószer, ózon, szmog, dohányfüst, por és egyéb légköri szennyeződések hatására. A környezetünkben lévő szabad gyökök élelmiszerekkel elfogyasztva, belélegezve vagy a bőrünkön keresztül jutnak a szervezetünkbe (Fehér és Vereckei, 1985; Frei, 1994).

Az oxidatív stressz az egyensúly megbomlását jelenti a reaktív oxigén vegyületek és az antioxidánsok között. Ez a folyamat a sejtek károsodását és pusztulását okozhatja, ami betegségekhez vezet (Aruoma, 1998).

Fontos azonban azt is megemlíteni, hogy szabadgyököknek fontos szerepe van a szervezet normál működésének fenntartásában. Normál körülmények között

a szervezetben keletkező szabadgyökök fő forrása a mitokondriális és mikroszomális elektrontranszportláncokból, a fagocita sejtekből és az enzimrendszerekből kifolyó elektronáramlás. Bizonyos mennyiségű reaktív oxigénforma szükséges a normális sejtműködés fenntartásához, a sejtek közötti szignál-transzdukcióhoz, a sejtek szaporodásához, a védekezést szolgáló gyulladássos folyamatokhoz, és az apoptózishoz, vagyis a programozott sejtpusztuláshoz (Lachance et al., 2001; Biró, 2003).

### A szervezet védelmi rendszere

Az emberi szervezet a zavartalan működéséhez, számos védelmi funkciót alakított ki. Ezek egyike az antioxidáns védelmi mechanizmus, melyet enzimés és nem enzimikus folyamatokra oszthatunk, ezt hívjuk antioxidáns védelmi rendszernek.

Az enzimés védelmi rendszerhez tartozik például a kataláz, a glutation-peroxidáz és a szuperoxid-dizmutáz enzimek, amely a szabad gyökök közömbösítését végzik, azok a molekulák, amelyek a mérgező anyagokat távolítják el (glutathion-S-transzferázok, kinon-reduktáz), valamint a javító enzimek, amik a molekulák szerkezetében végbement károsodásokat javítják ki (Lugasi, 2001). Az 1. táblázat tartalmazza a legfontosabb enzimeket és azok reakcióit.

A nem enzimikus védelmi mechanizmuson belül megkülönböztetünk nagy molekulatömegű fehérjékhez (cörolóplazmin, ferritin) kötődő komponenseket és kis molekulatömegű vegyületeket. A kis molekulatömegű antioxidánsok közé a C-, az E- és az A-vitamin, valamint az A-vitamin provitaminja, a  $\beta$ -karotin tartozik. A vitaminokon kívül, a flavonoidok, az izoflavonoidok, a fenolsavak és származékaik, a fitinsav, néhány kéntartalmú aminosav, a redukált glutathion, a szelén, bizonyos körülmények között a szőlőcukor, a húgysav, a bilirubin, az ubikinon (Q-10) és a liponsav.

1. táblázat

Az enzimés védelmi rendszer legfontosabb enzimei és enzimreakciói

Enzimek(1)	Reakciók(2)
Szuperoxid-dizmutáz (SOD)(3)	$2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
Kataláz(4)	$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$
Glutathion-peroxidáz (GSHpx)(5)	$2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$ , $2GSH + ROOH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$

Forrás: Boots et al. (2008)

Table 1: Main enzymes and enzymatic reactions of enzymatic antioxidant defence system

Enzymes(1), Reactions(2), Superoxide dismutase(3), Catalase(4), Glutathione peroxidase(5), Source: Boots et al. (2008)

Az emberi szervezetben az antioxidánsok szinergens, vagyis egymást erősítő hatással rendelkeznek, így együttes alkalmazásukkal kedvezőbb hatás érhető el a szabadgyökök ellen, mint külön-külön bevitel esetén (Lugasi, 2001).

Az még kevésbé köztudott, hogy figyelni kell az antioxidánsok megfelelő mennyiségi és minőségi bevitelére is, mivel túlzott fogyasztásuk esetén prooxidáció alakulhat ki, vagyis az antioxidánsok maguk is prooxidánsokká válhatnak, és a szabadgyökökhöz hasonlóan károsan befolyásolhatják a szervezet működését. Ezt nevezzük antioxidatív stressznek (Lugasi, 2001; Bouayed és Bohn, 2010).

### Antioxidatív stressz

Az antioxidánsok jótékony hatásairól már számos tanulmány született, azonban csak az elmúlt években kezdték vizsgálni, hogy milyen mennyiségben szükséges az antioxidánsok bevitel, illetve, hogy túlzott fogyasztástól antioxidatív stressz alakulhat ki. Magas koncentrációban sok antioxidáns okozhat káros elváltozást a sejtekben, a szövetekben, és ezáltal a szervezetben. Nagyon fontos lenne tehát tudni az egyes antioxidánsokban gazdag élelmiszerek, étrend-kiegészítők valódi antioxidáns kapacitását, mivel így kivédhető lenne, hogy antioxidánsok prooxidánsokká váljanak.

A folyamat lényege, hogy az antioxidánsok nem tudnak különbséget tenni azok között a szabadgyökök között, amelyeknek még fontos szerepe van a fiziológiai folyamatokban, és azok között, melyek már károsítanak a sejteket. A túlzott C-vitamin bevitel például

növeli a vas indukálta lipidperoxidációt (Dündar és Aslan, 2000), az E-vitamin véralvadást gátlókkal történő együttes szedése pedig nők esetében vérzési komplikációkhoz vezethet (Antal és Regöly-Mérei, 2012). Bjelakovic et al. (2007) szerint pedig a  $\beta$ -karotinnal, A-vitaminnal és E-vitaminnal történő hosszú távú kezelés növelheti a mortalitást.

Természetesen az étrendünk is tartalmaz vitaminokat és egyéb antioxidáns hatású vegyületeket, ezek fogyasztása azonban biztonságos, mivel nem tudunk belőlük akkora mennyiséget elfogyasztani, hogy az káros legyen. Probléma akkor lehet, ha túlzott mértékben fogyasztunk vitaminkészítményeket, antioxidáns hatású vegyületeket tartalmazó táplálék-kiegészítőket, ez ugyanis felboríthatja a szervezet fiziológiai egyensúlyát (Dündar és Aslan, 2000; Poljsak és Milisav, 2012).

### Antioxidáns-kapacitást mérő módszerek

Számos elvet és módszert fejlesztettek ki a kutatók az antioxidáns-kapacitás meghatározására. Ennek ellenére elmondható, hogy az antioxidáns vegyületek tanulmányozása igen költséges, és nem túl hatékony folyamat.

A problémát az okozza, hogy bár egyre több új eljárás jelenik meg, a különböző módszerekkel mért eredmények összehasonlíthatósága mégis egyre nagyobb gondot okoz. Több kutatócsoport is felvetette már, hogy a szabványmódszerek hiánya miatt nehéz összevetni az eredményeket, és hogy szükség lenne a különböző antioxidáns-kapacitást mérő módszerek előnyeinek és hátrányainak megvitatására. Ez azért fontos, hogy a validált referencia-módszereket tovább fejleszt-

hessék, és egy standard, széles körben alkalmazott módszer legyen elérhető az antioxidánsok vizsgálatával foglalkozó kutatók számára.

A jelenleg használt antioxidáns-kapacitást mérő módszereket 2 csoportra lehet osztani:

1. hidrogén atom átvitelén alapuló meghatározások (HAT – Hidrogen Atom Transfer), és
2. elektronátmeneten alapuló vizsgálatok (ET – Electron Transfer).

A hidrogénatom-átvitelen alapuló elemzések többsége egy versengő reakciórendszert alkalmaz, amelyben az antioxidánsok és a szubsztátok versenyeznek a termikusan keletkezett peroxi-gyökökért.

Az elektronátmeneten alapuló módszerek a színváltozás mértékével mérik az antioxidáns-kapacitást úgy, hogy az antioxidánsok mennyiségi csökkenése színváltozást okoz, és a színváltozás mértéke korrelál a minta antioxidánsainak koncentrációjával (Huang et al., 2005).

Kutatásainkhoz három hidrogénatom-átvitelen (FRAP, DPPH, TEAC) és két elektronátmeneten (ACL, ACW) alapuló vizsgálatot használtunk fel.

#### **Vasredukáló képességen alapuló módszer – FRAP–Ferric Reducing Ability of Plasma**

A FRAP módszert Benzie és Strain (1996) fejlesztette ki. A módszerben a  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ komplexet (TPTZ = 2,4,6 tripiridil-s-triazin) az antioxidáns hatású vegyületek redukálják. Ez a reakció színváltozással jár (sárgából kék lesz), ami spektrofotométeren detektálható.

Előnye, hogy az egyik legolcsóbb, leggyorsabb és leggyakrabban használt laboratóriumi módszer, rutinvizsgálatokhoz is fel lehet használni, és nincs hozzá szükség drága műszerekhez.

Hátránya, hogy a mérés a fiziológiai pH-nál jóval alacsonyabban történik (pH 3,6), hogy a tiol típusú antioxidánsok és a karotinoidek nem mérhetők vele, mivel a tiol típusú vegyületekre (például a glutationra) nem érzékeny, a karotinoideknek pedig nincs vasredukáló képességük. További problémát okozhat még, hogy más vegyületek is adhatnak interferenciát az adott hullámhosszon, illetve, hogy vannak olyan komponensek, amelyek redoxpotenciálja kisebb, mint 0,77 V, mivel ezek is képesek redukálni a vas-iont, így nem csak az antioxidánsokat detektálja a készülék. Néhány komponens (például kávésav) reakcióideje hosszabb, mint az ebben az eljárásban alkalmazott 5 perc, így ezek az antioxidánsok nem tudják kifejteni redukáló hatásukat, így a módszer nem tudja mérni őket (Balogh et al., 2010; Balogh, 2010).

#### **DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) gyökmegekötésén alapuló antioxidáns kapacitásmérés**

A módszer kidolgozása Blois (1958) nevéhez fűződik. A DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) egy stabil szabadgyök, melynek lila színe az antioxidánsokkal lezajlott reakció után elhalványul. Ezt a színintenzitás-csökkenést lehet mérni spektrofotométerrel.

A módszer előnye, hogy a DPPH kereskedelmi forgalomban is kapható stabilgyök, valamint, hogy a mérés egyszerűen kivitelezhető.

Számos hátrányai közé tartozik, hogy a gyök a normál anyagcsere során nem keletkezik, az élő szerve-

zetben nem található meg, tehát nehéz demonstrálni, hogy a minta antioxidánsai a biológiai gyökökkel szemben mennyire reaktívak. További jellemző, hogy pH-, oldószer-, fény- és oxigénfüggő, valamint a gyöknek rossz a hozzáférhetősége (a kis molekulák jobban oda-férnek a gyökhöz), illetve a karotinoidek interferálnak az alkalmazott hullámhosszon (Huang et al., 2005; Frankel és Meyer, 2000; Balogh, 2010).

#### **Troloxra vonatkoztatott Antioxidáns Kapacitás – TEAC–Trolox Equivalent Antioxidant Capacity**

A módszer kidolgozása Miller et al. (1993) nevéhez fűződik. A reakció az ABTS (2,2'-azinodi-(3-etilbenzotiazolin)-6-szulfoninsav) oxidációján alapszik. A sötétzöld színű  $\text{ABTS}^+$ -kation gyök reagál a mintában lévő antioxidánsokkal, ez által elszíntelenedik. A színváltozás mértéke ekvivalens az elreagált gyökök mennyiségével, így a színintenzitás csökkenés mérésével spektrofotométeren meghatározható a minta antioxidáns tartalma (Stratil et al., 2008).

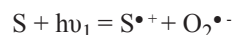
Előnye, hogy olcsó, és egyszerű módszer, valamint hogy az alkalmazott hullámhosszon a természetes növényi pigmentek nem okoznak jelentős interferenciát.

Hátránya, hogy hosszú időt vesz igénybe a minta-előkészítés, mivel a mérés előtt 12 óras inkubálás szükséges ahhoz, hogy az ABTS gyök kialakuljon. Nem egy élő szervezetben előforduló gyököt használ, így nem tudhatjuk, hogy a biológiai gyökökkel hogyan reagálnak a minta antioxidánsai. Gondot okozhat, hogy az előállított szabadgyök csak rövid ideig stabil, valamint hogy nem standardizált, ezért nehéz összehasonlítani az egyes laboratóriumokban kapott eredményeket. Azt is bizonyították már, hogy a szerkezeti különbségek valamint hasonlóságok (például a leadható elektronok száma) és a mért eredmények között ebben az esetben nincs összefüggés (Zulueta et al., 2009; Balogh, 2010).

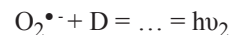
#### **Fotokemilumineszcencián alapuló antioxidáns-kapacitásmérés – PCL (Photochemiluminescence)**

A PCL módszert és a Photochem készüléket Popov és Lewin (1994, 1996) fejlesztette ki eredetileg vérplazma antioxidáns-kapacitásának mérésére. Mi ezt a módszert fejlesztettük tovább növényi minták meghatározására. Az 1. ábra a Photochem készülék működési diagramját mutatja be.

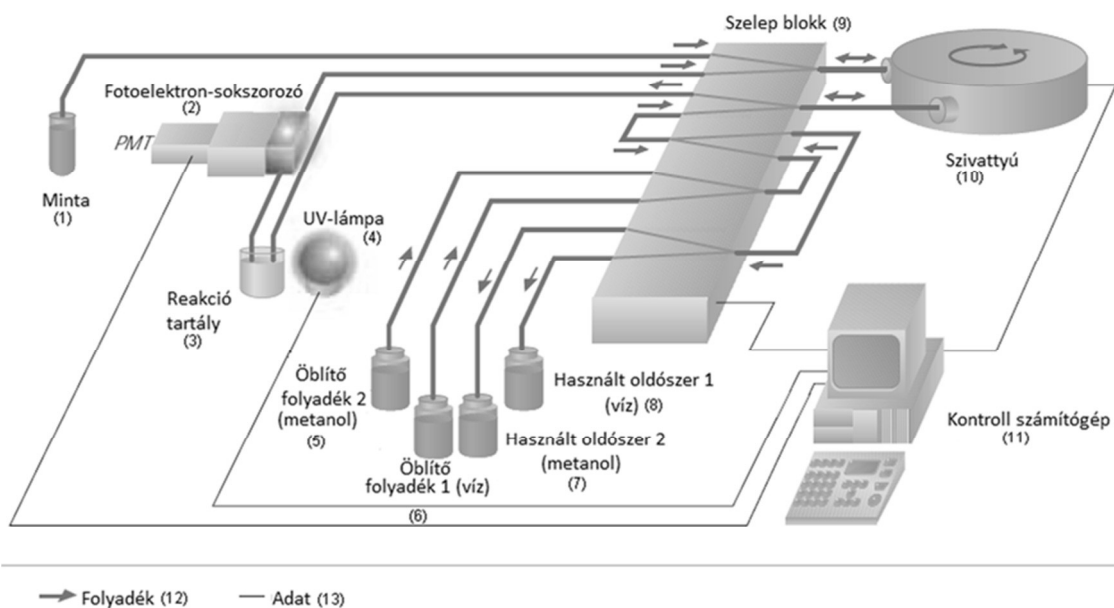
A módszer fotokemilumineszcencián alapul, melynek lényege, hogy a mintában lévő fényérzékeny anyag (S) UV-fény hatására ( $h\nu_1$ ) gerjesztődik, és szuperoxid anion gyök képződik ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ ), melynek egy része eliminálódik a minta antioxidáns tartalma miatt.



Az el nem reagált szuperoxid anionok egy specifikus fotokémiai detektor vegyülettel (D) reagálnak, lumineszcenciát ( $h\nu_2$ ) hozva létre, tehát a lumineszcencia mérésével határozható meg az antioxidánsok kapacitása.



1. ábra: A Photochem műszer működési diagramja



Forrás: Net1

Figure 1: The Photochem instrument measurement schematics

Sample(1), Photomultiplier(2), Reaction chamber(3), UV lamp(4), Rinsing liquid 2 (methanol)(5), Rinsing liquid 1 (water)(6), Waste bottle 2 (methanol)(7), Waste bottle 1 (water)(8), Valve block(9), Pump(10), Control-computer (11), Liquids(12), Data(13), Source: Net1

A Photochem a legelső olyan műszer, amely egyaránt képes a vízoldható és a zsírolható antioxidáns-kapacitás, valamint specifikusan a szuperoxid-dizmutáz enzim antioxidáns-kapacitás meghatározására.

Előnye, hogy standardizált kitekkel és nagyon kis mintamennyiséggel ( $\mu\text{l}$ ) dolgozik, mégis pontos mérést tesz lehetővé. Nem igényel bonyolult és időigényes minta-előkészítést, valamint költséghatékony, mivel nincs szükség drága vegyszerekre vagy enzimekre. Nagyon nagy előnye – a többi módszerrel szemben –, hogy egy élő szervezetben is megtalálható szabadgyököt (szuperoxid anion gyököt) használ, és biztosítva azt, hogy azok a vegyületek, amelyek a mérés során antioxidáns tulajdonságúnak bizonyulnak, a szervezetben is ki fogják majd fejteni a hatásukat. A minta be-

és kiadagolását, illetve a mérést és az adatrögzítést – számítógépes szoftver felügyelete mellett – automatikusan végzi a műszer. Gyors félautomata módszer (a mérési idő 1–3 perc), és a nem enzimikus antioxidánsok nanomólos koncentrációjának meghatározására is képes (Popov és Lewin, 1996; Veres et al., 2008). A mérési görbék a 2. ábrán láthatóak.

ACW esetében, a kapott görbe első deriváltja által meghatározott inflexiós ponthoz húzott érintő x tengely metszete adja meg a mintában található antioxidánsok mennyiségét (Popov és Lewin, 1994).

ACL esetében a program mind a vak, mind a minta mérési görbe alatti területét kiszámolja, integrálja, és a kettő különbségéből meghatározza az adott minta antioxidáns-kapacitását (Popov és Lewin, 1996).

2. ábra: Az ACW és az ACL módszer mérési görbéje

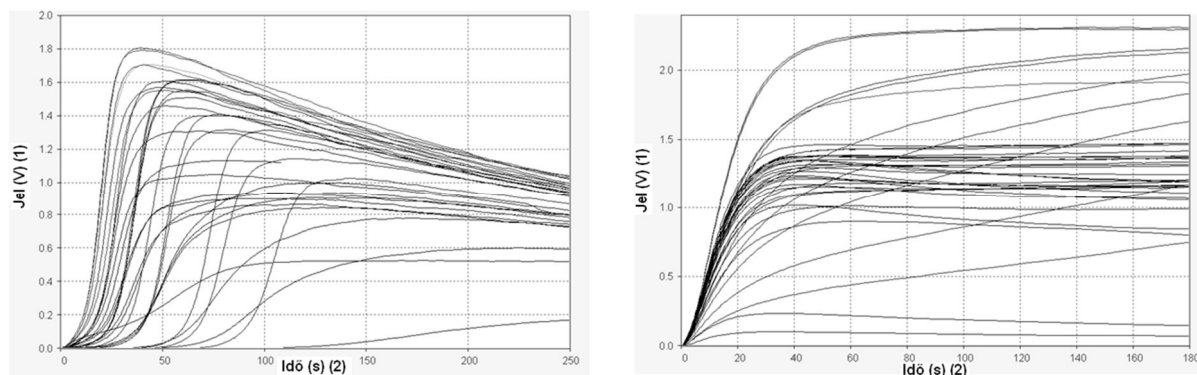


Figure 2: The measuring curve of the ACW and ACL method  
Signal (V)(1), Time (s)(2)

## ANYAG ÉS MÓDSZER

Vizsgálataink során 12 darab, 2014-ben termesztett meggyfajta antioxidáns-kapacitását határoztuk meg öt különböző módszerrel. A fajták a Debreceni Egyetem Pallagi Bemutatókertjéből származnak. A mintagyűjtés június és július közepe között történt az érés utolsó stádiumában. A betakarított gyümölcsöket a laboratóriumba történő szállítás után (-20 °C) fagyaszta tároltuk. A méréseket minden esetben háromszori ismétléssel végeztük el, az eredmények kiértékelésénél a kapott értékek átlagai szerepelnek, a szórás feltüntetésével.

### Minta-előkészítés antioxidáns-kapacitás meghatározására

Az antioxidáns aktivitás vizsgálatához a mintákat lefagyasztottuk, liofilizáltuk, porítottuk, majd a mintákból 25 mg/cm<sup>3</sup> koncentrációjú oldatokat készítettünk eppendorf csövekben. Az oldatok elkészítéséhez a vizsgálat jellegének megfelelő oldószert használtuk fel (FRAP – desztillált víz, DPPH – metanol, ACW – desztillált víz, ACL – metanol). Az így előkészített mintát 5 percig 10 000 rpm-en „2-16 Sartorius” (Sigma) típusú laboratóriumi centrifugán centrifugáltuk. A mérések elvégzéséhez az így kapott felüliszót használtuk fel.

### Vasredukáló képesség meghatározása FRAP módszerrel

A FRAP értékek meghatározása Benzie és Strain (1996) módszere alapján történt spektrofotometrián ( $\lambda=593$  nm). A módszer azon alapszik, hogy a 2,4,6-tris-(2-piridil)-s-triazin Fe(III)-al képzett komplexe antioxidáns jelenlétében redukálódik Fe(II) vegyület képződésével. A reakció következtében a kiindulási komplex vegyület színe sárgából kékre változik.

A reagenshez először el kell készítenünk az acetát puffert (3,1 g nátrium-acetát\*3H<sub>2</sub>O, 16 ml ecetsav/1 dm<sup>3</sup>), a FeCl<sub>3</sub>-oldatot (54 mg FeCl<sub>3</sub>/10 ml DV) és a TPTZ-oldatot (31,23 mg 2,4,6-tri (2-Piridil)-1,2,5-triazin (TPTZ), 33,5  $\mu$ l c.c. HCl/10 ml DV). Ezekből az oldatokból mérjük össze a FRAP reagenst (25 ml Acetát puffer, 2,5 ml FeCl<sub>3</sub>-oldat, 2,5 ml TPTZ-oldat). A mérés 593 nm-en folyik (Amersham Biosciences, Ultrospec 2100 pro, England).

### H donor aktivitás meghatározás DPPH módszerrel

A DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), amely stabil gyök képzésére alkalmas, jellemző aktivitást mutat 517 nm-en. A DPPH reakcióban az antioxidáns molekula H-atomok jelenlétében (melyet a vizsgálandó H-donor aktivitással rendelkező vegyületek szolgáltatnak) könnyen protonálódik, mely folyamat eredményeként az abszorbancia csökken. Ha az antioxidánsok reagálnak a gyökkel, az eredetileg lila vegyület színtelenné válik. Az oxidatív hatás erősségét általában azzal az antioxidáns koncentrációval jellemzik, amely felezi a szabadgyökök koncentrációját. Az összehasonlíthatóság kedvéért, mi a minták tényleges koncentrációját határoztuk meg (Hatano et al., 1988). A reagens 9%-os metanolos DPPH oldat. A mérést 517 nm-en végezzük

(Amersham Biosciences, Ultrospec 2100 pro, England), az összeméréstől számítva 30 perc elteltével (addig a kémcsöveket sötétben tároljuk).

### Troloxra vonatkoztatott Antioxidáns Kapacitás – TEAC–Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

A Troloxra vonatkoztatott Antioxidáns Kapacitás módszert Miller et al. (1993) dolgozták ki, majd Stratil et al. (2008) fejlesztették tovább. A reakció az ABTS (2,2'-azinodi-3-etilbenzotiazolin-6-szulfoninsav) oxidációján alapszik, kálium-perszulfát jelenlétében sötétzöld ABTS<sup>+</sup>-kation gyök képződik. A mintában megtalálható antioxidánsok a szabadgyökökkel reagálnak, így a színintenzitás csökken, és az oldat elszíntelenedik. Ezt mérjük spektrofotométeren, 734 nm-en.

A reagens készítéséhez 4,95 mmol/l kálium-perszulfát és 7 mmol/l ABTS 1:1 arányú oldata szükséges. Összemérés után az oldatot 12 órára sötét helyen kell tárolni szobahőmérsékleten, hogy kialakuljon a méréshez szükséges gyök. Az elkészült oldatot 10-szeresére hígítottuk desztillált vízzel, pH-ját 7,7-re állítottuk. A mérést spektrofotométeren (Amersham Biosciences, Ultrospec 2100 pro, England), az összeméréstől számítva 20 perc elteltével kell elvégezni (addig a kémcsöveket sötétben tároljuk).

### Antioxidáns kapacitás meghatározása kemilumineszenciás módszerrel

A vízoldható antioxidáns aktivitás (Antioxidant Capacity of Water-soluble, ACW) meghatározásánál az oldatkészítéshez desztillált vizet, a zsíroldható antioxidáns aktivitás mérésénél (Antioxidant Capacity of Lipid-soluble, ACL) pedig metanol használtunk fel. Az antioxidáns kapacitás mérését Photochem® (Analytik Jena AG, Germany) készüléken, a megfelelő készen vásárolható mérő kitek alkalmazásával végeztük el.

ACW esetében, az eredményeket aszkorbinsav ekvivalenciában adtuk meg (Popov és Lewin, 1994), ACL esetében pedig trolox ekvivalenciában fejeztük ki (Popov és Lewin, 1996).

### Antocianinok meghatározása pH differenciális módszerrel

A vizsgálathoz két különböző pH-jú oldatot kell előkészíteni egy pH 1,0-es puffert (KCl – HCl) és pH 4,5-ös puffert (Na-acetát – HCl). Az előkészített minták mérése 530 és 700 nm-en (Amersham Biosciences, Ultrospec 2100 pro, England) párhuzamosan zajlik (Lee et al., 2005).

### C-vitamin-meghatározás

A mérés a C-vitamin redukáló tulajdonságán alapul. A Fe(III) ionokból ekvivalens mennyiségű Fe(II) ionok keletkeznek, melyek az  $\alpha,\alpha'$ -dipiridil reagenssel színes komplexet képeznek, így a C-vitamin mennyisége spektrofotométeren mérhető.

A mintákból 5–5 g-ot kimértünk dörzsmozsárba és az aszkorbinsav konzerválására hozzáadtunk 1 ml ecetsavat. Péppé dörzsteltük, majd 100 ml-es mérőlombikba mostuk, és desztillált vízzel jelig töltöttük. Az elké-

szített és összerázott oldatból 50 ml-t kettős redőszűrőn Erlenmeyer lombikba szűrtünk, majd az oldatokat 15 percig centrifugáltuk. A felülúszókat ismét szűrtük és így tiszta, világos sárga oldatokat kaptunk.

Ezután egy mérőlombikba a következő oldatokat mértük össze: 10 ml ecetsavas kivonatot, 10 ml desztillált vizet, 3 ml 10%-os foszforsavat (az oldat pH-ja 1,7 legyen), 2,5 ml  $\alpha,\alpha$ -dipiridil reagent (1 g  $\alpha,\alpha$ -dipiridil oldva 100 ml etanolban) és 1 ml  $\text{FeCl}_3$  oldatot. Mindezek mellett a méréshez el kell készíteni minden minta saját vakját. A minták ecetsavas kivonatából 10 ml-t egy másik mérőlombikba is belepipettázzuk, majd 10 ml desztillált vizet, 3 ml 10%-os foszforsavat (az oldat pH-ja 1,7 legyen), és 1 ml  $\text{FeCl}_3$  oldatot adunk hozzá. A lombikok tartalmát összeráztuk és 30 percig sötét-

ben állni hagytuk. 30 perc elteltével a lombikokat desztillált vízzel 100 ml-re kiegészítettük és összerázás után 496 nm-en, Amersham Biosciences Ultraspec 2100 pro típusú spektrofotométeren mértük (Kandra, 2006).

### EREDMÉNYEK

Mivel a vizsgálatok célja a különböző antioxidáns-kapacitást mérő módszerek összehasonlítása volt, a minta előkészítést – az Anyag és módszer c. fejezetben leírtak szerint – egységesítettük.

Meghatároztuk a rendelkezésünkre álló 12 meggyfajta antioxidáns kapacitását FRAP, DPPH, TEAC és két kemiluminometriás módszerrel (2. táblázat).

2. táblázat

Zsírolldható antioxidáns kapacitás DPPH, TEAC és ACL módszerrel és az antocianinok koncentrációja (friss tömegre vonatkoztatva)

Minta neve(1)	DPPH ( $\mu\text{g Trolox/mg}$ )(2)	TEAC ( $\mu\text{g Trolox/mg}$ )(3)	ACL ( $\mu\text{g Trolox/mg}$ )(4)	Antocianinok ( $\mu\text{g/mg}$ )(5)
Achat	0,812 $\pm$ 0,011	1,129 $\pm$ 0,009	2,874 $\pm$ 0,016	0,324 $\pm$ 0,026
Csengődi csokros	0,754 $\pm$ 0,007	1,242 $\pm$ 0,002	4,005 $\pm$ 0,017	1,116 $\pm$ 0,047
Debreceni bőtermő	1,071 $\pm$ 0,007	0,934 $\pm$ 0,011	3,004 $\pm$ 0,008	0,138 $\pm$ 0,021
Érdi bőtermő	1,353 $\pm$ 0,005	0,877 $\pm$ 0,003	2,410 $\pm$ 0,017	0,157 $\pm$ 0,011
Éva	1,109 $\pm$ 0,017	0,778 $\pm$ 0,011	2,728 $\pm$ 0,073	0,152 $\pm$ 0,011
Gerema	0,502 $\pm$ 0,012	0,849 $\pm$ 0,007	3,186 $\pm$ 0,068	0,235 $\pm$ 0,020
Jáde	1,065 $\pm$ 0,009	1,281 $\pm$ 0,004	4,121 $\pm$ 0,168	0,120 $\pm$ 0,007
Kántorjánosi	0,873 $\pm$ 0,020	0,736 $\pm$ 0,003	2,137 $\pm$ 0,092	0,165 $\pm$ 0,013
Petri	0,913 $\pm$ 0,007	1,100 $\pm$ 0,029	2,036 $\pm$ 0,061	0,160 $\pm$ 0,011
Pisa	1,111 $\pm$ 0,017	1,316 $\pm$ 0,014	4,343 $\pm$ 0,107	0,278 $\pm$ 0,013
Pyramis	1,474 $\pm$ 0,006	1,084 $\pm$ 0,034	3,811 $\pm$ 0,076	0,349 $\pm$ 0,014
Újfehértói fűrtös	1,554 $\pm$ 0,006	1,909 $\pm$ 0,019	4,390 $\pm$ 0,085	0,153 $\pm$ 0,012

Table 2: Lipid soluble antioxidant capacity by DPPH, TEAC and ACL methods and the Anthocyanin concentration (in fresh weight) Name of sample(1), DPPH(2), TEAC(3), ACL(4), Athocyanins(5)

Az összes antocianin tartalmat pH differenciális módszerrel való meghatározására, azért volt szükség, hogy egy referenciaértékkel rendelkezünk, melyhez a kapott zsírolldékony antioxidáns-kapacitás értéket viszonyítani tudjuk, helyességüket ellenőrizni lehessen. Azért pont ezt a paramétert választottuk ki, mert a meggyfajták magas koncentrációban tartalmazznak antocianin származékokat, ennek következtében ezek a vegyületek a meggyfajták antioxidáns státuszának kialakításában is jelentős szerepet játszanak.

A C-vitamin meghatározására a vízőldékony antioxidánsok esetében ugyanezért volt szükség.

A 3. ábrán a vízőldékony antioxidáns hatású vegyületek meghatározására szolgáló módszerekkel mért eredmények láthatóak, kiegészítve a C-vitamin tartalommal. Megfigyelhető, hogy nemcsak a fajták között, hanem a mérő módszerek között is jelentősek a különbségek.

A legmagasabb eredményeket az ACW módszerrel mértük, rendszerint a FRAP módszerrel kapott érték többszörösét. Sőt, ez az eltérés az 'Újfehértói fűrtös' esetében majdnem 10-szeres. Látható, hogy mind a két módszerrel vissza tudtuk mérni a meggyminták C-vi-

tamin-tartalmát, mivel minkét mérő sorozat értéke meghaladják az aszkorbinsavra kapott koncentrációkat. Az is látható azonban, hogy a FRAP módszer – az aszkorbinsav koncentráción kívül – a mintában lévő antioxidánsok töredékét képes csak megmérni, míg az ACW módszer az antioxidáns kapacitással rendelkező vegyületek jóval nagyobb hányadát képes meghatározni.

A mérési eredmények itt is azt mutatják, hogy nemcsak a fajták között, hanem a zsírolldékony antioxidáns hatású vegyületeket mérő módszerek között is jelentősek a különbségek, és ebben az összehasonlításban szintén a fotokemilumineszcencián alapuló módszer – jelen esetben ACL – eredményei bizonyultak a legmagasabbaknak.

Érdekes, hogy a 'Gerema' fajta, amely a vízőldékony antioxidáns-kapacitás értékek tekintetében a kiemelkedő fajták között volt, zsírolldékony antioxidáns hatású vegyületekben már nem olyan gazdag, ellenben az 'Újfehértói fűrtös', ami mindkét összehasonlításban élen járó fajta.

Azt is megfigyelhetjük, hogy ezekben az esetekben a fajták közötti különbségek a vízőldékony módszerekre kapott eredményekhez képest kisebbek voltak.

3. ábra: Vízoldékony antioxidáns kapacitás FRAP és ACW módszerrel és a C-vitamin tartalom (f. t.–friss tömre vonatkoztatva)

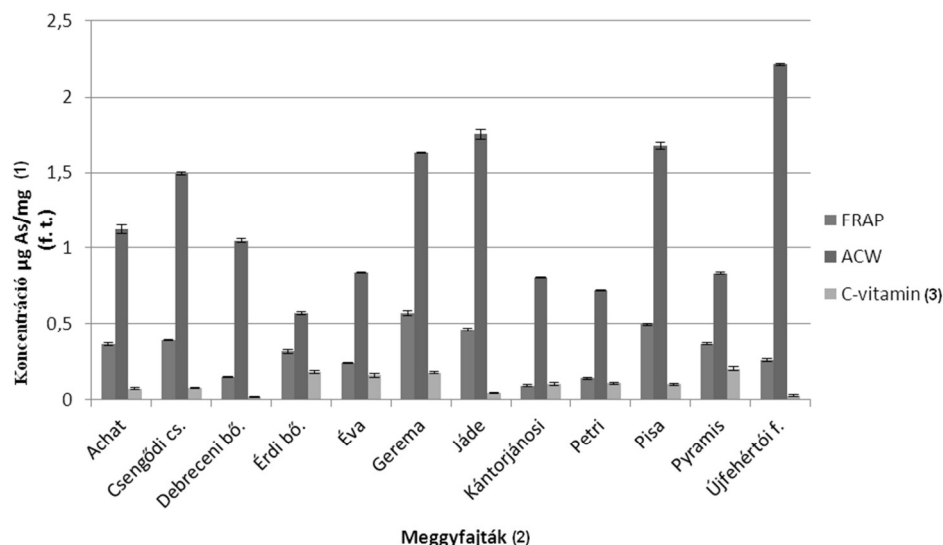


Figure 3: Water soluble antioxidant capacity by FRAP and ACW methods and the Vitamin C concentration (in fresh weight) Concentration (1) Sour cherry varieties (2), FRAP (3), ACW (4), Vitamin C (5)

## KÖVETKEZTETÉSEK

Az ACL technika a legalkalmasabb az antioxidánsok meghatározására, mivel előfordult, hogy egy adott módszer – jelen esetben a DPPH módszer – az antocianin koncentrációnak megfelelő antioxidáns-kapacitást sem volt képes meghatározni ('Csengődi csokros'). A TEAC esetében is csak minimálisan mértünk nagyobb antioxidáns koncentrációt, mint az antocianinokra meghatározott érték, pedig tudjuk, hogy a meggyben – az

antocianinokon túl – számos más antioxidáns-kapacitással rendelkező vegyület található.

A mérési eredmények alapján megállapítható, hogy a kemilumineszcenciás módszerekkel meghatározott eredmények pontosabb és valósabb eredményeket szolgáltatnak, mint a másik három módszer. Ennek a módszernek, valamint a precíz, nagy tisztaságú és hatékony minta-előkészítésnek köszönhetően jól reprodukálható, és alkalmas a különböző fajok és fajták összehasonlítására is.

## IRODALOM

- Antal M.–Regöly-Mérei A. (2012): Az E-vitamin szerepe az egészségmegőrzésben. Magyar Tudomány. 7: 861–869.
- Aruoma, O. I. (1998): Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. J. Am. Oil Chem. Soc. 75: 199.
- Balogh E. (2010): Antioxidáns-kapacitás meghatározása, és ennek kialakításában szerepet játszó vegyületek vizsgálata bogyós gyümölcsök esetében. Doktori PhD értekezés. Budapest. 149.
- Balogh, E.–Hegedűs, A.–Stefanovits-Bányai, É. (2010): Application of and correlation among antioxidant and antiradical assays for characterizing antioxidant capacity of berries. Scientia Horticulturae. 125: 332–336.
- Benzie, I. I. F.–Strain, J. J. (1996): The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measuring of "antioxidant power". The FRAP assay. Annal. Biochem. 239: 70–76.
- Biró Gy. (2003): Funkcionális élelmiszerek, természetes antioxidánsok szerepe az egészség megőrzésben. Élelmészeti Ipar. 57. 17: 835–838.
- Bjelakovic, G.–Nikolova, D.–Gluud, L. L.–Simonetti, R. G.–Gluud, C. (2007): Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. Journal of the American Medical Association. 297. 8: 842–857.
- Blois, M. S. (1958): Antioxidant determination by the use of stable free radicals. Nature. 181: 1199–2000.
- Boots, A. W.–Haenen, G.–Bast, A. (2008): Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. European Journal of Pharmacology. 585: 325–337.
- Bouayed, J.–Bohn, T. (2010): Exogenous antioxidants – Double-edged swords in cellular redox state. Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 3. 4: 228–237.
- Cadenas, E. (1989): Biochemistry of oxygen toxicity. Annu. Rev. Biochem. 58: 79–110.
- Dündar, Y.–Aslan, R. (2000). Antioxidative stress. Eastern Journal of Medicine. 5: 45–47.
- Fehér J.–Vereckei A. (1985): Szabadgyök-reakciók jelentősége az orvostudományban. Biogal Gyógyszergyár. Biotéka. Debrecen. 158.
- Frankel, E. N.–Meyer, A. S. (2000): The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. Journal of the Science of Food and Agriculture. 80: 1925–1941.
- Frei, B. (1994): Natural antioxidants in human health and disease. Academic Press. San Diego.
- Halliwel, B.–Gutteridge, J. M. C. (1989): Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press. Oxford
- Halliwel, B.–Gutteridge, J. M. C. (1995): The definition and measurement of antioxidants in biological-systems. Free Radical Biology and Medicine. 18: 125–126.

- Hatano, T.–Kagawa, H.–Yasuhara, T.–Okuda, T. (1988): Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem. Pharm. Bull.* 36. 6: 2090–2097.
- Huang, D.–Ou, B.–Prior, R. L. (2005): The chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 1841–1856.
- Kandra L. (2006): Biokémiai gyakorlatok. Debreceni Egyetem Természettudományi Kar. Debrecen. 113.
- Lachance, P. A.–Nakata, Z.–Jeong, W. S. (2001): Antioxidants: An integrative approach. *Nutrition*. 17: 835–838.
- Langseth, L. (1995): Oxidants, antioxidants and disease prevention. *ILSI Europe*. Belgium: 24.
- Lee, J.–Durst, R. W.–Wrolstad, R. E. (2005): Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*. 88: 1269–1278.
- Lugasi A. (2001): Az antioxidáns hatású anyagok jelentősége. *Új Diéta*. 1: 16–18.
- Lugasi A.–Blázovics A. (2004): Az egészséges táplálkozás tudományos alapjai. 4 Számú útmutató az egészség megőrzéséhez. Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézet. Budapest.
- Lugasi A.–Dworschák E.–Hóvári J.–Blázovics A.–Kéry Á.–Fejes Sz. (1999): Növényi antioxidánsok vizsgálata in vitro rendszerekben. *Fitoterápia*. 4. 3: 80–89.
- Miller, N. J.–Rice-Evans, C.–Davies, M. J.–Gopinathan, V.–Milner, A. (1993): A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* 84: 407–412.
- Net1: [http://www.mep.net.au/teachingresearch/TRL\\_12/TRL12\\_PHOTOCHM\\_Info\\_e\\_10\\_12\\_04.pdf](http://www.mep.net.au/teachingresearch/TRL_12/TRL12_PHOTOCHM_Info_e_10_12_04.pdf)
- Poljsak, B.–Milisav, I. (2012): The Neglected Significance of “Antioxidative Stress”. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 480895: 1–12.
- Popov, I. N.–Lewin, G. (1994): Photochemiluminescent detection of antiradical activity. 2. Testing nonenzymic water-soluble antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 17: 267–271.
- Popov, I. N.–Lewin, G. (1996): Photochemiluminescent detection of antiradical activity. 4. Testing of lipid-soluble antioxidants. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 31: 1–8
- Stratil, P.–Kubáň, V.–Fojtova, J. (2008): Comparison of the Phenolic Content and Total Antioxidant Activity in Wines as Determined by Spectrophotometric Methods. *Czech J. Food Sci.* 26. 4: 242–253.
- Vaya, J.–Aviram, M. (2001): Nutritional antioxidants: Mechanisms of action, analyses of activities and medical applications. *Curr. Med. Chem. Imm. Endoc. & Metab. Agents*. 1: 99–117.
- Veres Zs. G.–Remenyik J.–Fári M. (2008): A magyar meggyfajták beltartalmi értékeire alapozható versenyelőnyök a külföldi versenytársak meggyfajtáihoz viszonyítva. A jövő élelmiszerei és az egészség. Center-Print Nyomda. Debrecen. 123–146.
- Zulueta, A.–Esteve, M. J.–Frigola, A. (2009): Analytical Methods. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*. 114: 310–316.