

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Význam antioxidační kapacity potravin pro  
lidský organismus a metody jejího stanovení

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2013

František Herynek

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ  
Katedra analytické chemie

Význam antioxidační kapacity potravin pro  
lidský organismus a metody jejího stanovení

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**AUTOR PRÁCE:** František Herynek

**VEDOUcí PRÁCE:** prof. Ing. Karel Vytásk, DrSc.

**KONZULTANT PRÁCE:** Ing. Milan Sýs

2013

UNIVERSITY OF PARDUBICE

FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

Department of Analytical chemistry

The importance of the antioxidant capacity of  
food for the human body and the method of their  
determination

BACHELOR WORK

**AUTHOR:** František Herynek

**SUPERVISOR:** prof. Ing. Karel Vytásk, DrSc.

**CONSULTANT:** Ing. Milan Sýs

2013

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2012/2013

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **František Herynek**  
Osobní číslo: **C09343**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**  
Název tématu: **Význam antioxidační kapacity potravin pro lidský organismus a metody jejího stanovení**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Seznamte se s literárními údaji o antioxidační kapacitě potravin. Vypracujte přehled jednotlivých antioxidantů a volných radikálů.
2. Diskutujte význam antioxidační kapacity potravin - obsah antioxidantů v potravinách, funkci v organismu, vliv na lidský organismus a na trvanlivost potravin.
3. Popište metody stanovení antioxidační kapacity ve vzorcích potravin.
4. Diskutujte možnosti elektrochemického stanovení antioxidační kapacity u vzorků potravin. Informace přehledně zpracujte, použijte obrázky, schémata a grafy a ze získaných literárních údajů vyvoďte závěry o významu antioxidační kapacity potravin pro člověka.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.**

Vedoucí bakalářské práce:

**prof. Ing. Karel Vytřas, DrSc.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce:

**13. prosince 2012**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**19. července 2013**

  
prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.  
děkan

L.S.

  
doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 15. února 2013

Prohlášení:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Ve které literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skuteností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako kolektivního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše. Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 8.7.2013

František Herynek

### ***Podkování***

Na závěr bych velmi rád poděkoval vedoucímu práce prof. Ing. Karlu Vytasovi, DrSc., a Ing. Milanu Sýsovi, kteří mi velmi pomohli s vypracováním této bakalářské práce prostřednictvím poskytnutých rad, odborného vedení a hlavně vstřícností. Také musím poděkovat svým rodičům, kteří mi pomáhali k dosažení cílů domácího učení a přátelům za psychickou podporu.

## ***Souhrn***

Tato bakalářská práce je zaměřena na význam antioxidační kapacity (antiradikálové aktivity) potravin pro zdravý lidský organismus a na analytické metody potřebné k jejímu stanovení. Důraz je kladen na klasifikaci látek s antioxidačním účinkem a jejich významný vliv v prevenci civilizačních onemocnění. Základní principy jednotlivých analytických metod jsou uvedeny v jednotlivých kapitolách. Použitelnost nových metod pro analýzu antioxidační kapacity potravin je demonstrována pomocí jednotlivých aplikací zaměřených na stanovení významných antioxidantů a jejich vlastností v různých potravinách. V práci je diskutována možnost použití elektrochemického stanovení antioxidantů jakožto ekonomicky výhodné alternativy.

## ***Klíčová slova***

Antioxidant

Polyfenoly

Volné radikály

Civilizační onemocnění

Biosensor



## ***Abstract***

This bachelor work is focused on the importance of the food antioxidants capacity (antiradical activity) for a healthy human organism and on analytical methods needed for its determination. Emphasis is placed on the classification of substances with antioxidant effects and their significant impact influence to prevent civilization diseases. Basic principles of analytical methods are given in the individual chapters. Applicability of current methods to analyse the food antioxidant capacity is demonstrated by applications focused to determination of significant antioxidants and their properties in food various provenance. In this work, the possibility is discussed of using electrochemical determination of antioxidants as a cost-effective alternative.

## ***Keywords***

Antioxidant

Polyphenols

Free radicals

Civilization diseases

Biosensor

## Seznam použitých zkratk

AAPH	2,2'-azobis (2-amidinopropan) hydrochlorid
ABTS	2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
AGE	produkty pokročilé glykace
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
ATP	adenosintrifosfát
BTH	butylhydroxytoluen
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
ESI	elektrospray ionizace
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokou a jinou kapalinovou chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
LOO	lipoperoxidový radikál
LP	lipoperoxidace
NP HPLC	normální vysokou a jinou kapalinovou chromatografie
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PC	papírová chromatografie
PPO	polyfenoloxidáza
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
RP HPLC	reversní vysokou a jinou kapalinovou chromatografie
RVC	síťovaná uhlíková elektroda
SKE	saturovaná kalomelová elektroda
TAA	celková antioxidační aktivita
TEAC	Total Equivalent Antioxidant Capacity
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TPTZ	2,4,6-tripyridyl-S-triazin
TRAP	Total Radical-Trapping Potential

# OBSAH

1. ÚVOD .....	13
2. ANTIOXIDANTY .....	14
2.1. Výskyt antioxidant .....	14
2.2. Klasifikace antioxidant .....	15
2.2.1. Polyfenoly.....	15
2.2.1.1. Flavonoidy.....	15
2.2.1.1.1. Flavonoly .....	16
2.2.1.1.2. Flavony .....	17
2.2.1.1.3. Isoflavony .....	17
2.2.1.1.4. Flavanoly (katechiny).....	18
2.2.1.1.5 Flavanony .....	18
2.2.1.1.6. Anthokyany.....	19
2.2.1.2. Fenolické kyseliny .....	20
2.2.1.3. Stilbeny .....	21
2.2.2. Kyselina askorbová .....	21
2.2.3. Tokoferoly .....	22
2.2.4. Karotenoidy .....	24
2.2.5. Koenzym Q.....	24
3. VOLNÉ RADIKÁLY .....	25
3.1. Patologické působení volných radikál .....	25
3.1.1. Poškození bílkovin.....	27
3.1.2. Poškození ribonukleových kyselin.....	27
3.1.3. Poškození lipid .....	27
3.2. Onemocnění vyvolaná volnými radikály .....	28
3.2.1. Diabetes mellitus.....	28
3.2.2. Ateroskleróza.....	29

3.2.3. Zán tlivá onemocn ní st ev.....	29
4. ANTIOXIDA NÍ KAPACITA.....	30
4.1. Význam antioxida ní kapacity potravin .....	30
4.2. Ekvivalent antioxida ní kapacity .....	31
5. METODY STANOVENÍ ANTIOXIDA NÍ KAPACITY POTRAVIN .....	31
5.1. Spektrální metody.....	32
5.1.1. TEAC test (ABTS).....	32
5.1.2 FRAP test.....	33
5.1.3. ORAC test.....	34
5.1.4. TRAP test .....	35
5.1.5. DPPH test .....	35
5.2. Chromatografické metody .....	38
5.2.1. Kapilární zónová elektroforéza (CZE).....	38
5.2.2. Plynová chromatografie (GC).....	39
5.2.3. Vysokou ínná kapalinová chromatografie (HPLC).....	39
5.3. Elektrochemické metody .....	42
5.3.1. Cyklická voltametrie .....	43
5.3.2. Pulzní voltametrické techniky .....	44
5.3.3. Biosenzory .....	45
5.3.4. Pr toková injek ní analýza.....	46
6. ZÁV R.....	48
7. P EHLED POUFITÉ LITERATURY .....	49

# 1. ÚVOD

Tato bakalářská práce je rozdělena na dva celky. První část je zaměřena na vymezení pojmů (antioxidanty, volné radikály, antioxidační kapacita) a na klasifikaci látek s antioxidačním účinkem. V práci je diskutován pozitivní vliv těchto látek na zdraví a celkovou vitalitu. Příčinami velkého nárůstu civilizačních onemocnění (ateroskleróza, diabetes mellitus, hypertenze, zánětlivá střevní onemocnění a infarkt myokardu) jsou zejména nesprávné stravovací návyky, nedostatek aktivního pohybu, stres a požívání návykových látek. Pravidelná konzumace potravin s významným obsahem antioxidantů (antioxidační kapacity) má bezpochyby preventivní efekt vzniku výše zmíněných onemocnění.

Druhá část se zabývá analytickými metodami, které lze aplikovat ke stanovení této antioxidační kapacity. Mezi tyto metody zahrnujeme spektrální techniky založené na měření absorpčního záření v UV-VIS oblasti, chromatografické metody (z nichž nejvýznamnější má HPLC) a v poslední řadě elektrochemické metody. Použitím citlivého elektrochemického čidla lze dosáhnout správných výsledků měření vzorků potravin.

## 2. ANTIOXIDANTY

Antioxidanty jsou definovány jako látky, jejichž molekuly omezují aktivitu kyslíkových radikálů, které přecházejí do méně reaktivních nebo nereaktivních forem. Jiná definice je charakterizuje jako sloučeniny, které regulují oxidační pochody v organismu, zabrávují neřádným reakcím a poskytují ochranu buněčným strukturám proti volným radikálům [1]. V potravinách hrají důležitou roli z hlediska ochrany zdraví. Vdecké poznatky naznačují, že antioxidanty snižují riziko civilizačních onemocnění. Skupina neinfekčních onemocnění se statisticky vyskytuje častěji ve vyspělých zemích než v zemích třetího světa. Mezi tato onemocnění patří zejména diabetes mellitus, ateroskleróza, infarkt myokardu, cévní mozková příhoda, celkové oslabení imunitního systému, hypertenze, ulcerózní kolitida atd. [2]. K ochraně struktur a funkcí mnohých biomolekul jakožto polynenasycených mastných kyselin v buněčných biomembránách, aminokyselin v proteinech, sacharidů, nukleových kyselin mohou aktivně přispět antioxidanty. Jak známo [3], tyto totiž udržují fyziologickou rovnováhu mezi iniciátory oxidací a systémem antioxidační ochrany organismu.

### 2.1. Výskyt antioxidant

Mezi nejvýznamnější látky s antioxidačním účinkem (kromě kyseliny askorbové-vitamínu C), řadíme polyfenolické sloučeniny (polyfenoly). Tyto látky obsahují ve své chemické struktuře jedno nebo více benzenových jader s navázanými hydroxyskupinami [4]. Polyfenoly patří mezi hojně se vyskytující látky převážně v rostlinách a potravinách z nich vyrobených, které tvoří část lidské stravy. Denní příjem polyfenolů ve stravě se pohybuje kolem 1 g [5]. Hojně se vyskytují v ovoci, zelenině, obilovinách a nápojích. Ovoce ve srovnání se zeleninou bývá v průměru bohatší na celkový obsah polyfenolů. Nejhojně se vyskytující ovoce na našem území (ostružiny, maliny, rybíz, borůvky, hroznové víno, jahody, jablka, atd.) je bezpochyby cenným zdrojem těchto pro zdravý blahodárných látek. Z druhů zeleniny můžeme vybrat brokolici, špenát, chřest, květák, cibuli, rajčata a brambory. Vysoký obsah polyfenolů nalezneme i u nápojů jako jsou káva, čaj, víno, ovocné džusy a pivo [6,7].

## 2.2. Klasifikace antioxidantů

Na základě biologické funkce můžeme antioxidanty rozdělit na enzymatické a neenzymatické substráty. K enzymatickým substrátům patří enzymy jako katalázu, superoxiddismutázu, glutathionperoxidázu, glutathionreduktázu a glutathion-S-transferázu [2,8]. Během normálního metabolismu vzniká nepřetržitě v těle celá řada volných radikálů, které jsou pomocí těchto enzymů eliminovány na nereaktivní formy. Tyto enzymatické substráty jsou běžnou součástí normálního organismu a jejich kapacita je omezena vysokým příjmem potravin s vysokým obsahem kalorií (volných radikálů). Z tohoto důvodu je důležité zvýšit obranyschopnost organismu vůči oxidačnímu stresu vysokým příjmem antioxidantů a kompenzovat tak jejich nedostatek.

Mezi antioxidanty, které nemají enzymatický charakter, patří například bilirubin, kyselina močová, kyselina lipová, koenzym Q, vitamin C, vitamin A, vitamin E, karotenoidy a polyfenoly (flavonoidy, fenolické kyseliny, stilbeny) [9].

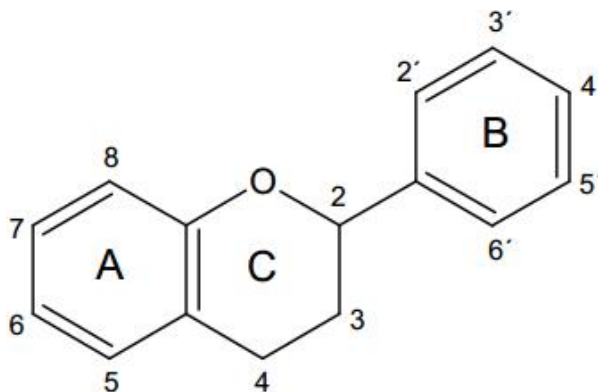
### 2.2.1. Polyfenoly

Dodnes bylo identifikováno několik tisíc polyfenolických látek, jejichž společným znakem je obsah jednoho nebo více aromatických jader, na nichž jsou navázány hydroxylové skupiny [4]. Polyfenoly rozdělujeme na flavonoidy, fenolické kyseliny, stilbeny, tokoferoly a karotenoidy [10]. Lze je najít v nejrozmanitějších komoditách rostlinného původu. V potravinářství se hojně používají synteticky vyrobené polyfenolické látky jako konzervanty, na produktech musí být označeny E-kódem; například anthokyany E163, -tokoferol E308, butylhydroxytoluen E321, butylhydroxyanisol E320 atd. [11].

#### 2.2.1.1. Flavonoidy

Flavonoidy patří do skupiny rostlinných pigmentů syntetizovaných z fenylalaninu se vyskytují prakticky ve všech částech rostlin, zejména ve fotosyntetizujících rostlinných buňkách [12]. Dodnes bylo identifikováno více než 4000 druhů flavonoidů, z nichž mnohé jsou odpovědné za atraktivní barvy květů, plodů a listů. V přírodě se vyskytují obvykle jako glykosidy (chemicky vázané na sacharidy), méně často jako volné látky. Molekula

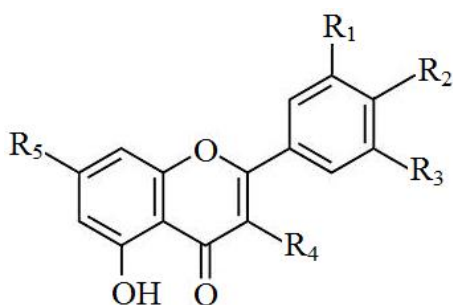
flavonoid obsahuje dvě benzenová jádra, která jsou spojena alkylovým et zcem (C3). Tento et zec tvoří heterocyklický (pyranový) kruh [13]. Obecný strukturní vzorec flavonoid je uveden na obr. 1.



**Obrázek 1.** Strukturní vzorec flavonoid [13].

#### 2.2.1.1.1. Flavonoly

Flavonoly se řadí mezi nejvíce rozšířenou skupinu flavonoidů v přírodě. Mezi hlavní zástupce patří quercetin, myricetin, rhamnetin a kemferol. Často tvoří glykosidy a jsou vázány na glukózu i rhamnózu. Hojně se vyskytují v rajatech, esneku, borůvkách, brokolici, cibuli, papírně, chmelu a víně. Kromě antioxidantů mají flavonoly také pozitivní vliv na permeabilitu a průhlednost krevních kapilár [10,14]. Chemická struktura flavonol je zobrazena na obr. 2.



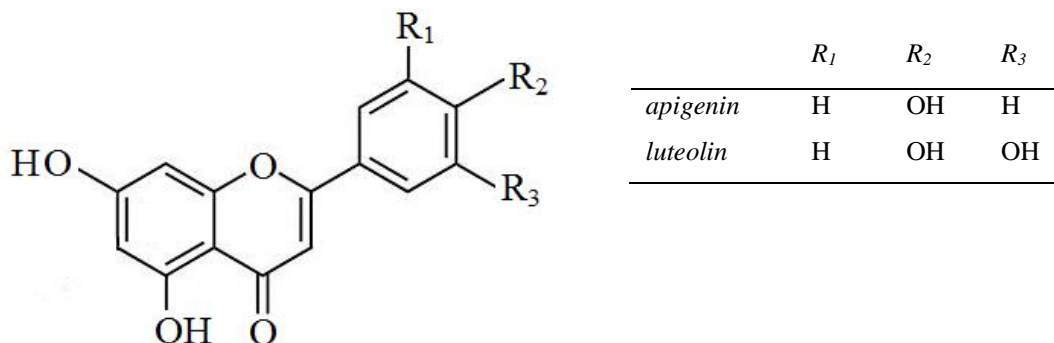
	$R_1$	$R_2$	$R_3$	$R_4$	$R_5$
<i>quercetin</i>	OH	OH	H	OH	OH
<i>myricetin</i>	OH	OH	OH	OH	OH
<i>rhamnetin</i>	OH	OH	H	OH	OCH <sub>3</sub>
<i>kemferol</i>	H	OH	H	OH	OH

**Obrázek 2.** Chemická struktura flavonol [15].



### 2.2.1.1.2. Flavony

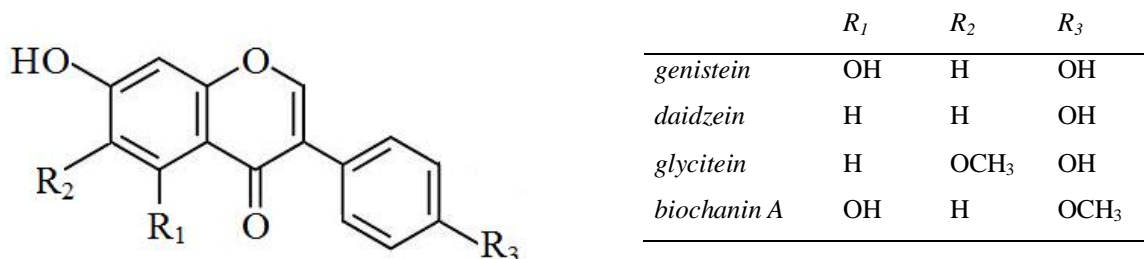
Flavony se v přírodě vyskytují méně často než flavonoly. Společně s nimi tvoří žluté pigmenty. Červené papriky, celer a byliny obsahují apigenin a luteolin, což jsou glykosidy patří k hlavním zástupcům flavonů, jejichž struktura je znázorněna na obr. 3 [10]. Mezi aglykony můžeme zařadit nobiletin, sinensetin a tangeretin, které se podílejí na hořké chuti citrusů [16].



**Obrázek 3.** Chemická struktura flavonů [15].

### 2.2.1.1.3. Isoflavony

V současné době bylo identifikováno kolem 200 různých isoflavonů. Vyskytují se především v luštěninách a sóji. Jeden kilogram sójových bobů může obsahovat až 580-3800 mg isoflavonů. Mezi hlavní zástupce patří genistein, daidzein, glycitein a biochanin A [10,17].

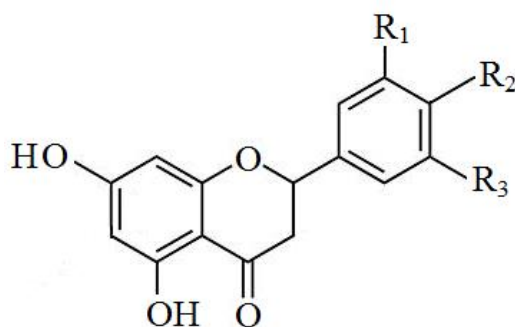


**Obrázek 4.** Chemická struktura isoflavonů [17].

Struktura isoflavon (obr. 4) je podobná estrogen m. Jsou schopné vazby na estrogenové receptory a proto jsou nazývány fytoestrogeny. Jejich biologické účinky jsou rozmanité (antioxidační, kardioprotektivní, protirakovinotvorné, antibakteriální, atd) [10,17].

#### 2.2.1.1.4. Flavanoly (katechiny)

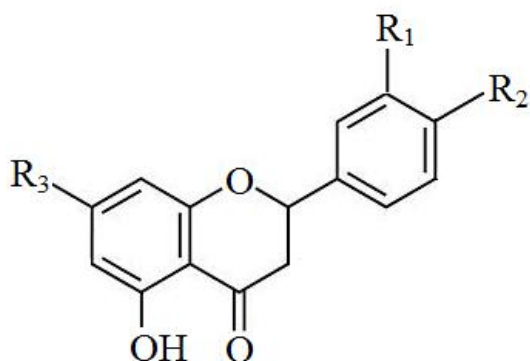
Flavanoly se v přírodě nacházejí jako monomery (katechiny) nebo polymery (proanthokianidiny). Katechiny jsou tvořeny dvěma enantiomery, (-)-epikatechinem a (+)-katechinem. Existují také (+)-epikatechin a (-)-katechin, v přírodě se ale obě fln nevyskytují. Flavanoly nalezneme například v grepu, artyoku, brusinkách, červeném vínu, zeleném čaji a kakoládě. Nejbohatším přírodním zdrojem jsou meruňky, které obsahují až 250 mg flavanolů na 1 kg čerstvé váhy [10,17,18]. Chemická struktura flavanolů je uvedena na obr. 5.



**Obrázek 5.** Chemická struktura flavanolů [10].

#### 2.2.1.1.5 Flavanony

Flavanony nalezneme ve vyšších koncentracích pouze v citrusech, v nichž přispívají k jejich typické chuti. Vyskytují se hlavně pod slupkou a mezi jednotlivými segmenty, proto je jejich obsah v celém ovoci až pětkrát vyšší než ve sklenici džusu. K hlavním zástupcům patří eridictyol, hesperetin, naringenin a pinocembrin [10] (viz. obr. 6.).

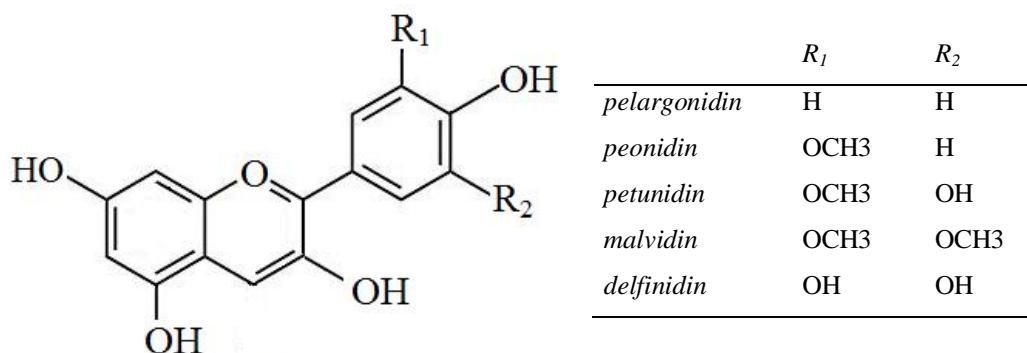


	$R_1$	$R_2$	$R_3$
<i>eridictyol</i>	OH	OH	OH
<i>hesperetin</i>	OH	OCH <sub>3</sub>	OH
<i>naringenin</i>	H	OH	OH
<i>pinocembrin</i>	H	H	OH

**Obrázek 6.** Chemická struktura flavanon [19].

#### 2.2.1.1.6. Anthokyany

Anthokyany, jejichž chemická struktura je znázorněna na obr. 7, patří k nejrozšířenější skupině rostlinných barviv. Jsou zodpovědné za červené, modré a modrofialové barvy ovoce i zeleniny. V potravinářském průmyslu se nejčastěji používají k barvení potravin a vykazují též antioxidantní úinky. Trpí ale značnou nestabilitou, proto dochází ke glykosilaci převážně glukózou v pozici C3. Vyskytují se v bobulích modrých odrůd vinné révy a v listové a kořenové zelenině, například v červeném zelí, cibuli, edkvíčkách. Mezi hlavní zástupce patří pelargonidin, peonidin, petunidin, malvidin a delphinidin [20].

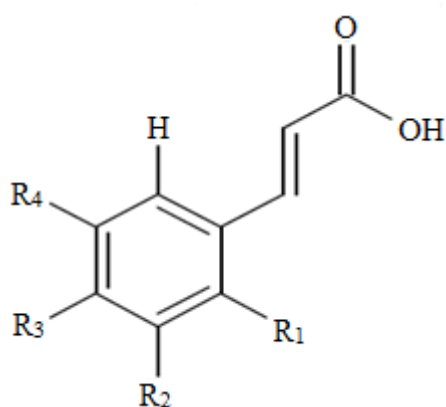


	$R_1$	$R_2$
<i>pelargonidin</i>	H	H
<i>peonidin</i>	OCH <sub>3</sub>	H
<i>petunidin</i>	OCH <sub>3</sub>	OH
<i>malvidin</i>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
<i>delphinidin</i>	OH	OH

**Obrázek 7.** Chemická struktura anthokyan [15].

### 2.2.1.2. Fenolické kyseliny

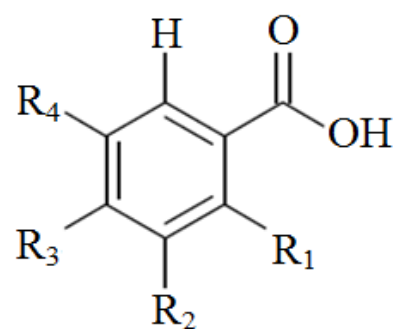
Fenolické kyseliny a jejich deriváty nalezneme v mnoha potravinách (káva, raj ata, brambory atd.). K zástupcům patří především hydroxyderiváty kyseliny skořicové (obr. 8) a benzoové (obr. 9). Mezi deriváty kyseliny skořicové patří kyselina kávová, kumarová, chlorogenová a felurová. Hydroxyderiváty kyseliny benzoové jsou kyselina vanilová, gallová, protokatechová, aj. K nejrozšířenějším esterům kyseliny kávové patří kyselina chlorogenová. Vyskytuje se v řadě druhů ovoce, zeleniny a v kávě. Bohatým zdrojem jsou brambory, jablka, hrušky a artyoky. Kyselinu felurovou obsahuje vláknina, v níž je esterovou vazbou navázána na hemicelulózu [10,21].



	$R_1$	$R_2$	$R_3$	$R_4$
<i>o</i> -kumarová	OH	H	H	H
<i>m</i> -kumarová	H	OH	H	H
<i>p</i> -kumarová	H	H	OH	H
felurová	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
kávová	H	OH	OH	H

**Obrázek 8.** Chemická struktura hydroxyskořicových kyselin [22].

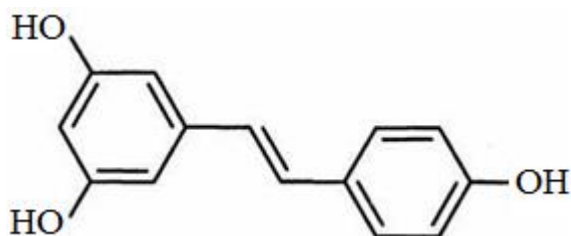
	$R_1$	$R_2$	$R_3$	$R_4$
<i>benzoová</i>	H	H	H	H
<i>p</i> -hydroxybenzoová	H	H	OH	H
gallová	H	OH	OH	OH
salicylová	OH	H	H	H
vanilová	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H



**Obrázek 9.** Chemická struktura hydroxybenzoových kyselin [22].

### 2.2.1.3. Stilbeny

Stilbeny patří do skupiny antioxidantů strukturně podobných flavonoidům. Mezi známé stilbeny patří resveratrol (obr. 10), který se vyskytuje ve vysoké míře v bobulích vinné révy a ve víně. Dále ho můžeme najít například v čínském zelí, červeném a bílém zelí, brokolici, mrkvi, cibuli, esneku a červené epurce. Resveratrol lze zařadit mezi sekundární metabolity rostlin, jelikož se může vyskytovat ve volné formě, nebo navázaný na nějaký sacharid. Ve zvýšené míře se tvoří po napadení rostliny houbami, viry nebo bakteriemi. V lidském organismu působí svými antioxidantními a protizánětlivými účinky, mají blahodárný vliv v prevenci proti kardiovaskulárním onemocněním [23,24].



**Obrázek 10.** strukturní vzorec resveratrolu [15].

### 2.2.2. Kyselina askorbová

Kyselina askorbová (vitamín C) je ve vodě rozpustný antioxidant nacházející se hlavně v extracelulárním prostředí organismu. Účinně chrání lidský organismus před působením superoxidu, chlornanu, peroxidu vodíku a před hydroxylovými a peroxylovými radikály. Může také chránit buněčné membrány před peroxidací tím, že zvyšuje účinnost tokoferolu.

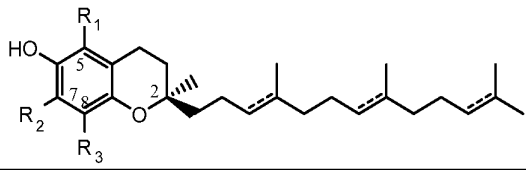
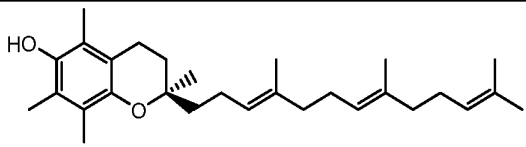
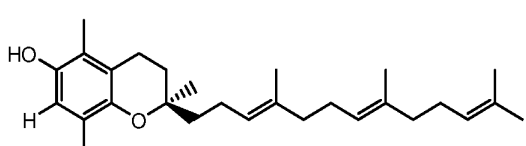
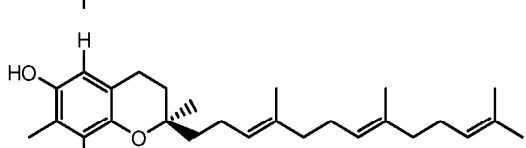
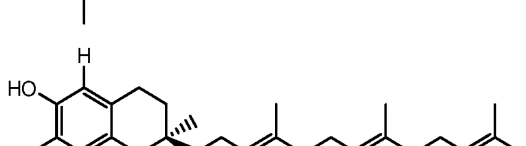
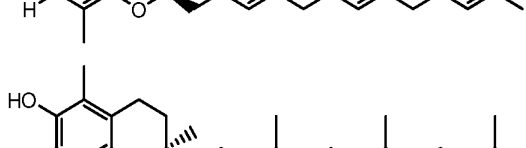
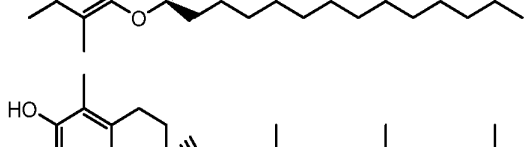
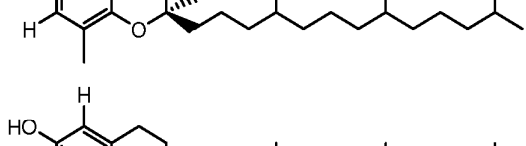
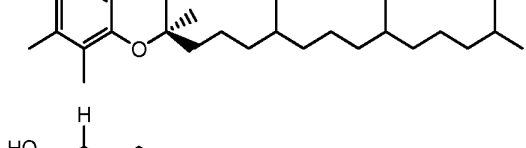
Mezi základní zdroje vitamínu C patří citrusové plody a listová zelenina. Při jeho nedostatečném příjmu v potravě se zvyšuje riziko výskytu astmatu, bronchitid a dalších plicních onemocnění, jelikož patří mezi antioxidanty vyskytující se v extracelulární tekutině plic [25,26].

### 2.2.3. Tokoferoly

Tokoferoly tvoří skupinu látek osmi izomerů (viz. Tab. 1). Z této řady izomerů má pro lidský organismus největší význam  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E). Tokoferoly se rozpouštějí v tucích a zodpovídají za ochranu polynenasycených mastných kyselin v buněčných membránách před lipoperoxidací [25,27].

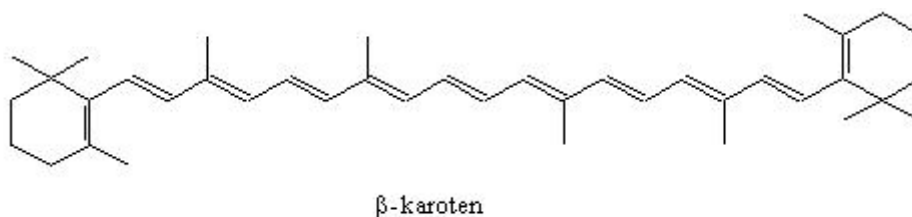
Při reakcích vitamínu E s alkylperoxylovými radikály lipidu  $LOO\cdot$  dochází k jejich přeměně na hydroxyperoxydy ( $LOOH$ ), které následně rozkládá enzym glutathionperoxidáza a dochází k zastavení lipoperoxidace a napadání dalších molekul mastných kyselin. Reakcemi s volnými radikály vzniká z vit. E tokoferolový radikál, který již nemá antioxidační schopnosti. K jeho regeneraci na aktivní formu s hydroxylovou skupinou na aromatickém jádru slouží kyselina askorbová [25,28].

**Tabulka 1.** P ehled tokoferol a tokotrienol [29].

		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Alpha-tocotrienol		methyl	methyl	methyl
Beta-tocotrienol		methyl	H	methyl
Gamma-tocotrienol		H	methyl	methyl
Delta-tocotrienol		H	H	methyl
Alpha-tocopherol		methyl	methyl	methyl
Beta-tocopherol		methyl	H	methyl
Gamma-tocopherol		H	methyl	methyl
Delta-tocopherol		H	H	methyl

#### 2.2.4. Karotenoidy

Karotenoidy tvoří širokou skupinu přirodních pigmentů syntetizovaných rostlinami a mikroorganismy, které se vyskytují v rostlinách, konkrétně v chromoplastech vyšších rostlin a řas. Karotenoidy byly objeveny také u některých druhů bakterií [30]. Většina karotenoidů obsahuje systém dvojných konjugovaných vazeb, který zodpovídá za jejich antioxidační aktivitu [25]. Uplatňují se zejména při odstraňování (ROO•) radikálů v lipidech a mají význam v prevenci proti rakovině. Lidský organismus totiž není schopen tyto látky syntetizovat, a proto karotenoidy přijímá hlavně z ovoce a zeleniny (např. kapusta, rajče, mrkev, brokolice, dýně, grapefruit, meruňky). Tyto lipofilní látky se vstřebávají v tenkém střevě pouze za přítomnosti žlučových kyselin a neporušené absorpce tuků. V současnosti je známo více než 600 druhů, mezi které patří například -karoten, -karoten, lutein a kryptoxantin. Mezi nejrozšířenější patří -karoten (obr. 11), jakouž to cenný zdroj vitamínu A [31].



**Obrázek 11.** Strukturální vzorec -karotenu [29].

#### 2.2.5. Koenzym Q

Koenzym Q byl izolován v 50. letech z mitochondrií hovězího srdce. Jeho hlavní funkce byla prodloužena pro přenos elektronů a syntézu adenosintrifosfátu (ATP) v dýchacím řetězci. Postupným zkoumáním koenzymu Q bylo zjištěno, že se nachází i v různých částech buňky: Golgiho aparátu, buněčném jádře, lysozomech a cytoplazm [32].

Vyskytuje se ve třech hlavních redoxních formách: plně oxidovaný (ubichinon), částečně redukovaný (semichinon) a plně redukovaný (ubichinol), který patří mezi účinné antioxidanty. Je to jediný lipofilní antioxidant, který si lidský organismus dokáže syntetizovat sám. Regeneruje vitamín E a vitamín C, dále je schopen zasáhnout do lipoperoxidace



kaskády a tím účinně chránit buněčné membrány před peroxidací lipidů. Velké uplatnění má koenzym Q také v dermatologii a kosmetice. V kůži představuje první antioxidační obranu před vlivy slunečního záření a tím chrání pleť před stárnutím [33].

### **3. VOLNÉ RADIKÁLY**

Volné radikály můžeme charakterizovat jako částice obsahující jeden nebo více nepárových elektronů ve svém elektronovém obalu. Tyto nepárové elektrony způsobují jejich značnou reaktivitu. V organismu vznikají při mnoha fyziologických nebo patologických procesech, například při svalovém výkonu na kyslíkový dluh, rozpadem fagocytů, kouření, odbouráváním alkoholu a působením ultrafialového světla. Volné radikály tvoří především reaktivní formy kyslíku (ROS) a reaktivní formy dusíku (RNS) [34,35]. Jejich pohled je znázorněn v Tab. 2.

#### **3.1. Patologické působení volných radikálů**

V lidském organismu může oxidativním působením volných radikálů docházet ke strukturním i funkčním změnám molekul, což vede až k zániku buněk nekrotickou i apoptózou. Při apoptóze dochází k tzv. programované buněčné smrti, kdy se buňka rozpadá na malé části, které mohou být následně fagocytovány a následně odstraněny. Ten vzniká právě při nekróze, kdy buňka praská a její obsah se vylévá do jejího okolí. Mezi molekuly, na které působí volné radikály, patří například bílkoviny, DNA nebo lipidy [35,36].

**Tabulka 2.** Přehled volných kyslíkatých a dusíkatých radikál (převzato z 34).

<i>Reaktivní látka</i>	<i>Vzorec</i>	<i>Reaktivita a vlastnosti</i>
<b>Reaktivní formy kyslíku</b>		
Superoxid	$O_2^{\cdot-}$	vznik v mitochondriích, kardiovaskulárním systému atd.
Hydroxylový radikál	$OH^{\cdot}$	vysoce reaktivní, tvorba při přetřížení organismu felezem
Peroxid vodíku	$H_2O_2$	vysoce reaktivní, výsledek metabolismu, prekurzorem hydroxidového radikálu
Peroxylový radikál	$ROO^{\cdot}$	vznik při oxidačním poškození lipidů, proteinů, DNA, cukrů, atd.
Organické hydroperoxydy	$ROOH$	reaguje s ionty přechodných kovů za vzniku reaktivních forem
Singletový kyslík	$^1O_2$	vysoce reaktivní, vznik při fotosenzitivních a chemických reakcích
Ozon	$O_3$	přítomný v atmosféře, může reagovat s různými látkami, vzniká $^1O_2$
<b>Reaktivní formy dusíku</b>		
Oxid dusnatý	$NO^{\cdot}$	neurotransmitter a regulátor krevního tlaku
Peroxynitrit	$ONOO^{\cdot}$	tvorí se z $NO^{\cdot}$ a superoxidu, vysoce reaktivní
Peroxynitridová kyselina	$ONOOH$	protonovaná forma $ONOO^{\cdot}$
Oxid dusičitý	$NO_2$	vznik při znečištění vzduchu

### 3.1.1. Poškození bílkovin

ROS a RNS napadají bílkoviny, které jsou součástí lipidových buněčných membrán nebo lipoproteinů. Při styku peroxidů s bílkovinami obsahujícími ve své struktuře železo dochází k tzv. Fentonově reakci, při které jsou železnaté ionty oxidovány peroxidem vodíku na železité ionty a hydroxidový radikál. Společně s ostatními typy oxidací poškození se předpokládá, že poškození bílkovin volnými radikály se podílí na rozvoji Alzheimerovy choroby, Parkinsonovy choroby, cirhózy jater, rakoviny a dalších patologických stavech [35,37,38].

### 3.1.2. Poškození ribonukleových kyselin

Negativním působením volných radikálů na deoxyribonukleové kyseliny (DNA) dochází k vzniku četných zlomů, modifikacím purinových i pyrimidinových bazí nebo deoxyribózy. K poškození dochází především působením OH radikálů, které se adují k bazím a mezi nimi je na oxo- a hydroxyderiváty. Tyto modifikace jsou důsledkem chybného párování i přerušení řetězce, což může vést k apoptóze, metagenézi nebo karcinogenezi [35,38].

### 3.1.3. Poškození lipidů

Volné radikály poškozují lipidy prostřednictvím jejich peroxidace, v případě lipidů lipoperoxidace (LP), kdy dochází k neřádnému přeměnění lipidů obsažených především v buněčných stěnách a lipoproteinech. Obvykle dochází k LP tzv. polyenových mastných kyselin, které obsahují více dvojných vazeb. Proces LP probíhá ve 3 fázích, kterými jsou iniciace, propagace a terminace.

Při iniciaci dochází k odtržení atomu vodíku z metylenové skupiny mastné kyseliny a vzniku uhlíkového radikálu. U tohoto radikálu se přeskupí dvojná vazba a vytvoří se konjugovaný dien. Ten poté reaguje s molekulou kyslíku a dochází k tvorbě lipoperoxidového radikálu LOO<sup>•</sup>

Ve fázi propagace napadá LOO<sup>•</sup> další mastné kyseliny, odtržením atomu vodíku vznikají nové radikály a hydroxyperoxydy LOOH. Tyto reakce probíhají tak dlouho, dokud

se spolu nesetkají 2 radikály nebo se radikál nesetká s antioxidantem. Při těchto reakcích dochází k terminaci a ukončení těchto reakce [9,34,35].

### **3.2. Onemocnění vyvolaná volnými radikály**

Onemocnění vyvolané volnými radikály bývá spojováno s oxidativním stresem. To je stav, při kterém se porušuje rovnováha mezi vznikajícími volnými radikály a antioxidanty [8]. Volné radikály mohou působit přímo nebo nepřímo vyvolávají onemocnění nebo zhoršují průběh jiných onemocnění. Volné radikály významně přispívají ke vzniku diabetes mellitus, podporují stárnutí, vznik zánětů, nádorů, plicních onemocnění a aterosklerosy. Typickým příkladem mohou být infekční onemocnění (angína, viróza), při kterých velmi rychle vzniká bezprostředně volných radikálů, a proto lékaři doporučují zvýšenou konzumaci ovoce a zeleniny (zdroje antioxidantů) [34,39,40,41].

#### **3.2.1. Diabetes mellitus**

Diabetes mellitus patří mezi skupinu civilizačních chronických chorob, jejichž projevem je hyperglykemie. K hyperglykémii může dojít především následkem poruchy tvorby inzulínu, jeho nedostatečnou funkce nebo kombinací obou těchto variant. Hlavní funkcí inzulínu je transport glukózy z krve do intracelulárního prostředí buněk, kde je využívána jako hlavní zdroj energie. Při porušení tohoto transportu se zvyšuje koncentrace glukózy v krvi a buňky nemohou být dostatečně zásobovány. Charakteristickými příznaky diabetes mellitus jsou ztráta tělesné hmotnosti, nechutenství, polyurie a nadměrné požívání tekutin.

Hyperglykemie podporuje vznik volných radikálů. Ty reagují s glykovanými bílkovinami a vznikají tzv. produkty pokročilé glykace (Advanced Glycosylation End-products; AGE). Tyto látky se hromadí v proteinech, které se nacházejí v retině, glomerulární membráně, cévním endotelu a myelinu. Jejich vznik je rychlejší než odbourávání, při kterém se musí navázat na receptor (RAGE). Touto vazbou AGE látek na receptor vznikají další volné radikály. Působením AGE látek dochází ke stimulaci tvorby cytokinů, způsobují proliferaci buněk, lipoperoxidaci, koagulopatii a podporují vznik volných radikálů [40,41,42].

### 3.2.2. Ateroskleróza

Ateroskleróza je onemocnění, při kterém volné radikály napadají lipoproteiny o nízké hustotě (LDL) a dochází k jejich oxidaci. Tím vznikají reaktivní aldehydy (malondialdehyd) atakující aminokyseliny apolipoproteinu B, dochází ke změně jeho struktury a stává se nerozpoznatelným pro LDL receptory. Vzniklé částice pronikají endotelem, kde se váží na scavengerové receptory makrofágů a vytváří se přitom nová buňka obsahující cholesterol. Přitom se hromadí v endotelu cévní stěny ve formě lipidových proufků. Tyto dílčí jsou ještě reversibilním stádiem aterosklerózy.

V další fázi přitom buňka zaniká, což způsobí proliferaci cévní stěny a stimulaci produkce vaziva. LDL pronikají endotelem, který se tím poškozuje a přestává produkovat NO, což má za následek náchylnost ke zúžení cév a snížení jejich průfčnosti. K orgánům neproudí dostatek okysličené krve a může dojít k jejich poškození. Ateroskleróza je prekurzorem pro další onemocnění, jako například infarkt myokardu nebo cévní mozkovou příhodu [2,34,39,].

### 3.2.3. Zánětlivá onemocnění střev

Mezi zánětlivá onemocnění tenkého a tlustého střeva řadíme ulcerózní kolitidu a Crohnovu nemoc, což je zánětlivé onemocnění jednoho nebo více úseků trávicího traktu. Postihuje sliznici, podslizniční vrstvu, pojivovou a svalovou vrstvu. Zánětlivá místa se hojí jizvami, které zužují trávicí trubici. Typickými příznaky mohou být bolesti břicha, výskyt krve v stolici, v ústech i konečníku, poruchy vstřebávání a podvýživa, objevování krve ve stolici, z toho vyplývající anémie ze ztráty železa i krvácení atd. Podle lékařských studií mohou být jednou z příčin těchto onemocnění právě volné radikály a nedostatek vitamínů C a E. [43,44].

## 4. ANTIOXIDA NÍ KAPACITA

Antioxida ní kapacitu lze definovat jako schopnost dané sloučeniny nebo směsi látek inhibovat oxida ní degradaci pro nás významných sloučenin. Dle litatury je také informace o délce trvání antioxida ního účinku. Pro vzájemné porovnávání antioxida ního účinku různých látek byl n kterými autory zaveden pojem celková antioxida ní kapacita (Total Antioxidant Capacity TAC). TAC je parametrem, který kvantifikuje schopnost vzorku biologického materiálu eliminovat volné radikály, a který koreluje s antioxida ní kapacitou krevní plazmy.

Aktivitu antioxidantů v potravinách ovlivňuje řada faktorů, které se mohou projevit v rozdílech experimentálních výsledků. Významnou úlohu v měření TAC hraje koncentrace a množství druhů přítomných antioxidantů, které spolu mohou synergicky nebo antagonicky reagovat. Záleží také na teplotě, pH, přítomnosti oxida ního inhibitoru enzymů a dalších látek (např. bílkovin v potravinách) [7,45].

### 4.1. Význam antioxida ní kapacity potravin

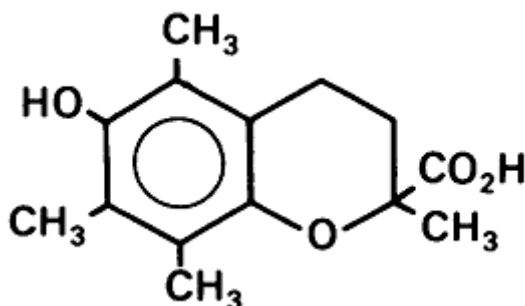
Všeobecně je známo, že obyvatelé přímořských oblastí trpí méně civilizačními onemocněními než lidé z vnitrozemských oblastí a velkých měst. V těchto oblastech se více konzumuje pestrá strava bohatá na ovoce a zeleninu, s vysokým obsahem antioxidantů. Naopak lidé z velkých měst se vystavují většímu stresu, konzumují kalorické potraviny a trpí nedostatkem pohybu.

Mezi typicky se vyskytující onemocnění zemí střední Evropy patří závažná onemocnění tenkého a tlustého střeva (nejčastěji v oblasti konečníku), tzv. ulcerózní kolitidu, dále infarkt myokardu a diabetes mellitus. Tato onemocnění se právě u obyvatel jižní Evropy vyskytují jen sporadicky [33,46,47].

Antioxida ní kapacita popisuje jen sumu antioxidantů vyskytujících se v dané potravine a blíže nespécifikuje zastoupení jednotlivých látek s antioxida ního účinkem. Každý antioxidant přispívá svou měrou k celkové antioxida ní kapacitě. Tato práce je cílena na stanovení právě této sumy. Celkovou antioxida ní kapacitu potravin i koncentraci zastoupení jednotlivých antioxidantů přítomných ve vzorku lze určit pomocí separa ních metod.

## 4.2. Ekvivalentní kapacita

Aby bylo možné porovnávat nutriční hodnoty potravin (celkový obsah látek s antioxidačními účinky) bylo zapotřebí předepsat jednotlivé příspěvky jednotlivých antioxidantů na celkový obsah komerčně nebo často se vyskytujícího antioxidantu, jakým je například kyselina gallová, kyselina askorbová, BHT (butylhydroxytoluol) [47] nebo Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-karboxylová kyselina)-syntetický ve vodě rozpustný analog vitamínu E. Antioxidační kapacita u vzorků potravin se nejčastěji vyjadřuje jako tzv. Total Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) v jednotkách koncentrace  $1 \text{ mmol l}^{-1}$  Troloxu [48] (obr. 12).



Obrázek 12. Chemická struktura Troloxu [48].

## 5. METODY STANOVENÍ ANTIOXIDA NÍ KAPACITY POTRAVIN

V moderní době se v analýze potravin používají metody jako TEAC, FRAP, ORAC, TRAP a DPPH, u kterých lze využít spektrální detekce. Další možností je použití kapalinové chromatografie nejčastěji HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*), kdy se jednotlivé příspěvky antioxidantů předepisují na hmotnostní ekvivalent kyseliny gallové, Troloxu atd. V poslední době je tu možnost využití elektrochemických metod, které nabízejí rychlou, snadnou a ekonomicky výhodnou alternativu [49]. Principy jednotlivých analytických metod, které se v momentální praxi používají, jsou detailně popsány v následujících kapitolách se záznamy reálných analýz.

## 5.1. Spektrální metody

Spektrální metody patří do skupiny analytických metod založených na sledování různých optických vlastností látek. Většina spektrálních metod zaměřená na stanovení antioxidační kapacity spoívá v měření absorpce (pohlcení) elektromagnetického záření molekul obsažených ve sledovaném vzorku v UV nebo viditelné oblasti o vlnové délce 200 až 800 nm.

Při absorpci dochází u molekulových orbitalů k excitaci valenčních elektronů a vznikají elektronová spektra. Míru absorbovaného záření stanovovanými látkami můžeme vyjádřit pomocí fyzikálně-chemického zákona (*Lambert-Beer*). Tento vztah vyjadřuje přímou závislost mezi absorpcí záření, koncentrací a délkou vrstvy absorbující látky. Matematicky můžeme Lambert-Beerův zákon popsat následujícím vztahem

$$A = \epsilon c d l$$

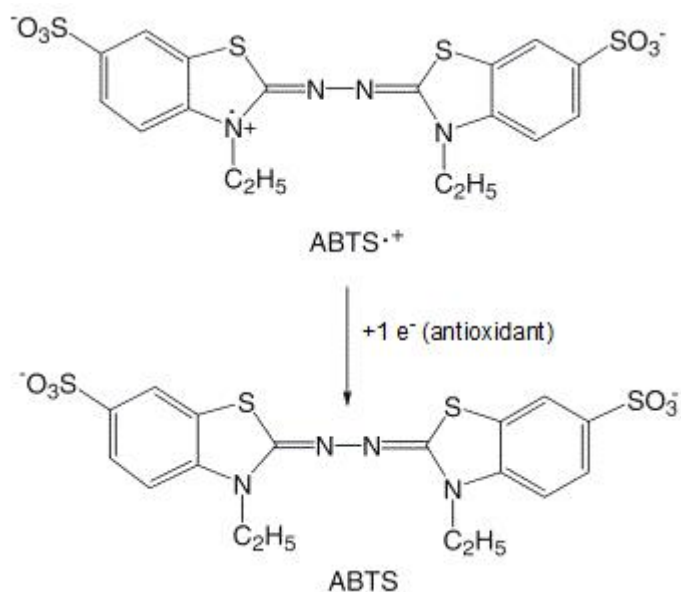
kde  $A$  je absorbance vzorku,  $\epsilon$  molární absorpční koeficient,  $c$  koncentrace absorbující složky a  $l$  délka absorbující vrstvy.

Tyto metody jsou často využívány díky své rychlosti, citlivosti a experimentální nenáročnosti. Nevýhodou ovšem může být velká spotřeba chemikálií a velké množství spotřebovaného vzorku. Většina spektrálních metod na měření antioxidační kapacity potravin je založena na redukčních schopnostech stanovovaných látek (antioxidantů).

### 5.1.1. TEAC test (ABTS)

Metoda TEAC s použitím ABTS<sup>•-</sup> radikálu 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny) se stává poslední dobou jednou z nejčastěji používaných metod k stanovení celkové antioxidační kapacity. TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) spoívá v neutralizaci modrozeleného radikál kationu ABTS<sup>•+</sup> (obr. 13), jednoelektronovou oxidací vzniká bezbarvý chromofor ABTS [7,50].



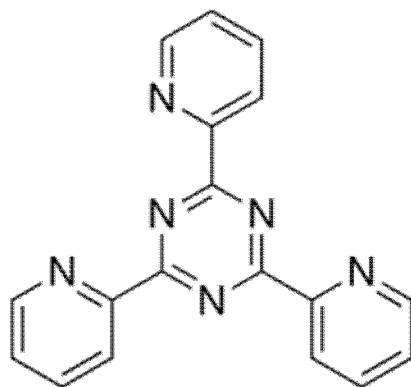


**Obrázek 13.** Jednoelektronová redukce  $\text{ABTS}^{\dot{\ominus}}$  radikálu (p evzato z 51).

Zdrojem elektron , které se zú ast ují této reakce, jsou práv stanovované látky s antioxi dá ními schopnostmi. Mnořství antioxi dá nt se v t-inou p evádí na koncentraci troloxu, která je v literatu e popisována jako TEAC. P i této metod se spektrometricky m í úbytek absorbance zp sobený neutralizací  $\text{ABTS}^{\dot{\ominus}}$  radikálu p i 645 nm, 734nm a 815nm [50].

### 5.1.2 FRAP test

Metoda FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) vyuřívá schopnosti antioxi dá nt redukovat bezbarvý felezitý komplex  $\text{Fe}^{3+}$ -2,4,6-tris(2-pyridyl-S-triazin) ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ), který vzniká reakcí TPTZ (2,4,6-tripyridyl-S-triazin) (obr. 14) s chloridem felezitým ( $\text{FeCl}_3$ ). Tmav mod e zbarvený produkt, který je výsledkem redukce antioxi dá ntů p ítomnými ve vzorku, se stanovuje fotometricky p i vlnové délce 593 nm.



**Obrázek 14.** Strukturní vzorec TPTZ [52].

Nevýhodou metody je méně ní a nefyziologicky nízké hodnoty pH (3,6), což má za následek malou citlivost na pomalu reagující polyfenolické látky a trioly. Z tohoto hlediska FRAP test odráží pouze schopnost látek redukovat ion  $\text{Fe}^{3+}$  a nemusí pozitivně odrážet celkovou antioxidační aktivitu vzorku [7,53].

### 5.1.3. ORAC test

U spektrální metody ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) sledujeme úbytek fluorescence -fykoerytrinu nebo fluoresceinu po reakci s hydroxylovými nebo peroxylovými radikály. Peroxylové radikály jsou generovány ve vodném roztoku z 2-azobis(2-amidinopropanu) hydrochloridu (AAPH), hydroxylové radikály pak ze systému  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cu}^{2+}$ .

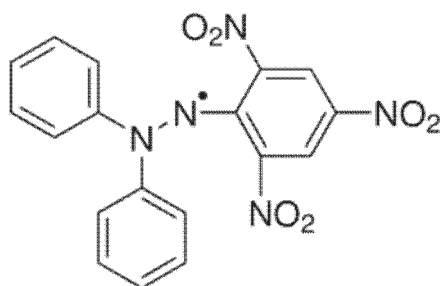
V závislosti na množství antioxidantu v roztoku dochází ke snížení fluorescence. Použitím fluoresceinu se stává metoda ORAC přesnější díky jednoduchému reakčnímu mechanismu, který je založen na přenosu vodíku. ORAC test patří k důležitým parametrům charakterizujícím antioxidanty, jelikož vyvolávané peroxylové a hydroxylové volné radikály patří mezi nejreaktivnější [50,54].

#### 5.1.4. TRAP test

Spektrální metoda TRAP (*Total Radical-Trapping Potential*) je ve své podstatě velmi podobná metodě ORAC. Vyvolává peroxidace R-fykoerytrinu, která je způsobena termálním rozkladem AAPH. Protože antioxidanty ve vzorku peroxidaci potlačují, reakce za netrvá dlouho, kdy jsou antioxidanty spotřebovány. Doba nástupu peroxidace je tedy přímo úměrná antioxidační kapacitě vzorku. Výsledky měření se vyjadřují v jednotkách TEAC [7].

#### 5.1.5. DPPH test

Tato spektrální metoda je založena na schopnosti stabilního volného radikálu 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu (DPPH) reagovat s donory vodíku. Tato metoda je jednoduchá a vhodná i pro manuální analýzu. DPPH (obr. 15) vykazuje silnou absorpci v UV-VIS oblasti. Vhodná koncentrace vzorku se přidá k určitému množství roztoku DPPH radikálu. Při vlnové délce 517 nm se sleduje úbytek absorbance, při čemž dochází k odbarvení fialového roztoku DPPH radikálu do fluktuálního zbarvení (zcela redukovaný roztok DPPH) vlivem antioxidačních látek přítomných ve vzorku [53,55].



**Obrázek 15.** Strukturální vzorec DPPH radikálu [56].

DPPH test se používá jako orientační metoda pro stanovení celkové antioxidační aktivity vzorku, jelikož je založena na vyvolávání redukce DPPH radikálu. Naměřené výsledky se nejčastěji uvádějí v procentech jako množství inhibovaného DPPH radikálu I (%) [53,55].

Výpočet lze snadno provést ze vztahu:

$$I (\%) = \frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{sample}} \cdot 100$$

kde  $A_{blank}$  je absorbance slepého pokusu a  $A_{sample}$  absorbance vzorku [53,55].

Výsledky stanovení antioxidační kapacity ovoce a zeleniny, (vždy po deseti druzích dané komodity), jsou uvedeny v tabulkách 3 a 4. Z těchto výsledků byly záměrně vybrány pouze antioxidační kapacity plodin rostoucích v České republice. Pro porovnání naměřených výsledků byly použity tři spektrální metody a to FRAP, TRAP a TEAC. Z tabulek je zřejmé, že hodnoty antioxidačních kapacit u jednotlivých vzorků nejsou zcela shodné pro všechny aplikované metody, ale tyto ukazují na úzkou korelaci analytických výsledků pořízených těmito metodami [7].

Analyzované druhy ovoce a zeleniny byly nakoupeny ve třech různých italských supermarketech. Po omytí a nakrájení se z jednotlivých vzorků vytvořila v dusíkové atmosféře homogenní směs pomocí vysokorychlostního mixéru. Přesné množství homogenizovaného vzorku (1 g) se za stálého míchání 15 minut extrahovalo se 4 ml vody při pokojové teplotě, centrifugovalo při 1000 otáčkách 10 minut a shromážděný vzniklý supernatant. Poté se extrakce opakovala se 2 ml vody a supernatanty se spojily. Postup zpracování vzniklých zbytků po centrifugaci a dužiny byl stejný, akorát se místo vody použil aceton. V případě potravin bohatých na lipidy se zbytky a dužina extrahovaly dvakrát se 2 ml chloroformu při pokojové teplotě 15 minut. Po provedené centrifugaci se opět shromážděný vzniklý supernatant. Všechny extrakty se naředily vhodným rozpouštědlem (v závislosti na jejich aktivitě) a ihned se provedla měření antioxidační kapacity [7].

Při měření metodou TEAC se pracovní roztok upravil přidáním zásobního roztoku etanolu tak, aby daná absorbance vzorku dosahovala při 734 nm hodnot  $0,70 \pm 0,02$  AU. Měření se provádělo na přístroji Hewlett-Packard 8453 spektrofotometru s diodovým polem (HP, Waldbronn, Německo). Takto upravený pracovní roztok se použil jako mobilní fáze v proučkovém systému. Výsledky byly vyjádřeny v mmol Troloxu na 1 kg daného vzorku [7].

U TRAP testu se zředěný vzorek (120  $\mu$ l) smíchal s 2,4 ml fosfátového pufru o pH 7,4, 375  $\mu$ l redestilované vody, 30  $\mu$ l zředěného R-PE a 75  $\mu$ l ABAP. Měření

se provádí při teplotě 38 °C po dobu 45 minut na LS-55 luminiscenčním spektrometru (Perkin Elmer, Wellesley, MA). Výsledné hodnoty byly vyjádřeny z délky lag-fáze vzorku porovnané s Troloxem a vyjádřeny v jednotkách mmol Trolox na 1 kg [7].

Metoda FRAP se hodnotila pomocí Hewlett-Packard 8453 spektrofotometru s diodovým polem. Vytvořená směs obsahující 100 µl z edněho vzorku a 3 ml pracovního roztoku se nechala 30 minut inkubovat při 37 °C a poté se změnila její absorbance při 539 nm. Výsledné hodnoty byly získány porovnáním absorpčních změn v testovaném vzorku s výsledky získanými ze zvyčejících se koncentrací Fe<sup>3+</sup> a vyjádřené jako mmol Fe<sup>2+</sup> na 1 kg vzorku [7].

Mezi zeleninu s nejvyšší antioxidační kapacitou měnou pomocí metod TEAC a FRAP mě flme za aditěpenát a papriku. Vysoká hodnota u řpenátu je způsobena přítomností flavonoidů, derivátů kyseliny glukuronové a kyseliny p-kumarové. Z ovoce, byly nejvyšší antioxidační kapacity nalezené v bobulích (tj., ostružiny, rybíz a malina), bez ohledu na použitý test [7].

**Tabulka 3.** Antioxidační kapacity u vybraných vzorků zeleniny (převzato z [7]).

zelenina	FRAP	TRAP	TEAC
	mmol Fe <sup>2+</sup> / kg	mmol Trolox / kg	
Brambor	3,67	0,85	0,80
Brokolice	11,67	3,07	3,04
Cibule	5,28	2,43	1,82
červená řepa	15,31	7,67	2,94
Hlávkový salát	4,94	2,31	1,33
Květák	4,27	1,61	1,10
Paprika	23,54	6,42	7,62
Rajčete	5,12	1,31	1,65
řpenát	26,94	5,79	8,49
Zelí	5,79	2,83	1,15

**Tabulka 4.** Antioxidační kapacity u vybraných vzorků ovoce (převzato z 7).

ovoce	FRAP mmol Fe <sup>2+</sup> / kg	TRAP mmol Trolox / kg	TEAC
Borůvka	18,61	9,30	7,43
Broskev	6,57	1,49	1,67
Hruška	5,00	3,87	2,19
Jablko	3,84	2,23	1,59
Jahoda	28,00	10,34	11,34
Malina	43,03	10,48	16,79
Ostružina	51,53	21,01	20,24
Rybíz	44,86	12,14	14,05
Švestka	12,79	8,09	5,11
Třešeň	8,10	4,17	2,69

## 5.2. Chromatografické metody

Chromatografické metody jsou analytické techniky založené na separaci prátomných látek ve směsích (potraviny). Základním principem chromatografie je rozdělování jednotlivých složek směsi mezi mobilní a stacionární fázi. Umožňuje kvalitativní i kvantitativní analýzu směsi, kdy určíme druh a koncentraci jednotlivých složek. Mezi starší metody, které se využívají pro analýzu polyfenolů v potravinách, patří například papírová chromatografie (PC) a chromatografie na tenké vrstvě (TLC). Mezi moderní metody lze zařadit kapilární zónovou elektroforézu (CZE), plynovou chromatografii (GC) a v současné době nejčastěji využívanou kapalinovou chromatografii (LC) [17].

### 5.2.1. Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

K separaci stanovovaných látek dochází na základě jejich různé mobility v elektrickém poli, kde kationty migrují k zápornému pólu a opačně. V CZE dochází k separaci látek v krátké kapiláře, obvykle o průměru 50-100  $\mu\text{m}$ . Tato metoda je poměrně rychlá a levná. Separace látek je ovlivována hodnotou pH a organickými látkami, které slouží jako modifikátory v nosných elektrolytech kde snižují polaritu pufru

a mohou mít pohyblivost analytu. Tyto vlastnosti přispívají ke zlepšení selektivity a vyšší pravděpodobnosti identifikace zkoumaných látek [17,57].

### 5.2.2. Plynová chromatografie (GC)

V GC dochází k separaci látek v plynném skupenství, a proto je důležité aby stanovované látky byly dostatečně volatily, což může být problém pro stanovení polyfenolických sloučenin pro svojí vysokou polaritu. GC lze využít především ke stanovení nízkomolekulárních flavonoidů a jednoduchých fenolových kyselin. Také se využívá pro stanovení polyfenolů se prakticky zvykne derivatizací především na ethery a estery.

Často využívanou metodou při derivatizaci je methylování, kdy jako derivatizační činidla slouží například diazomethan nebo dimethyl sulfoxid s methyljodidem v alkalickém prostředí. Dalším způsobem jak převést polyfenoly na ethery nebo estery je silylování. Jako činidla se používají například N,O-bis-(trimethylsilyl)acetamid (BSA), N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamid (MSTFA) nebo N,O-bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA). Tato činidla mají výhodu v tom, že mohou reagovat s více funkčními skupinami derivatizovaných polyfenolů. Pro urychlení procesu silylování je možné kombinovat s zahřátím.

Při stanovení polyfenolů se používají v tavené kapalině kapilární kolony z taveného křemene, které jsou dlouhé 25-30 m, vnitřní průměr mají 0,25-0,5 mm a tloušťku stacionární fáze 0,25 μm. Jako stacionární fáze může sloužit polysiloxanový materiál DB-5, obsahující 5% fenylových a 95% methylových substituentů. GC s hmotnostní detekcí (GC-MS) je jednou z neefektivnějších v současnosti používaných analytických metod, její hlavní nevýhodou jsou vysoké provozní náklady [58,59].

### 5.2.3. Vysokou tlakem kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC lze rozdělit na normální HPLC (NP HPLC) a reversní HPLC (RP HPLC). Rozdílem těchto dvou metod je polarita jejich stacionárních fází. Zatímco při normální HPLC má stacionární fáze polární charakter nefixované fáze mobilní, u reversní je tomu naopak. Metoda RP HPLC je v praxi využívána mnohem častěji.

Stacionární fázi tvoří mikročástice silikagelu, na které je navázána vlastní stacionární fáze. Ta se skládá například z nepolárních uhlovodíků (C8-C18) nebo polárnějších

uhlovodíku s funkčními skupinami (např. -CN a pod.). Při stanovení polyfenolů ve vzorcích se využívá především oktadekan. Podle použité stacionární fáze volíme mobilní fázi. Při RP HPLC tvoří mobilní fázi polární, nebo-li vodná a nepolární fáze. Vodná fáze obsahuje obvykle přísadu kyseliny octové. Jako nepolární fáze slouží organická rozpouštědla, například propanol, butanol, ethylacetát, methanol a acetonitril [60].

Oproti GC má HPLC mnohem větší uplatnění v analýze polyfenolů, jelikož není zapotřebí derivatizace vzorků. Polyfenolické sloučeniny jakožto aromatické látky dobře absorbují UV záření a díky tomu jsou snadno detekovatelné UV-VIS detektorem, který je běžnou součástí každého chromatografu. Použití HPLC s hmotnostním detektorem (HPLC-MS) umožňuje identifikaci velkého množství látek. Jednou z nevýhod použití těchto detektorů je vysoký nárok na čistotu látek a velmi drahý provoz a poizovací ceny materiálů. Podle způsobu ionizace lze rozlišit na chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI) a elektropray ionizaci (ESI). ESI se vyznačuje vysokou citlivostí a je vhodná k analýze polárních, netěkavých a termolabilních sloučenin jako například anthokyanů. APCI je zdokonalením ESI, kdy k ionizaci odpařené vzorky dochází pomocí koronového výboje. APCI se dá využít například při stanovování isoflavonů [59].

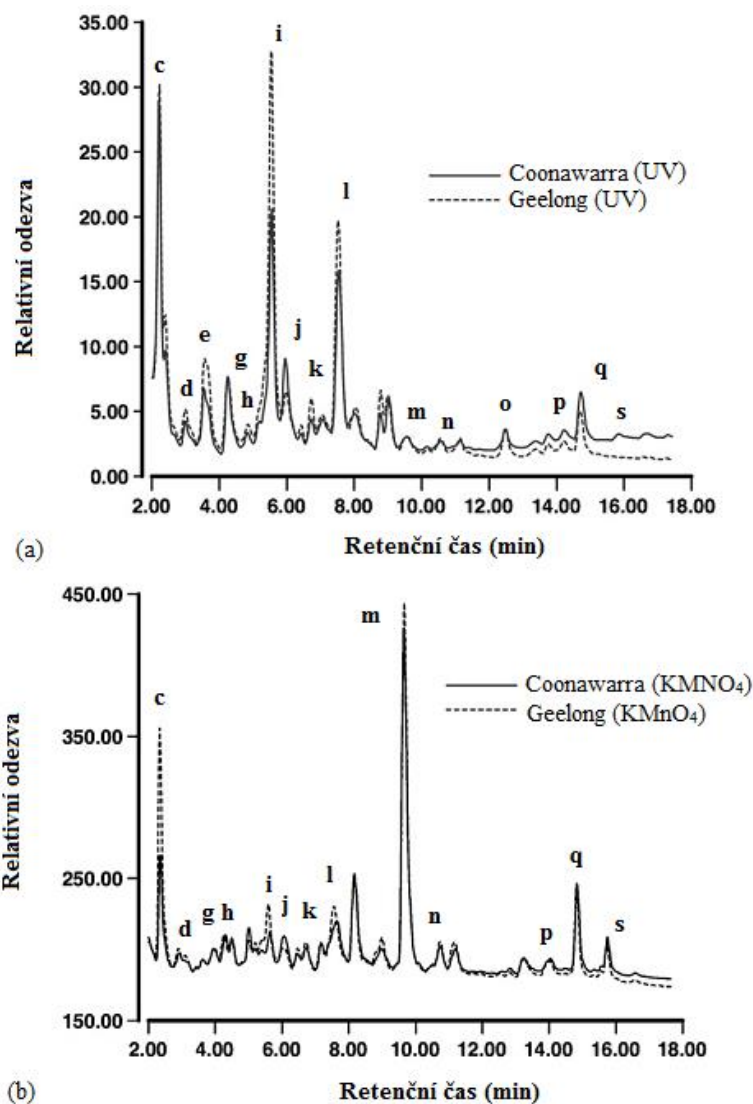
Při analýze polyfenolů lze také použít detekční metody založené na měření elektrochemických reakcí. Identifikace jednotlivých látek je založena na jejich oxidovatelnosti, kdy dochází ke změně ve struktuře molekul jednotlivých polyfenolů. V analýze polyfenolů se nejčastěji využívá voltametrická a coulometrická detekce [17].

Na obr. 16 je uveden příklad záznamu měření obsahu polyfenolů ve víně Chardonnay, za použití UV (a) a chemiluminiscenční (b) detekce, pocházející z vinařských oblastí Austrálie, a to Coonawarra a Geelong. Vzorky byly uloženy do centrifugálních zkumavek a zmrazeny při teplotě  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Před analýzou došlo k rozmrazení, vizuální kontrole, aby neobsahovaly žádné sraženiny, a poté se při pokojové teplotě dle kladně promísily pomocí mixéru. Nakonec se vzorky přefiltrovaly přes  $0,45\text{ }\mu\text{m}$  nylonový membránový filtr (Acrodisc PSV injekční filtry; Pall Austrálie, Vic., Austrálie) [61].

Samotná analýza byla provedena pomocí Hewlett Packard 1100 series kapalinového chromatografu s UV detektorem s diodovým polem a chemiluminiscenčním detektorem. Chromatograf byl vybaven autosamplerm (Agilent Technologies, FORESTHILL, Vic., Austrálie), kolonou Performance RP-18e Chromolith o rozměrech  $100\text{ mm} \times 4,6\text{ mm}$  a 5mm monolitickou ochrannou kolonou (Merck, Kilsyth, Vic., Austrálie). Data z obou



detektor byla zpracována pomocí Hewlett Packard Chemstation Software (Agilent Technologies).

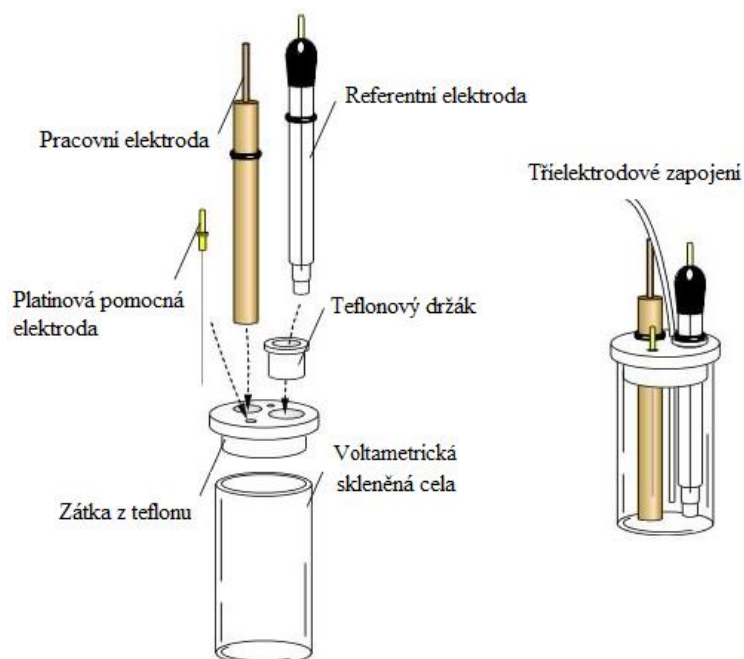


**Obrázek 16.** Záznam HPLC za použití UV (a) a chemiluminiscen ní (b) detekce s píky: *c* kyselina gallová, *d* gallokatechin, *e* kyselina vanilová, *f* quercetin, *g* katechin, *h* epigallokatechin, *i* kyselina kumarová, *j* kyselina kávová, *k* kyselina sinapiniková, *l* epikatechin, *m* myricetin, *n* kyselina syringová, *o* procyanidin B, *p* prokyanidin A, *q* resveratrol, *s* morin (p evzato z 62).

### 5.3. Elektrochemické metody

Elektrochemické metody představují skupinu analytických technik, které využívají redoxních vlastností stanovovaných látek. Antioxidanty jsou látky s redukčními vlastnostmi a jednoduše reagují s volnými radikály, které jsou extrémními oxidáčními činidly. Z tohoto hlediska je teoreticky možné stanovit oxidační kapacitu neznámých vzorků (potravin). Mezi významné elektrochemické metody, které lze úspěšně aplikovat pro analýzu antioxidantů, patří cyklická voltametrie, pulzní voltametrie a amperometrie s použitím biosensoru [62,63].

Elektrochemická měření se provádějí uskutečňují v tříelektrodeovém zapojení (obr. 17). Elektrody jsou ponořeny ve standardním elektrolytu, který je definován objemem, koncentrací použitých solí, hodnotou pH, typem použitého rozpouštědla (voda, ethanol, organická rozpouštědla, směsné elektrolyty), přítomností kyslíku, teplotou atd. Elektrochemické děje se odehrávají na povrchu pracovní elektrody (rtuťová, platinová, zlatá, uhlíková atd.), pracovní potenciál je řízen potenciostatem pomocí referenční elektrody (argentchloridová nebo kalomelová) a měřený elektrický proud je veden mezi pracovní a pomocnou elektrodou (platinový drátek nebo plíšek) [62,63].



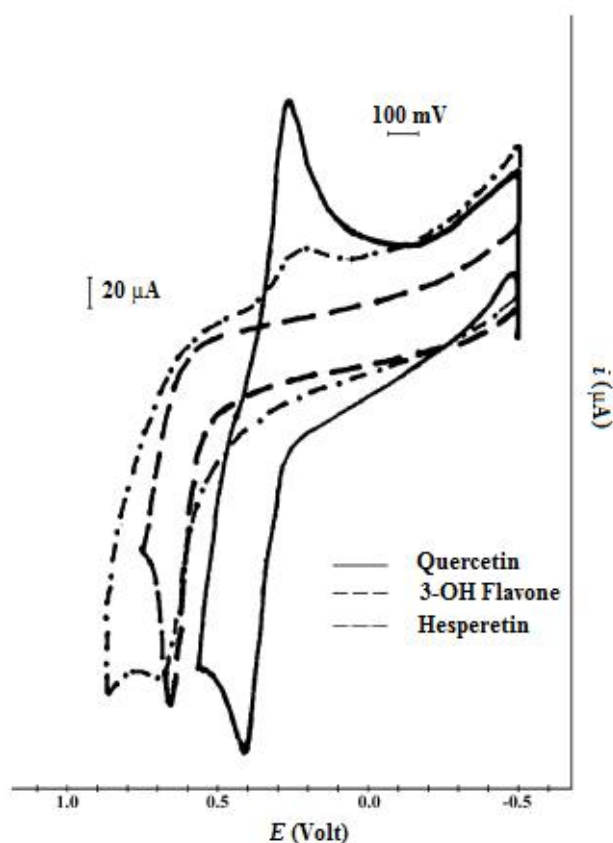
**Obrázek 17.** Schéma tříelektrodeového zapojení pro elektrochemickou analýzu (převzato z [64]).

### 5.3.1. Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie se využívá pro stanovení řady antioxidantů, včetně kyseliny askorbové, flavonoidů, fenolických kyselin a syntetických antioxidantů. Polyfenoly obsahující ortho- nebo para-difenolovou skupinu mají nižší oxidační potenciál než sloučeniny s meta-difenoly. Ještě nižší oxidační potenciál vykazuje kyselina askorbová a syntetické antioxidanty.

Na pracovní elektrodu se vkládá potenciálový pulz s určitou rychlostí polarizace a zároveň se sledují proudové odezvy látek ve zkoumaném roztoku. Redukční vlastnosti látek se vyhodnocují pomocí dvou parametrů, z potenciálu anodického oxidačního píku  $E^a$  a jeho anodického proudu  $I^a$ . Čím je hodnota  $E^a$  zkoumané látky nižší, tím je lepší antioxidantem. Z výšky píku  $I^a$  lze určit koncentraci dané látky [65].

Na obr. 18 je zobrazen záznam měření flavonoidů, které byly analyzovány pomocí modifikovaného FRAP testu a jejich oxidační potenciály byly měřeny cyklickou voltametrií.



Obrázek 18. Cyklické voltamogramy Quercetinu, 3-OH Flavonu a Hesperetinu [67].

K voltametričkému měření byl použit tříelektrodový multipolarograf (AMEL 472) společně s digitálním x/y rekordérem (AMEL 863). Tříelektrodový systém tvořila uhlíková pracovní elektroda, referenční SKE (+0,242 V) a platinový drátek. Pracovní elektroda byla před každým měřením vyleštěna pomocí leštící látky Buehler. Roztok obsahoval 300 mM acetátový pufr o pH 3,6 a 20 mM kyselinu chlorovodíkovou v poměru 10:2, k napodobení stejného stavu analýzy jako ve FRAP testu.  $\text{Fe}^{3+}$  byl analyzován v přítomnosti TPTZ za stejných podmínek jako ve FRAP testu za účelem získání katodického potenciálu. Zkoušená látka se přidá do tohoto roztoku v konečné koncentraci 0,1 mM [66].

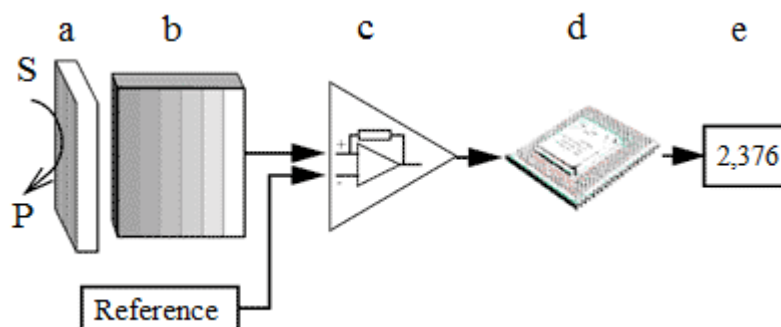
### 5.3.2. Pulzní voltametrické techniky

Diferenční pulzní voltametrie (DPV), normální pulzní voltametrie (NPV) a square wave voltametrie (SWV) jsou vysoce citlivé analytické metody, které mohou mít detekční limit od  $10^{-7}$  do  $10^{-8}$  mol.l<sup>-1</sup> pro nevodivé prostředí. Stanovení polyfenolů se obvykle uskutečňuje ve vodných roztocích, lze tedy předpokládat, že detekční limity budou ještě nižší. Obsah polyfenolů v potravinách jako je ovoce, zelenina a produkty z nich se pohybuje v řádech gramů na kilogram dané potraviny. Z tohoto důvodu se tyto voltametrické techniky v praxi nepoužívají, nebo bohatěji postačí cyklická voltametrie, která se spíše preferuje na elektrochemické studie elektrodových dějů.

Pro velkou citlivost těchto elektrochemických metod se spíše používá pro stanovení polyfenolů ve vzorcích, ve kterých se předpokládá nízká koncentrační hladina, jedná se vztínou o vzorky z klinického prostředí, jako je moč a krevní plazma [67,68].

### 5.3.3. Biosenzory

Biosenzory představují rychlou a spolehlivou alternativu pro měření antioxidantní kapacity zkoumaných látek v jednotlivých vzorcích potravin. Jejich využití je velice výhodné vzhledem k jejich jednoduchosti v aplikaci a specifí nastavení reakcí, které probíhají na membráně. Skládají se ze tří komponent: první část tvoří prvek pro urychlení reakce (enzym, protilátka, organela aj.), dále fyzikálně-chemický převodník a detektor [63]. (obr.19).



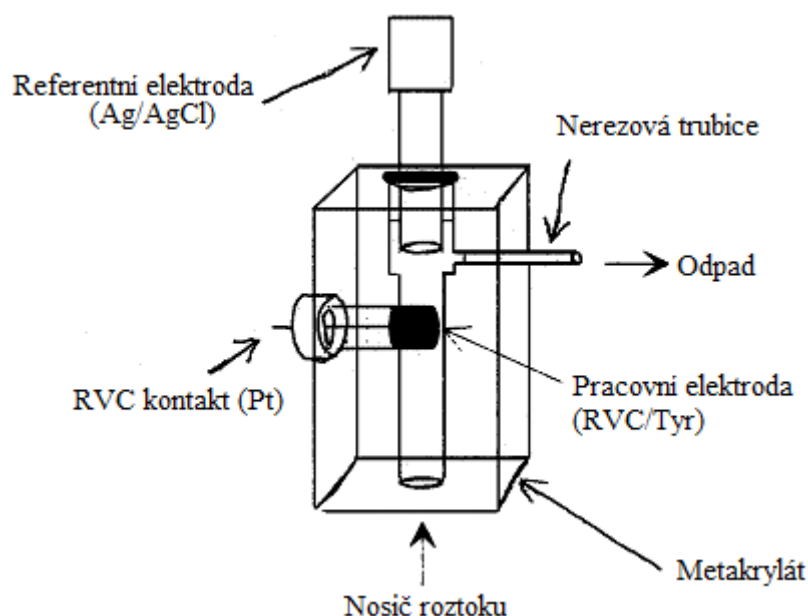
**Obrázek 19.** Schéma znázorňující hlavní části biosenzoru, skládající se z biokatalyzátoru (a), transduktoru (b), potenciometru (c) zesilovače signálu (d), zpracování a zobrazení (e). [69].

Vytvořený biosenzor, který se používá pro stanovení polyfenolů, je konstruován na bázi enzymu. Polyfenoloxidáza (PPO) je enzym (biokatalyzátor), který katalyzuje oxidaci polyfenolů vzdušným kyslíkem na chinoidní sloučeniny. Tyto produkty enzymatické reakce mohou být snadno elektrochemicky detekovatelné, nebo vykazují elektrochemickou aktivitu.

Polyfenoloxidázy jsou enzymy, které patří do skupiny metaloproteinů s obsahem manganu a patří do skupiny enzymů oxidoreduktáz, které katalyzují oxidaci širokého spektra fenolových sloučenin s využitím molekulárního kyslíku. K dispozici jsou především tři typy PPOs klasifikovaných podle jejich specifických substrátů a mechanismu reakcí. Jedná se o tyrosinázu, katechol-oxidázu a laktázu. Biosenzory po své miniaturizaci nacházejí široké uplatnění v průtokové injekční analýze (FIA, *Flow Injection Analysis*) [62,63].

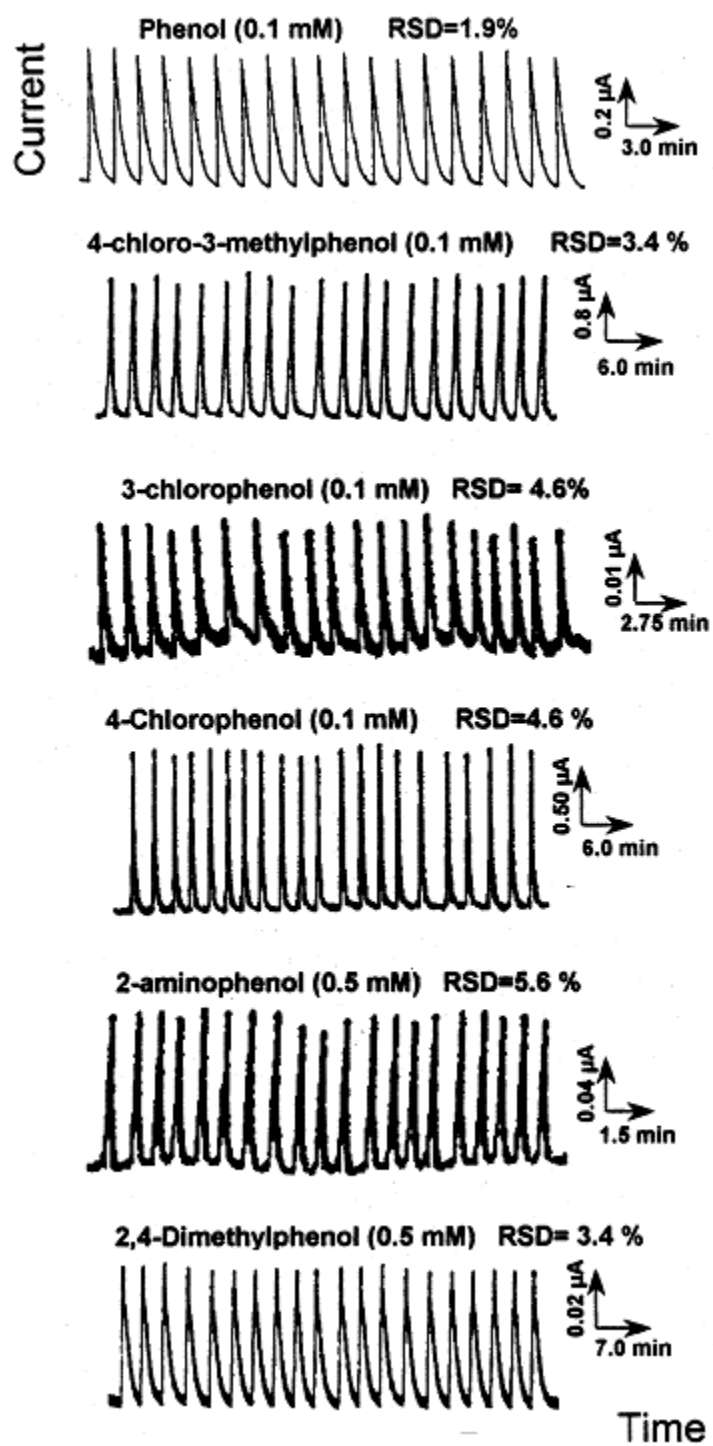
### 5.3.4. Pr toková injek ní analýza

Pr toková injek ní analýza, zkrácen FIA, se v posledních desetiletích stává velmi oblíbenou instrumentální technikou používanou ke stanovení polyfenolických látek pro svoji univerzálnost, přesnost, jednoduchost a ekonomickou výhodnost. Princip spoívá v nadávkování vzorku v kapalném skupenství do pohybujícího se proudu nosné kapaliny. Vzorek je transportován k detek ní cele, kde se zaznamenává změna potenciálu elektrody, absorpance nebo jiných fyzikálních parametr závislých na použitém druhu detektoru [70,71,72]. Na obr. 20 je schematicky znázorněna pr toková cela s použitím síťované uhlíkové elektrody (RVC) s kovalentně navázanou tyrozinázou.



**Obrázek 20.** Schéma pr tokové cely (p evzato z 73).

RVC/Tyr elektroda byla použita pro měření různých fenolických látek. Tento záznam je znázorněn na obr. 21. Jejich koncentrace byla  $1 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  a  $5 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  pro 2,4-dimetylfenol a 2-aminofenol. Vzorky o objemu  $90 \mu\text{l}$  byly měřeny v  $0,05 \text{ mol l}^{-1}$  fosfátovém pufru a při pH 6,5. Potenciál měl hodnotu  $-0,2 \text{ V}$  a rychlost pr toku  $1 \text{ ml min}^{-1}$ . Tato elektroda může být využita pro stanovení fenolických sloučenin např. v průmyslových odpadních vodách, kde je jejich nejvyšší povolené množství  $2 \text{ mg l}^{-1}$  a dále ke kontinuálnímu monitorování těchto látek za tekoucích podmínek [73].



Obrázek 21. Záznam měření fenolů pomocí RVC/Tyr elektrody [73].

## 6. ZÁVĚR

V první části této práce jsem se zabýval popisem a charakteristikou antioxidační kapacity potravin. Snáhl jsem se charakterizovat antioxidanty, jejich výskyt v potravinách a vliv na lidské zdraví, a volné radikály způsobující řadu civilizačních onemocnění.

V druhé části jsem se vnoval stanovení antioxidační kapacity pomocí nejčastěji využívaných chemických metod, mezi které lze zařadit metody spektrální, chromatografické a elektrochemické. Dle výsledků se domnívám, že elektrochemické metody se zdají být pro stanovení antioxidantů vhodnou alternativou pro svoji citlivost, nízkou spotřebu reagentů a nenáročnost.



## 7. P EHLED POUFITÉ LITERATURY

1. Halliwell B., *Annu. Rev. Nutr.* **16** (1996) 33
2. Young I S, Woodside J V., *J. Clin. Pathol.* **54** (2001) 176
3. Halliwell B., *Free Radic Res.* **31** (1999) 261
4. Sies H., *Arch. Biochem. Biophys.* **501** (2010) 2
5. Scalbert A., Johnson I. T., Saltmarsh M., *Am. J. Clin. Nutr.* **81**(suppl) (2005) 215
6. Halvorsen B. L., Holte K., Myhrstad M. C. W., Barikmo I., Hvattum E., Remberg S. F., Wold A. B., Haffner K., Baugerød H., Andersen L. F., Moskaug J. Ø, Jacobs D. R. Jr., Blomhoff R., *J. Nutr.* **132** (2002) 461
7. Pellegrini N., Serafini M., Colombi B., Rio D. D., Salvatore S., Bianchi M., Brighenti F., *J. Nutr.* **133** (2003) 2812
8. Sies H., *Exp. Physiol.* **82** (1997) 291
9. Laguerre M., Lecomte J., Villeneuve P., *Prog. Lip. Res.* **46** (2007) 244
10. Manach C., Scalbert A., Morand Ch., Rémésy Ch., Jiménez L. *Am. J. Clin. Nutr.* **79** (2004) 727
11. <http://www.emulgatory.cz/seznam-ecek> [cit. 2013-05-21]
12. Yao L. H., Jiang Y. M., Shi J., Barberán F. A. T., Datta N., Singanusong R., Chen S. S., *Plant. Food. Hum. Nutr.* **59** (2004) 113
13. Heim E. K., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J., *J. Nutr. Biochem.* **13** (2002) 572
14. Sultana B., Anwar F., *Food. Chem.* **108** (2008) 879
15. Pandey K. B., Rizvi . S. I., *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2** (2009) 270
16. Peterson J., Dwyer J., *Nutr. Res.* **18** (1998) 1995
17. Josep Valls, Silvia Millán, M. Pilar Martí, Eva Borràs, Lluís Arola, *J Chromatogr A*, **1216** (2009) 7143
18. Ferreira D., Slade D., *Nat. Prod. Rep.*, **19** (2002) 517
19. Williams R. J., Spencer J. P. E., Rice-Evans C., *Free Radical Bio. Med.* **36** (2004) 838
20. Kong J-M., Chia L-S., Goh N-K., Chia T-F., Brouillard R., *Phytochemistry* **64** (2003) 923
21. Mattila P., Hellström J., *J. Food Compos. Anal.* **20** (2007) 152
22. Ayaz F.A., Ayaz S. H., Karaoglu S. A., Grúz J., Valentová K., Ulrichová J., Strnad M., *Food. Chem.* **107** (2008) 19
23. Frémont L., *Life Sci.* **66** (2000) 663

24. Chong J., Poutaraud A., Hugueney P., *Plant Sci.* **177** (2009) 143
25. Sies H., Stahl W., *Am. J. Clin. Nutr.* **62** (suppl) (1995) I315
26. Rumsey S. C., Levine M., *J. Nutr. Biochem.* **9** (1998) 116
27. Trabera M. G., Atkinson J., *Free Radical Bio. Med.* **43** (2007) 4
28. Di Mascio P., Murphy M. E., Sies H., *Am. J. Clin. Nutr.* **53** (1991) 194
29. <http://www.google.com/patents/EP2362875A1?cl=en> [cit. 2013-05-28]
30. Eldahshan O. A., Singab A. N. B., *J. Pharmacog. Phytochem.* **2** (2013) 225
31. Paiva S. A. R., Russell R. M., *J. Am. Coll. Nutr.* **18** (1999) 426
32. Turunena M., Olsson J., Dallner G., *Biochim. Biophys. Acta* **1660** (2004) 171
33. Andrew M. J., Smith R. A. J., Murphy M. P., *Arch. Biochem. Biophys.* **423** (2004) 47
34. Devasagayam TP, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD., *J. Assoc. Physicians India* **52** (2004) 794
35. Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M., *Chem-Biol Interact* **160** (2006) 1
36. Halliwell B., *Biochem. Pharmacol.* **49** (1995) 1341
37. Halliwell B., Aeschbach R., Loliger J., Aruoma O. I., *Fd. Chem. Toxic.* **33** (1995) 601
38. Kasprzak K. S., *Free Radical Bio. Med.* **32** (2002) 958
39. Fearon I. M., Faux S. P., *J. Mol. Cell. Cardiol.* **47** (2009) 372
40. Prasad S., Sinha A. K., *Int. J. Diabetes Mellit.* **2** (2010) 141
41. Sydow K., Münzel T., *Int. Congr. Ser.* **1253** (2003) 125
42. Kuyvenhoven J. P., Meinders A. E., *Eur. J. Intern. Med.* **10** (1999) 9
43. Roessner A., Kuester D., Malfertheiner P., Schneider-Stock R., *Pathol. Res. Pract.* **204** (2008) 511
44. Armuzzi A., De Pascalis B., Fedeli P., De Vincentis F., Gasbarrini A., *Digest. Liver Dis.* **40S** (2008) S271
45. Kusano C., Ferrari B., *J. Cell. Mol. Biol.* **7** (2008) 1
46. Ninfali P., Mea G., Giorgini S., Rocchi M., Bacchiocca M., *Brit. J. Nutr.* **93** (2005) 266
47. Weisburger J. H., *Food Chem. Toxicol.* **37** (1999) 943
48. Davies M. J., Forni L. G., Willson R. L., *Biochem. J.* **255** (1988) 513
49. Wojdyła A., Oszmianowski J., Czemerz R., *Food Chem.* **105** (2007) 940
50. Zulueta A., Esteve M. J., Frígola A., *Food Chem.* **114** (2009) 310
51. Lee Y., Yoon J., von Gunten U., **39** (2005) 1946

52. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t1253?lang=en&region=CZ> [cit. 2013-06-12]
53. Ozgen M., Reese R. N., Tulio A. Z. Jr., Scheerens J. C., Miller A. R., *J. Agric. Food Chem.* **54** (2006) 1151
54. Bisby R. H., Brooke R., Navaratnam S., *Food Chem.* **108** (2008) 1002
55. Garcia E. J., Oldoni T. L. C., De Alencar S. M., Reis A., Loguercio A. D., Grande R. H. M., *Braz. Dent. J.* **23** (2012) 22
56. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/d9132?lang=en&region=CZ> [cit. 2013-06-13]
57. Arribas A. S., Fernández M. M., Chicharro M., *Tr. A. C.* **34** (2012) 78
58. Robbins R. J., *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003) 2866
59. Robards K., Prenzler P., Tuckler G., *Food Chem.* **66** (1999) 401
60. Tsao R., Deng Z., *J. Chromatogr. B* **812** (2004) 85
61. Bellomarino S. A., Conlan X. A., Parker R. M., Barnett N. W., Adams M. J., *Talanta* **80** (2009) 833
62. Ortega F., Domínguez E., Pettersson G. J., Gorton L., *J. Biotechnol.* **31** (1993) 289
63. Narang J., Chauhan N., Singh A., Pundir C. S., *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **72** (2011) 276
64. <http://www.als-japan.com/1021.html> [cit. 2013-06-15]
65. Rapta P., Miřík V., Stařko A., Vřábel I., *Free Radical Biol. Med.* **18** (1995) 901
66. Firuzi O., Lacanna A., Petrucci R., Marrosu G., Saso L., *Biochim. Biophys. Acta.* **1721** (2005) 174
67. Pohanka M., Ban ouchová H., Vl ková K., fi árová Karasová J., Ku a K., Damková V., Pecková L., Vitula F., Pikula J., *J. Appl. Biomed.* **9** (2011) 103
68. Adam V., Mikelova R., Hubalek J., Hanustiak P., Beklova M., Hodek P., Horna A., Trnkova L., Stiborova M., Zeman L., Kizek R., *Sensors* **7** (2007) 2402
69. <http://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=3753> [cit. 2013-06-15]
70. Petrozzi S., Wieland F., Gloess A. N., Dambrosio L., Yeretizian Ch., *J. Flow Injection Anal.* **28** (2011) 23
71. Parikh A., Patel K., Patel Ch., Patel B. N., *J. Chem. Pharm. Res.* **2** (2010) 118
72. Solná R., Skládal P., *Electroanal.* **17** (2005) 2137
73. Peña N., Reviejo A. J., Pingarrón J. M., *Talanta* **55** (2001) 179