

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

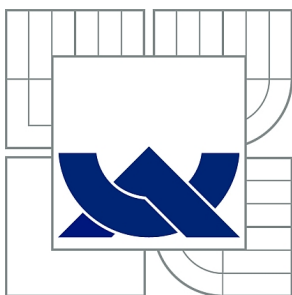
ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA VYBRANÝCH DRUHŮ DROBNÉHO OVOCE

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

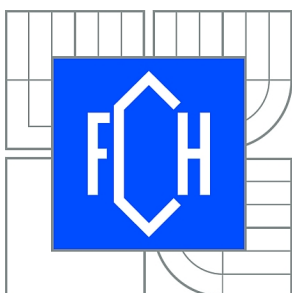
Bc. ALENA KŘENOVÁ

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA VYBRANÝCH DRUHŮ DROBNÉHO OVOCE

THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SELECTED SPECIES OF SMALL FRUIT

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. ALENA KŘENOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. PAVEL DIVIŠ, Ph.D.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0904/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Alena Křenová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Jaromír Pořízka	

Název diplomové práce:

Antioxidační aktivita vybraných druhů drobného ovoce

Zadání diplomové práce:

1. zpracování literární rešerže k zadané problematice
2. příprava vzorků ovoce k analýze
3. stanovení antioxidační aktivity vzorků různými postupy
4. zpracování naměřených dat

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2015

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Alena Křenová
Student(ka)

doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá stanovením celkové antioxidační aktivity červených a bílých angreštů a červených, bílých a černých rybízů. V teoretické části jsou shrnuty dostupné informace o drobném ovoci, přehled přírodních a syntetických antioxidantů a souhrn použitých metod pro stanovení celkové antioxidační aktivity. Zmražené vzorky ovoce byly poskytnuty výzkumným a šlechtitelským ústavem ovocnářským Holovousy, s. r. o. v rámci projektu QI111A141 – Výzkum nových technologií v pěstování angreštu a rybízu se zaměřením na kvalitu a využití plodů (Ministerstvo zemědělství ČR). Celková antioxidační aktivita červených a bílých angreštů a rybízů byla změřena spektrofotometrickými metodami využívající volné radikály $ABTS^{\bullet+}$ a DPPH a byla vyjádřena jako ekvivalent látky Trolox. Černé rybízy byly proměřeny elektronovou paramagnetickou rezonancí s využitím volných radikálů $ABTS^{\bullet+}$ a DPPH a celková antioxidační aktivita byla vyjádřena hodnotami $TEAC_{ABTS}$ a $TEAC_{DPPH}$. Celkem bylo proměřeno 8 odrůd červených angreštů, 6 odrůd bílých angreštů, 12 odrůd červených rybízu, 6 odrůd bílých rybízu a 8 odrůd černých rybízů. Nejvyšší hodnoty celkové antioxidační aktivity vykazovaly odrůdy červených a bílých angreštů Alan, Karmen, Pax a Invicta a odrůdy červených a bílých rybízů Rovada, Orion a Olin. Mezi černými rybízy dosahovaly nejvyšší hodnoty celkové antioxidační aktivity odrůdy Ometa a Ruben.

ABSTRACT

This diploma's thesis deals with the determination of total antioxidant activity of red and white gooseberries and red, white and black currants. There are available information about small fruits, an overview of natural and synthetic antioxidants and a summary of the methods to determine the total antioxidant activity in the theoretical part. Frozen fruit samples were provided by Research and Breeding Institute of Pomology Holovously Ltd. in the project QI111A141 – Research of new technologies in the cultivation of gooseberries and currants with a focus on quality and use of fetuses (Ministry of Agriculture). The total antioxidant activity of red and white gooseberries and currants was measured by spectrophotometric methods using free radicals $ABTS^{\bullet+}$ and DPPH and was expressed as a Trolox equivalent. The total antioxidant activity of black currants was measured by electron paramagnetic resonance using free radicals $ABTS^{\bullet+}$ and DPPH and expressed as a $TEAC_{ABTS}$ and a $TEAC_{DPPH}$. There were measured 8 species of red gooseberries, 6 species of white gooseberries, 12 species of red currants, 6 species of white currants and 8 species of black currants in this thesis. The highest values of total antioxidant activity showed species of red and white gooseberries Alan, Karmen, Pax and Invicta and species of red and white currants Rovada, Orion and Olin. Among black currants, species Ometa and Ruben had the highest values of total antioxidant activity.

KLÍČOVÁ SLOVA

Rybíz, angrešt, volné radikály, antioxidanty, celková antioxidační aktivita, ABTS, DPPH, EPR.

KEYWORDS

Currant, gooseberry, free radicals, antioxidants, total antioxidant activity, ABTS, DPPH, EPR.

KŘENOVÁ, A. *Antioxidační aktivita vybraných druhů drobného ovoce*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 52 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala doc. Ing. Pavlu Divišovi, Ph.D., za odborné vedení a cenné rady při vzniku této práce a Výzkumnému a šlechtitelskému ústavu ovocnářskému Holovousy, s. r. o. za poskytnuté vzorky.

OBSAH:

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Vybrané druhy drobného ovoce	9
2.1.1	Angrešt (<i>Ribes uva-crispa</i> L.)	9
2.1.2	Rybíz	9
2.1.2.1	Rybíz červený (<i>Ribes rubrum</i>)	10
2.1.2.2	Rybíz bílý (<i>Ribes vulgare</i>).....	10
2.1.2.3	Černý rybíz (<i>Ribes nigrum</i>).....	10
2.2	Volné radikály	10
2.2.1	Reaktivní formy kyslíku a dusíku	11
2.2.2	Oxidační stres.....	12
2.3	Antioxidanty	12
2.3.1	Dělení antioxidantů	13
2.3.2	Přírodní látky s antioxidačními účinky	13
2.3.2.1	Vitamin A – retinol.....	14
2.3.2.2	Vitamin C – kyselina askorbová.....	15
2.3.2.3	Vitamin E – tokoferol	16
2.3.2.4	Flavonoidy	17
2.3.2.5	Karotenoidy	18
2.3.2.6	Fenolické látky	19
2.3.3	Syntetické látky s antioxidačními účinky.....	19
2.4	Mechanismus působení antioxidantů.....	21
2.4.1	Přeměny antioxidantů při inhibičním procesu	21
2.4.2	Synergie antioxidantů.....	21
2.5	Stanovení celkové antioxidační aktivity potravin	22
2.5.1	Metody založené na eliminaci radikálů.....	22
2.5.1.1	Metoda TEAC (metoda používající ABTS)	22
2.5.1.2	Metoda používající DPPH	23
2.5.2	Elektronová paramagnetická rezonance	24
2.5.2.1	Princip EPR	24

2.5.2.2	Charakteristiky spinových systémů – g-faktor	26
2.5.2.3	Hyperjemné štěpení EPR spekter	26
2.5.2.4	Spinové lapače	27
2.5.2.5	Spinové značky	27
2.5.2.6	Použití EPR.....	27
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	28
3.1	Seznam použitých přístrojů a chemikálií.....	28
3.1.1	Přístroje	28
3.1.2	Chemikálie	28
3.1.2.1	Standardní chemikálie	28
3.1.2.2	Ostatní chemikálie	28
3.1.3	Pracovní pomůcky.....	28
3.1.4	Příprava roztoků	28
3.2	Vzorky – rostlinný materiál.....	29
3.2.1	Příprava vzorků	29
3.3	Pracovní postupy při provádění jednotlivých metod.....	30
3.3.1	Metoda TEAC (metoda používající ABTS).....	30
3.3.1.1	Stanovení kinetiky reakce.....	30
3.3.1.2	Stanovení kalibrační křivky.....	30
3.3.2	Metoda DPPH	30
3.3.2.1	Stanovení kinetiky reakce.....	30
3.3.2.2	Stanovení kalibrační křivky.....	31
3.3.3	Měření vzorků červených a bílých angreštů a červených a bílých rybízů metodami ABTS a DPPH.....	31
3.3.4	Vyhodnocení celkové antioxidační aktivity červených a bílých angreštů a červených a bílých rybízů metodami ABTS a DPPH	31
3.3.5	EPR experimenty.....	31
3.3.5.1	Charakterizace použitých reakčních systémů.....	31
3.3.5.2	Podmínky EPR měření	32
3.3.5.3	Zpracování naměřených údajů.....	32

3.4	Statistické hodnocení	33
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	36
4.1	Metody ABTS a DPPH.....	36
4.1.1	Kinetika reakcí	36
4.1.2	Kalibrační křivky.....	37
4.1.3	Celková antioxidační aktivita červených a bílých angreštů naměřená metodami ABTS a DPPH.....	39
4.1.4	Celková antioxidační aktivita červených a bílých rybízů naměřená metodami ABTS a DPPH.....	40
4.1.5	Porovnání celkové antioxidační aktivity červených a bílých angreštů a červených a bílých rybízů	42
4.2	EPR měření.....	43
4.2.1	Stanovení celkové antioxidační aktivity černých rybízů.....	43
4.2.1.1	Reakční systém ABTS a $TEAC_{ABTS}$	44
4.2.1.2	Reakční systém DPPH a $TEAC_{DPPH}$	45
5	ZÁVĚR.....	47
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	48
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	52

1 ÚVOD

Antioxidační aktivita potravin je bezprostředně spojena s ochranou biologických systémů proti škodlivému účinku reakcí zahrnujících reaktivní formy kyslíku a dusíku (ROS a RNS). Tyto radikály působí na biologicky významné sloučeniny, především lipidy, bílkoviny a nukleové kyseliny, a pozměňují tím jejich strukturu a funkci. Jejich působením může docházet ke změnám ve struktuře buněk a k poškození celých tkání a orgánů. Jednou z možností ochrany organismu proti volným radikálům je působení antioxidantů. Antioxidanty zabráňují nebo omezují oxidační destrukci těchto látek. Mnoho látek přírodního původu, které člověk přijímá v potravě, má tyto vlastnosti: zejména to jsou antioxidační vitaminy, polyfenolické látky, karotenoidy a flavonoidy.

Významnými zdroji antioxidačních látek jsou lokální druhy drobného ovoce – červené a bílé angrešty a červené, bílé a černé rybízy. První zmínky o rybízu a angreštu na území dnešní České republiky jsou datovány do 16. století, kdy docházelo k rozšíření ze západní Evropy do dalších zemí. Obsahové látky v dužnině těchto plodů jsou velmi rozmanité. Vedle vysokého obsahu antioxidantů, především vitamínu C a různých polyfenolických látek, jsou v plodech obsaženy organické kyseliny, pektiny, třísloviny, vláknina a v neposlední řadě minerální látky.

Přírodní antioxidanty jsou přijímány většinou jako součásti složitých směsí, jejichž složky reagují s radikály odlišnými mechanismy. Z tohoto důvodu je snaha charakterizovat antioxidační aktivitu vzorku jako celek. Byl zaveden pojem celková antioxidační aktivita (TAA), pomocí kterého je možné porovnávat antioxidační účinky různých směsí měřených různými metodami.

Ochranné účinky antioxidantů upoutávají stále větší pozornost, čímž se zvyšuje požadavek na jednoduché a spolehlivé metody pro stanovení antioxidační aktivity potravin. Celkovou antioxidační aktivitu lze stanovit jak metodami chemickými, tak fyzikálními. Tato práce se zaměřuje na chemické metody, které jsou založeny na reakci antioxidantů se syntetickými radikály (ABTS a DPPH).

Tato práce navazuje na bakalářskou práci, která byla zaměřena na metody pro stanovení celkové antioxidační aktivity potravin. Cílem diplomové práce bylo připravit vzorky ovoce k analýze, stanovit jejich celkovou antioxidační aktivitu metodami ABTS, DPPH a elektronovou paramagnetickou rezonancí a naměřená data zpracovat.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Vybrané druhy drobného ovoce

Diplomová práce je zaměřena na stanovení celkové antioxidační aktivity drobného ovoce – konkrétně vybraných odrůd červených a bílých angreštů a červených, bílých a černých rybízů. Obsahové látky v dužině plodů jsou velmi rozmanité. Vedle minerálních prvků (draslík, fosfor, vápník, hořčík a četné stopové prvky) je třeba zdůraznit důležitost organických kyselin s bakteriostatickými účinky, pektinů, tříslovin nebo vlákniny. Rybíz a angrešt obsahuje vysoké množství antioxidantů, především vitamínu C a různých polyfenolických látek. Zahradkáři u těchto rostlin oceňují jejich rychlý nástup do plodnosti, relativní nenáročnost na podmínky prostředí, snadnou sklizeň, možnost rychlé obnovy sortimentu a také pestré spektrum využití ovoce jak pro přímý konzum, tak pro nejrůznější formy zpracování [1].

2.1.1 Angrešt (*Ribes uva-crispa* L.)

Evropské odrůdy angreštu patří v botanicko-systematickém rozdělení k rodu *Ribes* L. [2]. Pravlastí angreštu je Evropa, Amerika i Střední Asie. Rod angrešt (*Glossularia*) patří do řádu lomikámenotvaré (*Saxifragales*), čeledi srstkovité (*Grossulariaceae*). Nejdůležitější pěstované odrůdy patří k druhu angrešt obecný [3].

Jsou to nízké až středně vysoké keře, trnité, s šedohnědými větvemi a s třílaločnými až pětilaločnými nestejně vroubkovanými listy. Krátce stopkaté drobné květy jsou umístěny na plodných větvičkách jednotlivě nebo ve svazečcích po 2 až 3 květech [2]. Důležitou charakteristikou odlišnosti odrůdy je barevnost a tvar plodu. Barva angreštu bývá zelená, bělozelená, žlutozelená, žlutá, nachová až červenohnědá. Tvar bývá kulatý, oválný, vejčitý nebo hruškovitý. Všechny plody na keři nemají jednotný tvar, vždy však jeden typický převládá. Plody angreštu slouží k přímému konzumu, moštování, kompotování, či ke zpracování na džem [4].

Rozeznáváme několik odrůd angreštů, které se liší různou dobou sklizně, vzhledem plodů, nároky na stanoviště i využitím. Rané odrůdy se sklízí od poloviny do konce června, středně rané, neboli polorané se sklízí do poloviny července a pozdní odrůdy koncem července. Angrešt lze sklízet v různých stupních zralosti probírkou podle plánovaného způsobu využití [4]. Zástupci odrůd angreštů jsou např. Astrid, Britania, Citronový obří, Industrie, Invicta, Produkta, Rixanta, Rolonda, Zlatý fik, Alan, Karát, Karmen, Remarka, Pax aj. [1], [3].

Angrešty jsou nutričně bohatými potravinami. Obsahují cukry, vlákninu, bílkoviny, tuk, vitaminy C, D, E, B, karoten, niacin a minerální látky, jako jsou draslík, vápník, hořčík, železo, mangan, zinek a měď. Obsah vody v plodech je asi 90 % [4].

2.1.2 Rybíz

Rod rybíz (*Ribes* L.) patří do řádu lomikámenotvaré (*Saxifragales*), čeledi srstkovité (*Grossulariaceae*). Rozlišujeme tři hlavní skupiny rybízů: rybízy červené, černé a bílé [4]. Rybíz je rozšířený v oblasti euroasijské, severní Afriky a Severní a Jižní Americe. Jedná se o středně velké keře se střídavými, dlanitě laločnatými a složitě zubatými listy. Květenství je hroznovité, popř. jsou květy ve svazečcích. Květy jsou zelenavé, převážně drobné. Plody – bobule – obsahují semena s rosolovitým vnějším a kamenným vnitřním osemením. Jednotlivé kulturní odrůdy rybízu, které pocházejí z většího počtu botanických druhů, mají rozdílné

požadavky na podmínky pěstování. Vlastní odrůdy rybízu lze identifikovat podle charakteru růstu, letorostů, pupenů, listů, květů a plodů – podle doby dozrávání plodů (rané, polorané a pozdní) a samotné plodnosti [2], [4].

2.1.2.1 Rybíz červený (*Ribes rubrum*)

Odrůdy červeného rybízu pocházejí nejčastěji z druhů rybízu mnohokvětého (*Ribes multiflorum*), skalního (*R. petraeum*) nebo pýřitého (*R. pubescent*) [2].

Mezi odrůdy červeného rybízu patří např. Detvan, J. V. Tets, Kozolupský raný, Losan, Maraton, Rovada, Rubigo, Tatran, Vitan aj. [1], [3].

Bobule červeného rybízu obsahují velké množství kyselin, jsou zdrojem vlákniny, antokyanů, vitamínu C, vitamínů B a minerálních látek (Fe, Ca, Mg, Zn). Syrové plody mají osvěžující nakyslou chuť [4].

2.1.2.2 Rybíz bílý (*Ribes vulgare*)

Odrůdy bílého rybízu mají podobné potřeby pro pěstování jako červený rybíz, jelikož pochází z mutací a kříženců červených rybízů. Stejně jako červený rybíz pocházejí z druhů rybízu mnohokvětého (*Ribes multiflorum*), skalního (*R. petraeum*) nebo pýřitého (*R. pubescent*) [2], [4].

Nejznámějšími odrůdami bílého rybízu pěstovanými u nás jsou Blanka, Jantar, Orion, Olin, Primus a Viktoria [1], [3].

Bílý rybíz je chuťově sladší a méně šťavnatý než červený rybíz. Barva bobulí je bílá, krémová až žlutá. Některé odrůdy mají růžový nádech. Z hlediska chemického složení se podobají červenému rybízu [4].

2.1.2.3 Černý rybíz (*Ribes nigrum*)

Mezi odrůdy černého rybízu patří např. Ceres, Démon, Eva, Focus, Moravia, Tisel, Titania, Triton, Vebus aj. [1], [3].

Černý rybíz je bohatým zdrojem vitamínu C, vitamínu P, flavonoidů, pektinů a resveratrolu. Je řazen mezi rostlinné antioxidanty a léčivé rostliny [4]. Je v něm poměrně vysoký obsah organických kyselin (1–4 %), které mají bakteriostatické účinky. Černý rybíz obsahuje více minerálních látek než ostatní druhy rybízů [1].

2.2 Volné radikály

Volné radikály jsou vysoce reaktivní a nestabilní molekuly, atomy nebo ionty, které ve své valenční sféře obsahují alespoň jeden nebo více nepárových elektronů [5]. Ve snaze získat chybějící elektron se rychle vážou na jinou strukturu nebo odebírají či přidávají elektron jiné molekule. Jsou velice reaktivní, čímž je značně omezena doba jejich existence. Reagují nejen s ostatními volnými radikály, ale i s inaktivními molekulami. Těmito reakcemi vytvářejí další volný radikál a děj dále pokračuje jako řetězová reakce [6]. V molekulách vznikají volné radikály třemi způsoby: oxidací, redukcí a homolytickým štěpením kovalentní vazby. Homolytické štěpení vyžaduje velké množství energie, proto v biologických systémech radikály vznikají převážně odejmutím nebo přijetím elektronu [7]. Oxidace představuje základní proces metabolismu a celého aerobního života. Volné radikály mohou napadat nukleové kyseliny, lipidy v lipoproteinech a buněčných membránách, sacharidy i bílkoviny

včetně enzymů. Napadení radikály může vést k těžkému poškození tkání a celých orgánů [6]. Důsledkem agresivního působení na buňky způsobují volné radikály různé zdravotní problémy, včetně aterosklerózy, zánětů, srdečně-cévních chorob a některých typů rakoviny [8].

2.2.1 Reaktivní formy kyslíku a dusíku

Řada volných radikálů patří mezi reaktivní formy kyslíku a dusíku. Reaktivní formy kyslíku ROS (reactive oxygen species) jsou v těle produkovány při metabolických procesech vyžadujících kyslík – při dýchání a při určitých buněčných imunitních funkcích [9], [10]. Zahrnují jak radikálové, tak neradikálové formy. Reaktivní formy dusíku jsou označovány zkratkou RNS (reactive nitrogen species) [9].

Tabulka 1. Reaktivní formy kyslíku (ROS), reaktivní formy dusíku (RNS) a neradikálové formy [9]

Reaktivní formy kyslíku		Neradikálové formy	
Superoxid	$O_2^{\cdot-}$	Peroxid vodíku	H_2O_2
Hydroxyl	HO^{\cdot}	Singletový kyslík	1O_2
Hydroperoxyl	HOO^{\cdot}	Ozon	O_3
Lipid	L^{\cdot}	Lipid hydroperoxid	LOOH
Lipid peroxy	LOO^{\cdot}	Kyselina chlorná	HOCl
Peroxy	ROO^{\cdot}	Peroxyinitrit	$ONOO^-$
Lipid alkoxy	LO^{\cdot}	Oxid dusitý	N_2O_3
Oxid dusičitý	NO_2^{\cdot}	Kyselina dusitá	HNO_2
Oxid dusnatý	NO^{\cdot}	Nitryl chlorid	NO_2Cl
Nitrosil	NO^+	Nitroxyl	NO^-
Thiyl	RS^{\cdot}	Kyselina peroxydusitá	ONOOH
Protein	P^{\cdot}	Oxid dusný	N_2O

Hlavním producentem reaktivních metabolitů kyslíku v buňkách jsou membránově vázané enzymy, jejichž koenzymy jsou schopné redukovat kyslík pouze jediným elektronem za vzniku superoxidu $O_2^{\cdot-}$. Jedná se o koenzymy s chinoidní nebo flavinovou strukturou, hemové koenzymy nebo koenzymy s mědí v aktivním centru [11]. Dalším velice významným zdrojem ROS je respirační řetězec mitochondrií. Místo čtyřelektronové redukce kyslíku na vodu dochází pouze k jedoelektronové redukci kyslíku za vzniku superoxidu. Superoxid je enzymaticky nebo samovolně nebo převeden na peroxid vodíku. Dalším zdrojem ROS je β -oxidace mastných kyselin probíhající v peroxisomech nebo vznik superoxidu z oxykomplexu cytochromu P-450 v endoplazmatickém retikulu. Ve specializovaných buňkách jako jsou leukocyty nebo makrofágy, je superoxid produkován NADPH-oxidázou obsaženou v cytoplazmatické membráně jako součást baktericidního ochranného systému. ROS jsou v těle tvořeny i mnohými dalšími procesy [12].

Nejvýznamnějším reaktivním metabolitem kyslíku je superoxidový radikál, který však není příliš reaktivní. Tento radikál je prekurzorem a výchozí látkou pro tvorbu dalších neredukovaných reaktivních forem kyslíku (např. hydroxylového radikálu) [5].

Nejvýznamnějším reaktivní formou dusíku je oxid dusnatý. Při nízkých koncentracích reaguje velmi pomalu s většinou molekul, včetně kyslíku. Pomalá reakce je způsobena několika faktory: průběžným vychytáváním oxidu dusnatého v erytrocytech za vzniku methemoglobinu, mnohem rychlejší difuzí oxidu dusnatého do krve (proti rychlosti syntézy oxidu dusnatého), schopností oxidu dusnatého reagovat *in vivo* dostatečně rychle jen s tranzitními kovy a regulační funkcí oxidu dusnatého v nízkých koncentracích. Oxid dusnatý je za určitých okolností prudce jedovatý [5].

Na druhou stranu ale oxid dusnatý ovlivňuje regulaci krevního tlaku a krevního oběhu a je součástí systémů, které chrání organismus proti bakteriím, prvkům a nádorům. Zasahuje také do procesů nespecifické imunity [12].

2.2.2 Oxidační stres

Oxidační stres popisuje poškození rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním reaktivních forem kyslíku a reaktivních forem dusíku [11].

ROS jsou v organismu nezbytnou součástí enzymových mechanismů, účastní se uvolňování a přeměny energie potřebné pro život. Za normálních okolností v organismu neškodí – škodí pouze, vymknou-li se kontrole. Oxidační stres může být vyvolán nadměrnou produkcí RONS, nedostatečnou funkcí antioxidantního systému nebo spojením obou nedostatků [11].

2.3 Antioxidanty

Antioxidanty jsou molekuly, které mohou zabraňovat nebo omezovat oxidační destrukci látek a celých biologických systémů. Jsou přítomny v malých koncentracích ve srovnání s látkami, jež by měly chránit. [8]. Antioxidanty neboli inhibitory oxidace, mají značný význam z hlediska eliminace volných radikálů – zejména kyslíku a dusíku. Zajišťují ochranu buněk a jejich struktur proti nežádoucímu působení těchto radikálů a podílejí se na eliminaci účinků oxidačního stresu v rostlinných i živočišných buňkách [13]. Antioxidanty představují skupinu látek lišící se chemickou strukturou a rozdílnými mechanismy působení. Jedním z nejdůležitějších mechanismů působení je reakce s volnými radikály za vzniku netoxických, inaktivních produktů [14]. Antioxidanty v systému vytváří přirozený ochranný systém před mnohými změnami. Nejčastěji dochází ke změnám nenasycených mastných kyselin, některých aminokyselin (zejména emthioninu a tryptofanu), dále dochází k působení na integritu a permeabilitu membrán a k řadě strukturálních dezintegračních změn [13]. Antioxidanty chrání biologické systémy a prodlužují údržnost potravin složitým komplexem mechanismů. Projev oxidace potravin je např. žluknutí tuků [15].

Epidemiologická studia ukazují, že nezdravý životní styl je nejčastější faktor přispívající k výskytu degenerativních chorob, jako jsou kardiovaskulární choroby a rakovina. Je prokázáno, že zvýšená konzumace ovoce a zeleniny přispívá k lepšímu zdravotnímu stavu, protože ovoce a zelenina jsou zdrojem velkého množství živin. Při jejich konzumaci může docházet ke snížení LDL cholesterolu, krevního tlaku, a může dojít ke zlepšení celkového stavu antioxidantního systému. Nedostatek antioxidantů je spojován s mnoha zdravotními komplikacemi. Za ubývání antioxidantů mohou stresové situace, kouření, diety omezující celkový přísun potravin, znečištění životního prostředí atd. [16].

2.3.1 Dělení antioxidantů

Antioxidační systémy zahrnují některé enzymy (superoxiddismutáza, kataláza, aj.) i neenzymatické substráty [13]. Mezi neenzymatické substráty řadíme endogenní nízkomolekulární antioxidanty (koenzym Q, kyselinu močovou, glutathion, kyselinu lipoovou) a přírodní látky s antioxidačními účinky (vitamin C, vitamin E, vitamin A, fenolické kyseliny, karotenoidy, flavonoidy, katechiny) [8]. Mezi antioxidanty řadíme i některé biomolekuly, jako je feritin, transferin, hemopexin, haptoglobin, aj. Nezastupitelnou roli v donor-akceptorovém systému mají přechodné prvky železo a měď. Měď je součástí řady enzymů (superoxiddismutázy, cytochromoxidázy a biomolekuly ceruloplazminu), zatímco železo je vázáno na hemoglobin a uplatňuje se při transportu kyslíku a při dalších fyziologických funkcích v organismu [13].

Antioxidanty jsou rozlišovány podle různých kritérií – nejčastěji je uvedeno dělení podle původu, chemického složení, mechanismu působení nebo podle stupně ochrany v komplexním antioxidačním systému [15], [17].

Podle původu se antioxidanty dělí na přírodní (extrakty a směsi získané ze zeleniny, koření, obilovin, bylin, ovoce, olejnin), přírodně identické (kyselina askorbová, syntetické tokoferoly) a syntetické (galláty, BHT, BHA) [15].

Podle struktury se antioxidanty dělí na fenolové sloučeniny (tokoferoly, syntetické tokoferoly, galláty, fenolové antioxidanty), endioly (kyselina askorbová, kyselina erythorbová, jejich soli a deriváty) a na jiné látky (flavonoidy, kurkuminoidy, alkaloidy rostlin, amidy) [15].

Podle stupně ochrany v komplexním antioxidačním systému rozlišujeme antioxidanty na primární antioxidanty (eliminací volných iontů Cu nebo Fe různými interními chelatačními činidly nebo inhibicí enzymů, katalyzujících tvorbu ROS, zabraňují tvorbě radikálů), sekundární antioxidanty (enzymové systémy a nízkomolekulární sloučeniny vychytávají již vytvořené ROS) a terciární antioxidanty (proteolytické a lipofilní enzymy a regenerační systémy pro opravu oxidačního poškození DNA – odstraňují molekuly poškozené působením ROS) [17].

Podle ovlivnění procesu oxidace lipidů a jiných oxilabilních látek antioxidanty mohou reagovat s volnými radikály (primární antioxidanty), redukovat již vzniklé hydroperoxydy (sekundární antioxidanty), reagovat s přítomným kyslíkem nebo vázat do komplexů katalyticky působící kovy [15].

2.3.2 Přírodní látky s antioxidačními účinky

V poslední době je velká pozornost věnována látkám přírodního původu, které se do lidského organismu dostávají jako složky potravy. Některé potraviny rostlinného původu jsou důležitým zdrojem antioxidantů [8]. K přírodním látkám s antioxidačními účinky patří antioxidační vitaminy A, C a E. Stále větší význam je přikládán dalším přírodním látkám, zejména polyfenolickým sloučeninám a karotenoidům [18]. Zdrojem těchto látek je zelenina, ovoce, vláknina, čaje, vína a aromatické a léčivé rostliny [8].

Dávkování jednotlivých antioxidantů je individuální, proto je v případě nemoci nutná konzultace s lékařem. Preventivní dávkování je nižší než dávkování v době nemoci nebo při nesprávné stravě [19].

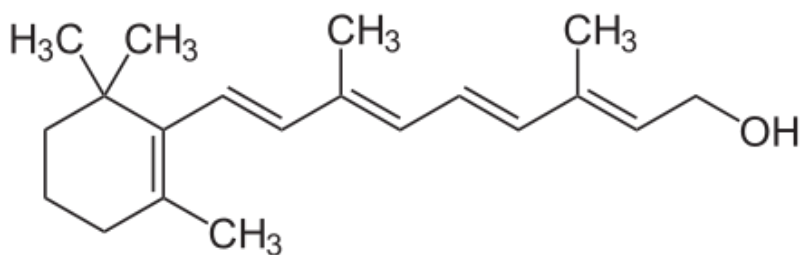
2.3.2.1 Vitamin A – retinol

Vitamin A a jeho provitaminy se řadí mezi terpenoidy, jinak nazývané isoprenoidy. Provitaminy A jsou tetraterpeny (uhlovodíky) nebo tetraterpenoidy (jejich kyslíkaté deriváty) obsahující v molekule 40 atomů uhlíku. Jejich štěpné produkty nazýváme apokarotenoidy, z nichž nejznámější biologicky aktivní apokarotenoid živočišných tkání je retinol neboli vitamin A₁ [20].

Karoteny jsou prekurzory vitaminu A a patří mezi nejdůležitější antioxidanty v naší výživě. Karoteny jsou nejširší skupinou přírodních barviv. Nejznámějším prekurzorem vitaminu A je β-karoten. Vitamin A má však mnoho možných prekurzorů, např. α-karoten, γ-karoten aj. V literatuře bývá zmiňováno asi 30 až 50 karotenů, které mají účinnost vitaminu A, avšak celkem jich existuje více než 400 [18]. Vitamin A je rozpustný v tucích a je skladován v játrech, proto je nutné syrové karoteny vždy konzumovat společně s tuky [19].

Provitaminy A jsou součástí kontrolních mechanismů likvidujících volné radikály, ale výrazně vyšší antioxidační aktivit mají některé jiné karotenoidy bez vitaminové účinnosti [20].

Provitaminy A (xanthofyly nebo karoteny) se vyskytují nejen v potravinách rostlinného původu, ale také v mnoha mikroorganismech a vyšších houbách [20].



Obrázek 1. Vitamin A – retinol [21]

2.3.2.2 Vitamin C – kyselina askorbová

Vitamin C zaujímá během posledních let klíčovou roli při prevenci a léčbě velkého množství nejrůznějších onemocnění. Jeho účinky významně posilují fungování našeho imunitního systému. Pro organismus člověka je naprosto nepostradatelný – v těle se účastní více než tři set tělesných funkcí [18]. Vitamin C má čtyři možné stereoisomery, pouze kyselina L-askorbová ale vykazuje příslušnou aktivitu. Názvem vitamin C je označována nejen kyselina L-askorbová, ale také celý reversibilní redoxní systém, který zahrnuje produkt jednoelektronové oxidace L-askorbylradikál a produkt dvouelektronové oxidace L-dehydroaskorbovou kyselinu [20].

V potravinách rostlinného původu (stejně jako v plasmě a tkáních živočichů) je 90–95 % vitamínu přítomno ve formě askorbové kyseliny a zbytek je tvořen dehydroaskorbovou kyselinou. Nejbohatším zdrojem vitamínu C je čerstvé ovoce a čerstvá zelenina, ale zpravidla konzumace ovoce a zeleniny nepokryje potřebné množství vitamínu pro člověka, neboť ovoce konzumujeme pouze příležitostně (sezónnost ovoce) a v malém množství. Proto pro člověka mají mnohem větší význam plodiny s průměrnou hladinou vitamínu C, které konzumuje po celý rok – např. zelí nebo brambory [20].

Kyselina askorbová je v rostlinách syntetizována z D-glukosy. Jako antioxidant reaguje s peroxidem, superoxidem nebo s tokoferolovým radikálem za vzniku monodehydroaskorbové kyseliny nebo dehydroaskorbové kyseliny. Redukované formy jsou recyklovány zpět na askorbát pomocí NADPH nebo glutathionu za účasti příslušných enzymů [22].

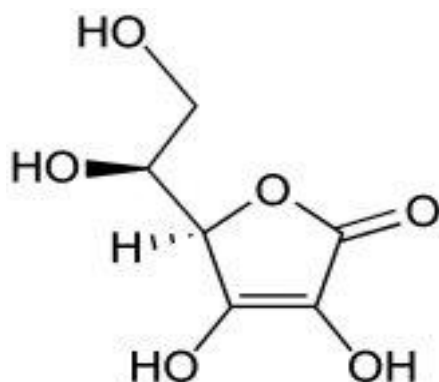
Kyselina askorbová se pro své vlastnosti využívá jako potravinářské aditivum. Dále se používá askorbát sodný (ve vodě rozpustná sůl askorbové kyseliny) a 6-palmitoyl-L-askorbová kyselina (lipofilní sloučenina) [20].

Kyselina askorbová je jedním z nejúčinnějších antioxidantů působících proti velkému množství oxidačních látek a volných radikálů [18]. Velice důležité jsou reakce s oxidovanými formami vitamínu E a aktivními formami kyslíku, které zabezpečují ochranu vitamínu E a lipidů membrán před oxidací. Reakce askorbové kyseliny s peroxylovým radikálem mastné kyseliny (R-O-O) nebo s alkoxylovým radikálem (RO) je uvedena v rovnicích 1–3 (R-O-OH je hydroperoxid mastné kyseliny) [20].



Vzniklý askorbylradikál už není schopen vyvolat další řetězovou reakci a disproportionuje na askorbovou a dehydroaskorbovou kyselinu [20].

Vitamin C je inhibitor tvorby nitrosaminů a má ochrannou funkci pro labilní formy listové kyseliny. Působí jako modulátor mutageneze a karcinogeneze [20].



Obrázek 2. Vitamin C – kyselina askorbová [23]

2.3.2.3 Vitamin E – tokoferol

Vitamin E, zvláště α -tokoferol, je nejdůležitější antioxidant rozpustný v tucích využívaný eukaryotickými buňkami. Je považován za nejvýznamnější antioxidant, který spolu s β -karotenem a koenzymy Q chrání integritu a strukturu biomembrán – buněčné (cytoplasmatické) membrány a membrán vnitrobuněčných organel (buněčné jádro, endoplasmatické retikulum, mitochondrie, lysozomy) [20]. Dále je vitamin E využíván při rozbíjení řetězových reakcí volných radikálů v lipidech a lipoproteinech, pomáhá chránit LDL před oxidací (je transportován asociovaný s lipidovou fází lipoproteinových částic LDL), minimalizuje opotřebování nervových tkání a zabraňuje většímu hromadění krevních destiček, tvoření krevních sraženin, křečových žil a mozkovým a srdečním mrtvicím [18], [19]. Vitamin E je jedním z faktorů zpomalujících proces stárnutí organismu a nachází uplatnění v prevenci kardiovaskulárních chorob a vzniku rakoviny [20].

Aktivitu vitaminu E vykazuje osm strukturně příbuzných derivátů chroman-6-olu. Strukturním základem všech těchto derivátů jsou tokol a tokotrienol, které dále obsahují chromanový cyklus s hydrofobním nasyceným nebo nenasyceným isoprenoidním postranním řetězcem o 16 atomech uhlíku [20].

Za nejúčinnější antioxidant (*in vivo*) je považován α -tokoferol. Antioxidační aktivita přítomných tokoferolů a tokotrienolů v potravinářských lipidech závisí na řadě faktorů, jako je složení nenasycených mastných kyselin. Při určitých podmínkách skladování jsou např. tokoferoly účinnějšími antioxidanty v živočišných tucích (olejová kyselina je hlavní mastnou kyselinou) než v rostlinných olejích (linolová kyselina je hlavní mastnou kyselinou) [20].

Mechanismus protiradikálového účinku vitaminu E je podobný účinku ostatních lipofilních antioxidantů (např. fenolových sloučenin). Reaguje s volnými radikály včetně ROS; jedna molekula tokoferolu může reagovat celkem se dvěma hydroperoxylovými radikály. Autooxidace lipidů je inhibována reakcí s hydroperoxylovými radikály lipidů za vzniku hydroperoxidů a radikálů tokoferolů. Dochází k přerušení řetězové reakce v propagační fázi (rovnice 4) [20].

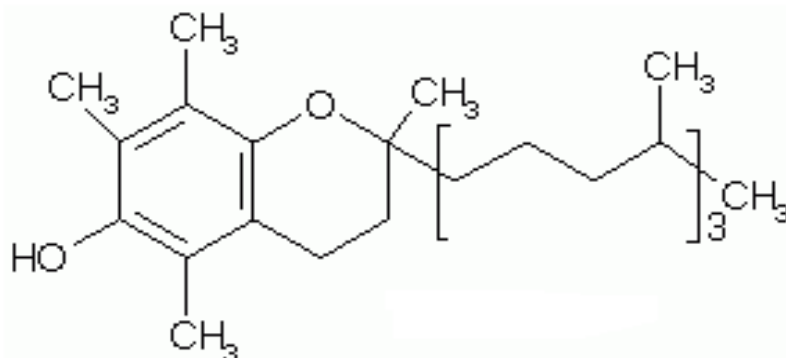


R-O-O• je hydroperoxylový radikál lipidu nebo mastné kyseliny, T-OH je tokoferol, T-O• je radikál tokoferolu a R-O-OH je hydroperoxid. Radikál tokoferolu není dostatečně reaktivní, a proto nemůže štěpit další molekulu lipidu. Ve fázi terminace se nevratnou reakcí s druhým hydroperoxylovým radikálem stabilizuje radikál tokoferolu (rovnice 5) [20].



Při vyšších koncentracích tokoferolu mohou některé tokoferolové radikály reagovat vzájemně za vzniku dimeru (případně trimeru) [20].

V potravinách se vyskytuje všech osm biologicky aktivních tokoferolů a tokotrienolů, samotný tokol a tokotrienol se v přírodě nevyskytují. Vitamin E se vyskytuje především v potravinách rostlinného původu, méně už v potravinách živočišného původu. Živočišné tuky tedy obsahují mnohem méně vitamínu E než tuky rostlinné. V potravinách živočišného původu ovlivňuje složení vitamínů E hlavně složení krmiva, hlavní složkou je však vždy α -tokoferol [20]. Nejlepšími zdroji vitamínu E je olej z obilných klíčků (obsahuje 59,4 mg na 100 g), slunečnicový olej (50 mg na 100 g), olej ze slunečnicových klíčků, neloupané lněné semínko, sójový olej, ořechy, čerstvé pšeničné klíčky, vaječný žloutek, zelená listová zelenina, lískové oříšky, mandle a luštěniny [18], [19].



Obrázek 3. Vitamin E – tokoferol [24]

2.3.2.4 Flavonoidy

Flavonoidy jsou přírodní fenolické antioxidanty obsažené v lidské stravě, převážně v zelenině, ovoci, olivách, červeném víně, sojovém oleji, čaji a čokoládě [25].

Flavonoidy jsou řazeny mezi vitaminy skupiny P. Tato rostlinná barviva jsou syntetizována z fenylalaninu a představují obrovskou skupinu polyfenolických sloučenin. Základními rysy struktury polyfenolů je přítomnost jednoho nebo více hydroxylovaných benzenových jader s heterocyklickým kruhem obsahujícím ve své struktuře kyslík a další hydroxylové skupiny. Společným strukturním základem je uhlíkatý skeleton C₆-C₃-C₆. Flavonoidy vykazují dobré antioxidační účinky kvůli jejich polyfenolické povaze, struktuře a redoxních vlastnostech [25], [26]. Důležitý je pro ně počet hydroxylových skupin v molekule a jejich poloha [27].

Mezi flavonoidy patří katechiny, leukoanthokyanidiny, flavanony, flavony, flavanonoly, chalkony, dihydrochalkony, anthokyaniny a aurony [27].

Flavonoidy jsou hlavní barevnou složkou kvetoucích rostlin. V potravinách udávají danou barvu a chuť, navíc působí jako prevence proti oxidaci tuků a jako ochránce enzymů a vitaminů [25].

Flavonoly jsou nejvíce zastoupenými flavonoidy v potravinách – řadí se mezi ně quercetin, myricetin a kaempferol. Flavony se vyskytují hlavně v celeru, flavonony v citrusových plodech [25].

Anthokyany, nazývané též anthokyaniny, jsou nejrozšířenější a početně velice rozsáhlou skupinou rostlinných barviv – v přírodě jich bylo identifikováno přes 500 [28]. Jsou to barviva rozpustná ve vodě, která udávají barvu květinám a spotřebitelsky žádaným druhům ovoce a zeleniny. Vyznačují se oranžovými, červenými, fialovými a modrými odstíny [27].

Podle počtu vázaných molekul cukru se anthokyany dělí na 18 skupin, z nichž nejvýznamnější jsou monosidy s glukosou, galaktosou, arabinosou nebo rhamnosou v poloze C-3; biosidy s disacharidy (např. rutinosa, soforosa, sambubiosa, genciobiosa) vázanými v poloze C-3; triosidy s lineárními nebo rozvětvenými trisacharidy vázanými v poloze C-3; 3,5-diglykosidy s monosacharidy v poloze C-3 a C-5; 3,7-diglykosidy s monosacharidy v poloze C-3 a C-7 a 3-biosidy-5-monosidy, kde je v polohách C-3 vázán disacharid a v poloze C-5 monosacharid [27].

Anthokyany jsou v různých druzích rostlin lokalizovány v buněčných vakuolách [27]. Jedná se o poměrně nestabilní a snadno oxidovatelné látky, které jsou citlivé na mnoho faktorů, jako je pH (změna stability a barvy), teplota a UV záření [28].

2.3.2.5 Karotenoidy

Karotenoidy jsou v tučích rozpustné sloučeniny, které propůjčují barvy mnoha rostlinám a potravinám [29]. Vyskytují se ve všech fotosyntetizujících rostlinných pletivech ve formě fotochemicky aktivních složek [27]. Hromadí se jako sekundární metabolity v chromoplastech a jsou zodpovědné za červenou, oranžovou nebo žlutou barvu rostlin [30]. Přítomnost karotenoidů v zelených částech rostlin však bývá maskována chlorofylem. Dnes je známo asi 700 pigmentů karotenoidů vyskytujících se přirozeně v přírodě [27]. V rostlinách mají díky jejich struktuře potenciální antioxidační vlastnosti a také v lidském organismu jsou součástí antioxidačního obranného systému. Jejich funkcí je ochrana rostlin proti fotooxidačním procesům, vychytávání singletového kyslíku a peroxylového radikálu [31].

Většina zástupců karotenoidů se řadí mezi tetraterpeny, tedy mezi terpenoidy, které formálně obsahují osm izoprenových jednotek. Příčinou jejich barevnosti je řetězec konjugovaných dvojných vazeb, vyskytující se v několika základních strukturách, nebo kombinace těchto řetězců. Karotenoidy rozdělujeme na dvě hlavní skupiny – karoteny a xantofyly [27].

Karoteny jsou uhlovodíky, jejichž nejjednodušším prototypem je polynenasycený acyklický uhlovodík fytoen. Acyklické karoteny se v potravinářských materiálech nacházejí v malém množství a pouze jako doprovodné látky alicyklických karotenů a xanthofylů. Výjimku tvoří poměrně hojně obsažený lykopen. Alicyklické karoteny vznikají enzymově katalyzovanou cyklizací na jednom nebo na obou koncích acyklických ψ -karotenů [27]. Nejdůležitějšími zástupci karotenů přijímaných ve stravě jsou lykopen, β -karoten a lutein [31].

Xanthofyly jsou alkoholy, aldehydy, ketony, epoxidy aj., které primárně vznikají jako produkty biochemické oxidace karotenů. Jedná se o hlavní karotenoidy rostlin, strukturně jsou to kyslíkaté sloučeniny odvozené od karotenu [27]. Nejdůležitějšími xanthofyly v naší stravě jsou β -kryptoxanthin, astaxanthin a zeaxanthin [31].

Mezi potraviny bohaté na karotenoidy řadíme ovoce, mrkev, rajčata, papriky, listovou zeleninu, šafrán, rostlinné oleje, ryby, koryše a vejce [27].

2.3.2.6 Fenolické látky

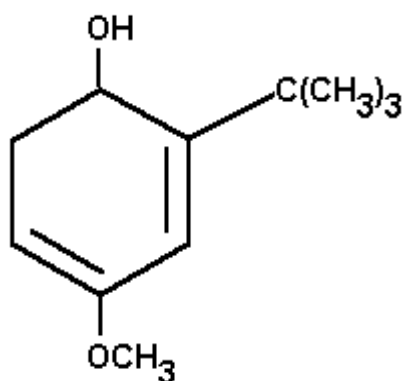
Antioxidační aktivita fenolických látek spočívá v jejich redoxních schopnostech. Hrají důležitou roli při neutralizaci a poutání volných radikálů, při rozkladu peroxidu nebo vychytávání (quenchingu) singletového a tripletového kyslíku [32]. Nacházejí se v rostlinných tkáních, kde slouží jako pigmenty nebo lákadla opylovačů. Obsahují chemický obranný mechanismus proti zranění hmyzem a infekcím způsobeným mikroorganismy [33]. Kromě výskytu v rostlinách, ovoci a obilí se hojně vyskytují v kořeni jako je šalvěj, tymián a oregano. Fenoly zpomalují oxidační degradaci lipidů, čímž zlepšují kvalitu a nutriční hodnoty potravin [32].

Fenolické látky mohou být podle stavby uhlíkového řetězce rozděleny na flavonoidy a ne flavonoidové sloučeniny. Hlavní podíl ne flavonoidových sloučenin představují skořicové kyseliny (kávová, nerulová a kumarová a kyselina), benzoové kyseliny (gallová, vanilová a syringová kyselina), stilbeny (resveratrol) [34], lignany, ligniny a tanniny [35].

2.3.3 Syntetické látky s antioxidačními účinky

Mezi syntetické antioxidanty řadíme dihydrochinolinové sloučeniny, sloučeniny fenolového typu a sloučeniny s dusíkatým heterocyklem, které jsou však pro značnou toxicitu méně používané. V ČR jsou povolené BHA, BHT, TBHQ, fumarová kyselina a galláty [36].

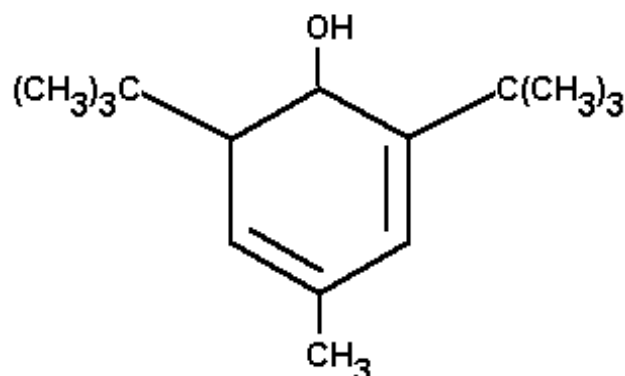
Butylhydroxyanisol (BHA) je směsí dvou isomerů, z čehož asi 90 % představuje 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisol (3-BHA) a 10 % jeho isomer 2-*tert*-butyl-4-hydroxyanisol (2-BHA). Používá se jako ochrana tuků obsahujících mastné kyseliny s kratším řetězcem, barvy a aroma silic. Vykazuje synergismus s BHT a galláty, je účinným antioxidantem i po tepelném zpracování potraviny. Většina primárních produktů, jako jsou dimery, bifenyly a jejich ethery, si zachovává antioxidační vlastnosti [27]. BHA je využíván hlavně v masné výrobě, tukovém průmyslu, pekárenství, cukrářství, ve výrobě nealkoholických nápojů, žvýkaček, cereálií aj. [37].



Obrázek 4. Syntetický antioxidant BHA [38]

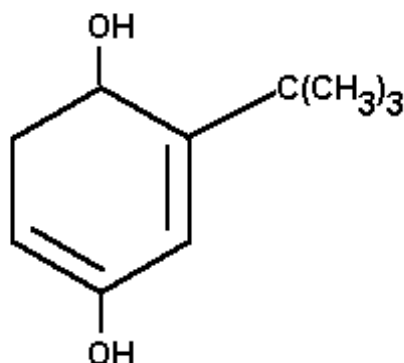
Butylhydroxytoluen (BHT) je ve srovnání s BHA účinnější jako antioxidant živočišných tuků. Významnými produkty degradace 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluenu jsou rovněž

aktivní antioxidanty [27]. Využití nachází převážně při výrobě másla, bramborových lupínek, olejů a margarínů a při zpracování mořských plodů jako ochrana přítomných lipidů [37].



Obrázek 5. Syntetický antioxidant BHT [39]

2-terc-butylhydrochinon (TBHQ) patří k nejlepším syntetickým antioxidantům tuků určeným na smažení. Všechny degradační produkty TBHQ vykazují antioxidantní aktivitu, 2,3-dihydro-2,2-dimethyl--benzofuran-5-ol vykazuje antioxidantní aktivitu dokonce vyšší. Ke zvýšení antioxidantní aktivity může dojít i v kombinaci s chelatačními činidly (např. s kyselinou citronovou) [27]. Přidává se do sušeného masa, uzenin, tuků na smažení, slouží jako ochrana margarínů, cereálií a při zpracování drůbežního masa [37].



Obrázek 6. Syntetický antioxidant TBHQ [40]

Fumarová kyselina ((E)-but-2-enediová kyselina) s označením E297 se vyskytuje ve všech rostlinných a živočišných organismech a ve vybraných druzích hub. Průmyslové využití nachází v uzeninách, bramborových lupíncích, sušeném mléku, másle (zabraňuje žluknutí) nebo jako ochucovadlo [36].

Galláty jsou estery gallové kyseliny (E310, E311, E312), z nichž nejvýznamnější jsou propyl-gallát, oktylgallát a dodecylgallát [36]. Jsou polárnější než BHA, BHT a TBHQ a účinnější v bezvodých tucích. V emulzích, kde jsou galláty rozpustnější, jsou méně aktivní než fenolové antioxidanty BHA a BHT [27]. Propyl-gallát není pro svou menší stabilitu vhodný pro tuky určené ke smažení (kde teplota přesahuje 190 °C). Využívá se v kombinaci s chelatačními činidly. Synergismus vykazují s BHA a BHT, kombinace s TBHQ není

povolená [27]. V omezeném množství se používají do vepřového a drůbežního sádla, loje, rybího tuku. Přidávají se do směsí pro přípravu moučníků, přípravků pro polévky a vývary, studených omáček, majonéz, kořenících přípravků, cereálií, žvýkaček aj. [36].

2.4 Mechanismus působení antioxidantů

Přidáním antioxidantu do reakční směsi dochází k inhibici řetězové reakce tím, že interferuje s nahromaděnými přechodnými radikály. V případě, že je antioxidant přidán do reakční směsi až ve fázi, kdy se vytvořila vysoká koncentrace radikálů, nemusí dojít k zastavení reakce. Obecně platí, že spotřeba antioxidantů je přímo úměrná rychlosti a množství vznikajících volných radikálů. Jejich účinnost je vyšší, přidáme-li je do chráněného substrátu před rozvinutím vlastní oxidační reakce. Po začátku oxidační reakce jsou schopny substrát chránit pouze vysoce účinné antioxidanty rozkládající hydroperoxy na neaktivní látky. Méně účinné antioxidanty nereagují s hydroperoxy a jsou účinné pouze při přidání před začátkem reakce. Mechanismus a účinnost působení antioxidantů jsou přímo ovlivněny výskytem reaktivních produktů autooxidace lipidů [41].

2.4.1 Přeměny antioxidantů při inhibičním procesu

Pro posouzení účinnosti antioxidantů je důležitá nejen znalost způsobu, jakým probíhá reakce mezi peroxidickými látkami a antioxidantem, ale i znalost charakteru látek vznikajících z antioxidantů v průběhu inhibičního procesu. Na celém procesu se významně podílejí produkty přeměny a reaktivní přechodné produkty. Mechanismus přeměn může být odlišný v různých fázích oxidace v závislosti na obsahu hydroperoxydů [41].

V průběhu inhibiční reakce za účasti antioxidantů může docházet k několika odlišným procesům. Převážně v primárních fázích reakce dochází k rychlé přeměně inhibitorů na aktivní látku, ke zvýšení antioxidační aktivity produktu ve srovnání s původní sloučeninou, k zachování antioxidační účinnosti primárního produktu, kterou však tento produkt po dalších reakcích ztrácí, nebo k cyklické regeneraci produktů v synergickém systému [41].

2.4.2 Synergie antioxidantů

Synergie antioxidantů představuje zesílení účinnosti inhibičních systémů. Mechanismus je určen podle povahy jednotlivých složek obranného systému. Synergická směs bývá tvořena antioxidanty a dalšími pomocnými látkami, které kladně ovlivňují působení primárních antioxidantů, přičemž jejich vlastní inhibiční činnost je často zcela zanedbatelná. Rozeznáváme homosynergismus (–směs antioxidantů reaguje stejným mechanismem) a heterosynergismus (–směs antioxidantů reaguje různými mechanismy). Aktivita synergických systémů je ovlivněna složením substrátu, kdy např. voda přítomná v tucích má spíše negativní vliv na působení synergických směsí [41].

Základním mechanismem synergie je vznik hydroperoxidů a jejich následný rozklad na neaktivní látky pomocí druhé složky přítomné synergické směsi, čímž je první antioxidant chráněn před přímou oxidací hydroperoxidem. Dále dochází ke snížení rychlosti reakce iniciované aktivními produkty rozpadu hydroperoxidu a ke snížení spotřeby první látky. Tímto mechanismem se řídí směsi dvou antioxidantů i jejich směsi s látkami, jejichž vlastní antioxidační účinek je slabý [41].

2.5 Stanovení celkové antioxidační aktivity potravin

Pro charakterizaci souhrnné koncentrace všech látek s antioxidačními účinky ve vzorku používáme termín celková antioxidační kapacita (TAA) [11].

V literatuře je popsáno více metod, které se používají ke stanovení celkové antioxidační aktivity. Tyto metody bývají velmi rozmanité, což je dáno působením různých mechanismů nízkomolekulárních antioxidantů. Obecně mohou být postupy stanovení TAA rozděleny do dvou skupin na metody hodnotící schopnost eliminovat radikály a metody posuzující redoxní vlastnosti látek [8]. V této práci bylo využito metod založených na eliminaci radikálů (ABTS a DPPH). Přehled ostatních metod je popsán v předchozí (bakalářské) práci. V případě analýzy černých rybízů bylo využito metody EPR ve spojení s metodami ABTS a DPPH.

2.5.1 Metody založené na eliminaci radikálů

Tyto metody využívají schopnosti vzorku zastavit nebo alespoň zpomalit tvorbu volných radikálů [11]. Z chemického hlediska se jedná o kyslíkové radikály (hydroxyl, peroxy, superoxidový anion-radikál) nebo syntetické stabilní radikály (DPPH, ABTS^{•+}, galvinoxyl), které jsou generovány přímo v reakční směsi nebo jsou do reakční směsi přidávány [8].

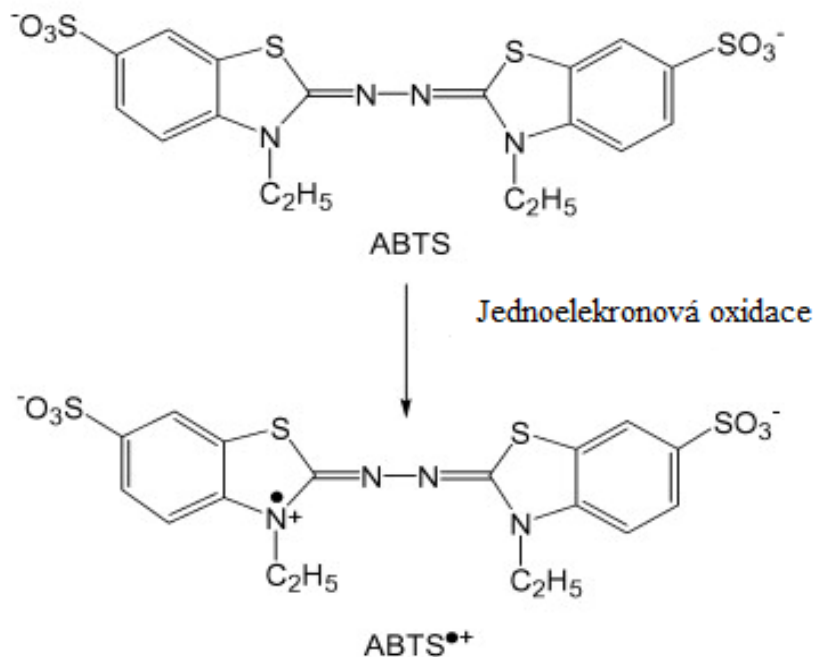
2.5.1.1 Metoda TEAC (metoda používající ABTS)

Metoda využívající ABTS je jednou z nejpoužívanějších metod pro stanovení celkové antioxidační kapacity [8]. ABTS (2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)) je peroxidázový substrát, který reakcí s peroxylovými radikály nebo jinými oxidanty vytváří v přítomnosti H₂O₂ metastabilní radikál kation ABTS^{•+}, který je intenzivně zeleno-modře zbarven a může být sledován spektrofotometricky v rozmezí 600–750 nm [42], nejčastěji při 734 nm [8]. Antioxidační aktivita látky, která se chová jako donor vodíků, je měřena jako schopnost snížit intenzitu zabarvení přímou reakcí s ABTS^{•+} [42], [43].

Pro stanovení celkové antioxidační aktivity s využitím ABTS se využívá systém ABTS/H₂O₂/peroxidasa, ABTS/methmyoglobin/H₂O₂, popř. se využívá chemické oxidace ABTS pomocí peroxodisíranu draselného nebo oxidu manganičitého. Při vlastním měření se antioxidant přidává do reakční směsi, ve které již byl vytvořen radikál-kation ABTS^{•+}, nebo je v reakční směsi obsažen při generování radikál-kationu ABTS^{•+} [8].

K hodnocení celkové antioxidační aktivity vzorků se využívá parametr TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). TEAC označuje antioxidační aktivitu vzorku ekvivalentní definovanému množství syntetického derivátu Troloxu [8]. Trolox je analog vitamínu E rozpustný ve vodě [44].

ABTS^{•+} v roztoku není ovlivňován iontovými silami a může být rozpuštěn jak ve vodě, tak v organickém rozpouštědle, můžeme tedy změřit hydrofilní i lipofilní antioxidanty [42]. Metoda stanovení pomocí ABTS je rychlá, jednoduchá a má široké uplatnění – od hodnocení antioxidační aktivity látek různého původu až po analýzu směsných vzorků [8].



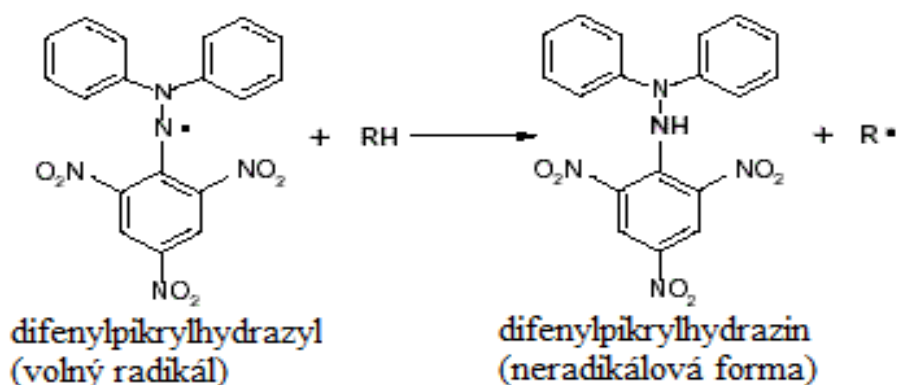
Obrázek 7. Jednoelektronová oxidace ABTS [45]

2.5.1.2 Metoda používající DPPH

DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl) je stabilní organický dusíkatý radikál tmavě fialové barvy, který nemusí být před měřením generován. Je komerčně dostupný [42]. Metoda spočívá v reakci vzorku testované látky se stabilním radikálem DPPH za vzniku redukováného radikálu DPPH-H (difenylpikrylhydrazinu) [8]. Při reakci dochází ke změně fialového zbarvení na světle žluté, z důvodu přítomnosti pikrylové skupiny [42]. Reakce se nejčastěji sleduje spektrofotometricky, kdy se měří pokles absorbance při 517 nm po uplynutí určitého konstantního času, nebo se pracuje v kinetickém režimu [8]. Redukční schopnost antioxidantů vůči DPPH v organickém rozpouštědle lze měřit i elektronovou paramagnetickou rezonancí nebo sledováním poklesu absorbance při 515–528 nm, dokud se absorbance neustálí na konstantní hodnotě [12]. Detekci ubývajícího radikálu je možno provádět pomocí HPLC, což je vhodné převážně při měření barevných roztoků, které by mohly při spektrofotometrickém stanovení interferovat [8].

U směsných vzorků se radikálová aktivita vyjadřuje v ekvivalentech askorbové kyseliny nebo v jednotkách standardu Troloxu [8]. Na základě hodnoty T_{EC50} je klasifikováno kinetické chování následovně: <5 min (rychlé), 5–30 min (střední) a >30 min (pomalé). Hodnota EC_{50} (efficient concentration value) udává koncentraci substrátu, který zapříčiní 50% pokles aktivity nebo barvy radikálu DPPH [42].

Tato metoda je po technické stránce jednoduchá, je zapotřebí pouze UV-VIS spektrofotometru. Analýza většího množství vzorků může být provedena na mikrotitračních destičkách. Nevýhodou je, že radikál DPPH může být rozpuštěn pouze v organických rozpouštědlech (přednostně v alkoholech) a ne ve vodě [42].



Obrázek 8. Redukce radikálu DPPH na DPPH-H [46]

2.5.2 Elektronová paramagnetická rezonance

Elektronovou paramagnetickou rezonanci (EPR) řadíme do skupiny magnetických rezonančních metod, jejíž využití je omezené na systémy s paramagnetickou povahou. Metoda poskytuje cenné informace o struktuře a vlastnosti látek obsahujících nepárový elektron. Mezi tyto látky patří např. volné radikály a široká řada koordinačních molekul obsahujících přechodové prvky s neúplně obsazenými d-orbitaly [47], [48].

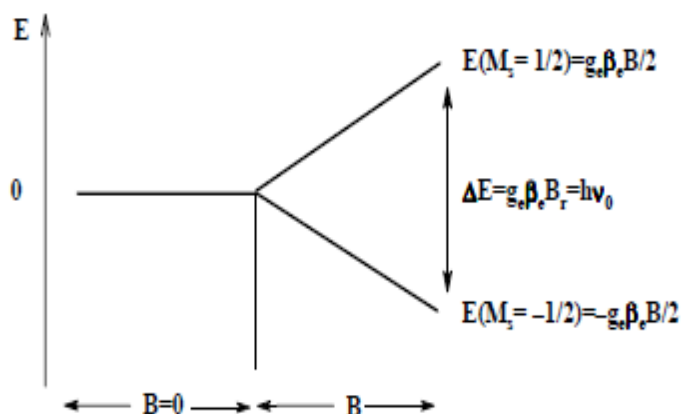
2.5.2.1 Princip EPR

Metoda je založena na interakci elektromagnetického vlnění v oblasti mikrovln (10^{10} Hz) nebo krátkých radiových vln (10^8 Hz) s elektrony měřené látky. Měřená látka je přitom umístěna v silném magnetickém poli. Při interakci s látkou způsobí absorbovaná energie přechody nenulových magnetických momentů na vyšší energetické stavy, čehož lze využít pro kvalitativní i kvantitativní popis měřené látky. Základním předpokladem je existence nenulového elektronového magnetického momentu a vystavení zkoumané látky dostatečně intenzivnímu homogennímu magnetickému poli [49]. Metodu EPR nemůžeme použít u většiny látek, protože obsahují spárované elektrony, které nemají magnetický moment. Můžeme ji však využít na zkoumání volných radikálů (např. hydroxylové, superoxidové, nitroxidové radikály), paramagnetických iontů přechodných kovů a excitovaných stavů (molekuly s vybuzeným elektronem) [50], [51].

Elektron má dva spinové kvantové stavy, a tím dvě možné orientace v magnetickém poli. Rezonance mezi těmito dvěma stavy může být indukována aplikací elektromagnetického pole o dané frekvenci [50]. Počet možných orientací spinu s v magnetickém poli můžeme všeobecně vyjádřit pomocí magnetického spinového kvantového čísla

$$M_s = 2s + 1 \quad (6)$$

Energetický stav elektronu s hodnotou $M_s = 1/2$ je označován jako stav α , hodnota $M_s = -1/2$ je označována jako stav β [47]. V magnetickém poli dochází k rozštěpení existující energetické hladiny na dvě hladiny s odlišnou energií. Energetické hladiny, které tímto štěpením vznikly, se nazývají Zeemanovy hladiny, rozštěpení původní hladiny se označuje jako Zeemanovo štěpení [48].



Obrázek 9. Schéma závislosti vzdálenosti mezi Zeemanovými hladinami od indukce magnetického pole B . S rostoucí hodnotou indukce magnetického pole se vzdálenost mezi Zeemanovými hladinami zvyšuje [47]

Pokud je magnetické pole orientováno ve směru osy z , potom složka indukce magnetického pole je

$$\mu_z = \gamma_e \cdot h \cdot M_s = -g_e \cdot \beta_e \cdot M_s \quad (7)$$

kde γ_e je gyromagnetický poměr elektronu, h je $\frac{h}{2\pi}$, $h = 6,62608 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$, M_s je magnetické spinové číslo, g_e je g -faktor volného elektronu ($g_e = 2,00231930486$), β_e je Bohrov magneton, $\beta_e = \frac{e \cdot h}{-2m_e} = 9,2740154 \cdot 10^{-24} \text{ J} \cdot \text{T}^{-1}$.

Se zohledněním předchozích úvah platí pro energii elektronu v magnetickém poli

$$E = -\mu_z B = g_e \cdot \beta_e \cdot M_s \cdot B \quad (8)$$

Dosažením přípustných hodnot pro $M_s = \pm 1/2$ je možné z rovnice (8) získat vztah popisující vzdálenost obou Zeemanových hladin

$$\Delta E = h \cdot \nu = -\mu_z B = g_e \cdot \beta_e \cdot B_r \quad (9)$$

kde B_r je indukce statického magnetického pole a ν je frekvence zdroje záření, při které se pozoruje přechod elektronu mezi energetickými hladinami. Tato rovnice je zároveň rovnicí rezonanční podmínky v EPR spektroskopii, která může být v ERP spektroskopii splněna dvěma způsoby [47], [52]. Buď se měří při konstantní frekvenci ν_r , při které se plynule mění indukce magnetického pole B až do dosažení rezonance, nebo se při konstantní hodnotě indukce magnetického pole mění frekvence. Druhého způsobu využívá pulzní EPR spektroskopie. Pro hodnoty indukce magnetického pole okolo 0,35 T je rezonanční podmínka splněna přibližně při frekvenci $\nu = 9,5 \text{ GHz}$, tedy v mikrovlnné oblasti při vlnové délce 3 cm pro X-pásmové spektrometry [48].

EPR spektroskopii dělíme na několik pásem, a to v závislosti na frekvenci, s jakou spektrometr pracuje. Pro lepší identifikaci vzorků využíváme kombinaci více pásem – dostaneme tak přesnější informace o struktuře vzorků. Přehled pásem a odpovídající frekvence jsou uvedeny v *Tabulce 2* [47].

Tabulka 2. Přehled pásem a frekvencí EPR spektrometrů

Pásmo	Frekvence [GHz]
L	1
S	3
X	9-10
K	24
Q	34
W	94

2.5.2.2 Charakteristiky spinových systémů – g-faktor

Ve vzorku může existovat kromě vnějšího magnetického pole o určité indukci i lokální magnetické pole. Lokální magnetická pole mohou být buď vlastní (nezávislá na velikosti vnějšího magnetického pole) nebo indukované vnějším magnetickým polem (jsou závislá na jeho velikosti). Celkové efektivní magnetické pole získáme vektorovým součtem těchto dvou polí

$$\vec{B}_{\text{eff}} = \vec{B}_{\text{ext}} + \vec{B}_{\text{loc}} \quad (10)$$

Pro látky, u kterých se lokální magnetické pole v látce indikuje, platí

$$\vec{B}_{\text{eff}} = B \cdot (1 - \sigma) = \left(\frac{g}{g_e} \right) \cdot B \quad (11)$$

Vztah $(1 - \sigma) = \left(\frac{g}{g_e} \right)$ je obdobou stínící konstanty, která se běžně využívá v NMR

spektroskopii. Parametr g představuje tzv. efektivní Zeemanův g -faktor. Pomocí EPR spektroskopie můžeme měřit paramagnetické látky – každá z těchto látek má vlastní hodnotu g -faktoru, která slouží k charakterizaci polohy signálu. Schopnost vnějšího pole B_{ext} indukovat ve zkoumaném vzorku (v radikálu nebo komplexu) lokální magnetické pole se projeví odchýlením g od g_e [47]. Studium g -faktoru lze získat některé informace o elektronové struktuře studovaného radikálu nebo komplexu [52]. U anizotropních systémů zvažujeme závislost hodnoty g -faktoru na orientaci látky v magnetickém poli. U systémů s izotropními vlastnostmi (roztoky s nízkou viskozitou) je hodnota g -faktoru nezávislá na orientaci vzorku v magnetickém poli a označuje se jako efektivní g -faktor. G -faktor v těchto systémech je identický se středem spektra [48].

2.5.2.3 Hyperjemné štěpení EPR spekter

Významnou vlastností EPR spektra je jejich hyperjemná struktura, která představuje rozštěpení jednotlivých rezonančních čar na složky. Zdrojem hyperjemné struktury je magnetická interakce mezi elektronem a magnetickým dipólovým momentem jader v radikálech nebo komplexech [53]. Nepárový elektron může interagovat s magnetickými dipólovými momenty ve svém okolí, a to dvěma způsoby. Buď dochází k dipól-dipólové interakci, nebo k Fermiho kontaktní interakci. Velikost a charakter dipól-dipólové interakce závisí na orientaci elektronu vzhledem k vnějšímu magnetickému poli, je pozorováno jen u radikálů, zachycených v tuhých látkách a zaniká s možností volného pohybu radikálů. Vyskytuje se u látek, jejichž elektrony se nachází v orbitalu p . Fermiho kontaktní interakce je charakteristická pro látky, jejichž elektrony se nacházejí v orbitalu s – elektronová hustota je okolo jádra rozložena sféricky. Tato interakce je magnetické povahy, její velikost nezávisí na

orientaci radikálu v magnetickém poli. Může se projevovat i u volně pohyblivých částic, ale pouze za předpokladu, že část jejich elektronové hustoty se nachází v orbitalu s [48].

Každé jádro je zdrojem magnetického pole. V závislosti na orientaci jaderného spinu se zesiluje (zvyšuje) nebo zeslabuje (snižuje) lokální magnetické pole

$$B_{\text{loc}} = B_r + \alpha \cdot m_i \quad (12)$$

kde α je konstanta hyperjemné interakce (štěpící konstanta), m_i je magnetické jaderné kvantové číslo ($I, I-1, \dots -I$) a B_r je indukce magnetického pole, při kterém je splněna rezonanční podmínka. Obecně platí, že přítomnost n chemicky ekvivalentních jader se spinem I způsobí štěpení všech čar v EPR spektru na $(2 \cdot n \cdot I + 1)$ rezonančních čar. Velikost štěpící konstanty α je závislá na rozložení elektronové hustoty v blízkosti interagujících jader. Na spolehlivé identifikaci radikálů v systému se podílí počet rezonančních čar v EPR spektru, hodnoty štěpících konstant, poloha spektra, která je charakterizovaná hodnotou indukce magnetického pole B a hodnota g -faktoru. Plocha EPR spektra určuje koncentraci, resp. množství radikálů přítomných ve vzorku. Pokud se nemění šířka spektrální čáry, je intenzita EPR signálu úměrná koncentraci radikálů v systému [47].

2.5.2.4 Spinové lapače

Spinové lapače jsou sloučeniny na bázi pyrolinoxidů nebo nitronů, které transformují reaktivní kyslíkaté a organické radikály s krátkou dobou života na déle žijící nitroxylové radikály. Z diamagnetických sloučenin se tak stávají sloučeniny paramagnetické. Charakterizaci zachyceného radikálu umožňuje analýza hodnot štěpících konstant a g -faktor [47].

2.5.2.5 Spinové značky

Spinové značky můžeme definovat jako stabilní radikály, které se záměrně přidávají do reakčního systému. Umožňují např. sledování kinetiky radikálových reakcí a určení kvalitativních i kvantitativních parametrů reakčního systému. Volba spinové značky závisí na vlastnostech reakčního systému a charakteru prostředí. Běžně se využívají deriváty kyseliny stearové, deriváty 3-karbamoyl-2,2,5,5,-tetrametylpyrolidin-N-oxyl (PROXYL) nebo deriváty spinové značky 2,2,6,6-tetramethylpiperidiny-N-oxyl (TEMPO) [47].

Stabilní volný radikál 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl (DPPH) je jedním z nejčastěji používaných dostatečně stabilních volných radikálů v EPR experimentech. Jeho roztoky jsou však značně fotosenzitivní a podléhají proton-výměnným reakcím, při kterých se z původně paramagnetické sloučeniny přeměňuje na diamagnetický pikrylhydrazin [47].

2.5.2.6 Použití EPR

EPR spektroskopie může být využita na všechny vzorky, které obsahují paramagnetický elektron. To zahrnuje celou řadu vzorků od základních organických a anorganických sloučenin až po složité biomolekuly, jako jsou např. proteiny. Spektra používáme k identifikaci molekul ve vzorcích. EPR spektroskopie je velice citlivá a specifická metoda, která se využívá např. pro zjištění, jak se substráty vážou na kofaktory obsahující kovy. Dále je využívána ke sledování volných radikálů, které vznikají při chemických, elektrochemických nebo fotochemických reakcích. EPR spektroskopie se prosazuje i při určování změn v biologických materiálech a při sledování molekul adsorbovaných na povrchu aktivních látek [49].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Seznam použitých přístrojů a chemikálií

3.1.1 Přístroje

- UV ± VIS spektrofotometr Helios γ (Unicam, UK)
- EPR spektrometr Magnettech (SRN)
- analytické váhy (Boeco, SRN)
- homogenizátor IKA T188, Ika-Werke GmbH (SRN)

3.1.2 Chemikálie

3.1.2.1 Standardní chemikálie

- Trolox 97%, ((\pm)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), $C_{14}H_{18}O_4$, Sigma-Aldrich, RUS
- ABTS 98%, (diamonná sůl 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzo-thiazolin)-6-sulfonové kyseliny) $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$, Sigma-Aldrich, CAN
- DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl), $C_{18}H_{12}N_5O_6$, Sigma Aldrich, SRN

3.1.2.2 Ostatní chemikálie

- Peroxodisíran draselný $K_2S_2O_8$, Lach-Ner, s.r.o., ČR
- Methanol CH_4O , Sigma-Aldrich, SRN

3.1.3 Pracovní pomůcky

- mikropipeta Finnpiette, Thermo labsystems (objem 0,1–1,0 ml) a příslušné špičky
- mikropipeta Finnpiette F1, Thermo scientific (objem 0,5–5,0 ml) a příslušné špičky
- filtrační aparatura s Büchnerovou nálevkou a membránovou vývěvou – filtrační papír Filtrapak No. 390
- kyveta pro EPR, Magnettech (SRN)
- stojan na zkumavky
- odměrné a běžné laboratorní sklo

3.1.4 Příprava roztoků

Všechny níže uvedené roztoky byly pro každé měření připravovány čerstvé. Příprava roztoků vycházela z výsledků publikovaných prací [54], [55]. Chemikálie Trolox, ABTS a DPPH byly mezi měřeními uskladněny v lednici.

Trolox

800 μ M roztok standardu byl připraven rozpuštěním 0,020 0 g Troloxu v methanolu a doplněním na 100,0 ml.

ABTS

7,4 mM roztok byl připraven rozpuštěním 0,038 1 g ABTS v destilované vodě a doplněním na 10,0 ml.

Peroxidisíran draselný

2,6 mM roztok byl připraven rozpuštěním 0,070 3 g $K_2S_2O_8$ v destilované vodě a doplněním na 100,0 ml.

DPPH

0,024 0 g DPPH bylo rozpuštěno v methanolu a doplněno na 100,0 ml, čímž byla získána koncentrace 6,1 μ M.

3.2 Vzorky – rostlinný materiál

Metodami ABTS a DPPH byly spektrofotometricky proměřeny vzorky červených a bílých angreštů a červených a bílých rybízů. Odrůdy černých rybízů byly proměřeny pomocí elektronové paramagnetické rezonance. U této techniky neruší zbarvení rybízů a následně jejich extraktů, jako je tomu u spektrofotometrických metod.

Zmražené vzorky byly poskytnuty výzkumným a šlechtitelským ústavem ovocnářským Holovousy, s. r. o. v rámci projektu QI111A141 – Výzkum nových technologií v pěstování angreštu a rybízu se zaměřením na kvalitu a využití plodů (Ministerstvo zemědělství ČR).

Všechny kultivary rybízů a angreštů byly pěstovány v České republice v sadech vybudovaných na podzim roku 2008 (50° 22' 29" severní šířky, 15° 34' 38" východní délky, 321 m. n. m.). V sadech se na kamenném a hlinitém podloží nachází těžká hlinitá a jílovitá půda. Průměrná roční teplota lokality je 8,14 °C. Průměrné množství ročních srážek činí v dané lokalitě 655 mm a průměrné množství srážek během vegetačního období je 379 mm. Během kultivace nebyly použity žádné pesticidy. Plody ovoce byly sklizeny v plné zralosti a před analýzou uchovávány při -18 °C.

Zkoumané odrůdy červených angreštů byly Alan, Hinnonmaki Rot, Karát, Karmen, Krasnoslawjankij, Remarka, Rolonda a Pax. Z bílých angreštů byly zkoumány odrůdy Darek, Invicta, Mucurines, Reflamba, Rixanta a Rodnik.

Z červených odrůd rybízů byly do této práce zahrnuty odrůdy Detvan, Jesan, Junnifer, Kozolupský raný, Losan, NŠLS, Rovada, Rubigo, Stansa, Tatran, J. V. Tets a Ronda; z bílých rybízů odrůdy Blanka, Jantar, Olin, Orion, Primus a Viktoria a z černých rybízů odrůdy Ceres, Lota, Ruben, Ometa, Fokus, Démon, Triton a Morávia.

3.2.1 Příprava vzorků

Metodika přípravy extraktu byla převzata z literatury a byla drobně modifikována [56], [57]. 5 g ovoce bylo 20 vteřin homogenizováno v 50 ml methanolu pomocí homogenizátoru. Vzniklá směs byla ponechána 24 hodin při laboratorní teplotě. Obsah byl přefiltrován pomocí membránové vývěvy a Büchnerovy nálevky přes filtrační papír Filtrapak No. 390. Extrakty byly na každé měření použity čerstvé, popř. byly skladovány při 4 °C [58].

3.3 Pracovní postupy při provádění jednotlivých metod

3.3.1 Metoda TEAC (metoda používající ABTS)

3.3.1.1 Stanovení kinetiky reakce

Zásobní roztok $\text{ABTS}^{\bullet+}$ byl připraven smícháním 7,4 mM roztoku $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a 2,6 mM roztoku $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ v poměru 1 : 1 (5,0 ml roztoku $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a 5,0 ml roztoku $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$). Zásobní roztok byl ponechán reagovat 12 h ve tmě při pokojové teplotě. Vlastní pracovní roztok byl získán smícháním 2,0 ml roztoku $\text{ABTS}^{\bullet+}$ s 60,0 ml methanolu [54].

Pro stanovení kinetiky reakce byl vybrán standardní roztok Troloxu o koncentraci 400 $\mu\text{mol/l}$, který byl připraven ředěním zásobního roztoku o koncentraci 800 $\mu\text{mol/l}$. 2 850 μl pracovního roztoku $\text{ABTS}^{\bullet+}$ bylo smícháno se 150 μl Troloxu. Absorbance byla měřena při 734 nm proti blanku (methanolu), a to prvních 30 minut v 10minutových intervalech a dále pak v 15minutových intervalech, celkem byla měřena 140 minut. Mezi měřeními byla zkumavka se vzorkem ponechána ve tmě při pokojové teplotě.

3.3.1.2 Stanovení kalibrační křivky

Pracovní roztok byl připraven stejně jako v případě stanovení kinetiky reakce ABTS.

Pro naměření a sestrojení kalibrační křivky byl použit základní standardní roztok Troloxu o koncentraci 800 $\mu\text{mol/l}$. Z tohoto roztoku byla připravena kalibrační řada Troloxu se vzrůstající koncentrací v jednotlivých vzorcích: 100, 200, 300, 400, 500, 600 $\mu\text{mol/l}$. V tomto rozmezí je kalibrační závislost lineární. Ke 2 850 μl pracovního roztoku $\text{ABTS}^{\bullet+}$ bylo přidáno vždy 150 μl roztoku Troloxu určité koncentrace. Takto připravené kalibrační roztoky byly promíchány a ponechány 2 h ve tmě při laboratorní teplotě. Po 2 h byla změřena absorbance při 734 nm proti blanku (methanolu) [54].

3.3.2 Metoda DPPH

3.3.2.1 Stanovení kinetiky reakce

Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním 0,024 0 g DPPH v methanolu a doplněním na 100,0 ml. Pracovní roztok byl získán smícháním 10,0 ml roztoku DPPH s 45,0 ml methanolu [54].

Pro stanovení kinetiky reakce byl vybrán standardní roztok Troloxu o koncentraci 400 $\mu\text{mol/l}$. 2 850 μl pracovního roztoku DPPH bylo smícháno se 150 μl Troloxu. Absorbance byla měřena při 515 nm proti blanku (methanolu), a to prvních 40 minut v 10minutových intervalech, dalších 80 minut v 20minutových intervalech a poté každou hodinu po dobu 5 hodin. Další měření byla provedena po 24 a po 29 hodinách od začátku měření. Celkem tedy byla kinetika reakce měřena po dobu 29 hodin. Mezi měřeními byla zkumavka se vzorkem ponechána ve tmě při pokojové teplotě.

3.3.2 Stanovení kalibrační křivky

Pracovní roztok DPPH byl připraven stejně, jako při stanovení kinetiky reakce.

Pro naměření a sestavení kalibrační křivky byl použit základní standardní roztok Troloxu o koncentraci 800 $\mu\text{mol/l}$. Z tohoto roztoku byla připravena kalibrační řada se vzrůstající koncentrací v jednotlivých vzorcích: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 $\mu\text{mol/l}$. V tomto rozmezí je kalibrační závislost lineární.

Ke 2 850 μl pracovního roztoku DPPH bylo přidáno 150 μl roztoku Troloxu určitých koncentrací. Kalibrační roztoky byly ponechány 24 h ve tmě při laboratorní teplotě. Absorbance byla změřena při 515 nm proti blanku (methanol) [54].

3.3.3 Měření vzorků červených a bílých angreštů a červených a bílých rybízů metodami ABTS a DPPH

Pracovní roztoky jednotlivých metod byly připraveny stejně jako v případě stanovení kalibrační křivky i stanovení kinetiky reakce. Ke 2 850 μl pracovního roztoku bylo přidáno 150 μl podle potřeby zředěného extraktu ovoce. Ředění bylo určeno experimentálně a v rámci skupin jednotlivých druhů ovoce bylo shodné. Vzorek byl ponechán ve tmě při laboratorní teplotě. Pro metodu ABTS byla absorbance změřena po 2 hodinách při 734 nm a pro metodu DPPH po 24 hodinách při 515 nm proti blanku.

Jako blank byla u obou metod použita směs 2 850 μl methanolu a 150 μl odpovídajícího naředěného extraktu ovoce. Z každého extraktu odrůdy ovoce byly změřeny tři paralelní vzorky.

3.3.4 Vyhodnocení celkové antioxidační aktivity červených a bílých angreštů a červených a bílých rybízů metodami ABTS a DPPH

Pomocí metod ABTS a DPPH byla proměřena celková antioxidační aktivita červených a bílých angreštů a červených a bílých rybízů. Každá odrůda těchto druhů ovoce byla proměřena třikrát. Koncentrace antioxidantů ve vzorcích byla vypočtena z průměrné hodnoty absorbance vzorku změřené na UV/VIS spektrofotometru, zředovacího faktoru a z rovnice kalibrační křivky pro danou metodu. Antioxidační aktivita byla vyjádřena jako ekvivalent Troloxu (TE).

3.3.5 EPR experimenty

3.3.5.1 Charakterizace použitých reakčních systémů

Extrakty černých rybízů byly připraveny stejně jako pro měření metodami ABTS a DPPH pomocí UV/VIS spektrofotometru. Extrakty byly pro měření pomocí elektronové paramagnetické rezonance 10 \times zředěny methanolem z důvodu odezvy systému. Z každého extraktu byly provedeny tři měření, z nichž byl vypočten průměr a vypočítány výsledné koncentrace antioxidantů ve vzorcích.

DPPH

K 500 μl 10 \times zředěného extraktu ovoce bylo přidáno 1 000 μl roztoku DPPH v methanolu o koncentraci $c_{\text{DPPH}} = 6,1 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Takto připravený reakční systém byl promíchán

dusíkem a umístěn do kyvety. V případě referenčního systému byl do reakční směsi přidán místo extraktu ovoce příslušný objem čistého methanolu.

ABTS^{•+}

Byl použit čerstvě připravený zásobní roztok ABTS^{•+} o koncentraci $c_{\text{ABTS}^{\bullet+}} = 7,4 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, který byl 10× zředěn methanolem na výslednou používanou koncentraci $c_{\text{ABTS}^{\bullet+}} = 0,74 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Zásobní roztok ABTS^{•+} byl připraven stejně jako při metodě TEAC. Ke 200 μl 10× zředěného extraktu ovoce bylo přidáno 1 000 μl roztoku ABTS^{•+} v methanolu. Takto připravený reakční systém byl promíchán dusíkem a umístěn do kyvety. V případě referenčního systému byl do reakční směsi přidán místo extraktu ovoce příslušný objem čistého methanolu.

3.3.5.2 Podmínky EPR měření

Všechna měření se uskutečnila v křemenné ploché kyvetě vhodné pro EPR měření polárních roztoků. Kyveta byla opatřena injekční stříkačkou o objemu 2 ml pro ulehčení plnění měřeným roztokem. Při měření všech vzorků byla použita stejná kyveta a vždy byla vkládána do dutiny EPR spektrometru stejným způsobem, aby byla zajištěna reprodukovatelnost měření. Nastavení a odezva spektrometru byla vždy před měřením kontrolována opakovaným měřením referenčního roztoku DPPH a ABTS^{•+}.

Kyveta byla umístěna do dutiny ERP spektrometru a po nastavení parametrů měření se přesně v čase 2 min po přidavku volného radikálu do systému sledoval časový vývoj 10 EPR spekter během 30 minut. Po dobu 30 min byla proměřena i stabilita samotných volných radikálů DPPH a ABTS^{•+}. Každé EPR spektrum představuje akumulaci (průměr) 10 individuálních scanů.

Parametry EPR spektrometru

- střed magnetického pole – central field (CF):	335,8 mT
- šířka pole – sweep width (SW):	15 mT
- modulační amplituda (Modulation Amplitude):	0,5 mT
- zesílení/citlivost (Receiver Gain):	$G = 8 \cdot 10^1$
- výkon/zeslabení mikrovlnného zdroje (MW attenuation/Attenuation):	6mW/10dB
- délka 1 scanu (Sweep time):	5,24 s
- časový rozdíl mezi spektry:	$\Delta t = 3 \text{ min}$
- čas měření jednoho spektra:	12 s
- počet snímaných spekter:	10

3.3.5.3 Zpracování naměřených údajů

Pro každý vzorek byly provedeny 3 identické experimenty pro oba zvolené experimentální systémy. Naměřená spektra byla zpracována programem KinetikD (Magnettech, Berlin). Numerická data získaná z průběhu kinetických křivek byla exportována do Excelu (Microsoft, 2007) a následně zpracována. Koncentrace antioxidantů ve vzorcích byla vyjádřena pomocí parametrů TEAC_{ABTS} a TEAC_{DPPH}. Pro výpočet byly využity relativní poklesy koncentrací volných radikálů v čase $t = 23 \text{ min}$ po přidání ABTS^{•+} do systému proti

jejich koncentraci v referenčním systému, které mají hodnotu 1. Hodnoty $TEAC_{ABTS}$ byly vypočteny podle vztahu:

$$c_{t(\text{TROLOX})} = \frac{(c_{o(\text{ABTS}^{*+})} - c_{t(\text{ABTS}^{*+})}) \cdot V_{\text{ABTS}^{*+}}}{V_{\text{vzorku}}} \cdot v \cdot Z \quad (13)$$

kde $c_{o(\text{ABTS}^{*+})}$, $c_{t(\text{ABTS}^{*+})}$ je koncentrace ABTS^{*+} v čase $t=0$, resp. ve zvoleném čase $t=23$ min, $V_{\text{ABTS}^{*+}}$ je objem ABTS^{*+} přidaného do systému, V_{vzorku} je objem vzorku přidaného do systému, v je stechiometrický koeficient reakce ABTS a Trolox (v tomto případě $v=1/2$) a Z je faktor zředění vzorku.

Hodnoty $TEAC_{DPPH}$ byly vypočteny podle vztahu:

$$c_{t(\text{TROLOX})} = \frac{(c_{o(\text{DPPH})} - c_{t(\text{DPPH})}) \cdot V_{\text{DPPH}}}{V_{\text{vzorku}}} \cdot v \cdot Z \quad (14)$$

kde $c_{o(\text{DPPH})}$, $c_{t(\text{DPPH})}$ je koncentrace DPPH v čase $t=0$, resp. ve zvoleném čase $t=23$ min, V_{DPPH} je objem DPPH přidaného do systému, V_{vzorku} je objem vzorku přidaného do systému, v je stechiometrický koeficient reakce DPPH a Trolox (v tomto případě $v=1/2$) a Z je faktor zředění vzorku.

3.4 Statistické hodnocení

Všechna stanovení vzorků byla opakována 3krát. Pro statistické hodnocení byl využit program Microsoft Excel, XLSTAT (statistický software MS Excel) a STATISTICA (StatSoft).

Výsledky opakovaných měření jsou v důsledku nahodilých chyb rozmístěny v okolí nejpravděpodobnější střední hodnoty. Odhadem střední hodnoty je aritmetický průměr \bar{x} (rovnice 15),

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (15)$$

kde n je počet analýz a x_i (pro $i=1, 2, 3 \dots n$) jsou jednotlivé naměřené hodnoty [59].

Ze získaných výsledků byly odstraněny odlehle výsledky provedením Dean-Dixonova testu (rovnice 16),

$$Q_1 = \frac{x_2 - x_1}{R} \quad (16)$$

kde vypočtenou veličinu Q_1 porovnááme s kritickou hodnotou Q_a . Pro hladinu významnosti $\alpha=0,05$ je $Q_a=0,941$. Je-li $Q_1 \geq Q_a$, výsledek je odlehlý [59].

Rozdíl hodnoty výsledku a průměrné hodnoty střední hodnoty vyjadřuje směrodatná odchylka s , která vrací míru rozptýlenosti od měřítka původních dat (rovnice 17),

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (17)$$

kde n je počet analýz, x_i (pro $i=1, 2, 3 \dots n$) jsou jednotlivé naměřené hodnoty a \bar{x} je aritmetický průměr [59].

Interval spolehlivosti (a, b) je odhadem parametru θ rozdělení náhodné veličiny X takovým, že platí vztah

$$P(a < \theta < b) = 1 - \alpha, \quad (18)$$

kde $\alpha \in (0, 1)$, přičemž nabývá hodnot 0,01; 0,05 nebo 0,10; a je dolní mez spolehlivosti a b je horní mez spolehlivosti. Interval (a, b) se nazývá $100 \cdot (1 - \alpha)\%$ oboustranný interval spolehlivosti [59].

Pro určení, jestli jednotlivé odrůdy daného ovoce vykazují význačně jinou aktivitu, byl použit Tukeyho test. Tukeyho metoda mnohonásobného porovnávání se používá v případě vyváženého třídění, tedy pokud $n_1 = \dots = n_k = n$, kde n je počet pozorování. Z hlediska síly testu a případné robustnosti k porušení předpokladů analýzy rozptylu je u tohoto testu doporučen stejný počet pozorování. Testujeme nulovou hypotézu $H_0 : \mu_i = \mu_j$, oproti alternativní hypotéze $H_1 : \mu_i \neq \mu_j$, tj. nulová hypotéza tvrdí, že střední hodnoty porovnávaných skupin i a j se neliší. Testové kritérium má tvar

$$Q = \frac{|\hat{\mu}_i - \hat{\mu}_j|}{S_*}, \quad (19)$$

kde směrodatná odchylka S_* je pro shodné počty pozorování n ve skupinách i a j tvaru

$$S_* = \sqrt{\frac{S_E}{n(N-1)}} \quad (20)$$

a testové kritérium Q se porovná s tabelovanou kritickou hodnotou $q_{1-\alpha}(I, N-1)$, která se nazývá *studentizované rozpětí*. *Studentizované rozpětí* je náhodná veličina $Q = \frac{R}{s}$, kde $R = \max X_i - \min X_i$ je rozpětí náhodného výběru z rozdělení $N(\mu, \sigma^2)$ a s^2 je odhad rozptylu σ^2 . Pak $P\{Q \geq q(I, N-1)\} = \alpha$ [60].

V rámci srovnávání jednotlivých skupin ovoce byly provedeny dvě analýzy – Brown-Forsytheův test shody rozptylů a t-test pro nezávislé proměnné. V případě, že máme k náhodných výběrů $X_{i1}, X_{i2}, \dots, X_{in}, i = 1, 2, \dots, k$, řídicích se normálními rozloženými $N(\mu_i, \sigma_i^2), n_i \geq 2, i = 1, 2, \dots, k$, na porovnání jejich rozptylů použijeme Brown-Forsytheův test. Testujeme nulovou hypotézu $H_0 : \sigma_1 = \sigma_2 = \dots = \sigma_k$.

Zavedme:

$$Z_{ij} = |X_{ij} - \tilde{X}_i|, \quad (21)$$

$$n = \sum_{i=1}^k n_i, \quad (22)$$

$$\tilde{X}_{Zi} = \frac{1}{n_i} \sum_{j=1}^{n_i} Z_{ij}, \quad (23)$$

$$\tilde{X}_Z = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} Z_{ij}, \quad (24)$$

$$S_{ZE} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (Z_{ij} - \tilde{X}_{Zi})^2, \quad (25)$$

$$S_{ZA} = \sum_{i=1}^k n_i (\tilde{X}_{Zi} - \tilde{X}_Z)^2, \quad (26)$$

kde \tilde{X}_i je medián i -té skupiny. Testová statistika Brown-Forsytheova testu má tvar:

$$F_Z = \frac{\frac{S_{ZA}}{k-1}}{\frac{S_{ZE}}{n-k}}. \quad (27)$$

Hypotézu o shodě rozptylů zamítáme na hladině statistické významnosti α , pokud $F_Z^* \geq F_{1-\alpha}(k-1, n-k)$ [59].

Dvouvýběrový nepárový t-test je test významnosti rozdílu dvou průměrů nezávislých vzorků. Používá se pro ověření hypotézy, jestli zjištěný rozdíl průměrů vzorku je nebo není na hladině významnosti statisticky významný. Testuje nulovou hypotézu $H_0 : \mu_1 - \mu_2 = d_0$. Pomocí Brown-Forsytheova testu byla prokázána shodnost rozptylů a tedy využití následující testové statistiky:

$$T = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2) - d_0}{\sqrt{(n-1) \cdot S_1^2 + (m-1) \cdot S_2^2}} \cdot \sqrt{\frac{m \cdot n \cdot (m+n-2)}{m+n}}, \quad (28)$$

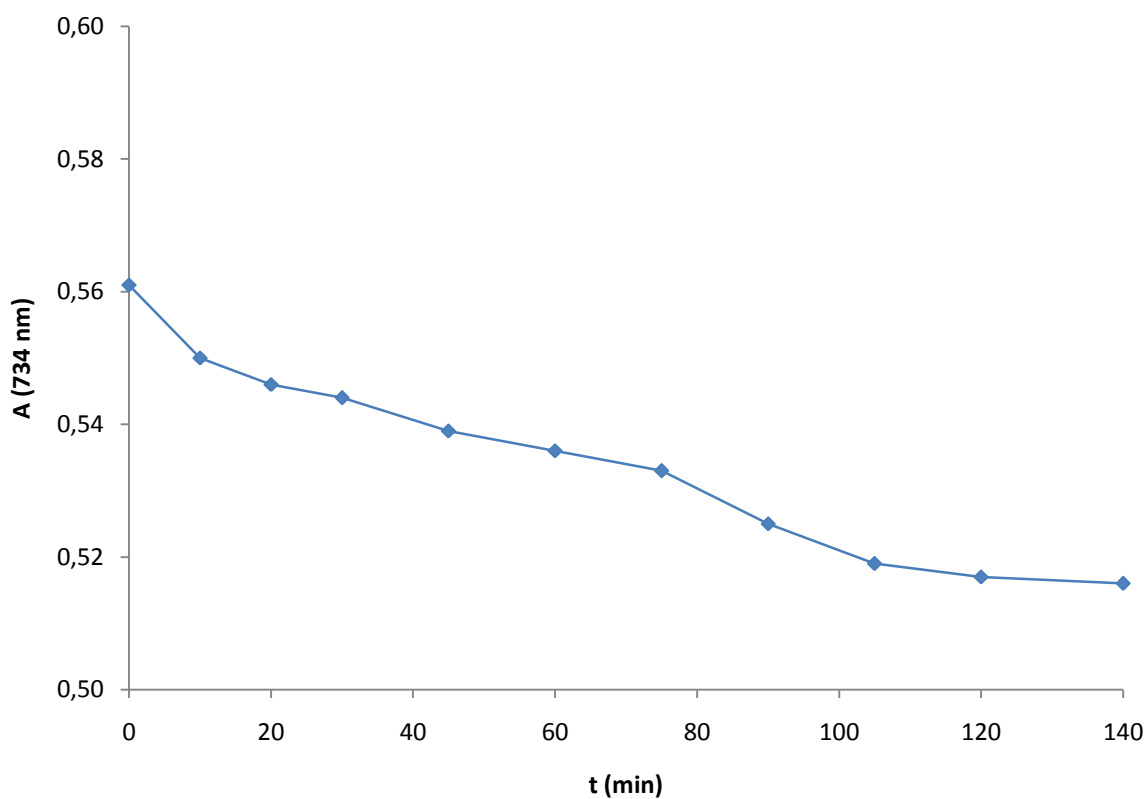
kde \bar{X} jsou výběrové průměry, S^2 výběrové rozptyly, d_0 testovaný rozdíl středních hodnot a m, n rozsahy souborů. Existuje několik možností – alternativní hypotéza $H_1 : \mu_1 - \mu_2 \neq d_0$: pokud je vypočtená hodnota $|T|$ vyšší než $t_p(n+m-2)$, pak nulovou hypotézu zamítáme a tvrdíme, že rozdíl je statisticky významný. Alternativní hypotéza $H_1 : \mu_1 - \mu_2 < d_0$: pokud je vypočtená hodnota T nižší než $-t_{2p}(n+m-2)$, pak nulovou hypotézu zamítáme. Alternativní hypotéza $H_1 : \mu_1 - \mu_2 > d_0$: pokud je vypočtená hodnota T vyšší než $t_{2p}(n+m-2)$, pak nulovou hypotézu zamítáme. Pokud je hodnota p nižší než zvolená hladina významnosti, pak nulovou hypotézu zamítáme a přijímáme alternativní hypotézu [61].

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

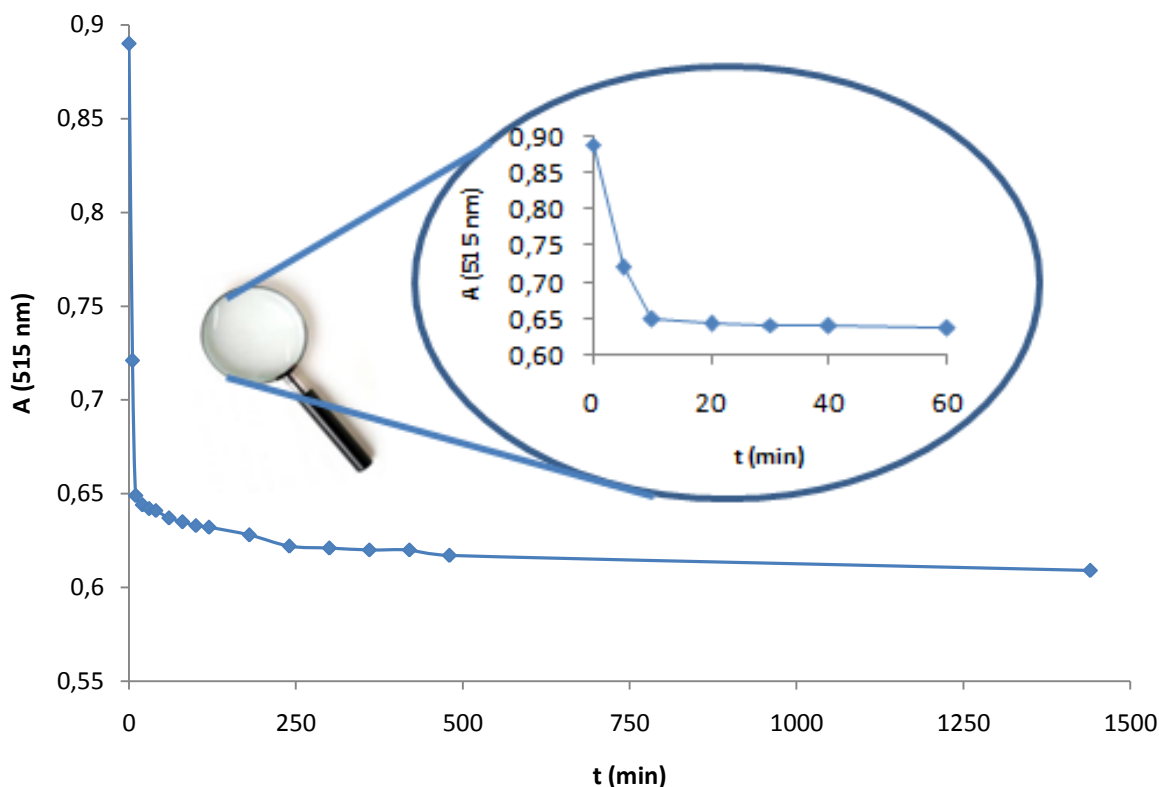
4.1 Metody ABTS a DPPH

4.1.1 Kinetika reakcí

Převzatý postup z publikované literatury [54] uvádí pro každou metodu určité časy, po jejichž uplynutí se měří absorbance vzorku (popř. standardu Troloxu). Účelem měření kinetiky reakce bylo ověření, jestli se v daném experimentu nadále mění absorbance i po uplynutí uvedeného času, nebo jestli absorbance zůstává konstantní. Výsledné změny absorbancí jsou zobrazeny pro metodu ABTS (*graf 1*) a DPPH (*graf 2*). U obou metod můžeme pozorovat pokles absorbance, který se ustálil na konstantní hodnotě, z čehož předpokládáme ustálení vlastní radikálové reakce.



Graf 1. Stanovení kinetiky reakce ABTS

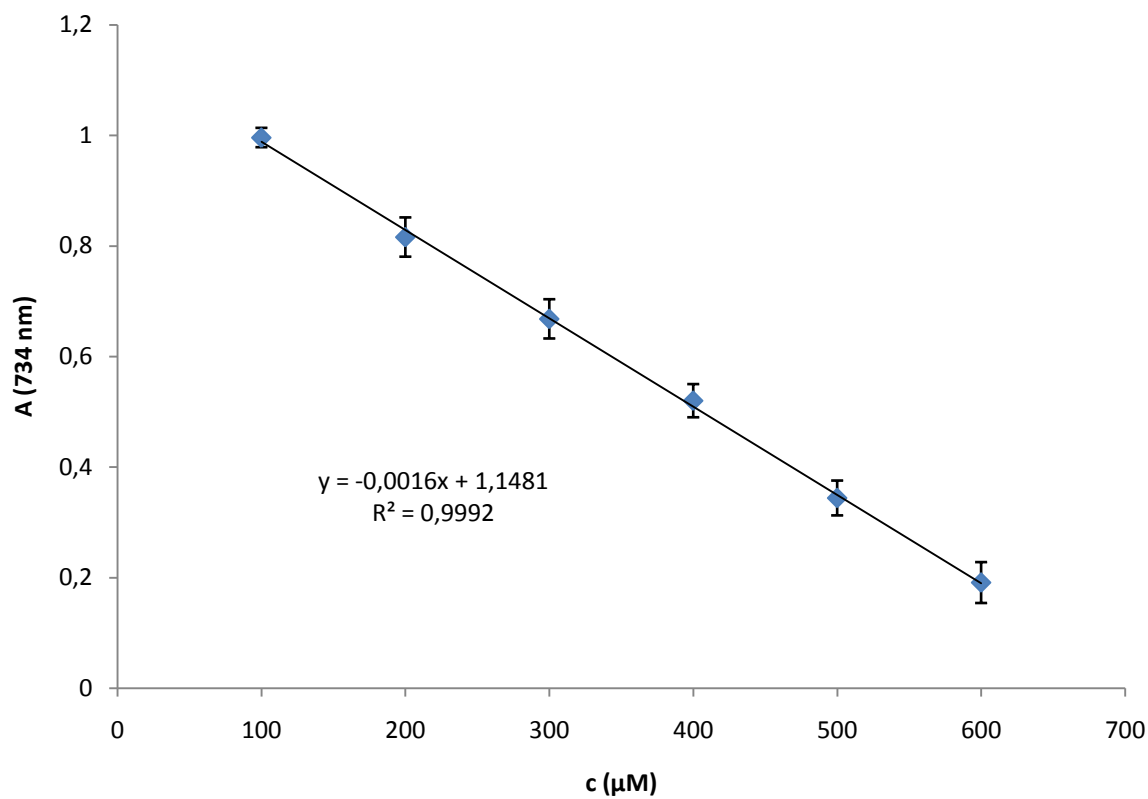


Graf 2. Stanovení kinetiky reakce DPPH

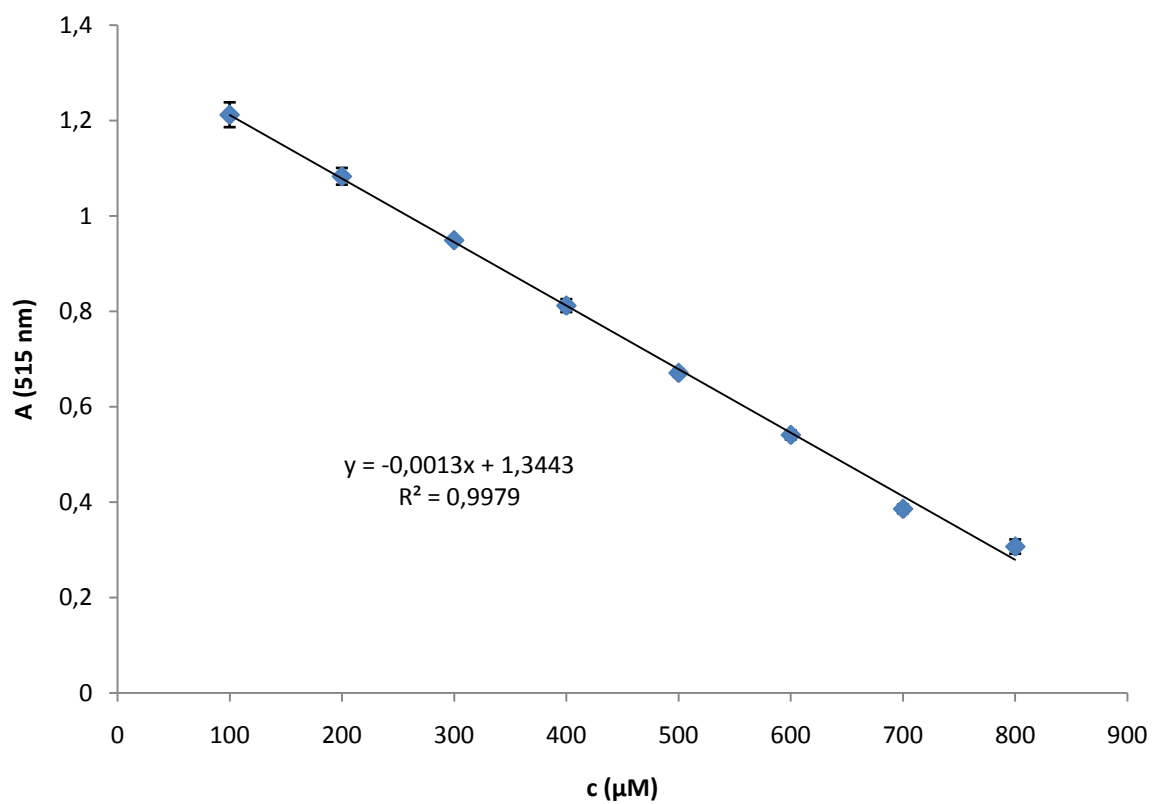
4.1.2 Kalibrační křivky

Dle postupů popsaných v kapitole 3.3.1.2 a 3.3.2.2 byly sestrojeny kalibrační závislosti. Sestrojení kalibračních křivek pro metody ABTS a DPPH bylo provedeno několikrát a v různé dny, abychom dokázali reprodukovatelnost měření. Kalibrační závislost se měnila minimálně. Rozdíly v jednotlivých měřeních jsou zobrazeny pomocí chybových úseček na základě intervalů spolehlivosti.

Z grafů můžeme vyčíst, že kalibrační závislost metod ABTS a DPPH měla velice podobný průběh (*graf 3, graf 4*). Po smíchání pracovního roztoku a Troloxu docházelo u metod ABTS a DPPH ke snížení intenzity zabarvení přímou reakcí látky se stabilními radikály. Látka se v tomto případě chovala jako donor protonů, čímž docházelo k zániku radikálů a k jejich odbarvení. ABTS^{•+} byl tmavě modro-zelený, po odbarvení byl světle zelený až čirý. DPPH byl fialový, po odbarvení přecházel na světle fialovou až světle žlutou. Platilo tedy, že čím koncentrovanější roztok Troloxu byl přidán k pracovnímu roztoku, tím více se roztok ABTS nebo DPPH odbarvil.



Graf 3. Kalibrační křivka metody ABTS

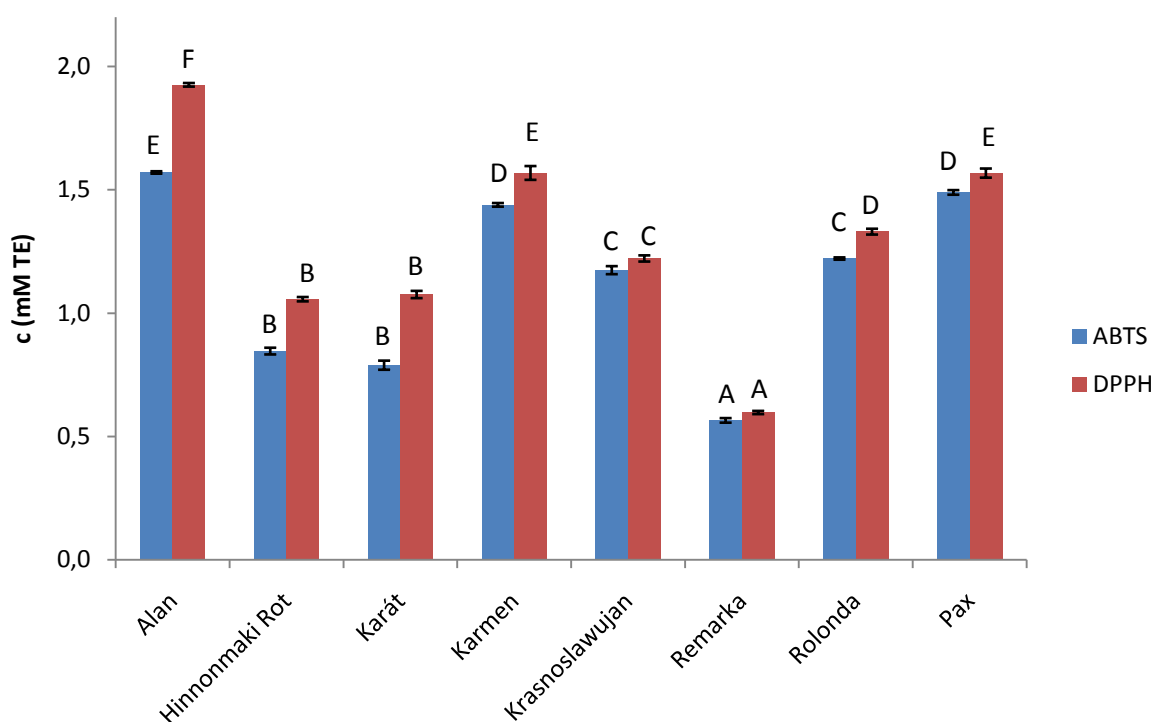


Graf 4. Kalibrační křivka metody DPPH

4.1.3 Celková antioxidační aktivita červených a bílých angreštů naměřená metodami ABTS a DPPH

Podle Dean-Dixonova testu neobsahovaly naměřené absorbance v případě metod ABTS i DPPH žádné odlehlé hodnoty ($n = 3$, $\alpha = 0,05$). Každá reakční směs reaguje s obsaženými antioxidanty různými mechanismy – přesnější by měla být metoda ABTS, kde činidlo reaguje se všemi látkami vykazujícími antioxidační aktivitu [55]. Výsledky získané metodou DPPH by měly být na základě podobného principu s metodou ABTS srovnatelné. Rozdíly ve stanovené celkové antioxidační aktivitě mohly být způsobeny tím, že radikál DPPH byl hned po namíchání připraven k použití a reagoval se vzorkem po dobu 24 h, kdežto ABTS** musel být před použitím generován (po dobu 12 hodin) a reagoval se vzorkem 2 h.

Konkrétní výsledky celkové antioxidační aktivity pro jednotlivé odrůdy různých druhů angreštů jsou uvedeny v následujících grafech (*graf 5 a 6*). Hodnoty celkové antioxidační aktivity jsou zobrazeny jako průměry ($n = 3$). Naměřená data byla zpracována pomocí Tukeyho testu, který na základě provedené analýzy rozptylu určil vzájemnou podobnost naměřených průměrných hodnot celkové antioxidační aktivity jednotlivých odrůd. Hodnoty s rozdílnými písmennými indexy (*graf 5 a 6*) byly na dané hladině statistické významnosti ($\alpha = 0,05$) významně odlišné ($p < 0,05$).

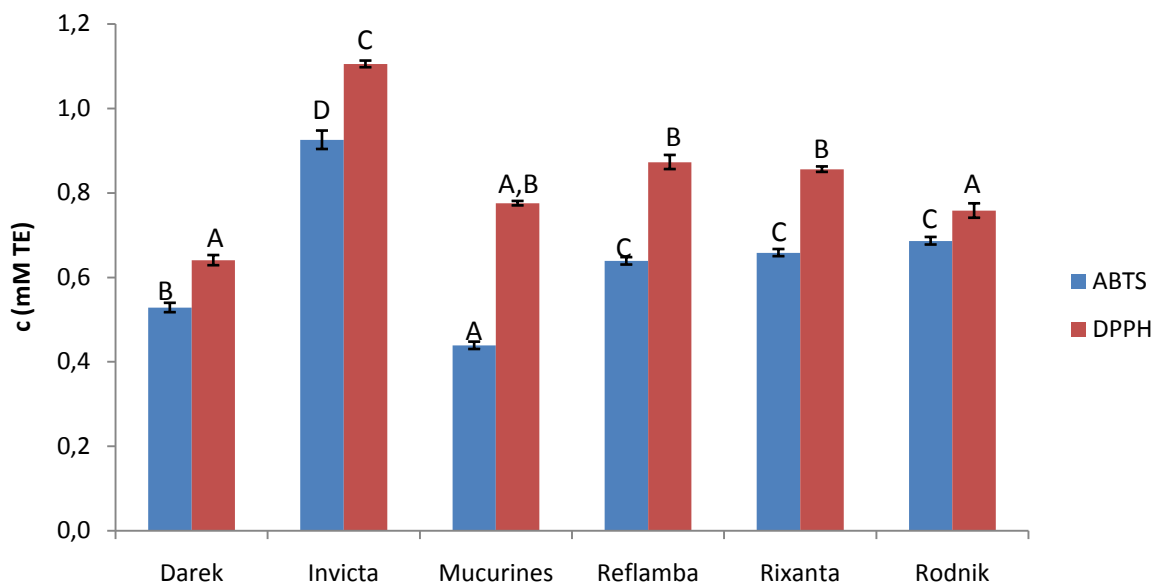


Graf 5. Celková antioxidační aktivita odrůd červených angreštů

Z červených angreštů vykazovaly největší celkové antioxidační aktivity odrůdy Alan, Karmen a Pax (*graf 5*). Hodnoty celkové antioxidační aktivity byly 1,6 mM TE metodou ABTS a 1,9 mM TE metodou DPPH pro odrůdu Alan; 1,4 mM TE metodou ABTS a 1,6 mM TE metodou DPPH pro odrůdu Karmen a 1,5 mM TE metodou ABTS a 1,6 mM TE metodou DPPH pro odrůdu Pax.

Na základě Tukeyho testu bylo zjištěno, že se na dané hladině statistické významnosti $\alpha = 0,05$ celková antioxidační aktivita odrůd červených angreštů významně lišila ($p < 0,05$).

Nejvýraznější vzájemné rozdíly v případě metod ABTS i DPPH vykazovaly odrůdy Alan (skupina E pro metodu ABTS a skupina F pro metodu DPPH) a Remarka (skupina A pro obě metody).



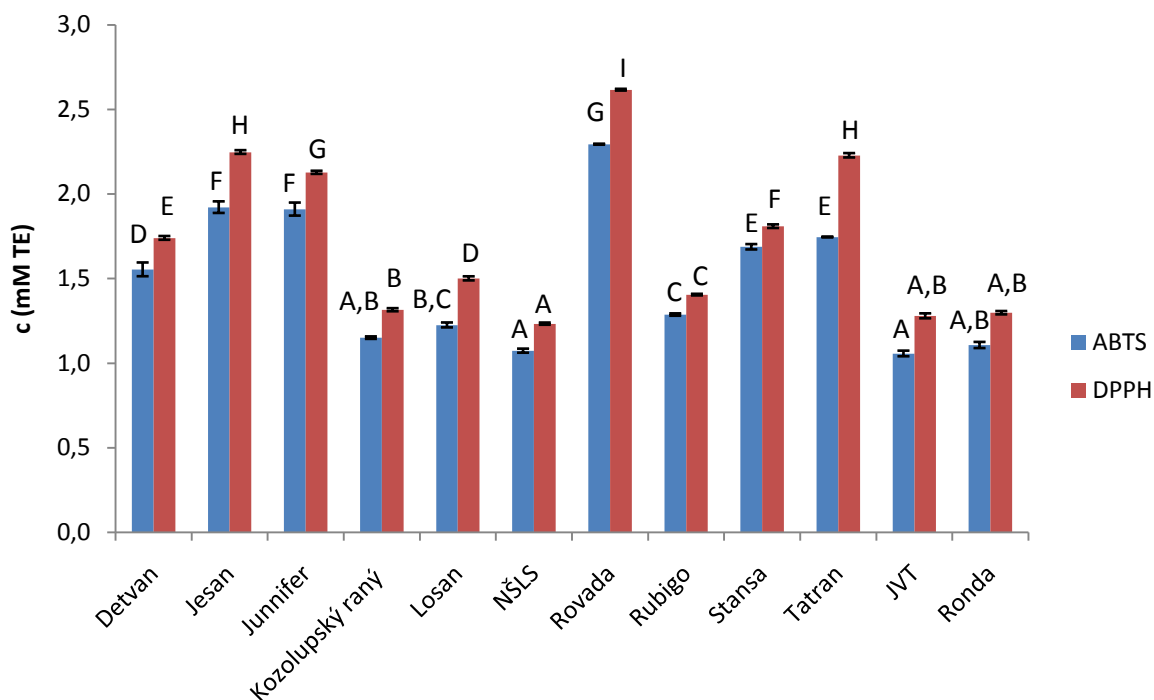
Graf 6. Celková antioxidační aktivita odrůd bílých angreštů

Z hlediska celkové antioxidační aktivity z bílých angreštů se jako nejvýznamnější ukázala být odrůda Invicta (graf 6). Její hodnota dosahovala 0,9 mM TE pro metodu ABTS a 1,1 mM TE pro metodu DPPH.

Tukeyho test určil významné odlišnosti celkové antioxidační aktivity některých odrůd bílých angreštů ($p < 0,05$) na hladině statistické významnosti $\alpha = 0,05$. Rozdíl v celkové antioxidační aktivitě odrůd Reflamba, Rixanta a Rodnik změřené metodou ABTS byl statisticky nevýznamný. V případě metody ABTS vykazovaly nejvýznamnější vzájemné rozdíly odrůdy Invicta (skupina D dle Tukeyho testu) a Mucurines (skupina A), v případě metody DPPH odrůdy Invicta (skupina D), Darek a Rodnik (skupina A).

4.1.4 Celková antioxidační aktivita červených a bílých rybízů naměřená metodami ABTS a DPPH

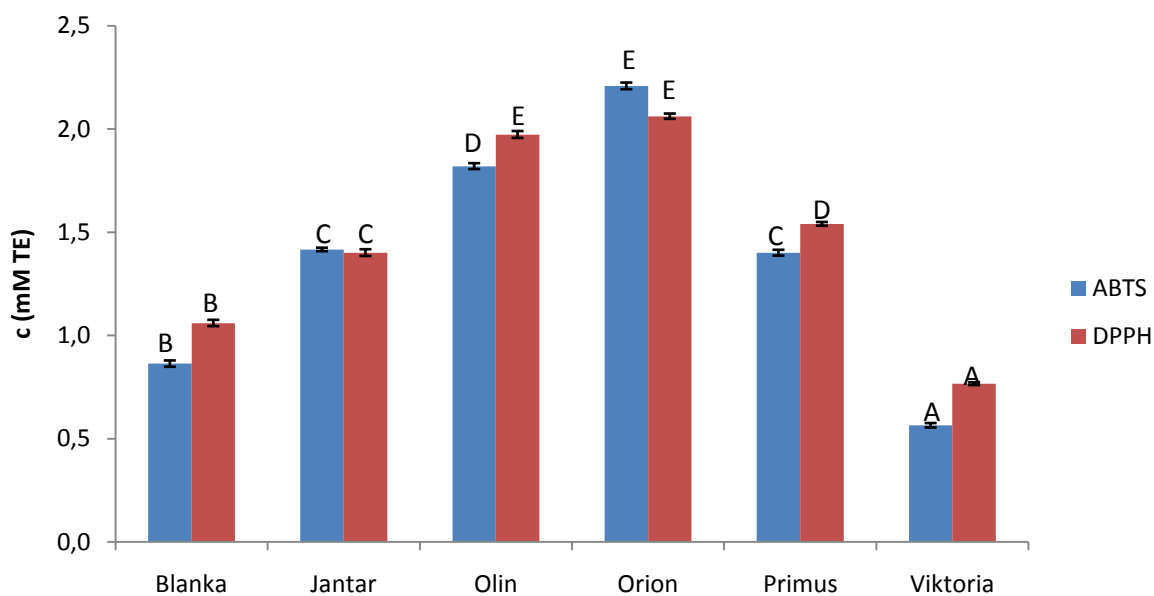
Konkrétní výsledky celkové antioxidační aktivity pro jednotlivé odrůdy různých druhů rybízů jsou uvedeny v následujících grafech (graf 7 a 8). Aplikací Dean-Dixonova testu na změřené absorbance byly odstraněny odlehlé hodnoty ($n = 3$, $\alpha = 0,05$). Hodnoty celkové antioxidační aktivity jsou zobrazeny jako průměry ($n = 3$). Naměřená data byla zpracována pomocí Tukeyho testu, který na základě provedené analýzy rozptylu určil vzájemnou podobnost naměřených průměrných hodnot celkové antioxidační aktivity jednotlivých odrůd. Hodnoty s rozdílnými písmennými indexy (graf 7 a 8) byly na dané hladině statistické významnosti ($\alpha = 0,05$) významně odlišné ($p < 0,05$).



Graf 7. Celková antioxidační aktivita odrůd červených rybízů

Z červených rybízů byla nejvyšší celková antioxidační aktivita naměřena u odrůdy Rovada (graf 7), a to 2,4 mM TE pro metodu ABTS a 2,6 mM TE pro metodu DPPH.

Na základě Tukeyho testu bylo zjištěno, že se na dané hladině statistické významnosti $\alpha = 0,05$ celková antioxidační aktivita odrůd červených rybízů významně odlišuje. Nejvýraznější vzájemné rozdíly v případě metod ABTS i DPPH vykazovaly odrůdy Rovada (skupina G pro metodu ABTS a skupina I pro metodu DPPH), NŠLS (skupina A pro obě metody) a JVT (skupina A pro metodu ABTS a skupina A, B pro metodu DPPH).



Graf 8. Celková antioxidační aktivita odrůd bílých rybízů

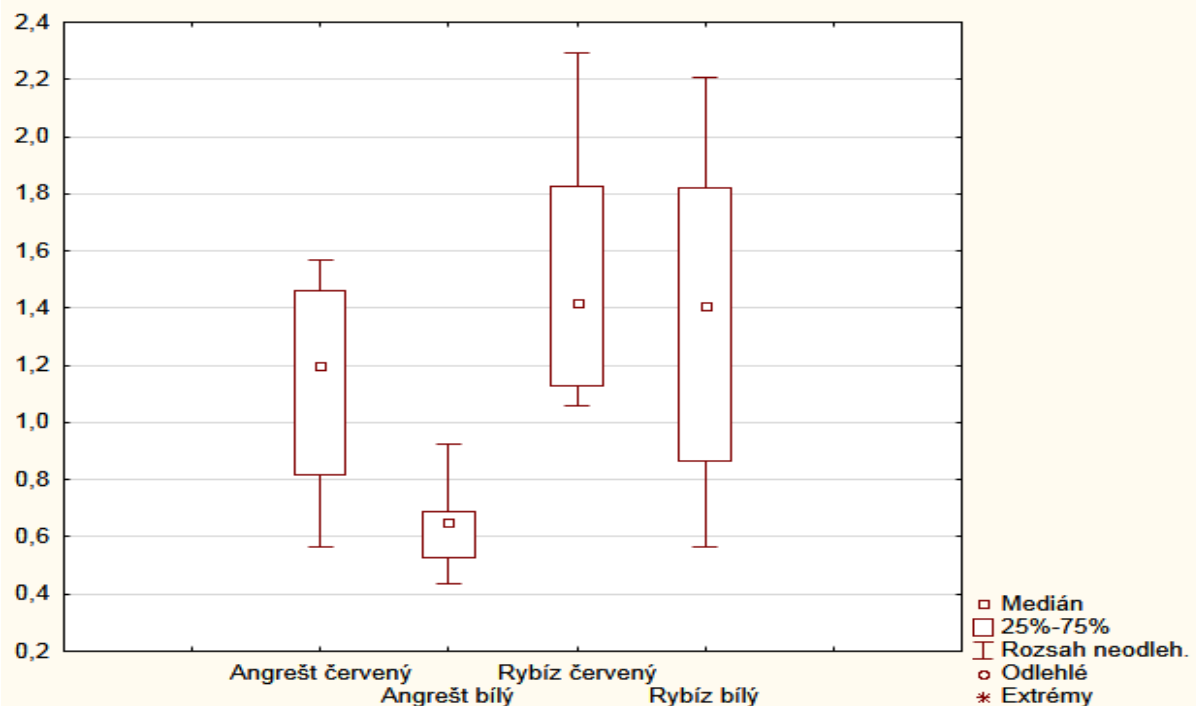
Mezi bílými rybízů měly nevyšší celkovou antioxidační aktivitu odrůdy Orion a Olin (graf 8), a to 1,8 mM TE metodou ABTS a 2,0 mM TE metodou DPPH pro odrůdu Olin a 2,0 mM TE metodou ABTS a 2,2 mM TE metodou DPPH pro odrůdu Orion.

Tukeyho test určil významné odlišnosti celkové antioxidační aktivity odrůd bílých rybízů na hladině statistické významnosti $\alpha = 0,05$. V případě metody ABTS i DPPH vykazovaly nejvýznamnější vzájemné rozdíly odrůdy Olin (skupina D pro metodu ABTS, skupina E pro metodu DPPH), Orion (skupina E pro obě metody) a Viktoria (skupina A pro obě metody).

4.1.5 Porovnání celkové antioxidační aktivity červených a bílých angreštů a červených a bílých rybízů

Porovnání rozsahů celkové antioxidační aktivity angreštů a rybízů měřených metodami ABTS a DPPH pomocí mediánu zobrazují graf 9 a graf 10.

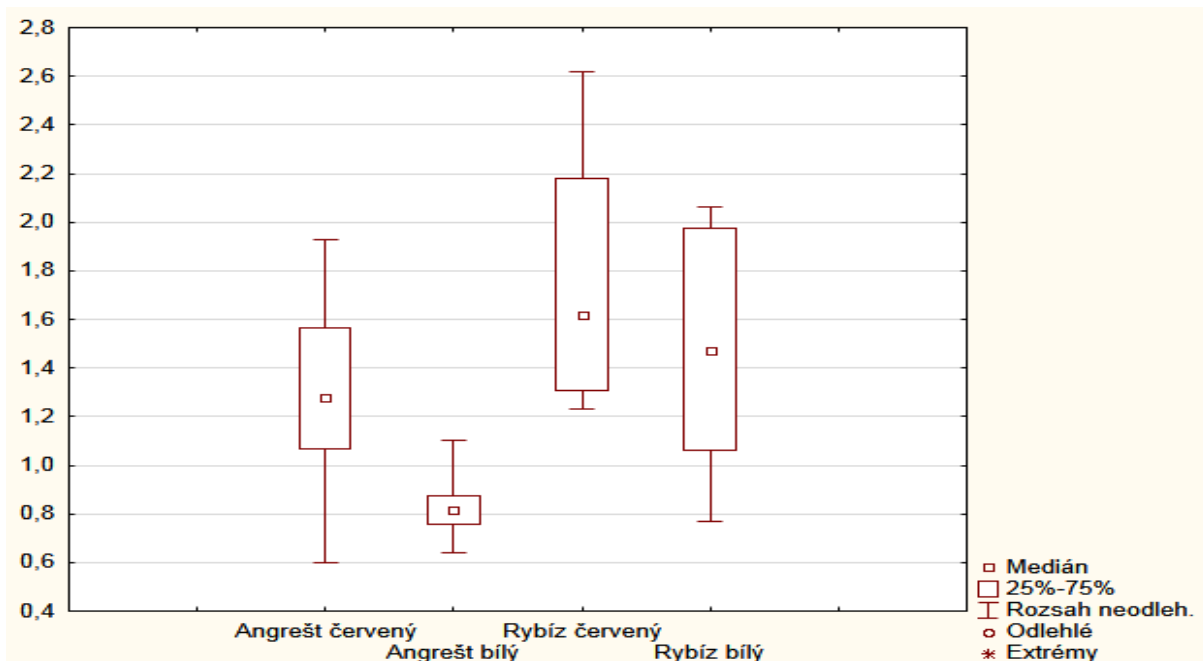
V rámci srovnávání jednotlivých skupin ovoce byly provedeny dvě analýzy – Brown-Forsytheův test shody rozptylů a t-test pro nezávislé proměnné. Brown-Forsytheův test potvrdil nulovou hypotézu ($p > 0,05$; p – poměr shody rozptylů) a tedy shodnost rozptylů. Následnou aplikací t-testu bylo zjištěno, zda měly dvě skupiny v průměru stejnou celkovou antioxidační aktivitu v rámci hladiny statistické významnosti $\alpha = 0,05$. Pokud $p > 0,05$, platila nulová hypotéza a tedy shodnost celkové antioxidační aktivity v rámci hladiny statistické významnosti $\alpha = 0,05$. Pokud $p < 0,05$, platila alternativní hypotéza, která vyvracela shodnost celkové antioxidační aktivity v rámci hladiny statistické významnosti $\alpha = 0,05$.



Graf 9. Zobrazení celkové antioxidační aktivity angreštů a rybízů měřené metodou ABTS pomocí krabicového grafu

Srovnáním celkové antioxidační aktivity červených a bílých angreštů měřených metodou ABTS bylo pomocí t-testu zjištěno, že $p = 0,01$, tedy červené a bílé angrešty neměly v průměru stejnou antioxidační aktivitu v rámci hladiny statistické významnosti $\alpha = 0,05$. Při porovnání celkové antioxidační aktivity červených a bílých rybízů měřených touto

metodou bylo t-testem zjištěno, že $p = 0,62$. Antioxidační aktivita červených a bílých rybízů byla v průměru stejná na hladině statistické významnosti $\alpha = 0,05$ (graf 9). Antioxidační aktivita rybízů a angreštů mezi sebou vzájemně nebyla porovnáována. Z grafu 9 je vidět, že mediány celkové antioxidační aktivity bílého rybízu, červeného rybízu a červeného angreštu jsou velmi podobné, zatímco medián celkové antioxidační aktivity bílého angreštu je podstatně nižší v porovnání s ostatními testovanými druhy ovoce.



Graf 10. Zobrazení celkové antioxidační aktivity angreštů a rybízů měřené metodou DPPH pomocí krabicového grafu

Při porovnání celkové antioxidační aktivity červených a bílých angreštů měřených metodou DPPH bylo t-testem zjištěno, že $p = 0,02$. Červené a bílé angrešty neměly v průměru stejnou antioxidační aktivitu v rámci hladiny statistické významnosti $\alpha = 0,05$, stejně jako v případě metody ABTS. Srovnáním celkové antioxidační aktivity červených a bílých rybízů měřených metodou DPPH bylo pomocí t-testu zjištěno, že $p = 0,28$, tedy červené a bílé rybízové měly v průměru stejnou antioxidační aktivitu v rámci hladiny statistické významnosti $\alpha = 0,05$, stejně jako v případě metody ABTS (graf 10). V rámci porovnání jednotlivých druhů ovoce bylo dosaženo podobných výsledků jako v případě metody ABTS.

4.2 EPR měření

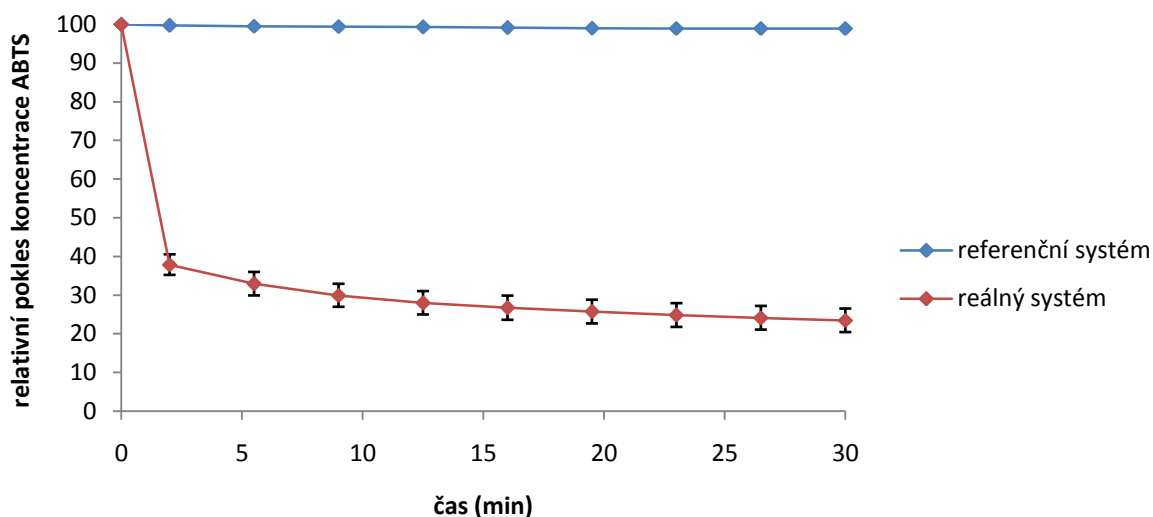
4.2.1 Stanovení celkové antioxidační aktivity černých rybízů

Celková antioxidační aktivita vzorků z odrůd černých rybízů byla stanovena pomocí EPR spektrometru. V případě těchto barevných odrůd není možné použít standardní techniku UV-VIS vzhledem k tomu že anthokyany obsažené v černém rybízu výrazně ruší spektrofotometrické stanovení.

4.2.1.1 Reakční systém ABTS a TEAC_{ABTS}

Z důvodu lepší porovnatelnosti dat byla celková antioxidační aktivita převedena na univerzální hodnotu TEAC_{ABTS} a výsledky jsou uvedeny v *grafu 12*.

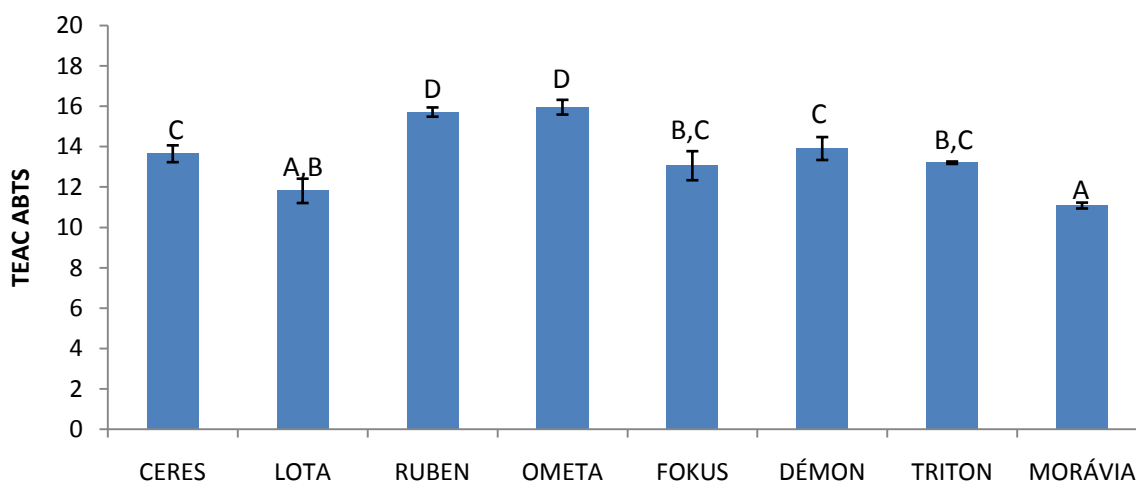
Stabilita referenčního roztoku ABTS^{•+} a chování reálného systému po přidání ABTS^{•+} ke vzorku ovoce jsou znázorněny v *grafu 11*. Každá odrůda černého rybízu byla proměřena třikrát, rozdíly v jednotlivých měřeních jsou zobrazeny pomocí chybových úseček na základě intervalů spolehlivosti.



Graf 11. Ukázka poklesu koncentrace radikálu ABTS^{•+} po přidání k extraktu odrůdy Démon v čase T

Z *grafu 11* je možné vyčíst, že referenční systém ABTS^{•+} byl po dobu experimentu stabilní a nedocházelo v něm k terminaci radikálů. Kinetické křivky všech odrůd černých rybízů vykazovaly podobný průběh závislosti relativní koncentrace ABTS na čase, v případě odrůdy Démon dochází k terminaci přibližně 65 % radikálů v prvních 5 minutách experimentu.

Pro snadnější interpretaci a srovnání výsledků s literaturou byly výsledky přepočítány na ekvivalent Troloxu dle vztahu (13) a jsou uvedeny v *grafu 12*.



Graf 12. Hodnoty TEAC_{ABTS} odrůd černých rybízů

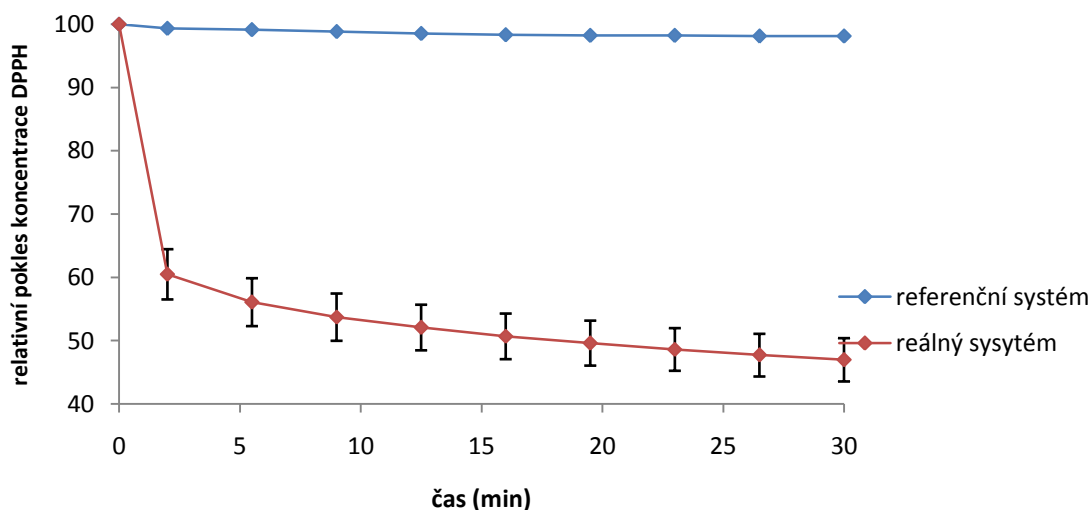
Nejvyšší celková antioxidační aktivita v rámci vzorků černých rybízů byla naměřena pro odrůdy Ruben a Ometa (*graf 12*), a to $TEAC_{ABTS} = 16$ TE pro obě odrůdy.

Ze srovnání odrůd je patrné, že vykazovaly podobné hodnoty celkové antioxidační aktivity. Na základě Tukeyho testu vykazovaly nejvýznamnější vzájemné rozdíly odrůdy Ruben (skupina D), Ometa (skupina D) a Morávia (skupina A).

4.2.1.2 Reakční systém DPPH a $TEAC_{DPPH}$

Výsledky celkové antioxidační aktivity černých rybízů měřených metodou DPPH pomocí elektronové paramagnetické rezonance byly převedeny na hodnoty $TEAC_{DPPH}$ a jsou uvedeny v *grafu 14*.

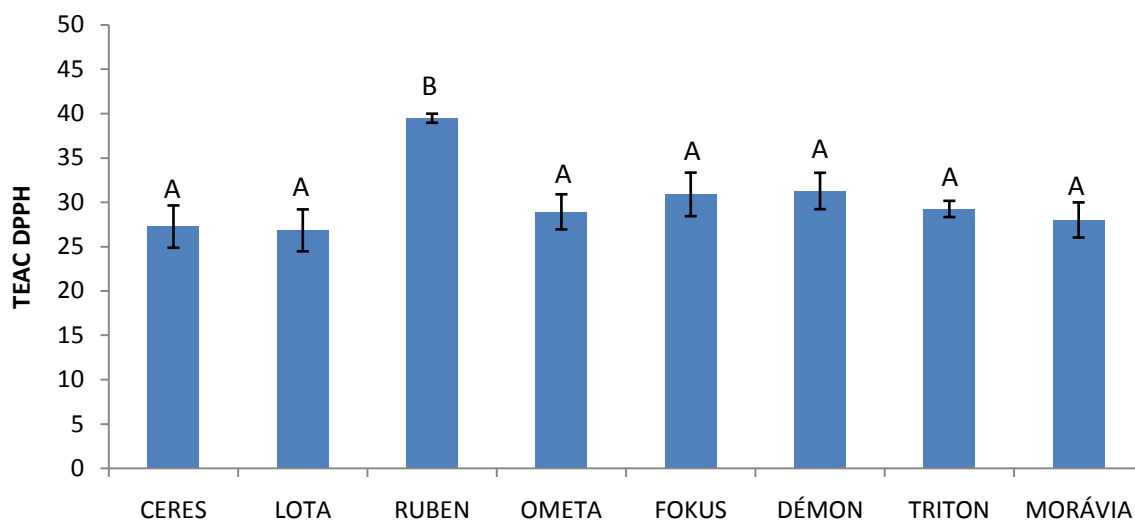
Stabilita referenčního roztoku DPPH a chování reálného systému po přidání radikálů DPPH ke vzorku ovoce je znázorněna v *grafu 13*. Každá odrůda černého rybízu byla proměřena třikrát, rozdíly v jednotlivých měřeních jsou zobrazeny pomocí chybových úseček na základě intervalů spolehlivosti.



Graf 13. Ukázka poklesu koncentrace radikálu DPPH po přidání extraktu odrůdy Démon v čase T

Z *grafu 13* je patrné, že referenční systém DPPH byl po dobu experimentu stabilní a nedocházelo k terminaci těchto radikálů. Kinetický výstup experimentu ukázal, že v případě odrůdy Démon docházelo k terminaci přibližně 45 % radikálů v prvních 5 minutách experimentu. Kinetické výstupy experimentů měly pro všechny odrůdy podobný průběh závislosti času experimentu na poklesu množství volného radikálu.

Pro snadnější interpretaci a srovnání s literaturou byly výsledky přepočítány na ekvivalent Troloxu dle vztahu (14) a jsou uvedeny v *grafu 14*.



Graf 14. Hodnoty $TEAC_{DPPH}$ odrůd černých rybízů

Nejvyšší celková antioxidační aktivita černých rybízů byla naměřena pro odrůdu Ruben (graf 14), a to $TEAC_{DPPH} = 40$ TE.

Z grafu 14 je patrné, že odrůdy černých rybízů vykazovaly podobné hodnoty celkové antioxidační aktivity. Tukeyho test určil významnou odlišnost celkové antioxidační aktivity odrůdy Ruben na hladině statistické významnosti $\alpha = 0,05$. Celkové antioxidační aktivity ostatních odrůd dávaly statisticky nevýznamné rozdíly ($\alpha = 0,05$).

5 ZÁVĚR

V předložené práci byla vypracována literární rešerše, která shrnuje dostupné informace o drobném ovoci, antioxidantech a metodách pro stanovení celkové antioxidační aktivity potravin. V experimentální části byly pomocí metod ABTS a DPPH spektrofotometricky stanoveny celkové antioxidační aktivity vzorků červených a bílých angreštů a červených a bílých rybízů. Pro stanovení celkové antioxidační aktivity odrůd černých rybízů byla použita elektronová paramagnetická rezonance, při které je na rozdíl spektrofotometrických metod ABTS a DPPH minimalizován rušivý vliv antokyanů přítomných ve vzorcích. Celková antioxidační aktivita vybraných angreštů a červených a bílých rybízů byla stanovena z kalibračních křivek sestavených za použití modelové látky Troloxu a byla vyjádřena v ekvivalentech Troloxu. Celková antioxidační aktivita jednotlivých odrůd černých rybízů změřených elektronovou paramagnetickou rezonancí byla vyjádřena parametry $TEAC_{ABTS}$ a $TEAC_{DPPH}$.

Jako nejperspektivnější z odrůd červených angreštů se jevily odrůdy Alan, Karmen a Pax. Hodnoty celkové antioxidační aktivity těchto odrůd byly 1,6 mM TE (ABTS) a 1,9 mM TE (DPPH) pro odrůdu Alan; 1,4 mM TE (ABTS) a 1,6 mM TE (DPPH) pro odrůdu Karmen a 1,5 mM TE (ABTS) a 1,6 mM TE (DPPH) pro odrůdu Pax. Nejvyšší antioxidační aktivita bílých angreštů byla naměřena u odrůdy Invicta, a to 0,9 mM TE (ABTS) a 1,1 mM TE (DPPH). Porovnáním celkové antioxidační aktivity červených a bílých angreštů měřených metodou ABTS bylo pomocí t-testu zjištěno, že průměrná hodnota antioxidační aktivity se významně lišila na hladině statistické významnosti $\alpha = 0,05$. Červené angrešty vykazovaly vyšší hodnoty celkové antioxidační aktivity, což může být způsobeno přítomností vyššího množství polyfenolických látek v porovnání s bílými angrešty. Metodou DPPH bylo pomocí t-testu dosaženo stejného závěru.

Z odrůd červených rybízů byla vyzdvižena odrůda Rovada. Hodnota celkové antioxidační aktivity této odrůdy byla stanovena na 2,4 mM TE (ABTS) a 2,6 mM TE (DPPH). U odrůd bílých rybízů byly největší celkové antioxidační aktivity změřeny pro odrůdy Orion a Olin, a to 1,8 mM TE (ABTS) a 2,0 mM TE (DPPH) pro odrůdu Olin a 2,0 mM TE (ABTS) a 2,2 mM TE (DPPH) pro odrůdu Orion. Aplikací t-testu na výsledky získané analýzou červených a bílých rybízů bylo zjištěno, že jejich celková antioxidační aktivita byla v průměru stejná na hladině statistické významnosti $\alpha = 0,05$ pro metodu ABTS i DPPH.

Antioxidační aktivita rybízů a angreštů mezi sebou vzájemně nebyla porovnáována, ale mediány celkové antioxidační aktivity bílého rybízu, červeného rybízu a červeného angreštu byly velmi podobné, zatímco medián celkové antioxidační aktivity bílého rybízu byl podstatně nižší v porovnání s ostatními druhy ovoce.

Nejslibnějšími odrůdami černých rybízů z hlediska celkové antioxidační aktivity byly odrůdy Ruben a Ometa s hodnotou $TEAC_{ABTS} = 16$ TE pro obě odrůdy. Metodou DPPH byla stanovena celková antioxidační aktivita u nejperspektivnější odrůdy Ruben na $TEAC_{DPPH} = 40$ TE. Hodnoty celkové antioxidační aktivity $TEAC_{DPPH}$ byly výrazně vyšší než hodnoty $TEAC_{ABTS}$. Podobných výsledků bylo dosaženo i v publikované literatuře [48].

V porovnání s dostupnou literaturou byla celková antioxidační aktivita angreštů a rybízů naměřená v této práci významně vyšší. Hodnoty celkové antioxidační aktivity ovoce mohou být ovlivněny různými postupy přípravy extraktů, případně rozdílným obsahem organických látek v jednotlivých odrůdách angreštů a rybízů. V porovnání s jinými druhy ovoce jsou rybízové a angrešty dobrými zdroji antioxidantů, zejména pak černý rybíz.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] HRIČOVSKÝ, Ivan. *Rybíz, angrešt na zahrádce*. 2. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1990, 52 s.
- [2] DVOŘÁK, Antonín. *Atlas odrůd ovoce*. 2. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1979, 399 s.
- [3] RICHTER, Miloslav. *Velký atlas odrůd ovoce a révy*. Vyd. 1. Lanškroun: TG TISK, c2002, 158 s. ISBN 80-238-9461-7.
- [4] NESRSTA, Dušan, Tomáš JAN a Milan HANČ. *Drobné ovoce a skořápkoviny: přes 140 barevných fotografií a popisů odrůd*. 1. vyd. Olomouc: Baštan, 2013, 213 s. ISBN 978-80-87091-40-1.
- [5] HALLIWELL, Barry a John M GUTTERIDGE. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. New York: Oxford University Press, 2007, xxxvi, 851 p., [8] p. of plates. ISBN 978-019-8568-681.
- [6] RACEK, Jaroslav a Václav HOLEČEK. Enzymy a volné radikály. *Chemické listy*. 1999, č. 93.
- [7] DARLEY-USMAR Victor a Barry HALLIWELL: Blood Radicals. Reactive Nitrogen Species, Reactive Oxygen Species, Transition Metal Ions and Vascular System. *Pharmaceutical Research*, 1996, č. 13, s. 649-662.
- [8] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*. 2004, č. 98, s. 174-179.
- [9] GÜLÇİN, İlhami. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*. 2012, č. 86, s. 345-391.
- [10] RILEY, P.A.: Free radicals in biology; oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *International Journal Of Radiation Biology*, 1994, č. 65 (1), s. 27-33.
- [11] ŠTÍPEK, Stanislav. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. 1. vyd. Praha: Grada, 2000, 314 s. ISBN 80-7169-704-4.
- [12] MACUCHOVÁ, Simona. *Studium aktivity enzymových a nízkomolekulárních antioxidačních systémů*. Brno, 2010. Disertační práce. FCH VUT Brno.
- [13] KOPŘIVA, Vladimír. *Antioxidační kapacita potravin* [online]. 2009 [cit. 13-2-2013]. Dostupné z: <http://cit.vfu.cz/ivbp/wp-content/uploads/2011/07/ANTIOXIDA%C4%8CN%C3%8D-KAPACITA-POTRAVIN.pdf>
- [14] POKORNÝ, Jan, Nedyalka YANISHLIEVA a Michael GORDON. *Antioxidants in food: practical applications*. Repr. Boca Raton FL: CRC Press, 2001. ISBN 18-557-3463-X.
- [15] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*. 1.vyd. Tábor: OSSIS, 1999. 368 s. ISBN 80-902391-5-3.
- [16] ŽITŇANOVÁ, Ingrid, Silvia RANOSTAJOVÁ, Hana SOBOTOVÁ, Denisa DEMELOVÁ, Ivan PECHÁŇ a Zdeňka ĎURAČKOVÁ. Antioxidative activity of selected fruits and vegetables. *Biologia*. 2006, č. 61, s. 279-284.
- [17] HALLIWELL, Barry a GUTTERIDGE. The definition and measurements of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*. 1995, č. 18, s. 125-126.
- [18] ORTEMBERG, Adriana. *Mládneme s antioxidanty*. Vyd. 1. Praha: Ivo Železný, 2003, 126 s. ISBN 80-237-3742-2.

- [19] JORDÁN, Václav a Marie HEMZALOVÁ. *Antioxidanty: zázračné zbraně: vitaminy, minerály, stopové prvky, aminokyseliny a jejich využití pro zdravý život*. Vyd. 1. Brno: Jota, 2001, 153 s. ISBN 80-7217-156-9.
- [20] VELÍŠEK, J., *Chemie potravin 1*. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [21] The main pathway of retinol metabolism. *Www.thetriplehelixian.com* [online]. 2012 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://thetriplehelixian.com/2012/08/05/part-i-updated-post-on-the-main-pathway-of-retinol-metabolism-v-0-02/>
- [22] MCKERSIE, Brian D. *Oxidative stress* [online]. 1996 [cit. 2015-02-02]. Dostupné z: www.plantstress.com
- [23] Kyselina askorbová E300. *Www.fichema.cz* [online]. 2013 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: http://www.fichema.cz/chemikalie-kyselina-askorbova-e300-potravin-c-37_117.html
- [24] Tokoferol. *Www.vydavatelstvi.vscht.cz* [online]. [cit. 2013-04-17]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/tokoferol.html
- [25] YAO, L. H., Y. M. JIANG, J. SHI, F. A. TOMÁS-BARBERÁN, N. DATTA, R. SINGANUSONG a S. S. CHEN. Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2004, č. 59, s. 113-122.
- [26] GARRIDO, Jorge a Fernanda BORGES. Wine and grape polyphenols - A chemical perspective. *Food Research International*. 2013, č. 54, s. 1844-1858.
- [27] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, xx, 623 s. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [28] PASCUAL-TERESA, Sonia a Maria Teresa SANCHEZ-BALLESTA. Anthocyanins: from plant to health. *Phytochemistry Reviews*. 2008, č. 7, s. 281-299.
- [29] WANG, C. C., S. C. CHANG, B. Stephen INBARAJ a B. H. CHEN. Isolation of carotenoids, flavonoids and polysaccharides from *Lycium barbarum* L. and evaluation of antioxidant activity. *Food Chemistry*. 2010, č. 120, s. 184-192.
- [30] LI, Hongyan, Zeyuan DENG, Ronghua LIU, Steven LOEWEN a Rong TSAO. Carotenoid compositions of coloured tomato cultivars and contribution to antioxidant activities and protection against H₂O₂-induced cell death in H9c2. *Food Chemistry*. 2013, č. 136, s. 878-888.
- [31] MÜLLER, Lars, Kati FRÖHLICH a Volker BÖHM. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*. 2011, č. 129, s. 139-148.
- [32] JAVANMARDI, J, C. STUSHNOFF, E. LOCKE a J.M. VIVANCO. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food chemistry*. 2003, č. 83, s. 547-550.
- [33] LI, Hongyan, Zeyuan DENG, Tao WU, Ronghua LIU, Steven LOEWEN a Rong TSAO. Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food Chemistry*. 2012, č. 130, s. 928-936.
- [34] GRANATO, Daniel, Flávia Chizuko Uchida KATAYAMA a Inar Alves de CASTRO. Phenolic composition of South American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price and sensory quality. *Food chemistry*. 2011, č. 129, s. 366-373.

- [35] SURVESWARAN, Siddharthan, Yi-Zhong CAI, Harold CORKE a Mei SUN. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*. 2007, č. 102, s. 938-953.
- [36] THORAT, Indrajit D., Dipali D JAGTAP, Debabandya MOHAPATRA, D.C. JOSHI, R.F. SUTAR a S.S. KAPDI. Antioxidants, their properties, uses in food products and their legal implications. *International Journal of Food Studies*. 2013, č. 2, s. 81-104.
- [37] SMITH, J., HONG-SHUM, L. *Food Additives Data Book*. Massachusetts: Blackwell Publishing, 2003. ISBN 978-0-632-06395-6.
- [38] BHA. *Www.hplc1.sweb.cz* [online]. 2004 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://hplc1.sweb.cz/ANTIOXIDANT/Chrom/bha.gif>
- [39] BHT. *Www.hplc1.sweb.cz* [online]. 2004 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://hplc1.sweb.cz/ANTIOXIDANT/Chrom/bht.gif>
- [40] Butylhydrochinon. *Www.hplc1.sweb.cz* [online]. 2004 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://hplc1.sweb.cz/ANTIOXIDANT/Chrom/buthydrochinon.gif>
- [41] POSPÍŠIL, J. *Antioxidanty*. 3.vyd. Praha: Academia, 1973. 392 s. ISBN 509-21-875.
- [42] KARADAG, Ayse, Beraat OZCELIK a Samim SANER. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*. 2009, č. 2, s. 41-60.
- [43] ARTS, Mariken J.T.J, Guido R.M.M HAENEN, Hans-Peter VOSS a Aalt BAST. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. *Food and chemical Toxicology*. 2004, č. 42, s. 45-49.
- [44] MACDONALD-WICKS, Lesley K, Lisa G WOOD a Manohar L GARG. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2006, č. 86, s. 2046-2056.
- [45] LEE, Yunho, Jeyong YOON a Urs von GUNTEN. Spectrophotometric determination of ferrate (Fe(VI)) in water by ABTS. *Water Research*. 2005, č. 39, s. 1946-1953.
- [46] Proprietà antiossidanti dei polifenoli. *Www.lem.ch.unito.it* [online]. 2007 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: http://lem.ch.unito.it/didattica/infochimica/2007_Polifenoli_Vino/antiox.html
- [47] POLOVKA, Martin. *EPR spektroskopie*. Dostupné z: <http://www.chtf.stuba.sk/~polovka/epr.pdf>
- [48] ŠŤAVÍKOVÁ, Lenka. Charakterizace vlastností extraktů z hroznových bobulí pomocí moderních analytických metod. Brno, 2010. Dostupné z: http://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=24817.
Disertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- [49] ČŮTA, František, Miloš HEJTMÁNEK, Milan KARLÍK, Zbyněk KSANDR, Zdeněk KUČERA, Bohumil POLEJ, Milan POPL a Karel VOLKA. Instrumentální analýza. 1. vyd. Praha: SNTL, 1986, 295 s.
- [50] GONZÁLEZ, Paula Mariela, María Belén AGUIAR, Gabriela MALANGA a Susana PUNTARULO. Electronic paramagnetic resonance (EPR) for the study of ascorbyl radical and lipid radicals in marine organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2013, č. 165, s. 439-447.

- [51] ZEMAN, Miroslav, Pavel STOPKA, Marek VECKA, Aleš ŽÁK, Alexandra PÍSAŘÍKOVÁ, Roman JIRÁK, Barbora STAŇKOVÁ, Lucie VÁVROVÁ, Jana KODYDKOVÁ, Jana KRÍŽOVÁ a Jaroslav MACÁŠEK. Stanovení hydroxylových a nitroxidových radikálů u deprese a hyperlipidémie elektronovou paramagnetickou rezonancí. *Chemické listy*. 2009, č. 103, s. 667-671.
- [52] WEIL, John A a James R BOLTON. *Electronparamagnetic resonance: elementary theory and practical applications*. 2nd ed. Hoboken: John Wiley, 2007, 664 s. ISBN 978-0-471-75496-1.
- [53] *EPR Spectroscopy: An Overview* [online]. 2009 [cit. 2013-11-26]. Dostupné z: <http://cnx.org/content/m22370/latest/>
- [54] THAIPONG, Kriengsak, Unaroj BOONPRAKOB, Kevin CROSBY, Luis CISNEROS-ZEVALLOS a David HAWKINS BYRNE. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006, č. 19, s. 669-675.
- [56] KIM, Dae-Ok, Seung Weon JEONG a Chang Y. LEE. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*. 2003, č. 81, s. 321-326.
- [57] BARROS, Lillian, Paula BAPTISTA a Isabel C.F.R. FERREIRA. Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays. *Food and Chemical Toxicology*. 2007, č. 45, s. 1731-1737.
- [58] ROP, Otakar, Jiří MLČEK, Tünde JURÍKOVÁ a Magdalena VALŠÍKOVÁ. Bioactive content and antioxidant capacity of Cape gooseberry fruit. *Central European Journal of Biology*. 2012, č. 7, s. 672-679.
- [59] MELOUN, Milan a Jiří MILITKÝ. *Statistické zpracování experimentálních dat*. Praha: PLUS, 1994, 839 s. ISBN 80-852-9756-6.
- [60] BLATNÁ, Dagmar. *Metody statistické analýzy*. Vyd. 3. Praha: Bankovní institut vysoká škola, 2008, 92 s. ISBN 978-80-7265-129-0.
- [61] PAVLÍK, Jiří. *Aplikovaná statistika*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005, 172 s. ISBN 80-7080-569-2.

AAPH	2,2'-azobis(isobutyrimidamid)-dihydro-chlorid
ABTS	2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát)
BHA	butylhydroxyanisol
BHT	butylhydroxytoluen
DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPLC-ECD	High Performance Liquid Chromatography – Electrochemical Detection
LDL	Low-density lipoprotein
NADPH	redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PROXYL	3-karbamoyl-2,2,5,5,-tetrametylpyrolidin-N-oxyl
RNS	Reactive Nitrogen Species
RONS	Reactive Nitrogen and Oxygen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
TAA	Total Antioxidant Activity
TBHQ	2-terc-butylhydrochinon
TE	Trolox Equivalent
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TEMPO	2,2,6,6-tetramethylpiperidinyln-oxyl
TPTZ	2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin
Trolox	(±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina