

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální chemie



INICIAČNÍ A SOLUBILIZAČNÍ SYSTÉMY PRO CHEMILUMINISCENČNÍ STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Michaela Baleková
Studijní program:	B 1407 Chemie
Studijní obor:	Aplikovaná chemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Doc. RNDr. Jan Hrbáč, Ph.D.

Olomouc 2014

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením doc. RNDr. Jana Hrbáče, Ph.D., za použití literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne 12. 5. 2014

.....

Michaela Baleková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu práce, panu doc. RNDr. Janu Hrbáčovi, Ph.D., za odborné vedení, jeho velikou trpělivost a cenné rady, které mi poskytl při vypracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Vladimíru Halouzkovi, Ph.D. za konzultace a rady při vypracování této práce.

1 OBSAH

Bibliografická identifikace	6
Bibliographical identification	7
2 Úvod	8
3 Teoretická část	9
3.1 Volné radikály	9
3.1.1 Reaktivní formy kyslíku	9
3.1.2 Reaktivní formy dusíku	10
3.1.3 Škodlivost ROS a RNS	11
3.2 Antioxidanty	13
3.2.1 Dělení antioxidantů	13
3.2.2 Antioxidační kapacita	16
3.3 Metody na měření antioxidační kapacity	16
3.3.1 ORAC	17
3.3.2 TRAP	18
3.3.3 TEAC	19
3.3.4 DPPH	19
3.3.5 FRAP	20
3.3.6 CUPRAC	20
3.3.7 Chemiluminiscenční metody	20
3.4 Povrchově aktivní látky, micelární systémy, solubilizace	23
3.4.1 Dělení povrchově aktivních látek	24
3.4.2 Micely	25
3.4.3 Solubilizace	27
3.5 Interakce povrchově aktivních látek s enzymy	28
3.5.1 Interakce povrchově aktivních látek s enzymy ve vodném prostředí	28
3.5.2 Dělení povrchově aktivních látek podle interakcí s enzymy	29
3.5.3 Interakce povrchově aktivních látek s HRP	30
3.6 Využití povrchově aktivních látek při stanovení AOC	30

4	Experimetální část	32
4.1	Chemikálie	33
4.2	Přístrojové vybavení	34
4.3	Typický experiment při stanovení aoc	35
4.3.1	Roztoky	35
4.3.2	Měření	35
4.4	Testování povrchově aktivních látek metodou využívající HRP	36
4.4.1	Roztoky	36
4.4.2	Měření	36
4.5	Testování povrchově aktivních látek metodou využívající anorganický systém	39
4.5.1	Roztoky	39
4.5.2	Měření	39
4.6	Výsledky a diskuse	40
	Metoda využívající HRP	40
	Metoda využívající anorganický systém	47
5	Závěr	51
6	Summary	53
	Použitá literatura	55

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora:	Michaela Baleková
Název práce:	Iniciační a solubilizační systémy pro chemiluminiscenční stanovení antioxidační kapacity.
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	Doc. RNDr. Jan Hrbáč, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2014
Abstrakt:	Cílem této práce je zjištění interakce povrchově aktivních látek s reakční směsí, která obsahuje křenovou peroxidasu, luminol, H_2O_2 a antioxidant při fyziologickém pH (7,4). Dalším cílem práce je nahrazení křenové peroxidasy anorganickým systémem obsahujícím $CoCl_2$, Bis-Tris (pH = 8), luminol, H_2O_2 a antioxidant a provedení obdobné studie vlivu povrchově aktivních látek na reakční směs.
Klíčová slova:	antioxidační kapacita, chemiluminiscence, luminol, křenová peroxidasa, α -tokoferol, trolox, kyselina askorbová, kvercetin, povrchově aktivní látky, solubilizace
Počet stran:	58
Jazyk:	Čeština

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname: Michaela Baleková

Title: Initiation and solubilization systems for chemiluminescence determination of antioxidant capacity.

Department: Department of Physical Chemistry

Type of thesis: Bachelor

Supervisor: Doc. RNDr. Jan Hrbáč, Ph.D.

Year of presentation: 2014

Abstract: The purpose of this work is to find out interactions between surfactants and reaction mixture containing horseradish peroxidase, luminol H_2O_2 and antioxidant in physiological pH (7,4). Another purpose of this work is to replace horseradish peroxidase for inorganic system containing CoCl_2 , Bis-Tris (pH = 8), luminol, H_2O_2 and antioxidant. Similar study of interactions between surfactants and reaction mixture is performed.

Key words: antioxidant capacity, chemiluminescence, luminol, horseradish peroxidase, α -tocopherol, trolox, ascorbic acid, quercetin, surfactants, solubilization

Number of pages: 58

Language: Czech

2 ÚVOD

Biologické antioxidanty jsou přírodní molekuly, které mají schopnost předcházet nekontrolovatelnému vzniku volných radikálů, reaktivních forem kyslíku a dusíku nebo zpomalit či úplně zastavit jejich reakce s biologickými strukturami. V užším slova smyslu jde o skupinu látek, nacházejících se v živých organismech. Právě pro jejich ochranné vlastnosti před volnými radikály jsou pro živé organismy nezbytné, neboť se v nich odehrává řada procesů, při kterých vznikají reaktivní formy, látky organismy poškozující, tedy velmi nebezpečné, a způsobující řadu chorob.

Látky působící jako antioxidanty mají obecně různou účinnost, která se dá kvantifikovat pomocí veličiny zvané antioxidační kapacita. Vzniklo mnoho metod, které ji umožňují změřit. Jedna z metod využívá emise světla uvolněné při chemiluminiscenční reakci luminolu. Emisi světla u luminolu vyvolávají právě volné radikály a to předurčuje chemiluminiscenční metody k měření antioxidační kapacity.

Antioxidanty se dělí na hydrofilní a lipofilní. Protože lipofilní antioxidanty nelze rozpustit ve vodném prostředí, je obtížné stanovit jejich antioxidační kapacitu metodami, které se používají pro hydrofilní antioxidanty. Řešení těchto obtíží u lipofilních antioxidantů spočívá v jejich solubilizaci za použití povrchově aktivních látek.

Cílem této práce je zjištění interakce povrchově aktivních látek s reakční směsí, která obsahuje křenovou peroxidasu, luminol, peroxid vodíku a antioxidant při fyziologickém pH (7,4). Studium vlivu povrchově aktivních látek na celý chemiluminiscenční systém je nezbytné, neboť u některých povrchově aktivních látek existuje možnost, že jejich působením dojde k denaturaci křenové peroxidasy. Dalším cílem práce je nahrazení křenové peroxidasy anorganickým systémem a provedení obdobné studie vlivu povrchově aktivních látek na reakční směs. Reakční směs, poskytující obdobné výsledky jako reakční směs s křenovou peroxidasou obsahuje: chlorid kobaltnatý, luminol, peroxid vodíku a pufr Bis-Tris (pH = 8). V práci bylo pro solubilizaci lipofilních antioxidantů testováno pět povrchově aktivních látek a byl studován jejich vliv na stanovení antioxidační kapacity modelových hydrofilních a lipofilních antioxidantů.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 VOLNÉ RADIKÁLY

Radikálem se označuje atom nebo molekula s jedním nebo více nepárovými elektrony. Nepárové elektrony dávají volnému radikálu značný stupeň reaktivity [1]. Radikály se dělí na radikál anionty, radikál kationty a radikály bez náboje [2].

3.1.1 REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU

Reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species, ROS) se dělí na volné radikály a reaktivní formy neradikálové povahy. Další způsob dělení je na iontové a neiontové [3].

Metabolické pochody v těle jsou doprovázeny redoxními reakcemi, při kterých dochází k přenosu elektronů mezi biomolekulami. Metabolické pochody reprezentují nezbytnou část aerobního života, protože kyslík je konečným akceptorem elektronu v systému produkujícího energii ve formě ATP. V uvedeném systému probíhají dvouelektronové redoxní reakce, problémy nastávají, začne-li docházet k přenosu samostatných elektronů, tím se začnou generovat volné radikály.

Mezi příklady kyslíkových volných radikálů, známé jako reaktivní formy kyslíku, zahrnujeme superoxidový radikál anion ($O_2^{\cdot-}$), hydroperoxylový radikál (HO_2^{\cdot} , jde o protonovanou formu superoxidového radikál aniontu), alkoxylové radikály (RO^{\cdot}), peroxylové radikály (ROO^{\cdot}) a hydroxylový radikál (OH^{\cdot}). Dále také existují reaktivní formy kyslíku neradikálové povahy, jako jsou singletový kyslík (1O_2), ozon (O_3), peroxid vodíku (H_2O_2) a kyselina chlorná ($HClO$) [4].

Radikály odvozené od kyslíku reprezentují nejdůležitější skupinu radikálových forem tvořících se v organismu. Molekula kyslíku má unikátní elektronovou konfiguraci, přidá-li se k ní jeden elektron, vznikne superoxidový radikálový anion, který je považován za primární ROS. Přidáním dalšího elektronu k superoxidovému radikálu se zformuje anion peroxidu vodíku, ze kterého vznikne přidáním třetího elektronu hydroxylový radikál. Hydroxylový radikál je jeden z nejreaktivnějších, a proto je nebezpečný.

Superoxidový radikál anion může dále interagovat, přímo nebo za enzymové katalýzy nebo katalýzy kovem, s dalšími molekulami za vzniku sekundárních ROS [1].

Zdroje vzniku ROS mohou být endogenní i exogenní. Potencionální endogenní zdroje zahrnují mitochondrie, metabolismus cytochromu P450, peroxisomy a aktivaci

zánětlivých buněk. Například mitochondrie vyrábí značné množství peroxidu vodíku a superoxidového radikál aniontu.

Kromě mitochondrií existují ještě další možnosti vzniku tohoto radikálu, např. reakcemi katalyzovanými xanthinoxidasou, enzymem, který je značně rozšířen (od bakterií po lidi) a nejhojněji se vyskytuje uvnitř různých tkání savců. Xanthinoxidasa katalyzuje reakci hypoxanthinu na xanthin a dále xanthinu na kyselinu močovou. V obou krocích se redukuje kyslík a tím vzniká superoxidový radikál anion a z něj pak disproportionací peroxid vodíku.

Hlavním zdrojem všech radikálů ve zdravém organismu a především v živočišných buňkách je redukce jednoho elektronu molekulárního kyslíku, čímž vzniká superoxidový radikál anion. Tento radikál se tvoří v komplexu NADPH oxidasy v cytoplasmatické membráně, membránách endoplasmatického retikula nebo v dýchacím řetězci na vnitřní membráně mitochondrií.

Superoxidový radikál anion je schopen redukovat trojmocné železo uložené ve ferritinu nebo obsažené v komplexech železa na dvojmocné železo za podmínek nepříznivých pro buňku. Dvojmocné železo dobře reaguje s peroxidem vodíku nebo chlornanem za vzniku hydroxylového radikálu. Hydroxylový radikál spouští proces lipidové peroxidace a generování lipidových radikálů [5].

Další endogenní zdroje buněčných ROS jsou neutrofilie, eozinofily a makrofágy (druhy bílých krvinek). Při imunitní odpovědi se makrofágy aktivují, spouští se proces zvaný respirační vzplanutí fagocytů a vzniká superoxidový radikál anion, oxid dusnatý a peroxid vodíku. Proces je doprovázen zvýšeným příjmem kyslíku.

ROS mohou být produkovány také řadou exogenních procesů. ROS lze přímo získat nebo nepřímo vyvolat environmentálními látkami, včetně negenotoxických karcinogenů [6].

3.1.2 REAKTIVNÍ FORMY DUSÍKU

Reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species, RNS) jsou odvozeny od dusíku a dělí se na radikálové a neradikálové, iontové (např. peroxonitritový anion) a neiontové (např. oxid dusnatý) [3].

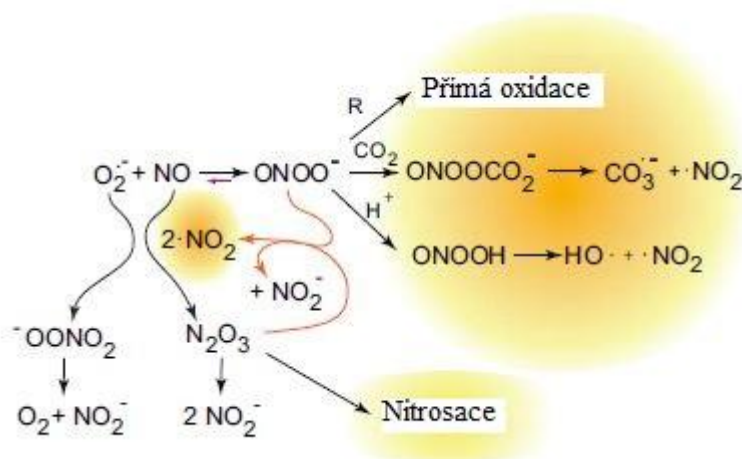
Mezi radikálové patří oxid dusnatý ($\text{NO}\cdot$) a dusičitý ($\text{NO}_2\cdot$), mezi neradikálové RNS patří nitrosylový kation (NO^+), nitroxyl (NO^-), kyselina dusitá (HNO_2), oxid dusitý

(N_2O_3), oxid dusičitý (N_2O_4), peroxonitritový anion (peroxodusitan, $ONOO^-$) a alkylperoxynitrit ($ROONO$) [7].

Oxid dusnatý je malá molekula obsahující jeden nepárový elektron, a proto je radikálem. NO radikál vzniká v biologických tkáních specifickou syntézou oxidu dusnatého, při které se metabolizuje arginin na citrulin za katalýzy NO synthasy prostřednictvím pěti elektronové oxidační reakce. Oxid dusnatý je velmi reaktivní radikál, hrající roli důležité biologické signalizační molekuly, v široké škále různých fyziologických procesů. Mezi tyto procesy se řadí neurotransmise, regulace krevního tlaku, relaxace hladkého svalstva a imunitní regulace.

Jak již bylo uvedeno, buňky imunitního systému (makrofágy) vytvářejí během respiračního vzplanutí, spuštěného zánětlivými procesy, superoxidový radikál anion a oxid dusnatý, které spolu za těchto podmínek reagují a produkují významné množství více reaktivního peroxonitritového aniontu [1]. Peroxonitritový anion se dále rozkládá na dusitan a kyslík (Obr. 1).

Peroxonitritový anion je efektivnější pro tvorbu hydroxylového radikálu než reakce železnatých iontů s peroxidem vodíku (známá jako Fentonova reakce). Peroxonitritový anion je silný oxidant a může přímo reagovat se skupinami bohatými na elektrony [8].



Obrázek 1: Vzájemné působení oxidu dusnatého, superoxid radikál aniontu, peroxinitritového aniontu a oxidu dusičitého [8].

3.1.3 ŠKODLIVOST ROS A RNS

Protože antioxidanty nejsou úplně spolehlivá ochrana organismu před volnými radikály, může docházet ke vzniku nadbytku volných radikálů v těle, čímž dochází k většímu poškození organismu. Tomuto efektu se říká oxidační stres. Pokud se objeví

mírný oxidační stres, tkáň na něj obvykle odpoví vytvářením většího množství antioxidantů. Když už je stres vážný, způsobí buňkám poškození a jejich následnou smrt. Buněčná smrt zapříčiněná volnými radikály může vést až k odumření tkáň (nekróza) nebo k řízené buněčné smrti (apoptóza) [9].

Příčinou oxidačního stresu je nedostatečné množství antioxidantů. Jejich nedostatek může být způsoben např. mutacemi, které ovlivní aktivitu enzymatických antioxidantů, nebo toxickými látkami, které vyčerpávají enzymatické antioxidanty (např. většina xenobiotik je metabolizována konjugací s glutathionem a vysoké dávky xenobiotik mohou způsobit jeho vyčerpání). Další příčinou oxidačního stresu může být zvýšená produkce ROS a RNS v důsledku vystavení většímu množství toxinů. Toxiny jsou samy o sobě reaktivními formami (např. plyn oxidu dusičitého, $\text{NO}_2\cdot$) nebo jsou metabolizovány tak, že generují tyto formy [10].

Ve vysokých koncentracích mohou ROS velmi škodit, protože poškozují lipidy v buněčných membránách, proteiny v tkáních nebo enzymech, sacharidy a DNA a vyvolávají oxidace, které způsobují poškození membrán, DNA a změnu struktury proteinů a enzymů. Tyto typy poškození hrají hlavní roli v procesech stárnutí a vzniku některých degenerativních nemocí (např. nemoci srdce, šedý zákal, kognitivní dysfunkce a rakovina) [4].

Hydroxylový radikál je schopen reagovat se všemi komponentami v molekule DNA a poškozovat jak purinové a pyrimidinové báze, tak páteř deoxyribosy. Trvalá změna genetického materiálu, která vyústí z oxidativního poškození, reprezentuje první krok k mutagenезi, karcinogenезi a stárnutí.

Je známo, že kovy vyvolaný vznik ROS, nemá za následek pouze útok na DNA, ale také na jiné části buněk, zahrnující zbytky polynenasycených mastných kyselin, fosfolipidů, které jsou extrémně citlivé na oxidaci [1].

RNS jako peroxonitritový anion a oxidy dusíku také způsobují poškození DNA, konkrétně peroxonitritový anion způsobuje fragmentaci DNA. Po reakci s guaninem se peroxonitritový anion přemění na 8-nitroguanin. Kvůli jeho struktuře vyvolá tento adukt tzv. transverzi guanin : cytosin na thymín : adenin. Zatímco v DNA je dusíkový adukt málo stabilní, v RNA vykazuje stabilitu mnohem vyšší [6].

Oxid dusnatý narušuje dýchání navázáním na hemové skupiny v proteinech. Jeho přítomnost v mitochondriích může pozměnit mnoho procesů např. dýchání, vznik mitochondrií a oxidační stres [3].

Vedle oxidačního stresu, existuje ještě dusíkový stres, který je způsoben zvýšenou produkcí reaktivních forem dusíku a nastává v případě, že vznik RNS v systému překročí jeho schopnost je neutralizovat. Dusíkový stres může vést k reakcím, které pozměňují strukturu proteinů a tím jim brání v jejich normálních funkcích [1].

3.2 ANTIOXIDANTY

Přírodní antioxidanty se nacházejí v zelenině, ovoci, koření, čaji a bylinkách. Jako jejich zdroje mohou také posloužit olejnatá semena, ořechy, obiloviny, luštěniny a živočišné produkty. Konzumace antioxidantů snižuje riziko rakoviny a kardiovaskulárních onemocnění [11].

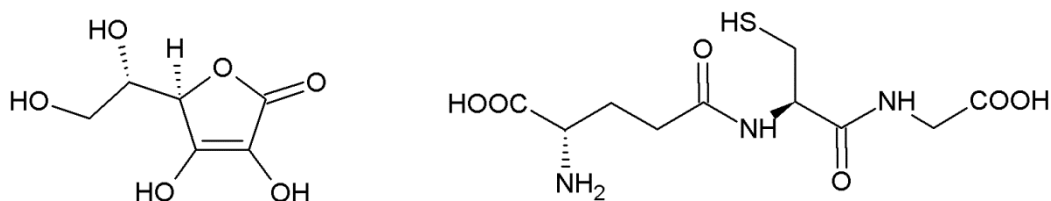
Jak již bylo zmíněno, antioxidanty jsou přírodní molekuly, které mají schopnost předcházet nekontrolovatelnému vzniku volných radikálů, reaktivních forem kyslíku a dusíku nebo zpomalit či úplně zastavit jejich reakce s biologickými strukturami [12].

Tím, že je organismus vystaven různým zdrojům volných radikálů, je donucen si rozvinout mnoho obranných mechanismů proti oxidačnímu stresu. Mezi tyto mechanismy se řadí mechanismy prevence, opravy, fyzické mechanismy ochrany a antioxidanty [1].

3.2.1 DĚLENÍ ANTIOXIDANTŮ

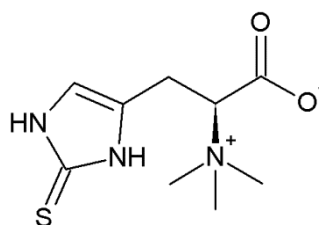
Antioxidanty se dají rozdělit na enzymatické, zahrnující superoxiddismutasu, glutathionperoxidasu a katalasu, a neenzymatické, mezi které patří tzv. nízkomolekulární antioxidanty – kyselina askorbová (vitamin C), tokoferol (vitamin E), glutathion, karotenoidy a flavonoidy. Za normálních okolností je mezi oběma skupinami nastolena rovnováha nezbytná pro zdraví a přežití organismů [1].

Nízkomolekulární antioxidanty se dělí na hydrofilní a lipofilní. Hydrofilní antioxidanty nalezneme v cytosolických, mitochondriálních a jaderných prostorech. Nejdůležitější z nich jsou askorbát a glutathion (Obr. 2). Jejich koncentrace uvnitř buněk se pohybuje v rozmezí 1 – 10 mmol/l. Hydrofilní antioxidanty zachytávají kyslíkové volné radikály ve vodě za pomoci přesunutí jednoho elektronu nebo atomu vodíku.



Obrázek 2: Vzorec kyseliny askorbové a glutathionu.

Mezi zástupce hydrofilních antioxidantů patří také ergothionein (Obr. 3), který se v současné době stává předmětem intenzivního výzkumu. Jde o aminokyselinu, jejíž struktura je uvedena na Obr. 3. Je syntetizován pouze plísněmi a mykobakteriemi, zachytáván kořeny rostlin a do buněk savců se dostává v potravním řetězci. V organismu je transportován specifickým proteinem ETT do míst s vysokou potencionální mírou oxidačního stresu – oční čočka, játra, kůže, seminální plasma apod., jeho koncentrace v některých tkáních dosahuje 0,1 – 1 mmol/l, což ho staví do pozice mocného chemického zachytávače mnoha kyslíkových forem. V organismu zachytává hydroxylové radikály, peroxonitritové anionty a zhaší singletový kyslík. Především však zachytává kyselinu chlornou produkovanou myeloperoxidase v leukocytech a hyper-valentní komplexy železa odvozené od myoglobinu a hemoglobinu [12].



Obrázek 3: Vzorec ergothioneinu.

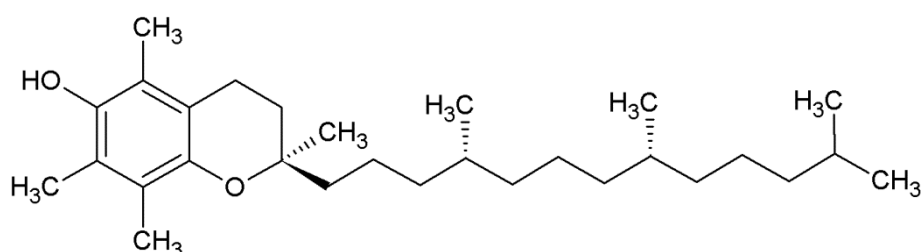
Dalšími hydrofilními antioxidanty jsou flavonoidy patřící mezi polyfenoly, které se běžně vyskytují v rostlinách jako jejich sekundární metabolity. Nejvíce flavonoidů lze získat ze zeleniny, z ovoce a z nápojů. Jejich antioxidační aktivita se uplatňuje při zablokování procesů způsobených enzymy (xanthinoxidasa, myeloperoxidasa, lipoxygenasa a cyklooxygenasa) [11].

V buněčných systémech se nachází buněčné membrány, jejichž součástí jsou lipoproteiny. Buněčná membrána se skládá z fosfolipidové dvojvrstvy a proteinu. Lipidy obsažené v buněčných membránách a lipoproteinech jsou poškozovány reaktivními formami kyslíku specifickým metabolickým pochodem, který se nazývá peroxidace lipidů. Peroxidace lipidů je řetězový proces, který nastává v případě, že ROS začnou přejímat elektrony lipidům, což způsobí jejich oxidativní degradaci a tím dojde k poškození buněk. Peroxidace lipidů probíhá ve třech krocích – propagace, iniciace a terminace.

Před lipidovou peroxidací buňku chrání lipofilní antioxidanty, které přerušují tento řetězový proces již v propagačním kroku nebo mu úplně zabrání zničením peroxidového radikálu nebo zablokováním vzniku hydroperoxidů ze singletových kyslíků 1O_2 .

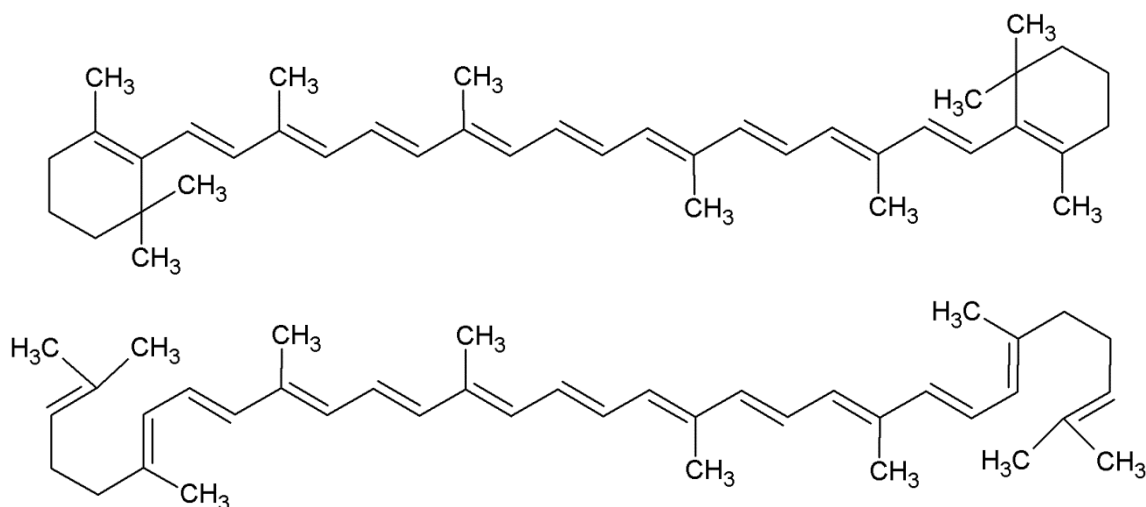
V živočišných buňkách mezi lipofilní antioxidanty zahrnujeme primární α -tokoferol, který zachytává radikály vzniklé z peroxidace lipidů, sekundární karotenoidy, zachytávající volné radikály a zhášející singletový kyslík, a redukovanou formu koenzymu Q, tzv. ubichinol [12].

Vitamin E zahrnuje skupinu účinných antioxidantů. Strukturní analýzy odhalily, že molekuly s antioxidační kapacitou vitaminu E zahrnují čtyři tokoferoly (α , β , γ , δ) a čtyři tokotrienoly (α , β , γ , δ). V přírodě se vitamin E nejčastěji vyskytuje ve formě α -tokoferolu, který je nejúčinnějším antioxidantem proti peroxidovým radikálům ve fosfolipidové dvojvrstvě [13].



Obrázek 4: Vzorec α -tokoferolu.

Mezi další antioxidanty ukotvené v buněčných membránách patří karotenoidy (např. lykopen, β -karoten) a polárnější oxykarotenoidy nebo xantofyly obsahující keto a/nebo hydroxy skupiny na koncovém kruhu. Karotenoidy se vyskytují uvnitř jádra hydrofobní membrány s mnohačetnými orientacemi, zatímco xantofyly obvykle přijímají rigidní orientaci. Karotenoidy se chovají jako zhášecí singletového kyslíku, což je jejich hlavní předností [12].



Obrázek 5: Vzorec β -karotenu a lykopenu.

3.2.2 ANTIOXIDAČNÍ KAPACITA

Antioxidační kapacita je veličina umožňující kvantifikovat schopnost sloučeniny významně potlačit, zpomalit nebo předejít zdraví škodlivým procesům oxidace, za které jsou zodpovědné reaktivní formy kyslíku či jiné radikály. Protože jsou tyto reaktivní formy považovány za vznik mnoha nemocí, je vynaloženo velké úsilí na vývoj metody pro zhodnocení antioxidační kapacity rozmanitých sloučenin a rostlinných extraktů [14].

Celková antioxidační kapacita (total antioxidant capacity, TAC) je často používaný parametr pro charakteristiku potravinářských výrobků a antioxidačního statusu těla (tělních tekutin, tkání, apod.) [15].

3.3 METODY NA MĚŘENÍ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITY

Pro zhodnocení antioxidační kapacity bylo vyvinuto mnoho metod. Většina metod pro stanovení antioxidační kapacity spočívá v:

1. Generaci vhodného volného radikálu.
2. Volný radikál reaguje s indikátorem a indikátor je volen tak, že průběh reakce je snadno monitorovatelný vhodnou analytickou metodou, např. fluorescenční spektrometrií, spektrofotometrií, chemiluminiscencí apod.
3. Při přidání vzorku, jehož antioxidační kapacita je stanovována, dochází ke zpomalení příp. zastavení reakce mezi volným radikálem a indikátorem, protože volné radikály reagují s molekulami antioxidantů ve vzorku.
4. Antioxidační kapacita se stanoví buďto ze změny kinetiky reakce volného radikálu s indikátorem po přidání vzorku antioxidantu nebo z času, po který je indikační reakce potlačena. Antioxidační kapacita se zpravidla vyjadřuje relativním způsobem, tzn., že výsledky metody se vztahují k vhodnému standardu (nejčastěji k troloxu, ke kyselině gallové apod.).

Nejčastěji využívanými metodami založenými na výše uvedeném principu jsou: total radical trapping parameter (TRAP), trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) a oxygen radical absorbance capacity (ORAC) [14]. Alternativně se dá antioxidační kapacita určit stanovením celkového množství antioxidantů (TAC) ve vzorku, které se měří chemickými metodami se spektrometrickou nebo fluorimetrickou detekcí. Mezi tyto

metody se řadí ABTS/TEAC (ABTS = [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazol-6-sulfonová kyselina)]), FRAP, DPPH a CUPRAC [15].

Při reakcích antioxidantů s volnými radikály resp. redukčními činidly se uplatňují dva základní mechanismy – přenos atomu vodíku (hydrogen atom transfer, HAT) a přenos elektronu (electron transfer, ET). Metody pro stanovení antioxidační kapacity lze rozdělit dle převažujícího mechanismu.

Metody, založené na HAT principu, kvantifikují schopnost antioxidantu likvidovat volné radikály formálním předáním atomu vodíku. Nejčastěji se HAT mechanismus uplatňuje při reakcích sloučenin fenolického typu (Ar-OH) s ROO· radikály. Uvedené reakce se nejčastěji monitorují metodami ORAC a TRAP [15].

ET metody se uplatňují při metodách stanovení antioxidační kapacity, které využívají redukční schopnost antioxidantů. Při těchto metodách je ke vzorku, který obsahuje antioxidanty přidáno vhodné činidlo (kovový ion - Fe³⁺, Cu²⁺, příp. vhodné radikály – ABTS^{•+} radikál kation apod.) přenosem elektronu [16]. Jak se činidlo (působící jako oxidant) redukuje, dochází ke změně jeho zabarvení, která se sleduje spektrofotometricky. Mezi tyto metody se řadí ABTS/TEAC, FRAP, DPPH a CUPRAC [15].

3.3.1 ORAC

Metoda ORAC byla poprvé navržena v pracech Ghiselliho et al. [17] a Cao et al. [18]. Základem metody je použití bis azidového iniciátoru jako AAPH [2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid], který při zahřátí, za přítomnosti dostatečného množství kyslíku, vytváří peroxidové radikály. Radikály potom reagují s fluorescenční sondou a dochází ke zhášení její fluorescence. Pokles fluorescence se sleduje spektrofotometricky. Porovnává se pokles fluorescence reakční směsi obsahující pouze peroxidové radikály a fluorescenční sondu s poklesem fluorescence směsi, která obsahuje navíc ještě antioxidant. Pokles fluorescence je pomalejší v přítomnosti antioxidantu. Antioxidační kapacitu určuje plocha mezi křivkami, které vyjadřují zhášení fluorescence v obou uvedených případech [15].

Původní ORAC metoda využívala jako sondu fluorescenční protein β-fykoerythrin. Kvůli problémům s nekonzistentností výsledků, citlivostí na světlo a reakcím s polyfenoly byl β-fykoerythrin nahrazen fluoresceinem [15]. Fluorescein je fluorescenční indikátor,

který je stabilní a má vysoký kvantový výtěžek fluorescence [19]. Použitím fluoresceinu bylo dosaženo reprodukovatelnějších výsledků než v případě použití β -fykoerythrinu [20].

ORAC je široce používaná metoda v USA, kde s její pomocí měří celkovou antioxidační kapacitu vzorků rozmanitého původu (farmaceutické produkty, potravinářské a zemědělské výrobky a vzorky lidského a zvířecího krevního séra). Jako kalibrační standard se používá trolox, ve vodě rozpustný analog vitamínu E [21].

Nevýhodou ORAC metody je, že metodou není možné měřit lipofilní antioxidanty. Aby byla ORAC metoda použitelná na lipofilní antioxidanty, došlo k její modifikaci. Solubilizace lipofilních antioxidantů byla umožněna pomocí roztoku (50% aceton/50% voda (v/v)) obsahujícího 7% náhodně methylovaného β -cyklodextrinu [16].

3.3.2 TRAP

Metoda TRAP byla popsána Waynerem et al. [22]. Stanovuje schopnost antioxidantu ovlivnit reakci mezi peroxidovými radikály a cílovou sondou. Principiálně je variantou metody ORAC, ale používá širší rozmezí iniciátorů a sond. Iniciační radikály jsou generovány azidy (např. AAPH), enzymy (např. křenová peroxidasa), $\text{NO}\cdot$ radikálem, singletovým kyslíkem nebo ABTS. Jako sondy se používají dichlorofluorescein diacetát, β -fykoerythrin, fluorescein a luminol [15].

Podobně jako u metody ORAC, i zde dochází ke zhášení fluorescence sondy volnými radikály, kdy v přítomnosti antioxidantu je zhášení fluorescence potlačeno. Oxidace sondy je sledována opticky nebo pomocí fluorescence.

Metoda TRAP má několik předpokladů, které by měly být splněny:

- sonda musí reagovat s $\text{ROO}\cdot$ radikálem v nízkých koncentracích,
- musí se projevit dramatická spektroskopická změna mezi původní a oxidovanou sondou pro dosažení co největší intenzity,
- nesmí se objevit radikálová řetězová reakce při oxidaci sondy.

Antioxidační kapacitu určuje plocha mezi křivkami, které vyjadřují zhášení fluorescence reakční směsi v přítomnosti antioxidantu a bez něj. Jako kalibrační standard se opět používá trolox.

TRAP metoda se nejčastěji používá na měření antioxidační kapacity krevního séra nebo plasmu, protože se měří nízkomolekulární antioxidanty (glutathion, kyselina askorbová, α -tokoferol a β -karoten) [16].

3.3.3 TEAC

TEAC je poměrně levná a jednoduchá metoda. K měření antioxidační kapacity využívá reakci $\text{ABTS}^{\cdot+}$ radikál kationtu se vzorkem antioxidantu. $\text{ABTS}^{\cdot+}$ radikál kation je relativně stálý, má intenzivní modrozelené zabarvení a jeho absorpční maxima jsou při vlnových délkách 645, 734, 815 a 415 nm, nicméně nejvíce se při měření antioxidační kapacity používá vlnová délka 415 nm [23]. $\text{ABTS}^{\cdot+}$ radikál kation je rozpustný ve vodě i v organických rozpouštědlech a není ovlivňován iontovou silou. Lze ho tedy použít v mnoha médiích k určení antioxidační kapacity hydrofilních i lipofilních vzorků různých extraktů a tělních tekutin [16].

Původní metoda navržená Millerem a Rice-Evansem [24] nazývaná jako TEAC I využívala metmyoglobin a H_2O_2 k vytvoření HO^{\cdot} radikálu. Ten pak reagoval s ABTS za vzniku $\text{ABTS}^{\cdot+}$ radikál kationtu. Vzhledem k tomu, že docházelo k reakcím HO^{\cdot} radikálu s antioxidanty, byly výsledky antioxidační kapacity nejasné. Proto došlo k úpravě metody, čímž vznikla metoda TEAC II [15].

TEAC II metoda k vytvoření $\text{ABTS}^{\cdot+}$ radikál kationtu využívá reakci s MnO_2 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, případně enzymovou reakci s hemoglobinem nebo křenovou peroxidasou. Chemická reakce vyžaduje hodně času (např. 16 hodin u reakce s $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) nebo vysokou teplotu (60 °C). Naopak enzymové reakce jsou rychlejší a jejich podmínky mírnější [25]. Jako nejvýhodnější se ukázalo použití $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, protože poskytuje vysoký výtěžek $\text{ABTS}^{\cdot+}$ radikál kationtu a je netečný vůči radikálům a antioxidantům [15].

Po vytvoření $\text{ABTS}^{\cdot+}$ radikál kationtu se do reakční směsi přidají testované antioxidanty a měří se jejich schopnost odbarvit $\text{ABTS}^{\cdot+}$ radikál kation. Stupeň odbarvení určuje množství radikálu, který zreagoval s antioxidantem, což také určuje antioxidační kapacitu antioxidantu. Výsledky se vyjadřují v porovnání s troloxem [16].

3.3.4 DPPH

DPPH je zkratka pro di(fenyl)-(2,4,6-trinitrofenyl)iminoazanium. Je to jeden z mála stabilních organických dusíkatých radikálů. Má tmavě nachovou barvu. Není třeba ho generovat před pokusem jako $\text{ABTS}^{\cdot+}$. Metoda měří schopnost antioxidantu redukovat DPPH, což se vyhodnocuje pomocí elektronové paramagnetické resonance (EPR) nebo měřením poklesu absorbance [16].

Poprvé tuto široce používanou odbarvovací metodu popsal Brand-Williams [26]. Antioxidační analýza se zakládá na spektrofotometrickém stanovení ztráty zabarvení

roztoku DPPH, při vlnové délce 515 nm, po reakci s testovanými sloučeninami [16]. Krystaly DPPH se rozpustí v methanolu nebo ethanolu, změří se výchozí absorbance, přidá se testovaný antioxidant a po 30 minutách se zjistí konečná absorbance. Antioxidační kapacita se určuje hodnotou IC₅₀ (koncentrace antioxidantu, která je potřebná na snížení absorbance DPPH na polovinu), procentuální ztrátou, původní absorbcí nebo EPR signálem. DPPH metoda je jedna z nejlevnějších, nejsnadnějších, a proto nejpoužívanějších metod pro stanovení antioxidační kapacity [15].

3.3.5 FRAP

FRAP je zkratka pro metodu označovanou jako ferric reducing antioxidant power metoda nebo někdy v literatuře uváděnou jako ferric reducing ability of plasma. Benzie a Strain [27][28] původně FRAP vyvinuli pro měření redukční síly krevní plasmy, ale následně byla adaptována a používána i na antioxidanty z rostlinných výtažků [16].

Metoda je založena na redukci trojmocného železa na dvojmocné, a to díky přítomnosti antioxidantů. Dvojmocné železo následně reaguje s 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-azinem (TPTZ) a poskytuje komplex, jehož absorpční maximum je při vlnové délce 593 nm [29]. Reakce probíhá při nízkém pH (3,6) a je provázena barevnou změnou. FRAP měří spíše redukční schopnost antioxidantů než jejich antioxidační kapacitu. Naměřené hodnoty se zanesou do grafu (závislost absorbance na koncentraci Fe²⁺ iontů) a vytvoří se kalibrační přímka, ze které se posléze vypočítá redukční schopnost antioxidantů [30].

3.3.6 CUPRAC

Metoda redukce mědi (copper reduction) je varianta FRAP, kdy se místo železa používá měď. Její podstatou je redukce mědi z oxidačního stavu dva do stavu jedna, antioxidanty obsaženými ve vzorku [16]. Jde o měření absorbance chromoforu CUPRAC, Cu(I)-neokuproin chelátu, který vznikne redoxní reakcí antioxidantů s CUPRAC činidlem, bis(neokuproin)mědnatým kationtem. K největší absorpci světla dochází při vlnové délce 450 nm. Metoda dokáže úspěšně změřit celkovou antioxidační kapacitu antioxidantů v potravinách či lidském séru [15].

3.3.7 CHEMILUMINISCENČNÍ METODY

Chemiluminiscence (CL) je definována jako emise světla, která je následkem vzniku elektronově excitovaných stavů zformovaných chemickou reakcí. Elektronově

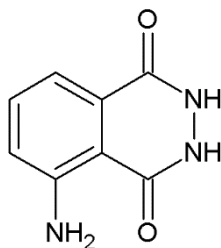
excitovaný produkt exotermické reakce relaxuje do základního stavu za současného vyzáření fotonů. Rozmezí vlnových délek emitovaného světla je u CL reakcí široké – od blízké ultrafialové oblasti po infračervenou oblast. Počet emitovaných fotonů při návratu excitovaných molekul do základního stavu vyjadřuje kvantový výtěžek.

Chemická reakce musí produkovat energii v dostatečném množství, aby vyvolala přechod elektronu ze základního do excitovaného elektronického stavu. Protože emise světla je kvantována, musí při reakci vedoucí k excitaci dojít k dodání alespoň takové energie, která je rovna nejkratší pozorované vlnové délce. Viditelnému světlu odpovídá energie od 168 do 294 kJ · mol⁻¹ [31]. Elektronový přechod je doprovázen vibračními a rotačními změnami v molekule. Excitovaná molekula však může ztratit energii i vstupem do chemické reakce, kolizní deaktivací, vnitřním přechodem nebo mezisystémovým přechodem, tyto procesy snižují účinnost chemiluminiscenční reakce [32].

Většina chemiluminiscenčních reakcí spadá pod reakce oxidační, což znamená, že vyžadují oxidační činidlo. Jako oxidační činidla se nejčastěji používají činidla odvozená od kyslíku – např. molekulární kyslík, peroxid vodíku nebo jiné peroxidy, kyslíkové radikály – superoxidový radikál anion, peroxylové radikály, hydroxylový radikál [31].

Chemiluminiscence se využívá v analytické chemii, metoda nabízí jednoduchost, citlivost, nízké detekční limity, široké lineární dynamické rozsahy a rychlou odezvu. Hojně se používá na sledování volných radikálů [14].

Nejznámější chemiluminiscenční reakcí je chemiluminiscence luminolu (5-amino-2,3-ftalazindion), která patří mezi přímé chemiluminiscence, což znamená, že reakční produkt aminoftalát je primární excitovanou formou [31]. Luminol reaguje s peroxidem vodíku v alkalickém prostředí. Produktem této reakce je dianion 3-aminoftalové kyseliny, jejíž vznik je doprovázen fluorescencí světla. Této reakce lze využít k určení tří typů sloučenin – sloučenin a iontů katalyzujících reakci, sloučenin měnících chování katalyzátorů a sloučenin vytvářejících peroxid vodíku v průběhu reakce [33].



Obrázek 6: Chemická struktura luminolu.

Některé z prvotních analytických aplikací zahrnují určení aminů benzoyl peroxidem a určení druhů chloru nebo stanovení trojmocného chromu ve stopových množstvích luminolem a peroxidem vodíku [14].

Luminol je kosubstrátem křenové peroxidasy (horseradish peroxidase, HRP), která katalyzuje oxidaci luminolu v přítomnosti peroxidu vodíku. Křenová peroxidasa reaguje s peroxidem vodíku a vzniká oxidovaná HRP I, která následně reaguje s aniontem luminolu za vzniku částečně redukovaného enzymu HRP II a radikálové formy luminolu. Enzym se vrací do své redukované podoby HRP reakcí s druhou molekulou luminolu (Schéma 1) [32].

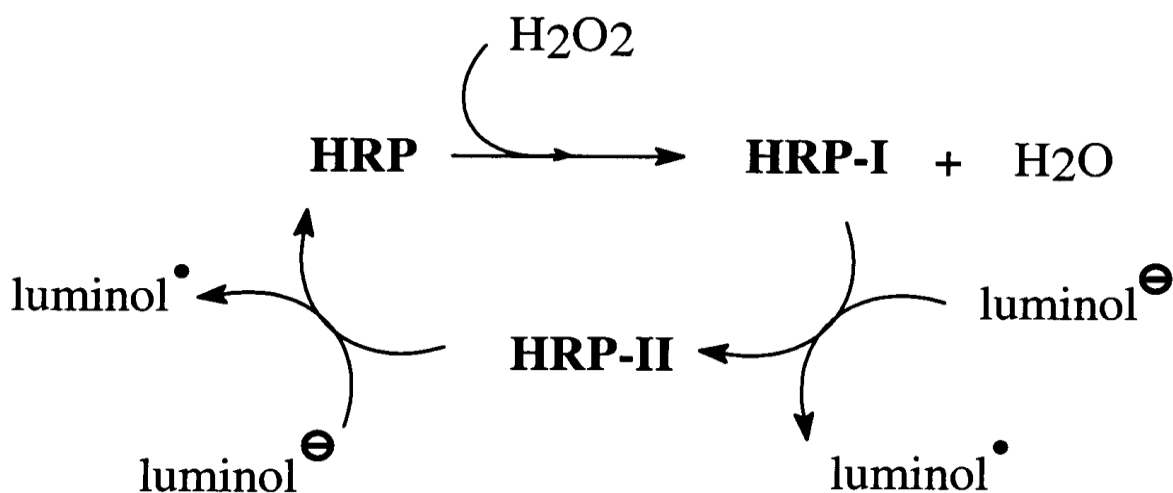
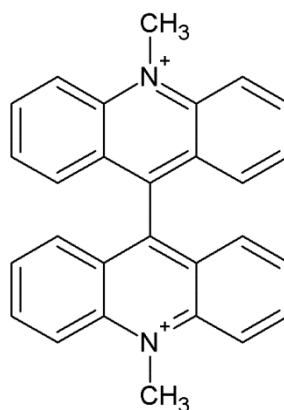


Schéma 1: Reakční mechanismus luminolu s peroxidem vodíku katalyzovaný křenovou peroxidasou [32].

Oxidace luminolu může probíhat dvěma způsoby. Prvním způsobem dochází k jedoelektronové oxidaci luminolu a vzniká semidiazachinon, který je dále potřeba oxidovat superoxidovým radikál aniontem. Druhým způsobem je dvoelektronová oxidace luminolu, kdy vzniká diazachinon, který je dále oxidován peroxidem vodíku. Produktem obou reakcí je α -hydroxyperoxid, který se rozkládá na aminoftalátový anion a dusík se současnou emisí světla.

Další používanou chemiluminiscenční reakcí je chemiluminiscence lucigeninu (bis-N-methylakridinium nitrát), která doprovází jeho reakci s peroxidem vodíku [34].

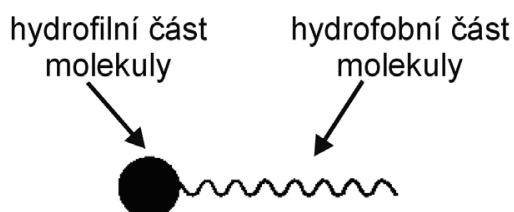


Obrázek 7: Chemická struktura lucigeninu [34].

3.4 POVRCHOVĚ AKTIVNÍ LÁTKY, MICELÁRNÍ SYSTÉMY, SOLUBILIZACE

Povrchově aktivní látky (surfaktanty, detergenty, tenzidy) mají mnoho různých využití v průmyslu, ve farmacii, apod. Široké uplatnění mají např. v elektronickém tisknutí, biotechnologiích, mikroelektronice a při výzkumu virů. Využívány jsou ale i v běžném životě (prací a čisticí prostředky).

Molekula surfaktantu (Obr. 8) má amfifilní (amfipatický) charakter. Skládá se ze dvou odlišných částí, jedné polární a druhé nepolární. Polární, hydrofilní, část molekuly je afinitní k vodě a dalších polárním látkám (lyofilní), zatímco nepolární část je hydrofobní (lyofobní). Surfaktant se může rozpustit ve vodě jako monomer, naadsorbovat se na nějaký povrch nebo se začlenit spolu s dalšími molekulami surfaktantu jako součást micely.



Obrázek 8: Molekula surfaktantu.

Surfaktanty schopné formovat agregáty ve vodném roztoku jsou molekuly typu RX , kde hydrofobní část R zastupuje většinou alkylový řetězec o počtu 8 – 18 uhlíků. Klasifikace surfaktantu závisí na povaze jeho hydrofilní části X [35]. Vztah mezi hydrofilní částí a hydrofobním řetězcem udává hydrofilně-lipofilní rovnováha

(hydrophilic-lipophilic balance, HLP). HLP nabývá hodnot 0 – 20. Čím vyšší je hodnota HLP, tím snadněji tvoří surfaktant micely [36].

3.4.1 DĚLENÍ POVRCHOVĚ AKTIVNÍCH LÁTEK

V závislosti na povaze hydrofilní části X, dělíme surfaktanty do čtyř hlavních skupin na anionické (povrchově aktivní část molekuly nese negativní náboj), kationické s pozitivním nábojem, amfionické, kde mohou být přítomny obě části s pozitivním a negativním nábojem, a neionické bez náboje.

Každý typ surfaktantu je tvořen jinou hydrofilní částí X. U kationických surfaktantů ji tvoří např. kvarterní amoniové nebo fosfoniové skupiny, u anionických sírany, sulfonáty nebo karboxylové skupiny a u neionických polyoxyethylenové skupiny [35].

Povrchově aktivní látky, surfaktanty, jsou nazvány podle své schopnosti adsorbovat se do mezifázových rozhraní. Z roztoků se adsorbují např. na pevné povrchy. Většina přírodních povrchů má negativní náboj. Pokud chceme, aby byl povrch hydrofobní, měl by se použít kladně nabitý surfaktant. Tento typ se naadsorbuje na povrch jeho pozitivně nabitou hydrofilní částí k negativně nabitému povrchu (díky elektrostatické přitažlivosti) a jeho hydrofobní část se bude orientovat směrem pryč od povrchu, čímž se povrch stane vodě odolným. Naopak když má být povrch hydrofilní, je třeba použít anionický surfaktant [35].

Neionické surfaktanty se adsorbují s hydrofilní nebo lipofilní částí orientovanou k povrchu, což záleží na jeho povaze. Jsou-li na povrchu přítomné polární skupiny a schopné vodíkové vazby s hydrofilní částí surfaktantu, pak se pravděpodobně surfaktant naadsorbuje jeho hydrofilní částí směrem k povrchu a povrch se stane více hydrofobním. Pokud polární skupiny chybí, bude povrch hydrofilní.

Amfionické surfaktanty se mohou naadsorbovat, jak na negativně nabitě povrchy, tak na pozitivně nabitě bez zjevné změny jejich náboje, čemuž vděčí za to, že nesou oba náboje. Když se kationický nebo anionický surfaktant naadsorbuje na negativně nebo pozitivně nabitý povrch, pak může být náboj povrchu snížen nebo dokonce obrácen. Neionický surfaktant povrchový náboj nijak nemění.

Kromě adsorpce na pevné povrchy je důležitá i vlastnost surfaktantů akumulovat se na rozhraní mezi kapalinou a vzduchem. Dochází přitom ke snížení povrchového napětí kapaliny díky snížení mezifázové Gibbsovy energie [37].

3.4.2 MICELY

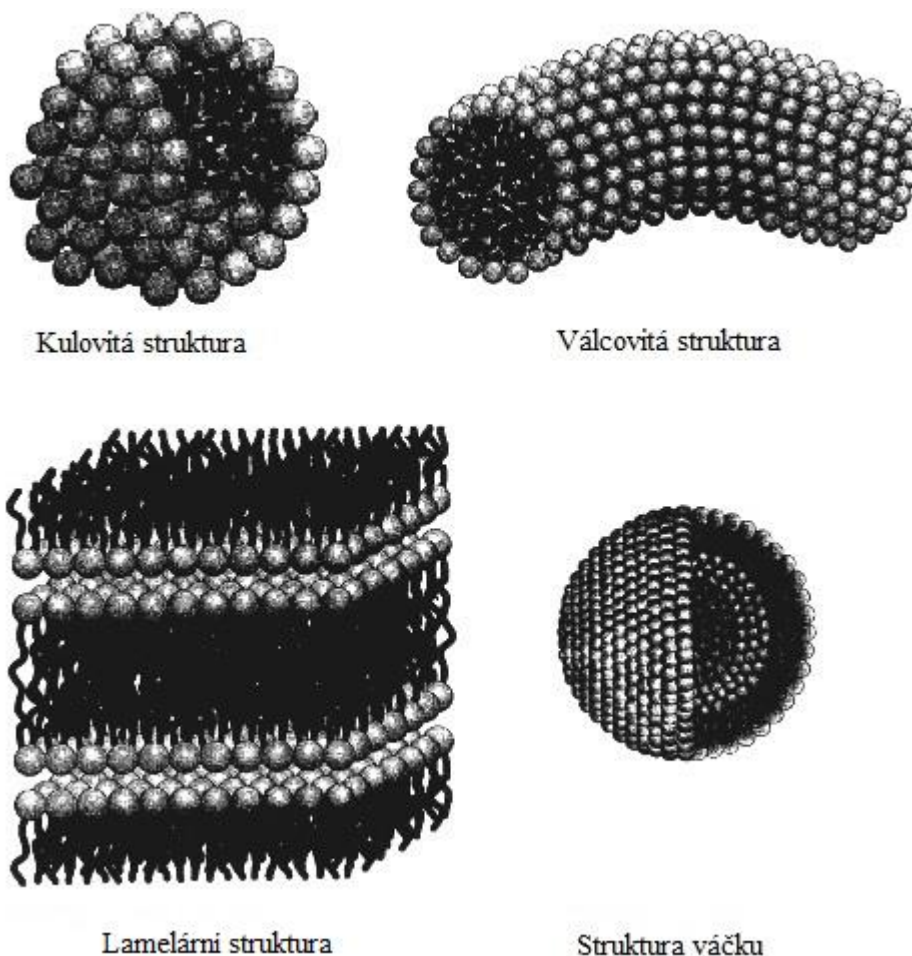
Micely jsou uspořádané koloidní agregáty vznikající ve vodných roztocích surfaktantů, u kterých jsou molekuly surfaktantu uspořádány tak, že hydrofobní části jsou uvnitř micely a hydrofilní skupiny jsou ve styku s roztokem. Koncentrace surfaktantu, při níž se monomery začínají shlukovat do micel, se nazývá kritická micelární koncentrace (critical micelle concentration, CMC) [38].

CMC je definována pro ionické surfaktanty, jde o nejnižší koncentraci, kdy se začínají formovat kulovité micely. Při jejich vzniku často dochází v systému k prudké diskontinuitě v jeho vlastnostech, mezi které se řadí povrchové napětí, konduktivita, rozptyl světla, vlastní difúze a molarita rozpuštěných složek. Podmínkami úspěšného vzniku micel jsou – dostatečná rozpustnost amfifilu ve vodě, prostředí, v němž micely vznikají, dostatečná délka hydrofobního řetězce (musí mít více jak deset uhlíků, čím delší je hydrofobní řetězec, tím nižší je CMC) a též dostatečná teplota. Teplota, od které se v roztoku mohou tvořit micely, se nazývá Krafftova teplota neboli Krafftův bod [36].

Na rozdíl od ionických surfaktantů, neionické surfaktanty nevykazují Krafftův bod, protože se vzrůstající teplotou se snižuje výskyt jejich micel v roztoku, čímž klesá jejich schopnost solubilizace a ztrácejí své povrchově aktivní vlastnosti při teplotě, která se nazývá bod zamlžení (cloud point) [39].

Průměrný počet molekul surfaktantu v micelle se nazývá agregační číslo [38]. S rostoucí koncentrací surfaktantu se zvyšuje počet micel v roztoku. Může dojít ke změně tvaru a velikosti micel, shlukováním micel se mohou dále tvořit větší a složitější struktury [37], např.:

- malé kulovité struktury,
- protáhlé válcovité struktury se zakulacenými konci (protáhlé elipsoidy),
- velké ploché lamelární struktury,
- váčkovité struktury (víceméně kulovité struktury sestávající z dvojvrstvy lamelových micel uspořádaných v jedné soustředné kouli nebo více) (Obr. 9) [37].



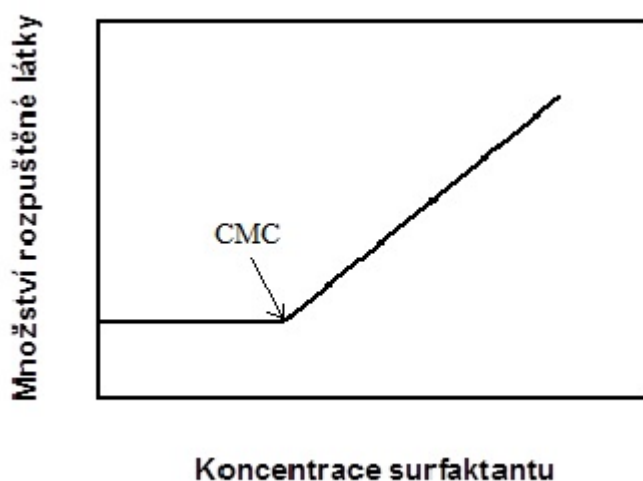
Obrázek 9: Některé typy agregátů vytvářených v roztocích povrchově aktivních látek [39].

Kulovité micely mají vnitřek složený z uhlovodíkových řetězců a povrch z polárních skupin (zobrazené jako kuličky), které směřují k vodě. Toto uspořádání platí i pro válcovitou micelu. Dvojvrstvy surfaktantu, které tvoří lamelární tekuté krystaly, mají uhlovodíkové jádro v systémech voda-surfaktant o tloušťce asi 80 % délky dvou natažených alkylových řetězců [39].

Kromě micel vzniklých ve vodném prostředí existují ještě reverzní micely. Ke vzniku reverzních micel dochází, když se surfaktant rozpustí v organickém rozpouštědle. Vznikají téměř kulovité agregáty molekul surfaktantů, jejichž vnější plášť tvoří hydrofobní části a vnitřní jádro je tvořeno polárními částmi. S tvorbou reverzních micel není spojena žádná CMC, k jejich vzniku dochází prakticky ihned nezávisle na koncentraci surfaktantu [40].

3.4.3 SOLUBILIZACE

Jedna z nejdůležitějších vlastností surfaktantů spojená se vznikem jejich micel je schopnost solubilizace. Solubilizace se dá definovat jako spontánní rozpuštění látky (pevné, kapalné nebo plynné) vratnými interakcemi s micelami, čímž vzniká termodynamicky stabilní izotropní roztok se sníženou termodynamickou aktivitou rozpuštěného materiálu [37]. Solubilizačním mechanismem se dají rozpustit látky v rozpouštědle rozpustitelné i nerozpustitelné, do micel se mohou začlenit polární i nepolární látky. Z praktického hlediska tkví důležitost tohoto jevu zejména v tom, že umožňuje rozpuštění látky v rozpouštědle, ve kterém je za normálních okolností nerozpustitelná. Nejčastěji se používá solubilizace ve vodě, kdy se rozpouští látka obsahující ve vodě nerozpustitelnou složku, která by jinak musela být rozpuštěna v organickém rozpouštědle. Podmínkou pro solubilizaci je dosažení CMC, protože pod touto koncentrací se látka téměř vůbec nerozpouští. Po překročení CMC stoupá množství solubilizované látky lineárně s koncentrací surfaktantu (Obr. 10) [37].



Obrázek 10: Závislost množství rozpuštěné látky na koncentraci surfaktantu [37].

Solubilizace se často využívá při odstraňování nečistot, proto surfaktanty nalézají široké uplatnění v čistících prostředcích. Princip jejich čistící funkce probíhá tak, že se hydrofobní částí naadsorbují na nečistoty, čímž způsobí snížení jejich povrchového napětí. Vytvořením micely je nečistota uzavřena uvnitř a hydrofilní část micely umožní přechod do roztoku a tím je nečistota odstraněna.

3.5 INTERAKCE POVRCHOVĚ AKTIVNÍCH LÁTEK S ENZYMY

Enzymy jsou vysoce selektivní biokatalyzátory, které fungují v mírných reakčních podmínkách, což je dělá potencionálně atraktivními v syntetické chemii, zvláště v syntéze přírodních produktů, farmaceutik a potravinářských přísad [41]. Již v milimolárních koncentracích jsou surfaktanty jedny z nejeftivnějších látek schopných denarovat enzymy [42]. O vlivu surfaktantu na enzym a o tom, jestli se kooperativně váže na protein a tím ho denaturuje, rozhoduje jeho náboj. Surfaktanty bez náboje proteiny nedenaturují, zatímco ionické surfaktanty ano, a to dokonce už i při velice nízkých koncentracích. Mnohdy ani není třeba, aby dosáhly své kritické micelární koncentrace, která se typicky pohybuje v mmol/l. Anionické surfaktanty denaturují proteiny nejvíce, jsou až 1000x efektivnějšími denuranty než klasické chemické denuranty (močovina, guanidinium chlorid apod.) [43].

Klíčovou roli v enzymové akci a ve vzniku aktivních 3D konformací hraje voda. Přesto se velké množství organických syntéz provádí v organických rozpouštědlech kvůli povaze substrátu anebo rozpustnosti produktu. Proto se vyvinulo několik metod pro použití enzymů v organických rozpouštědlech. Mezi tyto metody se mimo jiné řadí metoda s reverzními micelami, kdy jsou kulovité kapičky vody rozptýleny prostřednictvím povrchově aktivní látky v rozpouštědle s nízkou polaritou. Význam metody je založen na faktu, že mnoho enzymů si zachovává v roztoku surfaktantu svou aktivitu [41]. Stabilita enzymu v obrácených micelách závisí na soudržnosti micelárních agregátů s enzymy, pH, teplotě a iontové síle [40].

3.5.1 INTERAKCE POVRCHOVĚ AKTIVNÍCH LÁTEK S ENZYMY VE VODNÉM PROSTŘEDÍ

Interakce proteinu se surfaktantem ve vodném prostředí se, v závislosti na koncentraci surfaktantu, velmi liší, proto je důležité znát jeho CMC. Interakce proteinu a monomerního surfaktantu (pod CMC) jsou jiné než interakce proteinu a surfaktantu se vzniklými micelami (nad CMC). Např. neionické surfaktanty pod CMC vykazují s proteiny jen malé interakce. Zatímco navázání ionického surfaktantu na protein pod CMC způsobí, že protein projde mnoha konformačními změnami.

Existuje základní oblast, kdy se surfaktant váže bez vyvolání konformačních změn. Monomer surfaktantu se váže pomocí elektrostatických a hydrofobních interakcí.

Anionické surfaktanty se váží na kladně nabitě postranní řetězce a kationické na záporně nabitě. Ve vyšších koncentracích surfaktantu (nad CMC), když dojde k nasycení vazebných míst proteinu, může navázání více surfaktantů vést k uskupení, které rozkládá protein [43].

Neionickým surfaktantům se někdy říká „mírné“ povrchově aktivní látky, protože obvykle nezpůsobují kooperativní denaturaci proteinů jako kationické nebo anionické surfaktanty. Díky této vlastnosti se neionické surfaktanty používají k solubilizaci membránových proteinů, protože proteiny neztratí svou biologickou aktivitu [44][45].

Mezi „mírné“ surfaktanty se řadí také amfionické surfaktanty vzhledem k tomu, že nepřispívají ke změnám aktivit mnohých enzymů a někdy dokonce i zlepšují jejich katalytické vlastnosti [41].

3.5.2 DĚLENÍ POVRCHOVĚ AKTIVNÍCH LÁTEK PODLE INTERAKCÍ S ENZYMY

Surfaktanty se podle interakcí s proteiny dají rozdělit na ty, které se váží na protein a tím způsobí jeho denaturaci, a na ty, které na protein působí, ale nedenaturují ho. Existují surfaktanty zvyšující aktivitu a stabilitu enzymů. Surfaktant může ovlivnit aktivitu enzymu, protože:

- může „soutěžit“ se substrátem o aktivní místo enzymu,
- může změnit prostředí, ve kterém enzym pracuje,
- při vysokých koncentracích surfaktantu dochází ke zvýšení množství substrátu, který se začleňuje do micel, což způsobí snížení množství volného substrátu [41].

O tom, jestli surfaktant navázáním na enzym způsobí jeho konformační změnu na více aktivní formu enzymu, většinou rozhoduje polární část surfaktantu. Mezi polární částí surfaktantu a specifickými nabitými částmi na povrchu proteinu dochází k tvorbě silných iontových vazeb. Ve studii [46] se zjistil vliv různých ionických a neionických surfaktantů na lipoxygenasu L1. Nízká koncentrace neionických Tween 20 a Brij 35 zvyšuje aktivitu enzymu 1,5x, ale při vyšší koncentraci všechny surfaktanty aktivitě enzymu bránily.

Působením surfaktantu na enzym lze dosáhnout stabilizace přírodní struktury enzymu, kterou by za normálních okolností po pár hodinách inkubace ztratil [41].

3.5.3 INTERAKCE POVRCHOVĚ AKTIVNÍCH LÁTEK S HRP

Křen je zdroj peroxidaseového enzymu (křenová peroxidasa – EC 1.11.1.7, donor: H₂O₂ oxidoreduktasa), 40kD glykoproteinu obsahujícího protohemin. HRP patří k typickým členům rostlinných peroxidas sloužících jako baktericidy. Využívá peroxid vodíku na oxidaci široké škály donorů vodíku, mezi které patří fenolové a aromatické látky, primární, sekundární a terciální aminy, leuko barviva, vybrané heterocyklické sloučeniny (kyselina askorbová) a anorganické ionty, zejména jodidový anion [42].

HRP lze využít i k oxidaci ve vodě nerozpustných substrátů po jejich solubilizaci v micelách. Interakcí HRP s povrchově aktivní látkou se zabývá studie [47]. V této studii se používá n-dodecyl síran sodný (sodium n-dodecyl sulphate, SDS), anionický surfaktant, a byl zjišťován jeho vliv na HRP a katalasu. Mnoho enzymů v přítomnosti SDS ztrácí svou aktivitu. Přítomnost SDS micel způsobuje pomalé změny v terciální a sekundární struktuře, ale na rozdíl od mnohých monomerních enzymů je HRP inaktivována velmi pomalu. Důvodem, proč se tak děje, je podle autorů [47] přítomnost dvou vápníkových iontů v molekule HRP, které v katalase chybí. HRP je tedy v neutrálním pH mnohem odolnější proti SDS než katalasa. Změny v sekundární a terciální struktuře HRP se dějí pouze za přítomnosti micel, zatímco změny v terciální struktuře katalasy a snížení její aktivity začíná už za přítomnosti monomerního SDS a probíhá rychleji [47].

Interakce jiných surfaktantů s křenovou peroxidasou zatím nebyly prostudovány, proto je zde uvedena pouze interakce SDS s HRP.

3.6 VYUŽITÍ POVRCHOVĚ AKTIVNÍCH LÁTEK PŘI STANOVENÍ AOC

Některé metody (např. DPPH), které se využívají ke stanovení antioxidační kapacity, jsou omezeny pouze na hydrofilní antioxidanty nebo na rozpouštění lipofilních antioxidantů používají organická rozpouštědla. Nicméně docházelo ke zdokonalování metod, čímž se rozvinulo používání vodných roztoků s využitím agregátů nebo micel surfaktantů. Přidáním surfaktantu do vody se nad CMC spontánně vytvoří micely s hydrofobní částí směřující dovnitř a hydrofilní částí k povrchu micely. Tímto vznikla možnost použít DPPH metodu na hydrofilní i lipofilní vzorky. Metoda byla úspěšně otestována na lipofilních antioxidantech bez použití organického rozpouštědla [48].

Ve studii [49] byla měřena antioxidační kapacita lipofilních vzorků (vzorky olejů – slunečnicový, sójový, kukuřičný, panenský olivový a sezamový) pomocí chemiluminiscence luminolu v prostředí mikroemulze. Mikroemulze je směs vody, surfaktantu a organického rozpouštědla. Přítomnost mikroemulze kromě solubilizace lipofilních antioxidantů způsobila i intenzivnější chemiluminiscenci než přítomnost vodného prostředí. Analýzy byly prováděny metodou flow injection analysis (FIA).

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem této práce je zjistit, jaký vliv mají vybrané povrchově aktivní látky na jednotlivé komponenty reakční směsi při měření antioxidační kapacity hydrofilních i lipofilních vzorků antioxidantů. Povrchově aktivní látky byly testovány využitím dvou metod.

První metoda využívá chemiluminiscenci luminolu za katalýzy křenovou peroxidasou [32] s fosfátovým pufrem (pH = 7,4). Povrchově aktivní látky mohou přerušit činnost peroxidasového enzymu nebo jej denaturovat. Jak se však zjistilo v práci Rozsypala [50], u surfaktantu CTAB tomu tak není, proto zde bylo studováno, jestli je možné použít i jiné surfaktanty.

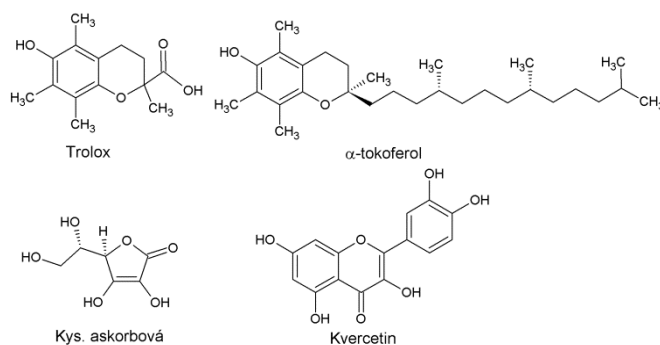
Druhou metodou je chemiluminiscence luminolu, která využívá anorganický systém s pufrem Bis-Tris (pH = 8) a chloridem kobaltnatým. Obdobně se studoval vliv surfaktantů na jednotlivé komponenty reakční směsi. Metoda vychází z prací Tunky [51] a Rozsypala [50]. Nejdříve byla ověřována funkčnost jednotlivých povrchově aktivních látek s troloxem.

4.1 CHEMIKÁLIE

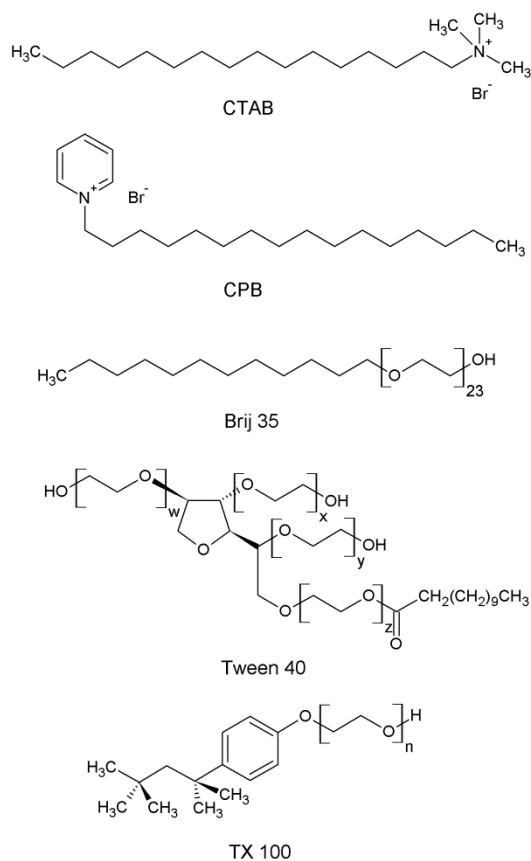
Název	Výrobce	Molární hmotnost (g/mol)
Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát	Lachner	358,14
Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát	Lachner	156,01
Chlorid sodný	Lachema	58,45
Hydroxid sodný	Lachner	40,00
Kyselina chlorovodíková	Penta	36,45
Luminol sodná sůl	Sigma	199,15
Křenová peroxidasa 5000 jednotek	Sigma	
Peroxid vodíku 3 %	Fluka	34,02
Trolox	Sigma	250,29
α -tokoferol	Sigma	430,72
Kvercetin dihydrát	Sigma	338,26
Kyselina askorbová	Fluka	176,13
CTAB (cetyltrimethylamonium bromid)	Fluka	364,46
Brij 35	Lachema	1199,54
CPB (cetylpyridinium bromid)	Lachema	402,47
TX 100 (Triton X 100)	Sigma	625,00
Tween 40	Loba Feinchemie	1283,00
Bis-Tris	Fluka	209,24
Chlorid kobaltnatý hexahydrát	Lachema	237,05

Tabulka 1: Přehled použitých chemikálií, jejich výrobce a molární hmotnosti.

Na Obr. 11 a 12 jsou uvedeny vzorce použitých antioxidantů a testovaných povrchově aktivních látek.



Obrázek 11: Strukturální vzorce použitých antioxidantů.



Obrázek 12: Strukturální vzorce testovaných surfaktantů.

Surfaktant	Kritická micelární koncentrace (mol/l)
CTAB	$8 \cdot 10^{-4}$ [52]
CPB	$8 \cdot 10^{-4}$ [53]
Brij 35	$6 \cdot 10^{-5}$ [54]
Tween 40	$2,26 \cdot 10^{-5}$ [54]
TX 100	$2,4 \cdot 10^{-4}$ [54]

Tabulka 2: Kritické micelární koncentrace testovaných surfaktantů.

4.2 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

K přípravě pufrů byl použit pH metr GRYF 209 s kombinovanou pH elektrodou, typ pH 2+L, výrobce ED, spol. s r. o.

Chemiluminiscenční experimenty byly realizovány na přístroji Fluoroscant Ascent FL, který se ovládá pomocí softwaru Ascent, verze 2.4.2. Roztoky se pipetovaly do mikrotitračních destiček s 96 jamičkami.

4.3 TYPICKÝ EXPERIMENT PŘI STANOVENÍ AOC

K tomu, aby došlo k chemiluminiscenci luminolu, je potřeba použít vhodné oxidační činidlo (peroxid vodíku). Reakce probíhá za katalýzy křenovou peroxidasou. Přidá-li se ke směsi nějaký antioxidant, na nějakou dobu se nástup chemiluminiscence zpozdí. Délka zpoždění závisí na účinnosti a koncentraci antioxidantu. Čím vyšší je jeho účinnost a koncentrace, tím je reakce více zpožděna. Doba, po kterou antioxidant znemožňuje nástup chemiluminiscence, určuje jeho účinnost. Většinou se účinnost testovaného antioxidantu srovnává s účinností troloxu.

4.3.1 ROZTOKY

Byl připraven se fosfátový pufr s $\text{pH} = 7,4$, který byl použit na přípravu všech roztoků. Ve 400 ml vody bylo rozpuštěno 17,907 g hydrogenfosforečnanu sodného, 1,375 g dihydrogenfosforečnanu sodného a 40 g chloridu sodného. Podle potřeby bylo pH upraveno hydroxidem sodným nebo kyselinou chlorovodíkovou o koncentraci 0,1 mol/l. Nakonec byl roztok doplněn na objem 500 ml. Tento roztok byl 10x koncentrovanější, proto bylo potřeba jej ještě 10x zředit.

Všechny látky byly rozpouštěny ve fosfátovém pufru. Příprava zásobních roztoků: křenová peroxidasa byla připravena rozpuštěním 1 mg peroxidasy v 1 ml pufru a následně ještě 5x zředěna, luminol byl připraven o koncentraci 0,0441 mol/l, trolox byl připraven o koncentraci 0,001 mol/l.

Pro samotné měření byla připravena chemiluminiscenční směs. Do 25ml odměrné baňky bylo napipetováno 500 μl 3% peroxidu vodíku a 1000 μl luminolu z připraveného zásobního roztoku a roztok byl doplněn fosfátovým pufrům po rysku.

4.3.2 MĚŘENÍ

Do jednotlivých jamiček mikrotitrační destičky bylo postupně napipetováno 10 μl 5x zředěné křenové peroxidasy, 20 μl troloxu o různých koncentracích (Tabulka 3) a nástřik chemiluminiscenční směsi byl nastaven na 80 μl . Celkový objem jamičky činil 200 μl .

Objem troloxu v jamičce (μl)	Koncentrace troloxu v jamičce (mol/l)	Látkové množství troloxu v jamičce (mol)
0,00	$0,00 \cdot 10^{+00}$	$0,00 \cdot 10^{+00}$
0,40	$2,00 \cdot 10^{-06}$	$4,00 \cdot 10^{-10}$
0,66	$3,00 \cdot 10^{-06}$	$6,00 \cdot 10^{-10}$
1,00	$5,00 \cdot 10^{-06}$	$1,00 \cdot 10^{-09}$
2,00	$1,00 \cdot 10^{-05}$	$2,00 \cdot 10^{-09}$
4,00	$2,00 \cdot 10^{-05}$	$4,00 \cdot 10^{-09}$
6,00	$3,00 \cdot 10^{-05}$	$6,00 \cdot 10^{-09}$
10,00	$5,00 \cdot 10^{-05}$	$1,00 \cdot 10^{-08}$

Tabulka 3: Výsledné objemy, koncentrace a látkové množství troloxu v jamičkách.

4.4 TESTOVÁNÍ POVRCHOVĚ AKTIVNÍCH LÁTEK METODOU VYUŽÍVAJÍCÍ HRP

Postupně byly testovány jednotlivé povrchově aktivní látky, zda je možné je použít pro měření antioxidační kapacity lipofilních antioxidantů chemiluminiscenční metodou. Byla zjišťována míra interakce surfaktantů s křenovou peroxidasou.

4.4.1 ROZTOKY

Všechny látky byly opět rozpouštěny v 10x zředěného fosfátového pufru s pH = 7,4. Příprava zásobních roztoků: luminol byl připraven o koncentraci 0,0441 mol/l, křenová peroxidasa byla připravena rozpuštěním 1 mg peroxidasy v 1 ml pufru, trolox byl připraven o koncentraci 0,001 mol/l, CTAB (pro lepší rozpouštění a vznik micel bylo třeba roztok zahřát), CPB, TX 100 Tween 40 a Brij 35 byly připraveny o koncentraci 0,05 mol/l, α -tokoferol o koncentraci 0,001 mol/l byl připraven solubilizací α -tokoferolu v 0,05mol/l roztoku CTAB, α -tokoferol a kvercetin byly připraveny o koncentraci 0,001 mol/l a solubilizovány v 0,05mol/l roztoku Brij 35 (roztoky bylo potřeba dát do ultrazvuku), kyselina askorbová byla připravena o koncentraci 0,001 mol/l.

4.4.2 MĚŘENÍ

Do jamiček mikrotitrační destičky bylo při měření s CTAB napipetováno 10 μl křenové peroxidasy, 20 μl troloxu o různých koncentracích (Tabulka 4), 20 μl α -tokoferolu

o různých koncentracích (Tabulka 4) a CTAB (Tabulka 5). Objem v jamičce byl doplněn fosfátovým pufrům na 120 μl . Nástřik chemiluminiscenční směsi byl nastaven na 80 μl .

Objemy látek v jamičkách (μl)	Koncentrace látek v jamičkách (mol/l)	Látkové množství látek v jamičkách (mol)
0,00	$0,00 \cdot 10^{+00}$	$0,00 \cdot 10^{+00}$
0,40	$2,00 \cdot 10^{-06}$	$4,00 \cdot 10^{-10}$
0,66	$3,00 \cdot 10^{-06}$	$6,00 \cdot 10^{-10}$
1,00	$5,00 \cdot 10^{-06}$	$1,00 \cdot 10^{-09}$
2,00	$1,00 \cdot 10^{-05}$	$2,00 \cdot 10^{-09}$
4,00	$2,00 \cdot 10^{-05}$	$4,00 \cdot 10^{-09}$
10,00	$5,00 \cdot 10^{-05}$	$1,00 \cdot 10^{-08}$

Tabulka 4: Výsledné objemy, koncentrace a látková množství troloxu a α -tokoferolu v jamičkách při měření s CTAB.

Objemy surfaktantů v jamičkách (μl)	Koncentrace surfaktantů v jamičkách (mol/l)
20	$5,00 \cdot 10^{-03}$
40	$1,00 \cdot 10^{-02}$
80	$2,00 \cdot 10^{-02}$

Tabulka 5: Výsledné objemy a koncentrace CTAB při měření troloxu a α -tokoferolu.

Při měření s CPB a TX 100 bylo do mikrotitrační destičky napipetováno 10 μl křenové peroxidasy, 20 μl troloxu o různých koncentracích (Tabulka 4) a CPB nebo TX 100 (Tabulka 5). Objem v jamičce byl doplněn fosfátovým pufrům na 120 μl . Nástřik chemiluminiscenční směsi byl nastaven na 80 μl .

Při měření s Tween 40 bylo do mikrotitrační destičky napipetováno 10 μl křenové peroxidasy, 20 μl troloxu o různých koncentracích (Tabulka 6) a Tween 40 (Tabulka 5). Objem v jamičce byl doplněn fosfátovým pufrům na 120 μl . Nástřik chemiluminiscenční směsi byl nastaven na 80 μl .

Trolox		
Objem (μl)	Koncentrace (mol/l)	Látkové množství (mol)
0,00	$0,00 \cdot 10^{+00}$	$0,00 \cdot 10^{+00}$
0,40	$2,00 \cdot 10^{-06}$	$4,00 \cdot 10^{-10}$
0,66	$3,00 \cdot 10^{-06}$	$6,00 \cdot 10^{-10}$
1,00	$5,00 \cdot 10^{-06}$	$1,00 \cdot 10^{-09}$
2,00	$1,00 \cdot 10^{-05}$	$2,00 \cdot 10^{-09}$
4,00	$2,00 \cdot 10^{-05}$	$4,00 \cdot 10^{-09}$
6,00	$3,00 \cdot 10^{-05}$	$6,00 \cdot 10^{-09}$
10,00	$5,00 \cdot 10^{-05}$	$1,00 \cdot 10^{-08}$

Tabulka 6: Výsledné objemy, koncentrace a látková množství troloxu v jamičkách při měření s Tween 40.

Při měření s Brij 35 bylo do mikrotitrační destičky napipetováno 10 μl křenové peroxidasy, 20 μl troloxu, α-tokoferolu, kvercetin a kyseliny askorbové o různých koncentracích (Tabulka 7) a Brij 35 (Tabulka 5). Při měření s kyselinou askorbovou byly napipetovány objemy Brij 35 podle Tabulky 8. Objem v jamičce byl doplněn fosfátovým pufrem na 120 μl. Nástřik chemiluminiscenční směsi byl nastaven na 80 μl.

Trolox, α-tokoferol, kvercetin, k. askorbová		
Objem (μl)	Koncentrace (mol/l)	Látkové množství (mol)
0,00	$0,00 \cdot 10^{+00}$	$0,00 \cdot 10^{+00}$
0,40	$2,00 \cdot 10^{-06}$	$4,00 \cdot 10^{-10}$
0,66	$3,00 \cdot 10^{-06}$	$6,00 \cdot 10^{-10}$
1,00	$5,00 \cdot 10^{-06}$	$1,00 \cdot 10^{-09}$
2,00	$1,00 \cdot 10^{-05}$	$2,00 \cdot 10^{-09}$
4,00	$2,00 \cdot 10^{-05}$	$4,00 \cdot 10^{-09}$
6,00	$3,00 \cdot 10^{-05}$	$6,00 \cdot 10^{-09}$
8,00	$4,00 \cdot 10^{-05}$	$8,00 \cdot 10^{-09}$
10,00	$5,00 \cdot 10^{-05}$	$1,00 \cdot 10^{-08}$

Tabulka 7: Výsledné objemy, koncentrace a látková množství troloxu, α-tokoferolu, kvercetin a kyseliny askorbové v jamičkách.

Brij 35	
Objem (μl)	Koncentrace (mol/l)
20	$5,00 \cdot 10^{-03}$
40	$1,00 \cdot 10^{-02}$

Tabulka 8: Výsledné objemy a koncentrace Brij 35 při měření kyseliny askorbové.

4.5 TESTOVÁNÍ POVRCHOVĚ AKTIVNÍCH LÁTEK METODOU VYUŽÍVAJÍCÍ ANORGANICKÝ SYSTÉM

Obdobně byly testovány povrchově aktivní látky (CTAB, Brij 35, CPB, Tween 40, TX 100) a možnost jejich použití pro solubilizaci lipofilních antioxidantů při měření antioxidační kapacity anorganickým systémem.

4.5.1 ROZTOKY

Příprava zásobních roztoků: pufr Bis-Tris byl připraven o koncentraci 0,025 mol/l a pH bylo upraveno na pH 8 pomocí kyseliny chlorovodíkové popř. hydroxidu sodného o koncentraci 0,1 mol/l, chlorid kobaltnatý byl připraven o koncentraci 0,25 mmol/l, luminolu byl připraven o koncentraci 0,385 mmol/l, CTAB, CPB, TX 100 Tween 40 a Brij 35 byly připraveny o koncentraci 0,1 mol/l, α -tokoferol a kvercetin byly připraveny o koncentraci 0,001 mol/l solubilizací v 0,1 mol/l roztoku CTAB (bylo potřeba je zahřát a dát do ultrazvuku), kyselina askorbová byla připravena o koncentraci 0,005 mol/l, trolox byl připraven o koncentraci 0,001 mol/l rozpuštěním ve fosfátovém pufru.

Chemiluminiscenční směs byla připravena smícháním 218 μl 3% peroxidu vodíku a 500 μl luminolu do 50ml odměrné baňky a roztok byl doplněn vodou po rysku.

4.5.2 MĚŘENÍ

Při měření s CTAB bylo do jamiček mikrotitrační destičky napipetováno 50 μl Bis-Tris a 12,5 μl chloridu kobaltnatého, různé objemy troloxu, kyseliny askorbové, α -tokoferolu a kvercetinu (Tabulka 9) a CTAB (Tabulka 10). Jamička byla doplněna vodou na objem 120 μl . Nástřik CL směsi činil 130 μl . Celkový objem jamičky tedy byl 250 μl .

Trolox, α -tokoferol			Kys. askorbová			Kvercetin		
Objem (μ l)	Koncentrace (mol/l)	Látkové množství (mol)	Objem (μ l)	Koncentrace (mol/l)	Látkové množství (mol)	Objem (μ l)	Koncentrace (mol/l)	Látkové množství (mol)
0,00	$0,00 \cdot 10^{+00}$	$0,00 \cdot 10^{+00}$	0,00	$0,00 \cdot 10^{+00}$	$0,00 \cdot 10^{+00}$	0,00	$0,00 \cdot 10^{+00}$	$0,00 \cdot 10^{+00}$
2,50	$1,00 \cdot 10^{-05}$	$2,50 \cdot 10^{-09}$	1,00	$2,00 \cdot 10^{-05}$	$5,00 \cdot 10^{-09}$	0,50	$2,00 \cdot 10^{-06}$	$5,00 \cdot 10^{-10}$
5,00	$2,00 \cdot 10^{-05}$	$5,00 \cdot 10^{-09}$	1,50	$3,00 \cdot 10^{-05}$	$7,50 \cdot 10^{-09}$	0,75	$3,00 \cdot 10^{-06}$	$7,50 \cdot 10^{-10}$
7,50	$3,00 \cdot 10^{-05}$	$7,50 \cdot 10^{-09}$	2,50	$5,00 \cdot 10^{-05}$	$1,25 \cdot 10^{-08}$	1,00	$4,00 \cdot 10^{-06}$	$1,00 \cdot 10^{-09}$
10,00	$4,00 \cdot 10^{-05}$	$1,00 \cdot 10^{-08}$	3,50	$7,00 \cdot 10^{-05}$	$1,75 \cdot 10^{-08}$	1,25	$5,00 \cdot 10^{-06}$	$1,25 \cdot 10^{-09}$
12,50	$5,00 \cdot 10^{-05}$	$1,25 \cdot 10^{-08}$	4,00	$8,00 \cdot 10^{-05}$	$2,00 \cdot 10^{-08}$	1,50	$6,00 \cdot 10^{-06}$	$1,50 \cdot 10^{-09}$
15,00	$6,00 \cdot 10^{-05}$	$1,50 \cdot 10^{-08}$	4,50	$9,00 \cdot 10^{-05}$	$2,25 \cdot 10^{-08}$	1,75	$7,00 \cdot 10^{-06}$	$1,75 \cdot 10^{-09}$
17,50	$7,00 \cdot 10^{-05}$	$1,75 \cdot 10^{-08}$	5,00	$1,00 \cdot 10^{-04}$	$2,50 \cdot 10^{-08}$	2,00	$8,00 \cdot 10^{-06}$	$2,00 \cdot 10^{-09}$
20,00	$8,00 \cdot 10^{-05}$	$2,00 \cdot 10^{-08}$	10,00	$2,00 \cdot 10^{-04}$	$5,00 \cdot 10^{-08}$	2,25	$9,00 \cdot 10^{-06}$	$2,25 \cdot 10^{-09}$

Tabulka 9: Výsledné objemy, koncentrace a látková množství troloxu, α -tokoferolu, kyseliny askorbové a kvercetinu v jamičkách při měření.

CTAB, Brij 35, Tween 40, TX 100, CPB		CTAB (při měření α -tokoferolu)	
Objem (μ l)	Koncentrace (mol/l)	Objem (μ l)	Koncentrace (mol/l)
12,50	$5,00 \cdot 10^{-03}$	25,00	$1,00 \cdot 10^{-02}$
25,00	$1,00 \cdot 10^{-02}$	37,50	$1,50 \cdot 10^{-02}$

Tabulka 10: Výsledné objemy a koncentrace CTAB, Brij 35, Tween 40, TX 100 a CPB při měření. Objemy a koncentrace CTAB se lišily pro α -tokoferol.

Při měření s Brij 35, Tween 40, TX 100 a CPB byly do jamiček napipetovány objemy povrchově aktivních látek podle Tabulky 9, 50 μ l Bis-Tris, 12,5 μ l chloridu kobaltnatého a různé objemy troloxu podle Tabulky 8.

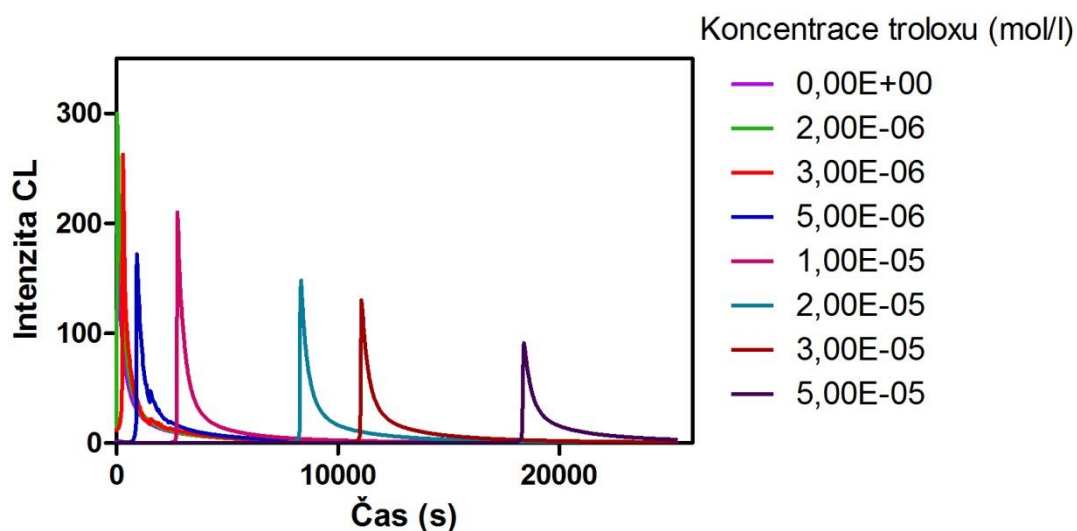
4.6 VÝSLEDKY A DISKUSE

Metoda využívající HRP

Pro studium vlivu povrchově aktivních látek při CL stanovení antioxidační kapacity byla vybrána varianta CL metody, využívající luminol, H_2O_2 a HRP [55][56]. Původní CL metoda [57][58] využívala navíc tzv. enhancer (4-jodofenol). CL profily (závislosti

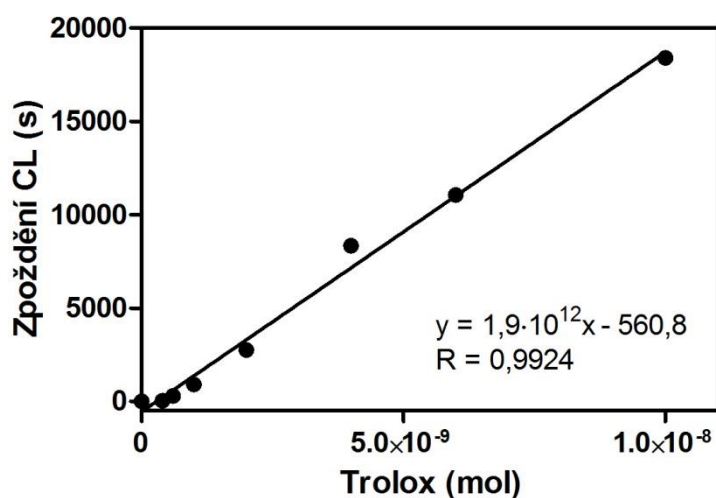
intenzita CL – čas) pro reakční směs obsahující luminol, H₂O₂ a HRP a různé koncentrace troloxu jsou uvedeny na Obr. 13.

Trolox bez surfaktantu



Obrázek 13: Závislost intenzity chemiluminiscence na čase pro různé koncentrace troloxu.

Z Obr. 13 je patrná zvětšující se časová prodleva nástupu chemiluminiscence s rostoucí koncentrací troloxu. Bez troloxu v reakční směsi začíná chemiluminiscence okamžitě po nástřiku směsi. Závislost prodlevy nástupu chemiluminiscence na koncentraci troloxu je lineární, proto ji lze použít jako míru antioxidační kapacity (Obr. 14).

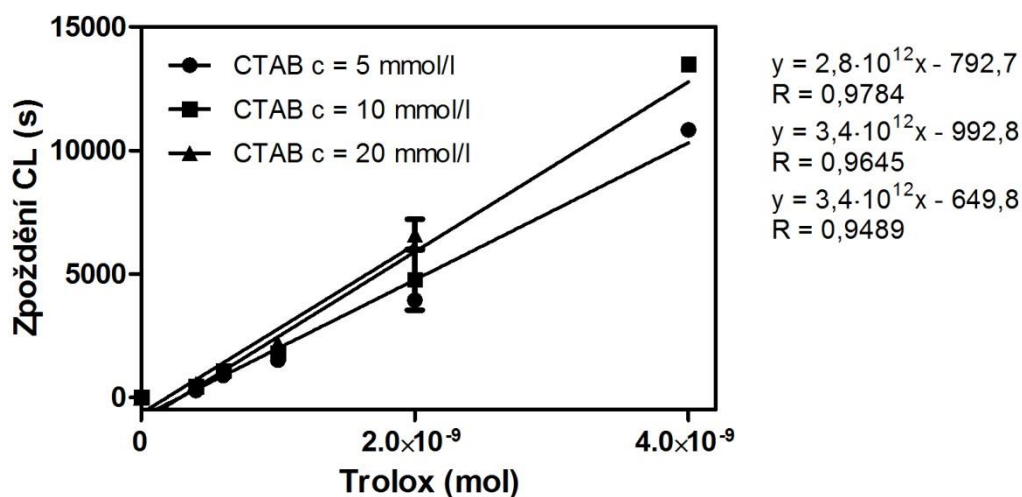


Obrázek 14: Závislost zpoždění chemiluminiscence na látkovém množství troloxu.

Pro studium ovlivnění uvedené reakční směsi povrchově aktivními látkami byly vybrány dva kationické (CTAB, CPB) a tři neionické surfaktanty (TX 100, Tween 40 a Brij 35). Anionické surfaktanty (SDS) nebyly studovány, protože je známo, že účinně denaturují HRP [47]. Dalším důvodem vyřazení anionických surfaktantů byl fakt, že důležité antioxidanty (kyselina askorbová, trolox, α -tokoferol) jsou anionty a obtížně se solubilizují v micelách SDS. Pro studium byly použity relativně vysoké koncentrace použitých surfaktantů (5, 10 a 20 mmol/l), aby bylo možné do vzniklých micel solubilizovat dostatečná množství testovaných antioxidantů.

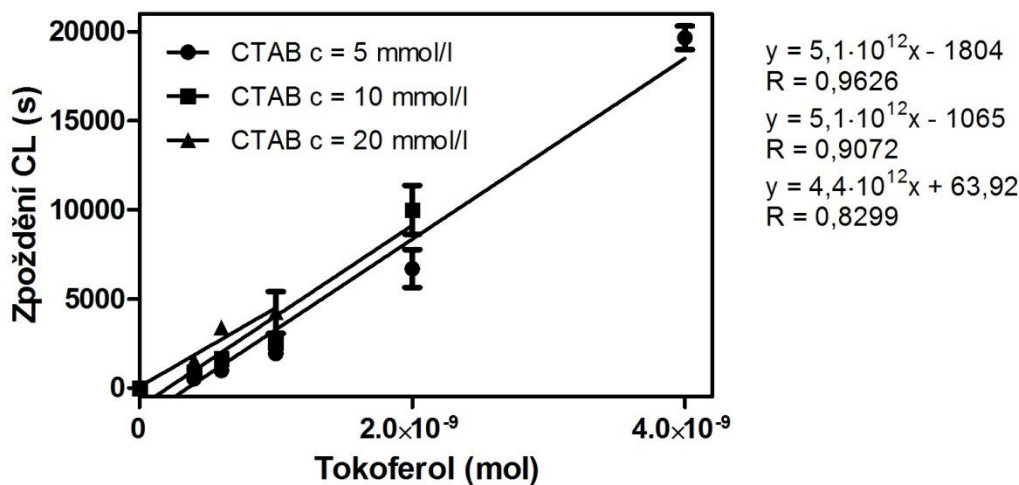
Trolox + CTAB

Na Obr. 15 je uvedena kalibrační křivka pro analogický experiment, jak byl popsán na Obr. 13 a 14, reakční směs však obsahovala CTAB. Z výsledků je patrné, že přítomnost CTAB zpomaluje stanovení, prodlevy CL jsou o cca 76% delší v přítomnosti CTAB. Použitelnost metody pro stanovení lipofilních antioxidantů byla testována na příkladu α -tokoferolu (Obr. 16). Trolox je hydrofilní analog α -tokoferolu, proto by měly tyto látky mít stejnou antioxidační kapacitu. Z výsledků vyplývá, že α -tokoferol poskytuje vyšší hodnotu antioxidační kapacity (1,4x). Uvedený výsledek byl několikrát ověřován, je patrně způsoben rozdílnou interakcí troloxu a α -tokoferolu s HRP, protože výsledky získané při měření v anorganickém systému nahrazujícím HRP (viz kapitola Metoda využívající anorganický systém na str. 47) ukazují shodnou antioxidační kapacitu troloxu a tokoferolu.



Obrázek 15: Závislost zpoždění chemiluminiscence na látkovém množství troloxu při různých koncentracích CTAB.

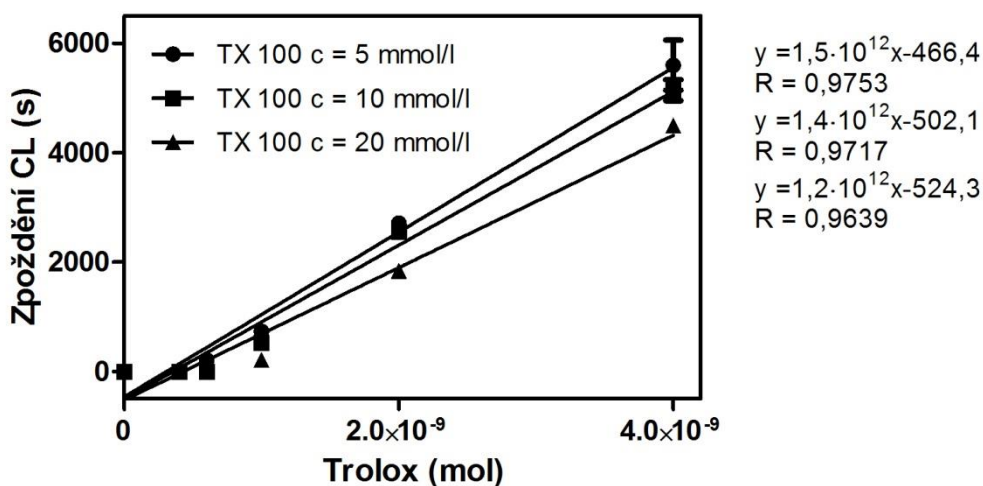
Tokoferol + CTAB



Obrázek 16: Závislost zpoždění chemiluminiscence na látkovém množství α -tokoferolu při různých koncentracích CTAB.

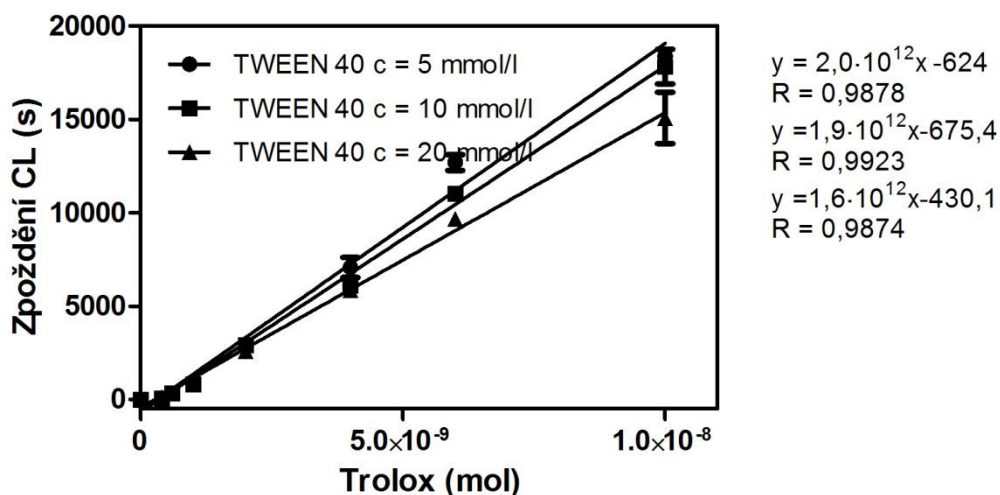
Dalším testovaným surfaktantem byl CPB. Bylo zjištěno, že CPB je velmi účinný zhášecí CL směsi, případně inaktivuje HRP natolik, že při experimentech nebyla zaznamenána měřitelná chemiluminiscence.

Další série experimentů byla věnována neionickým surfaktantům. Byly testovány surfaktanty TX 100, Tween 40 a Brij 35. Výsledky pro trolox jsou uvedeny na Obr. 17-19.



Obrázek 17: Závislost zpoždění chemiluminiscence na látkovém množství troloxu při různých koncentracích TX 100.

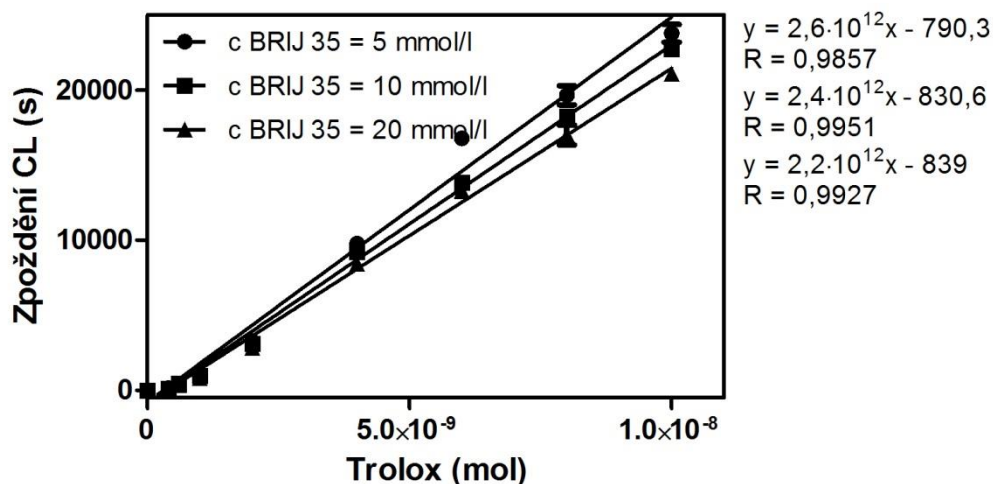
Je patrné, že při použití Tween 40, se antioxidační kapacita troloxu nejvíce přibližuje antioxidační kapacitě troloxu z Obr. 14, kdy v reakční směsi nebyl přítomen žádný surfaktant. Tween 40 by mohl být vhodným surfaktantem pro měření antioxidační kapacity lipofilních vzorků, nicméně práce s ním je obtížná, neboť je kapalný a jeho navážky nemusí být přesné.



Obrázek 18: Závislost zpoždění chemiluminiscence na látkovém množství troloxu při různých koncentracích Tween 40.

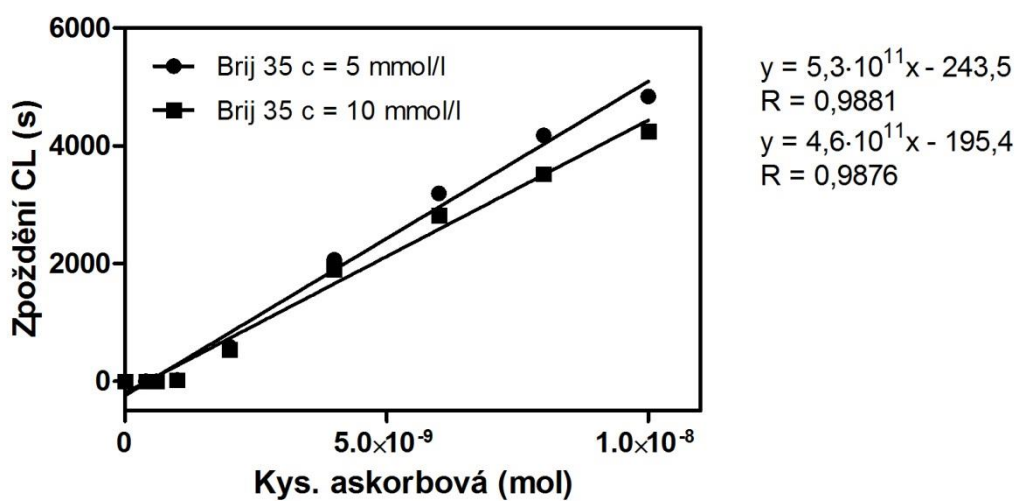
Trolox + Brij 35

Posledním testovaným neionickým surfaktantem byl Brij 35 (Obr. 19). Přítomnost Brij 35 v reakční směsi ovlivňuje stanovení antioxidační kapacity (hodnoty jsou přibližně 1,3x větší), ale tento rozdíl je výrazně nižší než u CTAB (Obr. 14). Vzhledem k tomu, že Brij 35 je pevná látka, byl také použit pro stanovení antioxidační kapacity kyseliny askorbové a byl použit pro solubizaci lipofilních antioxidantů (α -tokoferol, kvercetin).



Obrázek 19: Závislost zpoždění chemiluminiscence na látkovém množství troloxu při různých koncentracích Brij 35.

Kys. askorbová + Brij 35

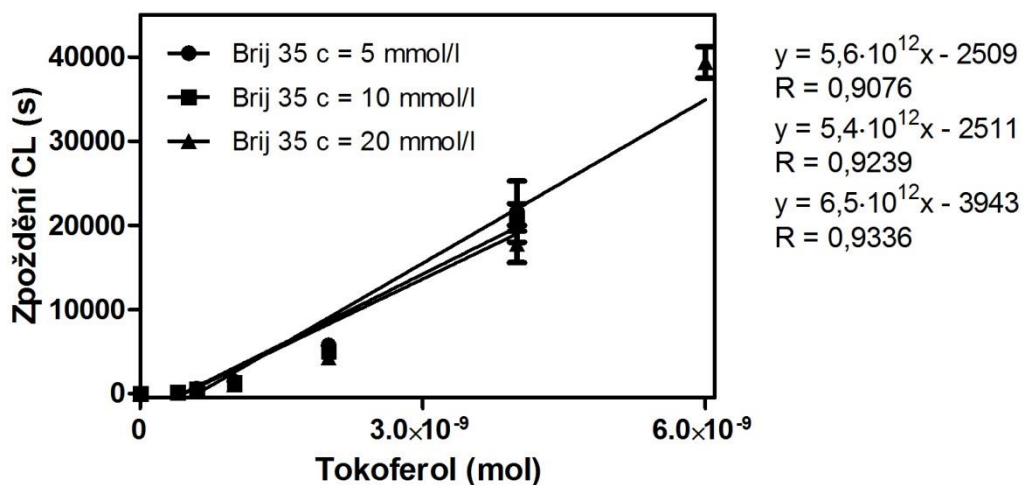


Obrázek 20: Závislost zpoždění chemiluminiscence na látkovém množství kyseliny askorbové při různých koncentracích Brij 35.

Z Obr. 20 lze vyčíst, že kyselina askorbová poskytuje nejnižší hodnotu antioxidační kapacity ze všech antioxidantů použitých v této práci při použití uvedené metody.

α -tokoferol + Brij 35

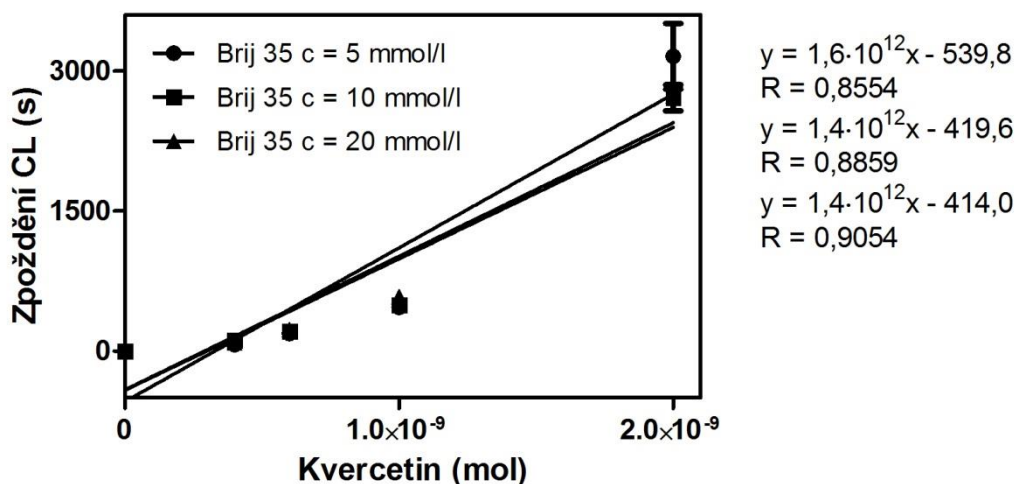
Měření antioxidační kapacity α -tokoferolu v přítomnosti Brij 35 (Obr. 21) ukázalo, že ani v tomto případě s použitím metody s HRP není antioxidační kapacita troloxu a α -tokoferolu stejná.



Obrázek 21: Závislost zpoždění chemiluminiscence na látkovém množství α -tokoferolu při různých koncentracích Brij 35.

Kvercetin + Brij 35

Dalším antioxidantem, který byl studován v přítomnosti Brij 35, byl kvercetin (Obr. 22). Kvercetin je za podmínek experimentu, podobně jako lipofilní antioxidanty, nerozpustný, proto byla otestována možnost měření jeho antioxidační kapacity po solubilizaci v roztoku Brij 35.



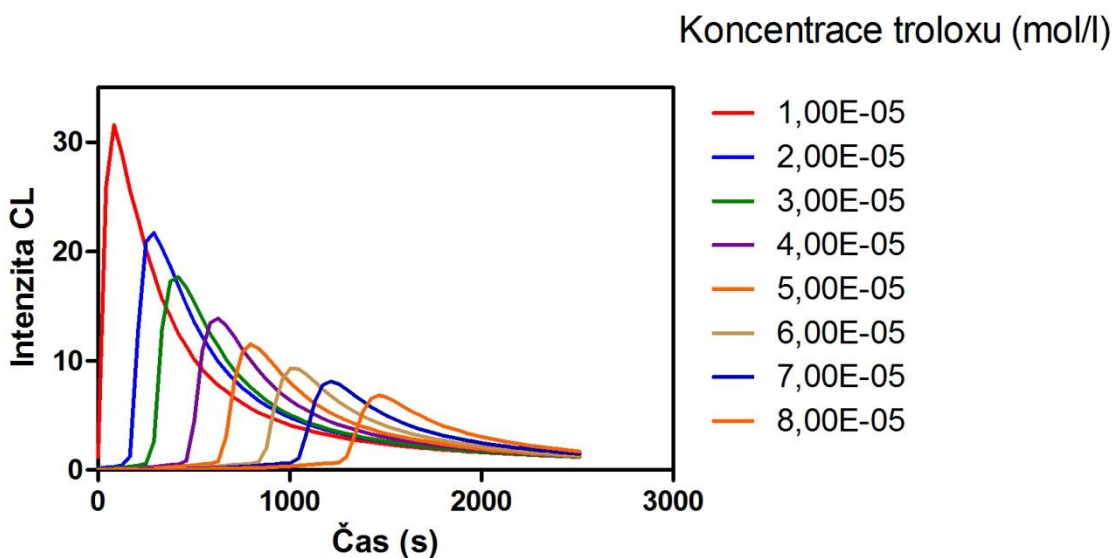
Obrázek 22: Závislost zpoždění chemiluminiscence na látkovém množství kvercetinu při různých koncentracích Brij 35.

Metoda využívající anorganický systém

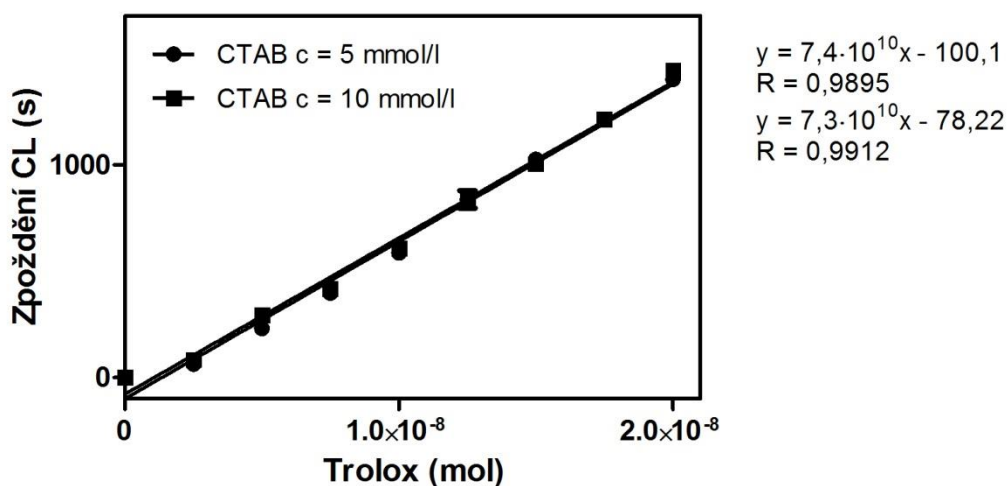
Druhou metodou pro stanovení antioxidační kapacity látek byla metoda využívající anorganický systém. Reakční směs místo HRP a fosfátového pufru obsahovala chlorid kobaltnatý a pufr Bis-Tris (pH = 8). Bez přítomnosti surfaktantu neposkytuje reakční směs luminolu, pufru, H₂O₂ a Co²⁺ chemiluminiscenci. Proto byla uvedená chemiluminiscenční směs a její využití pro stanovení antioxidační kapacity studována v přítomnosti stejných surfaktantů, které byly použity u metody využívající HRP (CPB, TX 100, Brij 35 nebo Tween 40). Ukázalo se však, že žádný z testovaných surfaktantů chemiluminiscenci neumožňuje, proto bylo možné zjistit antioxidační kapacitu antioxidantů (trolox, kyselina askorbová, α -tokoferol a kvercetin) pouze s CTAB v reakční směsi.

Trolox + CTAB

Podobně jako u metody s HRP je u Obr. 23 patrné zpoždění chemiluminiscence s rostoucí koncentrací troloxu. Intenzita chemiluminiscence je cca 10x nižší, než u peroxidase metody, ale její vyhasínání je pomalejší, obecně lze říci, že metoda poskytuje reprodukovatelnější výsledky než metoda využívající HRP.



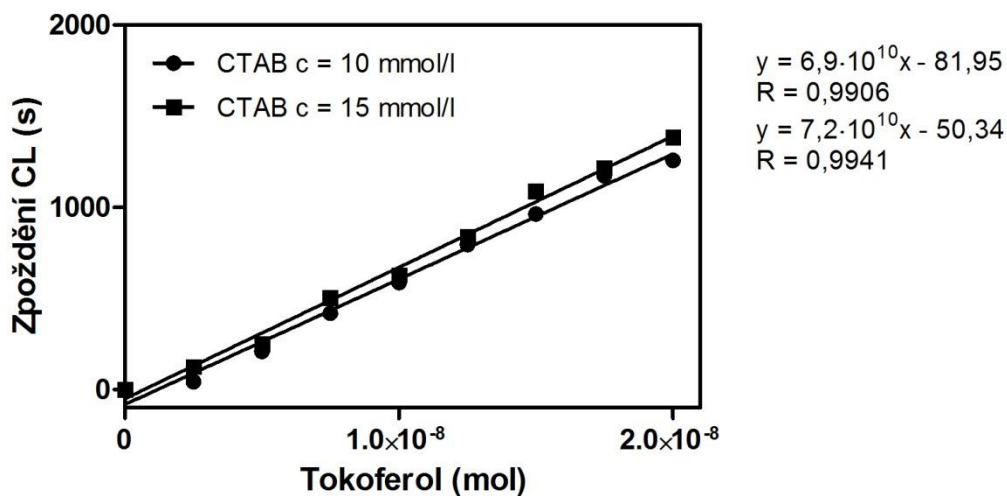
Obrázek 23: Závislost intenzity CL na čase pro různé koncentrace troloxu.



Obrázek 24: Závislost zpoždění chemiluminiscence na látkovém množství troloxu při různých koncentracích CTAB.

Z Obr. 24 – 27 je patrné, že různé koncentrace CTAB v reakční směsi neovlivňují antioxidační kapacitu měřených antioxidantů jako v případě metody s HRP. Dalším rozdílem oproti metodě s HRP je, že trolox a α -tokoferol poskytují stejné hodnoty antioxidační kapacity, čímž se potvrzuje, že trolox je ekvivalentní α -tokoferolu.

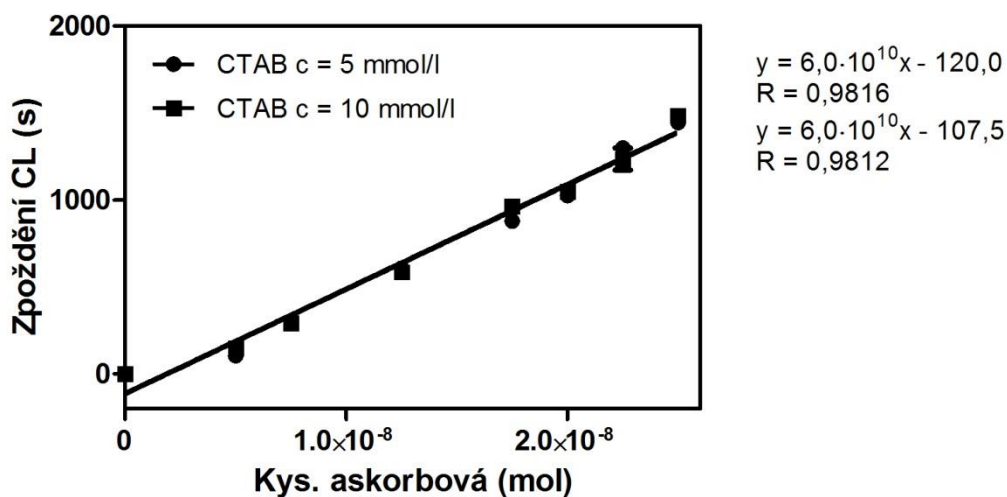
α -tokoferol + CTAB



Obrázek 25: Závislost zpoždění chemiluminiscence na látkovém množství α -tokoferolu při různých koncentracích CTAB.

Kys. askorbová + CTAB

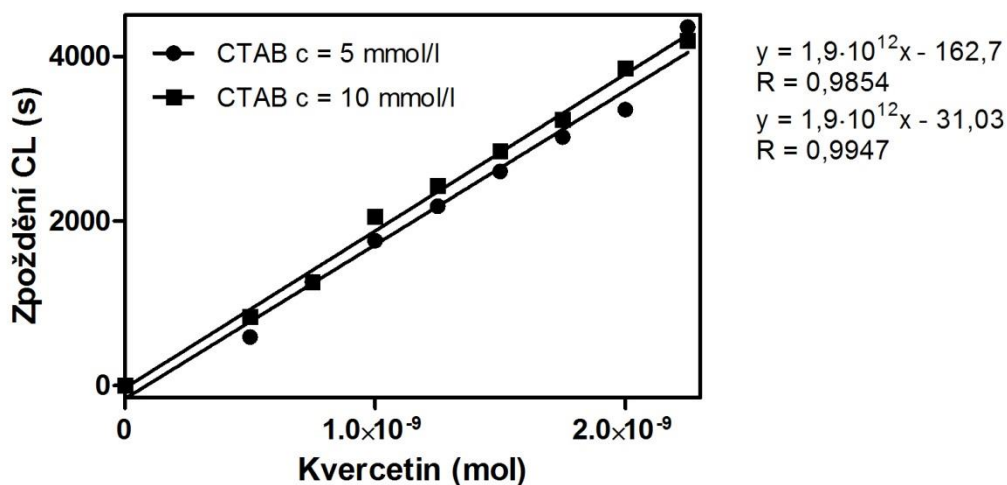
Měření antioxidační kapacity kys. askorbové anorganickým systémem potvrzuje, že kys. askorbová poskytuje podobnou (o 15% nižší) hodnotu antioxidační kapacity jako trolox a α -tokoferol.



Obrázek 26: Závislost zpoždění chemiluminiscence na látkovém množství kys. askorbové při různých koncentracích CTAB.

Kvercetin + CTAB

Antioxidační kapacita kvercetinu musela být měřena pouze pro malé koncentrace kvercetinu. Důvodem bylo, že vyšší koncentrace účinně zháší chemiluminiscenci vyvolanou anorganickým systémem.



Obrázek 27: Závislost zpoždění chemiluminiscence na látkovém množství kvercetinu při různých koncentracích CTAB.

Metoda poskytuje výrazně vyšší (28x) hodnotu antioxidační kapacity pro kvercetin ve srovnání s troloxem a α -tokoferolem. Je známo, že kvercetin je má výrazně vyšší antioxidační účinky než trolox a α -tokoferol, TEAC pro kvercetin má 6,9x vyšší hodnotu [59], tato hodnota však platí pro antioxidační účinky troloxu a kvercetinu vůči radikálu $\text{ABTS}^{\cdot+}$.

5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zjištění interakce povrchově aktivních látek s reakční směsí, která obsahovala křenovou peroxidasu, luminol, peroxid vodíku a antioxidant při fyziologickém pH (7,4). Dalším cílem práce bylo nahrazení křenové peroxidasy anorganickým systémem a opět provedení studie vlivu povrchově aktivních látek na reakční směs.

Pro studium ovlivnění uvedených reakčních směsí povrchově aktivními látkami byly vybrány dva kationické (CTAB, CPB) a tři neionické surfaktanty (TX 100, Tween 40 a Brij 35). Pro studium byly použity relativně vysoké koncentrace surfaktantů (5, 10 a 20 mmol/l), aby bylo možné do vzniklých micel solubilizovat dostatečná množství testovaných antioxidantů.

Z výsledků metody s HRP bylo zjištěno, že přítomnost CTAB zvyšuje hodnoty prodlev nástupu chemiluminiscence o cca 76 %. Použitelnost metody pro stanovení lipofilních antioxidantů byla testována na příkladu α -tokoferolu. Z výsledků vyplývá, že α -tokoferol poskytoval vyšší hodnotu antioxidační kapacity (1,4x) než trolox. Dalším testovaným surfaktantem byl CPB. Bylo zjištěno, že CPB je velmi účinný zhášecí CL směsi.

Z neionických surfaktantů byly testovány TX 100, Tween 40 a Brij 35. Všechny neionické surfaktanty poskytovaly podobné výsledky antioxidační kapacity. Pro další stanovení byl vybrán Brij 35.

Přítomnost Brij 35 v reakční směsi mírně ovlivnila stanovení antioxidační kapacity – hodnoty byly přibližně 1,3x větší ve srovnání se stanovením v nepřítomnosti surfaktantů. Bylo testováno stanovení antioxidační kapacity pro kyselinu askorbovou, α -tokoferol a kvercetin. Kyselina askorbová poskytla nejnižší hodnotu antioxidační kapacity ze všech antioxidantů použitých v této práci při použití uvedené metody. Měření antioxidační kapacity α -tokoferolu v přítomnosti Brij 35 ukázalo, že ani v tomto případě s použitím metody s HRP nebyla antioxidační kapacita troloxu a α -tokoferolu stejná.

Druhou metodou pro stanovení antioxidační kapacity látek byla metoda využívající anorganický systém. Reakční směs místo HRP a fosfátového pufru obsahovala chlorid kobaltnatý a pufr Bis-Tris o pH = 8. Bez přítomnosti surfaktantu neposkytovala reakční směs luminolu, pufru, H_2O_2 a Co^{2+} chemiluminiscenci. Proto byla uvedená chemiluminiscenční směs a její využití pro stanovení antioxidační kapacity studována

v přítomnosti stejných surfaktantů, které byly použity u metody využívající HRP (CPB, TX 100, Brij 35 nebo Tween 40).

Ukázalo se však, že s výjimkou CTAB v přítomnosti žádného z testovaných surfaktantů směs neposkytovala chemiluminiscenci, proto byly experimenty realizovány pouze s CTAB. Intenzita chemiluminiscence byla cca 10x nižší, než u peroxidasové metody, ale její vyhasínání bylo pomalejší, obecně lze říci, že metoda poskytuje reprodukovatelnější výsledky než metoda využívající HRP. Různé koncentrace CTAB v reakční směsi neovlivňovaly antioxidační kapacitu měřených antioxidantů jako v případě metody s HRP. Dalším rozdílem oproti metodě s HRP bylo, že trolox a α -tokoferol poskytovaly stejné hodnoty antioxidační kapacity. Měření antioxidační kapacity kys. askorbové metodou využívající anorganický systém potvrzuje, že kys. askorbová poskytuje podobnou (pouze o 15 % nižší) hodnotu antioxidační kapacity jako trolox a α -tokoferol. Antioxidační kapacita kvercetinu musela být měřena pouze pro malé koncentrace kvercetinu, protože vyšší koncentrace účinně zhasí chemiluminiscenci vyvolanou anorganickým systémem. Metoda poskytuje výrazně vyšší (28x) hodnotu antioxidační kapacity pro kvercetin ve srovnání s troloxem a α -tokoferolem.

6 SUMMARY

The purpose of this work was to find out the interaction between surfactants and reaction mixture, which contained horseradish peroxidase, luminol, hydrogen peroxide and antioxidant in physiological pH (7,4). Another purpose of this work was replacing horseradish peroxidase for inorganic system and performing the study focused on the effect of surfactants on reaction mixture.

To study the effect of surfactants on the aforementioned reaction mixtures by two cationic (CTAB, CPB) and three nonionic surfactants (TX 100, Tween 40 and Brij 35) were chosen. Quite high concentrations of surfactants (5, 10 and 20 mmol/l) were used in order to solubilize sufficient amounts of tested antioxidants.

From the results obtained with HRP method it was found out that the presence of CTAB increases delayed values of chemiluminescence onsets. The values of CL delays were about 76 % higher. The usability of this method for determining lipophilic antioxidants was tested on α -tocopherol. α -tocopherol gave significantly higher value of antioxidant capacity (1,4x) than trolox. Another tested surfactant was CPB. It was found out that CPB is very effective quencher of CL mixture and therefore cannot be used in the antioxidant capacity assay.

From nonionic surfactants TX 100, Tween 40 and Brij 35 were tested. All nonionic surfactants gave similar results of antioxidant capacity. Brij 35 was chosen for more detailed study.

The presence of Brij 35 in the reaction mixture slightly affected the determination of antioxidant capacity – values were approximately 1,3x higher in comparison with the determination without surfactants. Antioxidant capacity was measured also for ascorbic acid, α -tocopherol and quercetin. Ascorbic acid gave the lowest antioxidant capacity value from all antioxidants used in this work using HRP method in the presence of Brij 35. Measurement of antioxidant capacity of α -tocopherol in the presence of Brij 35 showed different value compared to trolox. It can be concluded, that HRP method provides inconsistent results of antioxidant capacities of the standard antioxidants. Another method for the determination of antioxidant capacity of substances was method using inorganic initiation system. Reaction mixture contained cobalt (II) chloride and Bis-Tris (pH = 8) buffer instead of HRP and phosphate buffer. In the absence of surfactant the reaction mixture of luminol, buffer, H_2O_2 a Co^{2+} , did not provide any chemiluminescence. For this reason the reaction mixture and its usage for determination of antioxidant capacity was

studied in the presence of the same surfactants which were used in HRP method (CPB, TX 100, Brij 35 or Tween 40).

However, with the exception of CTAB, no chemiluminescence was observed in the presence of these surfactants. That's why all other experiments were carried out with CTAB only. The intensity of chemiluminescence was about 10x lower than intensity observed with HRP method, but its decay was slower. Generally, one can say that this method gives more reproducible results than HRP method. Different concentrations of CTAB in the reaction mixture didn't have effect on antioxidant capacity of measured antioxidants as in the case of HRP method. Another difference against HRP method was that trolox and α -tocopherol gave the same values of antioxidant capacity. Measurement of antioxidant capacity of ascorbic acid using inorganic system confirms that ascorbic acid gives similar (only 15 % lower) value of antioxidant capacity as trolox and α -tocopherol. Antioxidant capacity of quercetin had to be measured only for low concentrations, because higher concentrations effectively quench chemiluminescence induced by inorganic system. The method gives distinctly higher (28x) value of antioxidant capacity of quercetin in comparison with trolox and α -tocopherol.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, and J. Telser, "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 39, no. 1, pp. 44–84, Jan. 2007.
- [2] W. H. Koppenol, "Names for inorganic radicals (IUPAC Recommendations 2000)," *Pure Appl. Chem.*, vol. 72, no. 3, pp. 437–446, 2000.
- [3] S. Bolisetty and E. a Jaimes, "Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 3, pp. 6306–44, Jan. 2013.
- [4] P. G. Pietta, "Flavonoids as antioxidants.," *J. Nat. Prod.*, vol. 63, no. 7, pp. 1035–1042, Jul. 2000.
- [5] Y. a Vladimirov and E. V Proskurnina, "Free radicals and cell chemiluminescence.," *Biochem. Biokhimiia*, vol. 74, no. 13, pp. 1545–1566, Dec. 2009.
- [6] M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, and M. Mazur, "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 160, no. 1, pp. 1–40, Mar. 2006.
- [7] J. Pourova, M. Kottova, M. Voprsalova, and M. Pour, "Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes.," *Acta Physiol. (Oxf)*, vol. 198, no. 1, pp. 15–35, Jan. 2010.
- [8] P. Pacher, J. Beckman, and L. Liaudet, "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease.," *Physiol. Rev.*, pp. 315–424, 2007.
- [9] B. Halliwell, "Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence?," *Lancet*, vol. 344, pp. 721–724, 1994.
- [10] B. Halliwell, "Free radicals and other reactive species in disease," *eLS*, pp. 1–7, 2005.
- [11] J. Pokorny, N. Yanishlieva, and M. Gordon, *Antioxidants in food*. Woodhead Publishing Limited, 2001.
- [12] J. Chaudière and R. Ferrari-Iliou, "Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 37, no. 9–10, pp. 949–962, 1999.
- [13] R. Brigelius-Flohe and M. Traber, "Vitamin E: function and metabolism," *FASEB J.*, pp. 1145–1155, 1999.
- [14] D. Christodouleas, C. Fotakis, K. Papadopoulos, E. Yannakopoulou, and a C. Calokerinos, "Development and validation of a chemiluminogenic method for the evaluation of antioxidant activity of hydrophilic and hydrophobic antioxidants.," *Anal. Chim. Acta*, vol. 652, no. 1–2, pp. 295–302, Oct. 2009.
- [15] R. Apak, S. Gorinstein, V. Böhm, K. M. Schaich, M. Özyürek, and K. Güçlü, "Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report)," *Pure Appl. Chem.*, vol. 85, no. 5, pp. 957–998, Feb. 2013.
- [16] R. L. Prior, X. Wu, and K. Schaich, "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements.," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 10, pp. 4290–4302, May 2005.
- [17] A. Ghiselli, M. Serafini, and A. Ferro-Luzzi, "New approaches for measuring plasma or serum antioxidant capacity: A methodological note," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 16, no. 1, p. 135, Jan. 1994.
- [18] G. Cao, H. M. Alessio, and R. G. Cutler, "Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 14, no. 3, pp. 303–311, Mar. 1993.

- [19] D. Huang, B. Ou, and R. L. Prior, "The chemistry behind antioxidant capacity assays.," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 6, pp. 1841–1856, Mar. 2005.
- [20] B. Ou, M. Hampsch-Woodill, and R. L. Prior, "Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe.," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, no. 10, pp. 4619–4626, Oct. 2001.
- [21] M. Rafiq, M. Azeemuddin, S. Anturlikar, G. Viswanatha, and P. Patki, "Application of oxygen radical absorbance capacity ORAC assay in the estimation of antioxidant value of botanicals," *Oxid. Antioxid. Med. Sci.*, vol. 1, no. 2, p. 1, 2012.
- [22] D. D. M. Wayner, G. W. Burton, K. U. Ingold, and S. Locke, "Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation," *FEBS Lett.*, vol. 187, no. 1, pp. 33–37, 1985.
- [23] R. Re, N. Pellegrini, and A. Proteggente, "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay," *Free Radic. Biol.*, vol. 26, no. 98, pp. 1231–1237, 1999.
- [24] N. J. Miller, C. Rice-Evans, M. J. Davies, V. Gopinathan, and A. Milner, "A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates.," *Clin. Sci. (Lond.)*, vol. 84, pp. 407–412, 1993.
- [25] P. Sharma and R. P. Singh, "Evaluation of Antioxidant Activity in Foods with Special Reference to TEAC Method," *Am. J. Food Technol.*, vol. 8, no. 2, pp. 83–101, Feb. 2013.
- [26] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, and C. Berset, "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 28, pp. 25–30, 1995.
- [27] I. F. F. Benzie, "An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA)," *Clin. Biochem.*, vol. 29, pp. 111–116, 1996.
- [28] I. F. Benzie and J. J. Strain, "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay.," *Anal. Biochem.*, vol. 239, pp. 70–76, 1996.
- [29] M. Pohanka, H. Bandouchova, J. Sobotka, J. Sedlackova, I. Soukupova, and J. Pikula, "Ferric reducing antioxidant power and square wave voltammetry for assay of low molecular weight antioxidants in blood plasma: performance and comparison of methods.," *Sensors (Basel)*, vol. 9, no. 11, pp. 9094–9103, Jan. 2009.
- [30] I. F. Benzie and J. J. Strain, "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay.," *Anal. Biochem.*, vol. 239, no. 1, pp. 70–76, Jul. 1996.
- [31] K.-D. Gundermann and F. McCapra, *Chemiluminescence in Organic Chemistry*, vol. 23. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1987.
- [32] C. Dodeigne, L. Thunus, and R. Lejeune, "Chemiluminescence as diagnostic tool. A review.," *Talanta*, vol. 51, no. 3, pp. 415–439, Mar. 2000.
- [33] a C. Calokerinos, N. T. Deftereos, and W. R. Baeyens, "Chemiluminescence in drug assay.," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 13, no. 9, pp. 1063–1071, Aug. 1995.
- [34] K. Faulkner and I. Fridovich, "Luminol and Lucigenin as Detectors for O₂," vol. 15, pp. 447–451, 1993.
- [35] E. Cordes and R. Dunlap, "Kinetics of organic reactions in micellar systems," *Acc. Chem. Res.*, no. November, 1969.
- [36] T. Dwars, E. Paetzold, and G. Oehme, "Reactions in micellar systems.," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 44, no. 44, pp. 7174–7199, Nov. 2005.

- [37] M. J. Rosen, *Surfactants and Interfacial Phenomena*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2004.
- [38] D. Edwards, R. Luthy, and Z. Liu, "Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions," *Environ. Sci.*, vol. 25, no. 1, pp. 127–133, 1991.
- [39] K. Holmberg, B. Jönsson, B. Kronberg, and B. Lindman, *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2002.
- [40] P. V. Iyer and L. Ananthanarayan, "Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment," *Process Biochem.*, vol. 43, no. 10, pp. 1019–1032, Oct. 2008.
- [41] G. Savelli, N. Spreti, and P. Di Profio, "Enzyme activity and stability control by amphiphilic self-organizing systems in aqueous solutions," *Curr. Opin. colloid interface*, vol. 5, pp. 111–117, 2000.
- [42] A. Moosavi-Movahedi, K. Nazari, and A. Saboury, "Thermodynamics of denaturation of horseradish peroxidase with sodium n-dodecyl sulphate and n-dodecyl trimethylammonium bromide," *Colloids Surfaces B*, 1997.
- [43] D. Otzen, "Protein-surfactant interactions: a tale of many states.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1814, no. 5, pp. 562–591, May 2011.
- [44] B. D. Rege, J. P. Y. Kao, and J. E. Polli, "Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers.," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 16, no. 4–5, pp. 237–246, Sep. 2002.
- [45] P. M. Rodi, M. D. Bocco Gianello, M. C. Corregido, and a M. Gennaro, "Comparative study of the interaction of CHAPS and Triton X-100 with the erythrocyte membrane.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1838, no. 3, pp. 859–866, Mar. 2014.
- [46] S. Srinivasulu and A. G. A. Rao, "Kinetic and structural studies on the interaction of surfactants with lipoxygenase L1 from soybeans (*Glycine max*)," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 41, no. 3, pp. 366–371, Mar. 1993.
- [47] L. Gebicka, "Kinetic approach to the interaction of sodium n-dodecyl sulphate with heme enzymes.," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 24, no. 1, pp. 69–74, Jan. 1999.
- [48] T. Noipa, S. Srijaranai, T. Tuntulani, and W. Ngeontae, "New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems," *Food Res. Int.*, vol. 44, no. 3, pp. 798–806, Apr. 2011.
- [49] J. a. Murillo Pulgarín, L. F. G. Bermejo, and A. C. Durán, "Evaluation of the antioxidant activity of vegetable oils based on luminol chemiluminescence in a microemulsion," *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 112, no. 12, pp. 1294–1301, Dec. 2010.
- [50] J. Rozsypal, "Chemiluminiscenční stanovení antioxidační kapacity – srovnání metod využívajících luminol-CTAB-BisTris a luminol-HRP," Univerzita Palackého v Olomouci, 2012.
- [51] O. Tunka, "Vliv vybraných biologických pufrů na chemiluminiscenční reakce luminolu," Univerzita Palackého v Olomouci, 2006.
- [52] S. P. Moulik, M. E. Haque, P. K. Jana, and A. R. Das, "Micellar Properties of Cationic Surfactants in Pure and Mixed States," *J. Phys. Chem.*, vol. 100, no. 2, pp. 701–708, Jan. 1996.
- [53] M. Vojteková and F. Kopecký, "Effect of addition of KX type electrolytes and temperature on the critical micellar concentrations of 1-cetylpyridinium and carbethopendecinium bromides," *Collect.*, vol. 59, pp. 99–105, 1994.

- [54] S. K. Hait and S. P. Moulik, "Determination of critical micelle concentration (CMC) of nonionic surfactants by donor–acceptor interaction with iodine and correlation of CMC with hydrophile–lipophile balance and other parameters of the surfactants," *J. Surfactants Deterg.*, vol. 4, no. 3, pp. 303–309, 2001.
- [55] S. Girotti, E. Ferri, F. Fini, L. Bolelli, A. G. Sabatini, R. Budini, and D. Sichertova, "Automated and manual luminescent assay of antioxidant capacity: Analytical features by comparison," *Talanta*, vol. 64, pp. 665–670, 2004.
- [56] M. Bancirova, "Comparison of the antioxidant capacity and the antimicrobial activity of black and green tea," *Food Res. Int.*, vol. 43, pp. 1379–1382, 2010.
- [57] T. P. Whitehead, D. Robinson, S. Allaway, J. Syms, and A. Hale, "Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum.," *Clin. Chem.*, vol. 41, pp. 32–35, 1995.
- [58] S. Girotti, L. Bolelli, and F. Fini, "Chemiluminescent determination of antioxidant capacity of beverages," *Ital. J. food*, vol. 14, pp. 113–122, 2002.
- [59] R. Van Den Berg and G. Haenen, "The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay," *Food Chem.*, vol. 70, pp. 391–395, 2000.