Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Pedagogická fakulta
Katedra výchovy ke zdraví

Metody zjišťování látek antioxidačního charakteru

Diplomová práce

Autor: Kateřina Turková
Studijní program: Vychovatelství
Studijní obor: Vychovatelství se zaměřením na výchovu ke zdraví
Vedoucí práce: Mgr. Jan Schuster, Ph.D.

České Budějovice, duben 2013

University of South Bohemia in České Budějovice
Faculty of Education
Department of Health Education

The Methods for the Detection of Antioxidants Substances

Diploma Thesis

Author: Kateřina Turková
Study Programme: Specialization in Education
Field of Study: Education for Health
Supervisor: Mgr. Jan Schuster, Ph.D.

České Budějovice, April 2013

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Kateřina Turková

Název diplomové práce: Metody zjišťování látek antioxidačního charakteru

Studijní obor: Vychovatelství se zaměřením na výchovu ke zdraví

Pracoviště: Katedra výchovy ke zdraví, Pedagogická fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Jan Schuster, Ph.D.

Rok obhajoby diplomové práce: 2014

Abstrakt: Antioxidantům a volným radikálům se v současnosti věnuje velká pozornost v klinické a výživové literatuře. Různé reaktivní formy kyslíku jsou vytvářeny při zcela normálních metabolických pochodech naší látkové výměny nebo pocházejí z vnějších zdrojů, jako je vystavení různým vlivům našeho životního prostředí. Lipidy, proteiny, uhlohydráty a DNA jsou schopné reagovat s reaktivními formami kyslíku a mohou být zapojeny v etiologii nejrůznějších onemocnění. Antioxidační systém chrání organismus před účinky volných radikálů jejich vychytáváním, a tím zabraňuje strukturálnímu poškození buněk. Měření jednotlivých složek antioxidačního systému poskytuje důležité informace o ochraně proti účinkům volných radikálů. Během minulého desetiletí bylo vyvinuto mnoho analytických metod k detekci antioxidační aktivity přírodních sloučenin a jejich směsí *in vitro*. Některé procedury zahrnují metody založené na generaci různých forem radikálů a jejich následné eliminaci po ošetření směsi potenciální sloučeninou s antioxidačním charakterem. Metody používané pro stanovení celkové antioxidační aktivity jsou: Trolox equivalent antioxidant capacity-TEAC, diphenylpicrylhydrazil - DPPH, oxygen radical absorbance capacity-ORAC a metody zkoumající schopnost zábránit lipidové peroxidaci. Další skupinu tvoří metody posuzující redoxní vlastnosti látek (ferric reducing antioxidant potential assay-FRAP, cyklická voltametrie, HPLC).

Klíčová slova: antioxidanty, antioxidační aktivita, vitaminy, polyfenoly, volné radikály, oxidační stres, metody

Bibliographic Identification

Name and Surname: Kateřina Turková

Title of Diploma Thesis: The Methods for the Detection of Antioxidants Substances

Field of Study: Education for Health

Department: Health Education, Faculty of Education, University of South Bohemia in České Budějovice

Supervisor: Mgr. Jan Schuster, Ph.D.

The Year of Presentation: 2014

Abstract: Antioxidants and free radicals are widely discussed in the clinical and nutritional literature. Various reactive oxygen species (ROS) may be produced from normal biochemical, essential metabolic processes or from external sources as exposure to a variety of agents presented in the environment. Lipids, proteins, carbohydrates and DNA are all capable of reacting with ROS and can be implicated in etiology of various human disorders. The antioxidant system protects the organism from the effects of free radicals by scavenging them and thus preventing structural damage of cells. Measuring the individual components of the antioxidant system has provided important information about the defences against free radical effect. During the last decade, many analytical methods have been developed to determine the antioxidant activity of natural compounds and their mixtures *in vitro.* Some procedures involve the methods based on the generation of various radical species and their elimination by treatment with potential antioxidant compounds. The tests used for the evalution of total antioxidant activity are: Trolox equivalent antioxidant capacity-TEAC, diphenylpicrylhydrazil - DPPH, oxygen radical absorbance capacity-ORAC and the methods testing the ability to prevent lipid peroxidation. The other group includes the procedures that are based on measurement of redox properties of compouds (ferric reducing antioxidant potential assay-FRAP, cyclic voltammetry, HPLC).

Keywords: antioxidants, vitamins, polyphenols, free radicals, oxidative stress, methods, antioxidant activity,

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci „Metody zjišťování látek antioxidačního charakteru“ vypracovala samostatně pod odborným vedením Mgr. Jana Schustera, Ph.D., pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), v platném znění, souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě, fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 31. 3. 2013 Kateřina Turková

Poděkování:

Děkuji Mgr. Janu Schusterovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a ochotu při vypracování diplomové práce. Můj vřelý dík patří též MUDr. Václavu Holečkovi, CSc., za jeho čas a ochotu poskytnout cenné informace.

OBSAH

1 ÚVOD 9

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED 10

2.1 TEORIE VOLNÉHO RADIKÁLU 10
2.2 POJEM VOLNÉHO RADIKÁLU 10
2.3 PŘÍČINY VZNIKU ROS 13
2.4 ZDROJE ROS *IN VIVO* 13
2.5 ÚČINKY VOLNÝCH RADIKÁLŮ 15
2.5.1 Oxidační stres 15
2.5.2 Následky oxidačního stresu 17
2.5.3 Příznivé účinky volných radikálů 17
2.6 NEMOCI A STAVY ZPŮSOBENÉ VOLNÝMI RADIKÁLY 18
2.7 POJEM ANTIOXIDANT 20
2.8 CELKOVÁ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITA A AKTIVITA 21
2.9 LÁTKY ANTIOXIDAČNÍHO CHARAKTERU 22
2.9.1 Antioxidačně působící enzymové systémy 23
2.9.2 Minerály s antioxidačními účinky 24
2.9.3 Antioxidační vitaminy 24
2.9.4 Flavonoidy a jiné rostlinné fenoly 28
2.10 ZÁSADY PODÁVÁNÍ ANTIOXIDANTŮ 30

3 PRAKTICKÁ ČÁST 33

3.1 CÍLE PRÁCE 33
3.2 METODICKÝ PŘÍSTUP 33
3.3 ANALYTICKÉ VLASTNOSTI LABORATORNÍ METODY 33
3.4 METODY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY 34
3.4.1 Metody stanovení antioxidační aktivity in vitro vs. in vivo 36
3.4.2 Základní princip analytické laboratorní biochemie 38
3.4.3 Problematika stanovení rostlinných fenolických látek 39
3.4.4 Chemické metody 40
3.4.4.1 Metoda DPPH 40
3.4.4.2 Metoda FRAP 41
3.4.4.3 Metoda TEAC 41
3.4.4.4 Metoda ORAC 42
3.4.5 Fyzikální metody 44
3.4.5.1 Elektronová paramagnetická rezonance 44
3.4.5.2 Chemiluminiscence 48
3.4.5.3 Stanovení redox potenciálu 50
3.4.6 Lipidově peroxidační metody 50
3.4.6.1 TBARS metoda 52
3.4.6.2 HPLC metoda 53
3.4.7 Elektrochemické metody 55
3.4.7.1 Cyklická voltametrie 56
3.4.7.2 HPLC metoda s elektrochemickou detekcí 59
3.4.8 Metoda FORT a FORD 60
3.4.9 Komerční metody 62
3.4.9.1 Komerční souprava fy RANDOX 62
3.4.9.2 Metoda PCL (Photochem) 62
3.4.9.3 Biofotonický skener 64
3.5 UPLATNĚNÍ METOD 65

4 ZÁVĚR 68

5 SEZNAM POUŽITÝCH INFORMAČNÍCH ZDROJŮ

6 SEZNAM ZKRATEK

1 ÚVOD

Po celém světě se dlouhou dobu vědci intenzivně zabývají tématem volných radikálů, antioxidantů a oxidačního stresu. V moderní společnosti stoupá počet civilizačních onemocnění, která souvisí s působením volných radikálů. Problematika vztahu volných radikálů a onemocnění, která mohou být vyvolána či zhoršena jejich působením, i možnosti antioxidační terapie se stále častěji diskutuje v odborné, ale i populární literatuře. John Gutteridge a Barry Halliwell (1994), přední vědci na poli volných radikálů a antioxidantů, vystihli aktuálnost dané problematiky: „*V dnešní době je obtížné otevřít populárně vědecký časopis či odborné medicínské periodikum bez toho, aniž bychom si všimli článku o roli volných radikálů u onemocnění“* (TIRZITIS, BARTOSZ, 2010).

Co jsou to kyslíkové radikály? Proč jsou antioxidanty důležité? V čem spočívá jejich schopnost prospívat zdraví? S rostoucí popularitou nutričních doplňků více a více lidí vyhledává přesné a aktuální informace o živinách, které mohou zkvalitnit jejich život. Zároveň vzrůstá snaha chránit organismus před volnými radikály. Nabízí se tedy rozhodnutí pro antioxidační terapii či podporu zdraví právě antioxidanty. Prvním krokem by mělo být sledování vlastního stavu oxidačního stresu, potažmo antioxidační kapacity, ještě předtím, než se začne s neuváženým užíváním nutričních doplňků. Důležitým opatřením smysluplné prevence zdraví je tedy bezpochyby hodnocení antioxidačního stavu organismu. Oxidační stres je jedním z důležitých faktorů, které se podílejí na patogenezi řady onemocnění. V současné době je věnována stále větší pozornost možnostem jeho hodnocení. Lze jej laboratorně včas prokázat různými metodami. Oxidační stres může být způsoben oslabením antioxidační ochrany organismu. A naopak, dlouho trvající a intenzivní oxidační zatížení může vyčerpat nebo oslabit antioxidační systém. Proto je měření jednotlivých složek a testování kapacity systému velmi významné.

V posledních letech se též velký zájem soustřeďuje na otázku antioxidačních vlastností různých látek jak v řadách laické veřejnosti, tak i potravinářských odborníků, což má za následek vytvoření spolehlivých metod pro stanovení jak obsahu těchto látek *(in vitro)*, tak i účinků v organismu *(in vivo)*, které jejich přítomnost v potravinách navozuje. V oblasti chemické analýzy a biologického hodnocení potravin byly v posledním desetiletí vypracovány početné metody, které umožňují stanovit tzv. celkovou antioxidační aktivitu vzorku. Jsou principiálně značně navzájem odlišné a postupně se vyvíjejí jejich modifikace.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Teorie volného radikálu

Důležitým mezníkem je vytvoření teorie volných radikálů, kterou v šedesátých letech předložil doktor Harman. Teorie volného radikálu, posuzující působení fenoménu stárnutí, je známa od roku 1956 a je založena na předpokladu, že jeden jednoduchý proces, modifikovaný genetickými faktory a faktory zevního prostředí, je zodpovědný za stárnutí a smrt. Teorie tvrdí, že stárnutí je vyvoláno volnými radikály (např. reakcemi, které jsou zahrnuty do procesu stárnutí a souvisejí s životním prostředím, nemocemi a vnitřními procesy stárnutí). Oxidační stres a poškození volnými radikály poškozují buněčné tkáně, zvláště bílkoviny, DNA a tuky, a to je součást stárnutí a různých chronických onemocnění (MANDELKER, 2009). Z více než 300 teorií multifaktoriálního procesu stárnutí patří tato teorie k nejdůležitějším (HOLEČEK, 2006).

Do této doby se mělo za to, že volné radikály existují vně těla. Z vědců byli s volnými radikály obeznámeni jen organičtí chemici, kteří využívali produkce volných radikálů k syntéze nových sloučenin nebo ke komerční výrobě složitých chemikálií.

Harman velmi dobře znal volné radikály i lidské tělo. Pracoval jako vědec s praktickými zkušenostmi v radiační chemii a působil také jako lékař. Tato jedinečná kombinace mu umožnila pochopit, že volné radikály existují v těle a mohou mu působit škody (PASSWATER, 2002).

2.2 Pojem volného radikálu

Volné radikály jsou látky (atomy, molekuly, ionty) schopné samostatné existence, které mají ve svém elektronovém obalu nepárový elektron, event. více nepárových elektronů. Vznikají z normální částice ztrátou či přijetím elektronu (RACEK, 2003). Někdy je při chemické reakci jeden elektron odtržen od mateřské molekuly a stane se volným radikálem. Je to tedy nepárový elektron. Volné radikály jsou velmi nestálé a reaktivní, vyhledávají další elektron, aby vytvořily pár. Volné radikály způsobují škodu tím, že „vytrhávají“ elektrony z normálních tělesných buněk (PASSWATER, 2002). Elektrony zaujímají v atomech a molekulách definované prostory, tj. energetické hladiny, slupky zvané orbitaly. Každý orbital může obsahovat maximálně dva elektrony a ty musí mít opačný spin (řekněme směr rotace).

Pokud atom nebo molekula obsahuje alespoň jeden orbital s jediným nepárovým elektronem, částice se nazývá volný radikál (ŠTÍPEK, 2000).

Většina volných radikálů v těle jsou deriváty kyslíku, nazývané reaktivní formy kyslíku (ROS – reactive oxygen species), a deriváty dusíku, nazývané reaktivní sloučeniny dusíku (RNS – reactive nitrogen species). Za normálních okolností naše těla tyto reaktivní molekuly stále produkují ve velice reaktivních formách odvozených od kyslíku a dusíku. Protože obsahují jeden nebo více nepárových elektronů a jsou schopné nezávislé existence, nazývají se volné radikály (MANDELKER, 2009).

Volné dusíkaté radikály byly na naší zemi již v době, kdy zde ještě neexistoval život. Se vznikem života se pak objevily volné kyslíkové radikály. Není tedy divu, že volné radikály zasahují do mnoha životních funkcí i do vzniku mnoha nemocí. Na druhé straně se organismus naučil je i využívat ke svému prospěchu (HOLEČEK, 2011, on-line).

V posledních letech bylo získáno mnoho dokladů o tom, že v organismu běžně vzniká řada ROS a RNS, a že tyto látky mají značný fyziologický i patogenetický význam. Staly se proto předmětem intenzivního lékařského výzkumu a vědomosti o nich se postupně uplatňují v lékařské praxi. Jde o látky, které pohotově reagují s různými biologickými strukturami – mastnými kyselinami a lipidy, aminokyselinami a proteiny, mononukleotidy a polynukleotidy, i s řadou nízkomolekulárních metabolitů, koenzymů a jiných součástí živé hmoty. Díky tomu se staly významnými prostředníky přenosu energie a faktory imunitní ochrany. Za určitých okolností působí jako toxické látky a jako dezinformační agenti, schopní organismus poškodit a dokonce ho i usmrtit (ŠTÍPEK aj., 2000).

Radikálové poškození má často podobu řetězové reakce, neboť volný radikál se typicky stabilizuje vytržením elektronu z jiné struktury, čímž ji přemění na jiný radikál a proces pokračuje. Všechny typy biomolekul mohou být, a reálně také během lidského života jsou, poškozovány oxidací. Řetězová oxidace polynenasycených mastných kyselin v lipidech je známa nejvíce, ale oxidace proteinů a DNA (vedoucí k mutaci a kancerogenezi) může být in vivo důležitější (PLÁTENÍK, 2009).

Reakce probíhají značně rychle, např. volný hydroxylový radikál ($OH^{\cdot}$ – tečka značí volný elektron) má poločas svého trvání jen 10^{-9} s, radikál superoxid ($O_2^{\cdot -}$) 10^{-5} s. Řetězová reakce trvá tak dlouho, dokud se volný radikál nesetká s tzv. antioxidantem, který reakci výrazně zpomalí, až zastaví, nebo s jiným volným radikálem, s nímž pak vytvoří elektronový pár (HOLEČEK, 2011, on-line).

Mezi reaktivní formy kyslíku se řadí například superoxid ($O_2^{\bullet}$-) vznikající přijetím jednoho elektronu molekuly kyslíku: O_2 + e- ® $O_2^{\bullet}$- . Pokud superoxid přijme další elektron, dojde k redukci na peroxid vodíku: $O_2^{\bullet}$- + e- + 2H+ ® H2O2. Vzniklý peroxid vodíku se může vlivem dalšího elektronu rozpadnout na vodu a hydroxylový radikál ($HO^{\bullet}$) a ten opět reaguje s jedním elektronem za vzniku hydroxidového anionu (OH-). Tato čtyřelektronová redukce molekulového kyslíku na dvě molekuly vody je nezbytnou reakcí pro aerobní způsob života a probíhá v dýchacím řetězci mitochondrií v aktivním centru enzymu cytochromoxidázy. Vzniklý hydroxylový radikál není ve vazbě s enzymem škodlivý. Za jiné situace, v tzv. Fentonově reakci, vzniká z peroxidu vodíku v reakci s dvojmocným železem Fe^{2+} vysoce toxický hydroxylový radikál $HO^{\bullet}$, který v živé hmotě okamžitě reaguje s okolními molekulami, a jako extrémně silné oxidační činidlo vytrhuje elektron z nenasycených mastných kyselin a atakuje báze nukleových kyselin (DARLEY-USMAR, HALLIWELL, 1996).

Každý vzorec radikálu se označuje tečkou, indikující nepárový elektron, a jsou-li popisované částice zároveň ionty, vzorec se doplňuje podle počtu a typu náboje symboly plus (+) nebo minus (-) (RACEK, 2003).

Tab. 1 *Reaktivní formy kyslíku a dusíku* (ŠTÍPEK aj., 2000)

Reaktivní formy kyslíku (ROS)			
volné radikály		*látky neradikálové povahy*	
superoxidový radikálanion	$O_2^{\bullet -}$	peroxid vodíku	H_2O_2
hydroperoxylový radikál	HO_2		
hydroxylový radikál	$OH^{\bullet}$	kyselina chlorná	HClO
peroxylový radikál	$ROO^{\bullet}$	ozon	O_3
alkoxylový radikál	$RO^{\bullet}$	singletový kyslík	$^1O_2$
Reaktivní formy dusíku (RNS)			
volné radikály		*látky neradikálové povahy*	
oxid dusnatý	$NO^{\bullet}$	kyselina dusitá	HNO_2
oxid dusičitý	$NO^{\bullet}_2$	oxid dusitý	N_2O_3
		peroxynitrit	$ONOO^-$
		alkylperoxynitrit	$ROONO^-$

2.3 Příčiny vzniku ROS

Kyslík je esenciálním prvkem pro aerobní organismy. Po celou dobu života je však aerobní organismus současně vystavován i negativním vlivům jeho reaktivních forem vznikajících při oxidačních reakcích, tj. volných kyslíkových radikálů (HIEMER, MAROVÁ, ILLEK, 2007). Volné radikály a především ROS jsou vytvářeny různými mechanismy. Vznikají ve velkém množství během infekce a nemoci. Významné množství volných radikálů pochází i z buněčných mitochondrií. Redukce kyslíku, ke které dochází v různých místech mitochondriálního dýchacího elektronového řetězce, generuje volné radikály jako je superoxidový radikál (O^{2-}). Vzhledem ke své chemické povaze a tendenci přijímat volné elektrony pro tvorbu O^{2-} a skutečnosti, že v každé aerobní buňce musí docházet k buněčnému dýchání, je tvorba od kyslíku odvozených volných radikálů průvodním jevem mitochondriální produkce energie (MANDELKER, 2009).

Reaktivní formy kyslíku jsou vytvářeny při zcela normálních metabolických pochodech naší látkové výměny a podílejí se na syntéze pro organismus tak nezbytných látek, jako jsou bílkoviny, hormony či nukleové kyseliny. Vznikají v procesu postupné redukce kyslíku na vodu nebo sekundárními reakcemi působením protonu (H^+), resp. kovů jako železo nebo měď (KALAČ, 2003).

Reaktivní formy kyslíku existují normálně ve všech aerobních buňkách v rovnováze s antioxidanty. Oxidační stres se objevuje pokud je překročena kritická hranice, právě vlivem nárůstu reaktivních forem kyslíku, nebo úbytkem antioxidantů, popř. dojde k oběma stavům současně (WARIS, HAASEB, 2006).

Kyslík je tedy jedním ze základních prvků nezbytných pro udržení života, ale může mít škodlivé účinky, pokud množství jeho reaktivních sloučenin ve formě volných radikálů přesáhne potřebu buněk a není toto množství včas zablokováno (KALAČ, 2003).

2.4 Zdroje ROS *in vivo*

Endogenní zdroje kyslíkových radikálů:

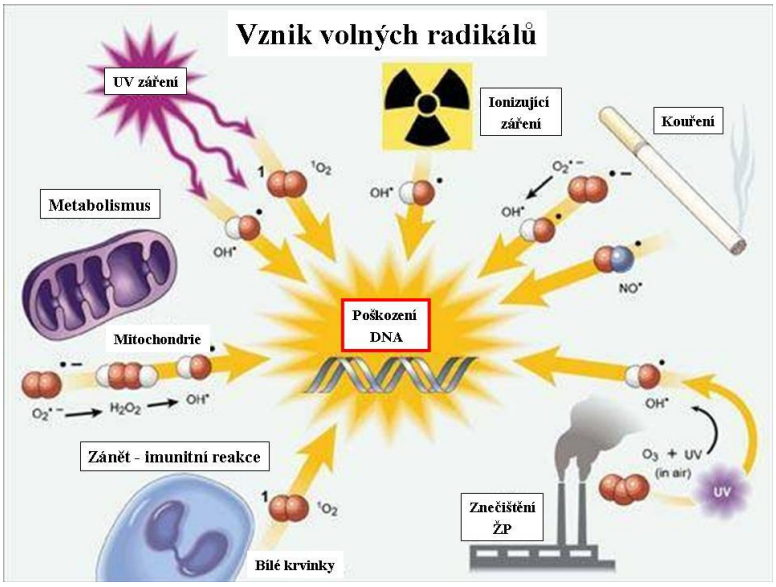
- průsak elektronů z dýchacího řetězce v mitochondriích
- respirační vzplanutí aktivovaných fagocytů /makrofágy, neutrofilní granulocyty, monocyty) – záněty, infekce
- produkce oxidu dusnatého (silný vasodilatační účinek)
- buněčná signalizace

- reakce cytochromu P-450
- peroxisomální oxidace mastných kyselin
- autooxidace katecholaminů
- biosyntéza kyseliny močově, prostaglandinů a estradiolu
- hypercholesterolemie, hyperglykémie
- nadměrná fyzická aktivita
- některé patologické stavy (BENZIE, STRAIN, 2005)

Exogenní zdroje kyslíkových radikálů:

- radioaktivní a UV záření
- tepelné zpracování potravin
- znečištěné ovzduší životního a pracovního prostředí (BENZIE, STRAIN, 2005)

Na vzniku volných reaktivních radikálů se podílí i znečištěné životní prostředí (Obr. 1). Zdrojem volných radikálů je ionizující záření, UV-záření, kouření a ozón. Velmi důležitým zdrojem, který dává vzniknout nebezpečným kyslíkovým radikálům, je ozón. Ozón vstupuje do listů rostlin průduchy a již v intercelulárách, v kontaktu s vlhkými buněčnými stěnami se velmi rychle rozkládá. Průnik nerozloženého ozónu přes plazmatickou membránu probíhá velice obtížně a pomalu. Při rozkladu ozónu vzniká nejen molekulový kyslík, ale jako meziprodukty i reaktivní superoxid, peroxid vodíku a hydroxylový radikál (LÍZALOVÁ, 2010).



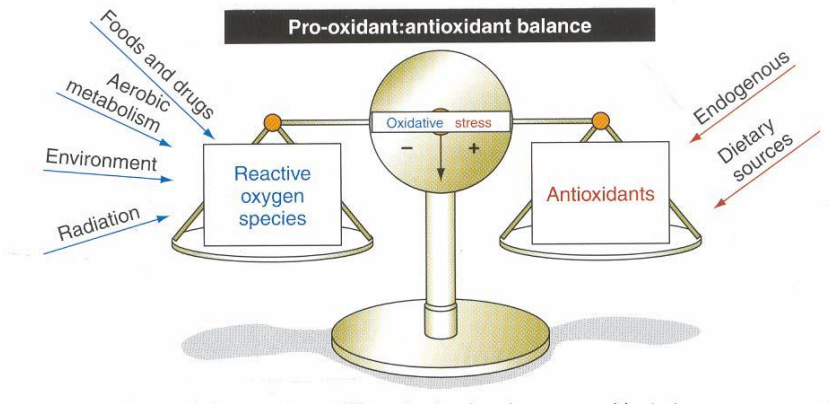
Obr. 1 *Vznik volných radikálů* (LÍZALOVÁ, 2010)

Tvorba VR zahrnuje řadu neenzymových dějů (ionizující záření, exhalace z průmyslu, kouření aj.), stejně tak mnohé prostředky antioxidační ochrany mají neenzymový charakter. Existuje však i množství dějů katalyzovaných enzymy, při nichž VR (resp. ROS) vznikají, nebo jsou naopak odbourávány. NADPH-oxidasa vedle NO-synthasy patří k hlavním enzymům katalyzujícím vznik volných radikálů v buňkách (RACEK, HOLEČEK, 1999). Fagocytární NADPH-oxidáza coby enzym produkující množství radikálů představuje pro organismus nebezpečí. Kdyby nebyly k dispozici dostatečně výkonné ochranné mechanizmy, hrozilo by poškození tkání při sebemenším povzbuzení imunity (VEJRAŽKA, 2004).

2.5 Účinky volných radikálů

2.5.1 Oxidační stres

Za normálních okolností existuje mezi produkcí volných radikálů a antioxidanty rovnováha. Převaha jedné i druhé složky vede k poruchám, které mohou organismus vážně ohrozit. Častější je případ, kdy převládají volné radikály, ať je to dáno jejich zvýšenou tvorbou, snížením koncentrace antioxidantů, nebo kombinací obou stavů. Převaha volných radikálů se označuje termínem oxidační stres, může vést k rozvoji chorob známých pod pojmem nemoci z volných radikálů (RACEK, 2004). Oxidační stres je tedy relativní převaha reaktivních forem kyslíku a dusíku nad antioxidační kapacitou (HOLEČEK, 2010).



Obr. 2 *Oxidační stres – nerovnováha mezi ROS a antioxidanty* (KOMPRDA, 2010).

Oxidační stres je jednoduše vzestup hladiny volných radikálů (např. ROS a RNS) v buňkách, kde se hromadí ve větším než normálním množství. Můžeme také definovat oxidační stres jako fyziologický stav, který se vyskytuje tam, kde dochází k významné nerovnováze mezi výrobou ROS a antioxidativními obrannými mechanismy.

Oxidační stres je fyziologickým stavem, který nastává při závažné nerovnováze mezi produkcí reaktivních forem kyslíku a antioxidační ochranou. Jakmile se objeví oxidační stres, a k tomu dochází téměř u všech chorob, můžeme si položit otázku, zda je pouze součástí chorobného procesu nebo je to choroba sama (MANDELKER, 2009).

Oxidační stres produkuje množství škodlivých metabolitů. Zvláště to jsou kancerogenní aldehydy, které se však vážou na bílkoviny a tak vytváří vysoce imunogenní látky. Proti nim se vytváří patologické protilátky, což může způsobit vznik různých onemocnění, jako je systémový lupus erythematodes (SLE), diabetes mellitus, revmatická artritida aj. (HOLEČEK, 2010).

Míra schopnosti tkáně vzdorovat oxidačnímu stresu je určena jednak množstvím v ní přítomných antioxidantů, jednak jejich druhem. Parametr, který koreluje se schopností tkáně odolávat oxidačnímu stresu, je označován jako antioxidační kapacita (HRBÁČ, 2007).

V posledních desetiletích přicházejí vědci se stále novými poznatky o úloze volných radikálů při oxidačním stresu u živých organismů. Tyto radikály působí na biologicky významné sloučeniny, především lipidy, bílkoviny a nukleové kyseliny, pozměňují jejich strukturu a tím modifikují jejich funkci. Reakce iniciované radikály vedou k následným změnám ve struktuře buněk, poškození celých tkání, orgánů a důležitých funkcí v organismu (RACEK, 2003).

Tab. 2 *Hlavní cílové struktury pro reaktivní formy a následky těchto napadení* (ŠTÍPEK aj., 2000)

CÍL	**POŠKOZENÍ**	**NÁSLEDKY**
Nenasycené mastné kyseliny v lipidech	• ztráta dvojných vazeb, • tvorba reaktivních metabolitů (peroxidy, aldehydy)	• změněná fluidita lipidů, • změny v propustnosti membrán, • vliv na membránově vázané lipidy,
Proteiny	• agregace a síťování, • modifikace thiolových skupin a benzeových jader AMK, • fragmentace a štěpení	• změny v aktivitě enzymů, • změny v transportu iontu, • vstup Ca^2+ do cytosolu
DNA	• štěpení kruhu deoxyribózy, • modifikace a poškození bazí • zlomy řetězce, • křížové vazby řetězců	• mutace, • translační chyby, • inhibice proteosyntézy

2.5.2 Následky oxidačního stresu

Podle všeho podléhá každá buňka v některém stadiu své existence oxidačnímu stresu. Většina orgánových systému je přímo postižena oxidačním stresem a jejich narušená funkce má přímý dopad na zdravotní stav. Patří sem poškození ledvin, srdce a cirkulační soustavy, jater, slinivky břišní, centrální nervové soustavy a nervové tkáně, střev, nadledvinek, kostní dřeně, plic a štítné žlázy. Takže oxidační stres působí nejen na jednotlivé buňky, ale i na orgánové systémy, stav imunitního systému a stárnutí (MANDELKER, 2009).

Volné radikály mohou modifikovat promotorovou část DNA, která reguluje aktivitu genu – navozuje nebo potlačuje transkripci. Reakcí superoxidu s oxidem dusnatým vznikající peroxinitril nitruje bílkoviny, volné radikály působí lipoperoxidaci, při které vznikají kancerogenní aldehydy, vysoká koncentrace radikálu oxidu dusnatého zrychluje tumorigenezi (HOLEČEK, 2010). Karcinogeneze je vícestupňový proces zahrnující mutace a zvýšenou proliferaci buněk. Neregulovaná nebo prodloužená produkce buněčných oxidantů je také spojena s mutacemi DNA a s modifikacemi genové exprese (MANDELKER, 2009).

Stejně jako lipidy a proteiny jsou také nukleové kyseliny poškozovány reaktivními formami kyslíku a dusíku, především hydroxylovým radikálem HO•. Reaguje s deoxyribosou za vzniku malondialdehydu a dalších produktů, modifikuje a uvolňuje purinové a pyrimidinové báze. Následkem těchto reakcí se může přerušit polynukleotidový řetězec, nebo se mohou vytvořit křížové vazby DNA s proteiny. Primární reakcí HO• s DNA je odštepení vodíkového atomu z deoxyribosy, což vede k destrukci sacharidu a přerušení řetězce. HO• je schopen připojit se k purinovým a pyrimidinovým bázím a změnit je tak na hydroxyderiváty a oxoderiváty. Následkem takových změn je chybné párování bází při replikaci DNA a zavedení chyby do genetické informace. Poškození DNA se projeví apoptosou, mutagenezí, karcinogenezí a stárnutím (WANG, KREUTZER, ESSINGMANN, 1998).

2.5.3 Příznivé účinky volných radikálů

Ve většině publikací je zdůrazňován nepříznivý účinek volných radikálů. Nesmíme však zapomenout, že volné radikály mají i účinky pro organismus příznivé (RACEK, 2004).

Reaktivní formy kyslíku se účastní uvolňování a přeměny energie nezbytné pro životní pochody, jsou součástí enzymových mechanismů a některé z nich jsou významnými signálními molekulami v buněčném informačním systému. Škodí pouze tehdy, vymknou-li se přísné kontrole, kterou každý aerobní organismus získal v průběhu vývoje biologického systému (ŠTÍPEK aj., 2000).

Oxygenace a volné kyslíkové radikály jsou nezbytné k obraně proti útočícím organismům. Volné kyslíkové radikály jsou mitochondriálním dýchacím řetězcem produkovány dokonce denně v rámci normální respirace a tvorby energie mitochondriemi. Z toho vyplývá, že ne všechny formy oxidačního stresu jsou špatné. Oxidační stres má také své výhody. Bez některých forem oxidačního stresu by živé buňky nebyly schopny života. Oxidační stres řídí mnoho z našich nejdůležitějších metabolických drah, které produkují nové tkáně, hojí rány, podporují růst a umožňují našemu tělu adaptaci na stres či onemocnění (MANDELKER, 2009)

Mezi konkrétní pozitivní účinky patří to, že buňky imunitního systému za pomoci volných radikálů se účastní likvidace bakterií ve fagocytech. K zabíjení fagocytovaných mikroorganismů se využívá kyselina chlorná. Volné radikály hrají též úlohu při oplodnění. Spermie vyžaduje k úspěšnému oplodnění vajíčka superoxid a peroxid vodíku. Superoxid je třeba k narušení membrány vajíčka, peroxid vodíku je vytvářen vajíčkem po oplodnění a zabraňuje pronikání dalších spermií.

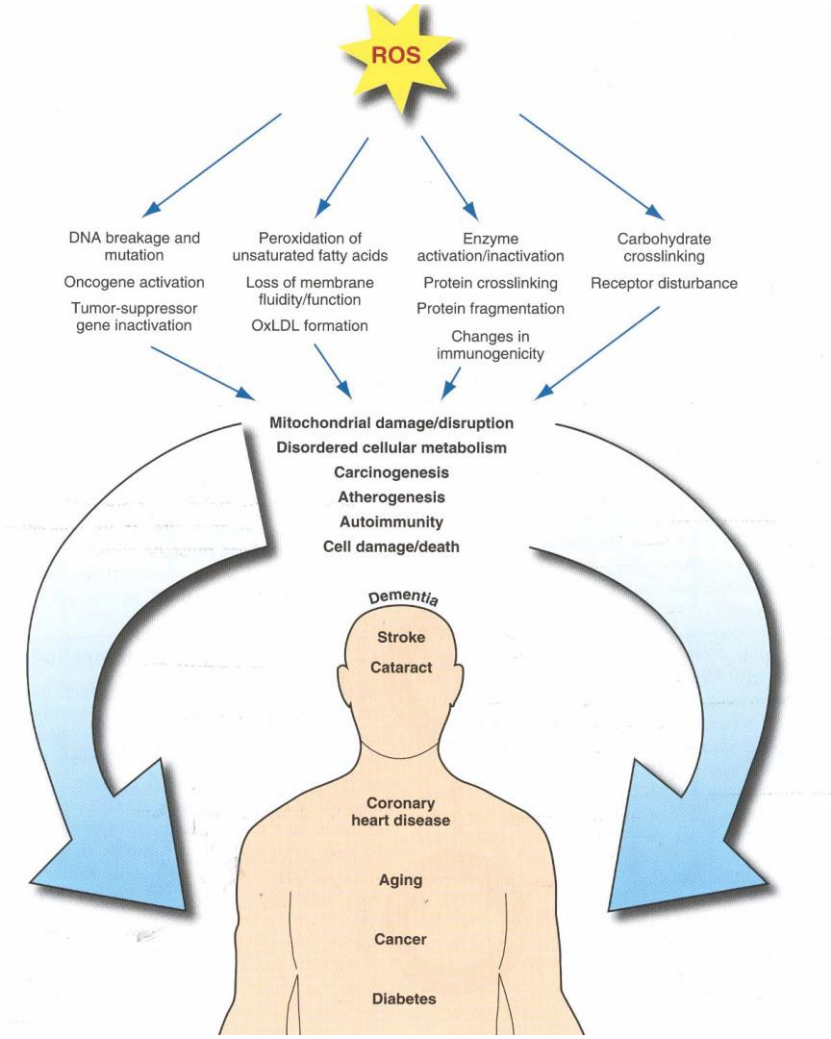
Příznivý účinek má i oxid dusnatý, který je rovněž radikálem a má výrazný vazodilatační efekt. Oxid dusnatý je však produkován rovněž v lymfocytech, nadledvinách, buňkách centrálního nervového systému a mnoha dalších. Má význam v regulaci imunitních pochodů, při erekce i jako neurotransmiter (RACEK, 2004).

2.6 Nemoci a stavy způsobené volnými radikály

Volné radikály plní v organismu řadu důležitých fyziologických funkcí. A tvoří-li se však z různých důvodů v nadměrném množství nebo nejsou-li dostatečně rychle likvidovány, stávají se pro svou reaktivitu nebezpečné. Mohou být příčinou rozvoje závažných patologických procesů. Dochází tak k urychlení procesu degenerace a stárnutí buněk, narušení přirozené obranyschopnosti organismu, případně genetického vybavení buňky (JORDÁN, 2001).

Oxidační stres byl implikován v patogenezi valné většiny, ne-li všech lidských chorob. I když se přidržíme mírné skepse doporučované vedoucími autoritami na poli biologie a medicíny kyslíkových radikálů, stále to znamená, že reaktivní formy kyslíku hrají významnou úlohu v rozvoji tak závažných a rozšířených onemocnění, jako je ateroskleróza, diabetes mellitus, hypertenze, chronické střevní záněty, některé typy rakoviny, ischemicko-reperfuzní poškození srdce a jiných orgánů, mozkové trauma/ischemie, Parkinsonova nemoc, Alzheimerova nemoc atd. I podstatou fyziologického stárnutí zřejmě není nic jiného než

akumulace malých chyb systému antioxidační ochrany a údržby tělesných struktur (PLÁTENÍK, 2009).



Obr. 3 *Účinky ROS – celkové schéma* (KOMPRDA, 2010).

Holeček (2006) uvádí následující oblasti možných onemocnění a nežádoucích stavů, které jsou ovlivňovány volnými radikály:

- Stomatologie
- Gastrointestinální choroby
- Psychiatrická a neurologická onemocnění
- Ateroskleróza
- Ischémie/reperfuze
- Dermatologie
- Imunologie, infekční choroby a alergie

- Transfuzní lékařství
- Sportovní a fyzické aktivity
- Teorie stárnutí
- Výživa
- Obezita
- Nádory, diabetes, katarakta a další nemoci

2.7 Pojem antioxidant

Významnou pomoc pro zvýšení obrany organismu vůči nadměrnému výskytu volných radikálů představují ty složky potravy, které volné radikály převádějí na nereaktivní, nebo alespoň méně reaktivní formy. Tyto látky se označují jako antioxidanty (KALAČ, 2003). Velmi často je uváděna i specifičtější definice Halliwellova, podle které jsou biologickými antioxidanty látky významně znemožňující nebo předcházející ROS a RNS způsobenou oxidaci biomolekul, byť jsou přítomny v nižší koncentraci než biomolekuly, které mají chránit (HRBÁČ, 2007). Jednoduše řečeno antioxidant je látka, která chrání naše tělo před procesem zvaným oxidace. Antioxidant v podstatě ochraňuje sloučeniny před devastačním účinkem kyslíku (PASSWATER, 2002). Mechanismus působení antioxidantů lze popsat reakcí:

$$\underset{\text{hydroperoxid}}{\text{R-O-OH}} \rightarrow \underset{\substack{\text{hydroperoxidový} \\ \text{radikál}}}{\text{R-O-O}\bullet} + \underset{\text{antioxidant}}{\text{A-H}} \xrightarrow{-H_2O} \underset{\substack{\text{hydroperoxid} \\ \text{antioxidantu}}}{\text{R-O-OH}} + \underset{\text{radikál}}{\text{A}\bullet}$$

(VELÍŠEK, 1999).

Kvasničková (2000) nabízí tuto definici: *„Antioxidant je jakákoliv látka, která, jestliže je přítomna v nízkých koncentracích ve srovnání s oxidovatelným substrátem, významně oddaluje nebo zamezuje oxidaci tohoto substrátu“.*

Termín „antioxidant“ však pochází z potravinářské chemie ze 40. let a je původně celkem úzce definován jako látka schopná zastavit řetězové radikálové reakce typu peroxidace lipidů (PLÁTENÍK, 2009). Antioxidanty jsou látky, které prodlužují údržnost potravin tak, že je chrání před znehodnocením způsobené oxidací, jejímž projevem je žluknutí přítomných tuků a dalších, snadno oxidujících se, složek potravin, např. vonných látek. Oxidace lipidů vyvolává další chemické změny v potravinách, které negativně ovlivňují jejich

výživovou, hygienicko-toxikologickou a senzorickou hodnotu (VELÍŠEK, HAJŠLOVÁ, 2009). Vnímání antioxidační ochrany živých organismů je bohužel tímto historickým konceptem stále ovlivněno. Antioxidační ochrana lidského těla je mnohem komplexnější pojem (PLÁTENÍK, 2009).

Antioxidanty jsou předmětem zájmu jak potravinářských, tak zdravotnických odborníků. Jedná se o látky, které v potravině - *in vitro* nebo v organismu - *in vivo* mohou ve vhodných koncentracích zabránit oxidaci substrátu vedoucí k nežádoucím změnám. V lidském organismu tvoří ochranu před oxidačním poškozením nejen antioxidanty syntetizované v těle, ale i ty, které přijímáme potravou. Antioxidanty získáváme potravou hlavně z ovoce, zeleniny obilovin a nápojů. Nejvýznamnějšími přírodními antioxidanty jsou tokoferoly a tokotrienoly (vitamin E), askorbová kyselina (vitamin C), fenolové látky (především flavonidy, fenolové kyseliny, jednoduché fenoly, stilbeny) a karotenoidy, přičemž nejvíce zastoupenými antioxidanty v potravě jsou flavonidy a fenolové kyseliny (PÁRKÁNYIOVÁ, POKORNÝ, 2003). Nevýhodou přírodních antioxidantů je jejich nízká odolnost vůči kyslíku, vystavení světlu, vysokým teplotám, sušení. Změny probíhají i při skladování potravin (SCHMIDT, POKORNÝ, SEKRETÁR, 2006). Přírodní antioxidanty přítomné v potravinách a dalším biologickém materiálu vyvolaly značný zájem kvůli svým potenciálním nutričním a terapeutickým účinkům (LACHMAN, HAMOUZ, ORSÁK, 2005).

2.8 Celková antioxidační kapacita a aktivita

Pro vzájemné porovnávání antioxidačních účinků různých směsí byl některými autory zejména v souvislosti s analýzou potravinových vzorků zaveden pojem celková antioxidační aktivita (Total Antioxidant Activity – TAA). TAA je parametrem, který kvantifikuje kapacitu vzorku biologického materiálu eliminovat radikály. Poměrně často se stanovuje tzv. celková antioxidační kapacita (AOC) plazmy, resp. extracelulární tekutiny. Představuje souhrn všech látek s antioxidačním účinkem v této tekutině obsažených Pojem celková antioxidační kapacita je však v mnoha publikacích používán v širším významu a rozmanitost používaných metod při jejím stanovení je značná (PAULOVÁ, BOCHOŘÁKOVÁ, TÁBORSKÁ, 2004).

Antioxidační kapacita je míra, jakou jsou antioxidanty schopné eliminovat volné radikály. Je souhrnnou fyzikálně-chemickou vlastností, která je podmíněna redoxními aktivitami především všech obsažených přírodních látek a projevuje se za přesně definovaných podmínek redukčním (antioxidačním) účinkem (KOPŘIVA aj., 2012, on-line).

K měření celkové antioxidační kapacity slouží několik metod, které nejenže poskytují rozdílné výsledky, ale liší se i podílem jednotlivých složek plazmy na výsledku (RACEK, 2003).

Vlastní ochrana organismu představuje složitý komplex mechanismů, které pracují ve vzájemné souhře, doplňují se a mnohdy i vzájemně potencují. Navíc musejí být rovněž v rovnováze s prooxidačními látkami, tedy produkcí volných radikálů (KOPŘIVA aj., 2012, on-line).

2.9 Látky antioxidačního charakteru

V biologických systémech se nachází obranné systémy, které snižují působení volných radikálů nebo je zcela eliminují. Patří sem zejména mechanismy, které brání tvorbě nových volných radikálů, vychytávají již vytvořené volné radikály (někdy se označují jako vychytávače, lapače, zhášeče), anebo se podílí na opravných mechanismech poškozených molekul. Z pohledu výživy je možno antioxidanty rozdělit na endogenní a exogenní. Endogenní antioxidanty se tvoří v našem těle. Jedná se především o různé enzymy s antioxidačním účinkem. Exogenní antioxidanty získáváme z přijímaných potravin. (KOPŘIVA aj., 2012, on-line).

V biologických materiálech se *in vivo* jako látky s antioxidačními účinky uplatňují karotenoidy a příbuzné polyeny, některé vitaminy (zejména C a E) a další dusíkaté a sirné sloučeniny. Z dusíkatých sloučenin mají např. významnou antioxidační aktivitu některé alkaloidy, močová kyselina a další puriny, aminokyseliny a peptidy. Důležitými sirnými sloučeninami s antioxidační aktivitou jsou sirné aminokyseliny (cystein a melathion), od nich odvozené peptidy a proteiny. Antioxidantem živočichů, rostlin, a mikroorganismů je lipoová kyselina a od ní odvozené sulfidy a polysulfidy (VELÍŠEK, HAJŠLOVÁ, 2009).

Některé antioxidanty si naše tělo vytváří samo, jako enzymy, koenzymy apod. Jiné se musí tělu dodávat a těm říkáme esenciální. Jsou to zejména vitaminy, ale i různé biologicky aktivní látky. Antioxidanty v potravinách se dají členit na přirozené nebo syntetické, nebo na přirozeně přítomné či doplňované jako přísady. Přidávat se mohou jak antioxidanty syntetické, tak tzv. přírodně identické, tedy takové, které se v přírodě přirozeně vyskytují, ale jsou syntetizovány uměle (KASTNEROVÁ, 2012).

Antioxidanty rozdělujeme podle prostředí, v němž působí na hydrofilní, lipofilní a amfofilní. Podle způsobu účinku na antioxidanty neenzymové povahy (vitamin E, C, karoteny, flavonoidy, kyselina močová, kyselina fytová, glutathion, kyselina ferulová) a

enzymy (superoxid-dismutasa, glutathion peroxidasa, katalasa). Mezi neenzymové antioxidanty se počítají i některé prvky, které však souvisí s funkcí enzymů (selen, zinek, měď). Kromě toho existuje řada antioxidantů vyráběných průmyslově, které se používají jako potravinářská aditiva (MAROUNEK, 2006, on-line). Použití antioxidantů jako přídatných látek při výrobě potravin upravuje vyhláška Ministerstva zdravotnictví č.4/2008. Podle této vyhlášky jsou antioxidanty látky, které prodlužují trvanlivost potravin a chrání je proti zkáze způsobené oxidací, jejímiž projevy jsou žluknutí tuků nebo změna zbarvení potravin (KVASNIČKOVÁ, 2000).

Podle biologické funkce se dělí na enzymové antioxidační systémy (superoxiddismutáza, glutathionperoxidáza, glutathiontransferáza, kataláza) a na nízkomolekulární antioxidanty (kyselina askorbová, tokoferoly, karotenoidy, flavonoidy, glutathion, kyselina lipoová, koenzym Q, bilirubin, kyselina močová) (LÍZALOVÁ, 2010).

Další dělení dle Hrbáče (2007) je na základě obecného náhledu na reakce ROS jako na řetězové radikálové reakce které vedou k poškození buněčných struktur tkání lze antioxidanty rozdělit do dvou hlavních skupin – na antioxidanty preventivní (preventative antioxidants), které zabraňují vzniku řetězových radikálových reakcí a na antioxidanty přerušující již běžící řetězové radikálové reakce (chain breaking antioxidants).

2.9.1 Antioxidačně působící enzymové systémy

Účinnými složkami obranného systému organismu jsou některé proteiny, obsahující selen, měď, zinek. Jsou to enzymy chránící organismus před oxidačním stresem tím, že jsou převáděny aktivní formy kyslíku na méně účinné (ŠTÍPEK aj., 2000). Na prvním místě je třeba jmenovat superoxiddismutázu (SOD), která katalyzuje přeměnu superoxidu na peroxid vodíku. Vyskytuje se ve třech formách: cytoplazmatická Cu,Zn-superoxiddismitasa (CuZnSOD), mitochondriální Mn-superoxiddismutasa (MnSOD) a extracelulární superoxidismutasa (ECSOD) (KOPŘIVA aj., 2012, on-line). Na následné odstranění peroxidu vodíku je v těle machanismů více:

- kataláza (KAT) svou strukturou je podobná hemoglobinu (skládá se ze čtyř podjednotek s trojmocným železem) a rozkládá peroxid vodíku tvořený v peroxisomech na vodu a molekulární kyslík, (pouze v peroxizomech a v červených krvinkách),
- glutathionperoxidáza (GPx) : redukuje peroxid vodíku, případně peroxidy lipidů a zároveň oxiduje glutathion, ten je pak regenerován glutathionreduktázou využívající NADPH,

- peroxiredoxin: malý protein s–SH skupinou, redukuje peroxid vodíku (PLÁTENÍK, 2009).

2.9.2 Minerály s antioxidačními účinky

Minerály samy o sobě nejsou antioxidanty, některé z nich jsou však důležitými složkami antioxidačních enzymů vytvářených tělem (zinek, selen, železo apod.) (KASTNEROVÁ, 2012). Selen je neenzymový antioxidant, nicméně souvisí s funkcí enzymů. Selen jako součást glutathionperoxidasy umocňuje biologické účinky vitaminu E. Esencialita selenu byla prokázána v roce 1957. Na selen jsou bohaté především mořské ryby, měkkýši a korýši, sladkovodní ryby a také vnitřnosti jatečných zvířat. Relativně vysoký obsah mají také vejce, přičemž většina selenu je obsažena ve žloutku (VELÍŠEK, HAJŠLOVÁ, 2009). Selen usnadňuje odstraňování jedů (zbavuje nás těžkých kovů –kadmia, olova a rtuti – a volných radikálů). Dospělí potřebují 50 – 100 µg denně (ZITTLAU, 2005).

Dalšími stopovými prvky důležitými v roli v antioxidační ochrany má zinek, měď a mangan (ŠTÍPEK aj., 2000). Zinek účinně inhibuje peroxidaci lipidů na membránové úrovni pravděpodobně tím, že vytěsňuje železo nebo zamezuje vázání železa (KVASNIČKOVÁ, 2000).

2.9.3 Antioxidační vitaminy

- **Vitamin C**

Názvem vitamin C se označuje nejen L-askorbová kyselina, ale také celý reverzibilní redoxní systém. Velmi důležitými reakcemi souvisejícími s antioxidačními vlastnostmi vitaminu jsou reakce s aktivními formami kyslíku, resp. s volnými radikály, a reakce s oxidovanými formami vitaminu E (VELÍŠEK, HAJŠLOVÁ, 2009). Zhášení různých radikálů askorbátem, případně kooperace s tokoferolem, je dobře doloženo *in vitro,* do jaké míry takto askorbát skutečně funguje v lidském těle až tak přesvědčivě prokázáno není, přinejmenším v tom smyslu, že podání askorbátu normálně živenému zdravému člověku už žádné další měřitelné změny parametrů oxidačního stresu nezpůsobí. Velké (gramové) dávky vitaminu C per os jinak zpravidla ani nepomáhají, ani podstatně neškodí – renální práh pro askorbát je kolem 200mg/den a množství nad tento limit se prostě rychle vyloučí ledvinami (PLÁTENÍK, 2009). Problém vitaminu C je, že je velice málo odolný vůči vodě, kyslíku světlu a horku. Ztráty obnášejí až 100 % (ZITTLAU, 2006). Vařením se ničí až 60 %, sušením až 50 %, šetrnější je dušení v páře. Nejšetrnější k vitaminu C je mražení

(KASTNEROVÁ, 2012). Askorbát (vitamin C) je příkladem poměrně prozkoumaného a známého antioxidantu, přitom jeho hlavní funkcí v těle je regenerovat Fe v aktivních centrech hydroláz, což je v principu činnost prooxidační. Výpadkem této funkce lze dobře vysvětlit většinu příznaků kurdějí (sorbutu).

Nízké koncentrace vitaminů C v plazmě i v různých orgánech mohou být způsobeny zvýšenou zátěží volnými radikály. Značně snížené koncentrace vitaminu C mají proto kuřáci, pacienti s těžkými infekcemi, s pankreatitidou, karcinomem trávícího traktu, hypertenzí, po kardiochirurgických výkonech či akutním infarktu myokardu (RACEK, 2003). U kuřáků vede zátěž respiračního traktu oxidanty z tabákového kouře ke zrychlené konsumpci tokoferolu i askorbátu, suplementace vitaminem C, ale ne tokoferolem, měřitelně snižuje markery lipoperoxidace i degradaci tokoferolu (ale nemá vliv na kancerogenitu tabákového kouře) (PLÁTENÍK, 2009). Deficience vitaminu C či hypovitaminosa se projevuje řadou nespecifických příznaků, nejčastěji tzv. jarní únavou (VELÍŠEK, HAJŠLOVÁ, 2009). Legislativně je kyselina askorbová (E 300) řazena mezi potravní doplňky (KALAČ, 2003).

- **Vitamin E**

Vitamin E (zvláště α-tokoferol) je nejvýznamnějším lipofilním antioxidantem uplatňujícím se u eukaryotických buněk jako ochrana nenasycených mastných kyselin v lipidech a fosfolipidech před poškozením volnými radikály. Spolu s β-karotenem a koenzymy Q chrání strukturu a intergritu biomembrán, tedy buněčné neboli cytoplasmatické membrány a zejména membrán vnitrobunečných organel (bunečné jádro, mitochondrie, lysosomy, endoplasmatické retikulum) (VELÍŠEK, HAJŠLOVÁ, 2010).

Antioxidační funkce tokoferolu spočívá v přeměně alkylperoxidových radikálu LOO· na hydroperoxidy při peroxidaci lipidu. Zneškodní tak peroxylové radikály mastných kyselin dříve, než mohou reagovat s dalšími lipidy. Tokoferol se přitom mění na tokoferylový radikál, který je stabilnější než látky, se kterými tokoferol reaguje. Vzniklé hydroperoxidy jsou deaktivovány pomocí glutathionperoxidasy (ŠTÍPEK aj., 2000).

Podobně jako u askorbátu, u zdravého normálně živeného člověka je velmi obtížné prokázat snížení markerů lipoperoxidace po extra dávkách α-tokoferolu. Dietní zdroje tohoto vitaminu jsou přitom hojné (mimo jiné obiloviny, listová zelenina), a s deficitem se tedy setkáváme prakticky jen u poruch střevní absorpce tuků, při dlouhodobé intravenózní výživě, případně u nezralých novorozenců (PLÁTENÍK, 2009). Ke ztrátám dochází při rafinaci surových olejů, při smažení, pečení a za přítomnosti kyslíku (KASTNEROVÁ, 2012).

- **Karotenoidy a vitamin A**

Vitamin A řadíme mezi vitaminy s antioxidačními účinky. Je přijímám v potravě ve své konečné podobě jako retinol, nebo jako provitamin ß-karoten, ze kterého se retinol v organismu vytvoří. Tento vitamin se ukládá v játrech, v ledvinách a v tukové tkáni (ČERMÁK, 2002). Vitamin A na vzduchu a světle lehce oxiduje a může se stát prooxidantem. Antioxidační účinek vitaminu A se projevuje ve tmě – inhibuje tvorbu volných kyselin v rostlinných olejích. Vitamin A patří mezi slabé antioxidanty (KVASNIČKOVÁ, 2002). Aktivitu vitaminu A (vitamin proti xeroftalmii, šeroslepotě) také vykazuje asi 50 dalších přirozeně se vyskytujících sloučenin ze skupiny karotenoidů, které se nazývají provitaminy A. Nejvýznamějším provitaminem A je β-karoten (VELÍŠEK, HAJŠLOVÁ, 2009). Je málo odolný vůči kyselinám, kyslíku, světlu a horku. Ztráty téměř nikdy nepřevýší 40 % (ZITTLAU, 2006).

Karotenoidy jsou značně rozšířené žluté a oranžové, výjimečně také žlutozelené a červené, převážně lipofilní pigmenty rostli, hub, řas, mikroorganismů a *de novo* také pigmenty živočichů (korýšů, ryb, ptáků, savců). V rostlinách jsou karotenoidy principiálně asociovány s chlorofyly v chromoplastech. Resp. v chloroplastech. Dnes je známo asi 700 přirozeně se vyskytujících karotenoidních pigmentů. Z tohoto množství vykazuje asi 50 sloučenin aktivitu vitaminu A, a proto se označují jako retinoidy (VELÍŠEK, HAJŠLOVÁ, 2009).

V antioxidační ochraně se karotenoidy uplatňují při odstaňování radikálu centrovaných na uhlík a alkylperoxidových radikálů ROO· v lipidech. Mechanismus jejich působení je dosud nejasný, pravděpodobně se uplatňují prostřednictvím tokoferolu. Mohou též zhášet singletový kyslík (ŠTÍPEK aj., 2003).

Konečně β-karoten je výborný inhibitor lipoperoxidace *in vitro,* jeho antioxidační působení v těle je nejpravděpodobnější v kůži, kde zháší singletový (aktivovaný) kyslík po UV záření, jinak je přinejmenším nejisté (PLÁTENÍK, 2009). β-karoten je odolný a daleko lépe je zhodnocen z vařené a nakrájené zeleniny, než ze syrové (ZITTLAU, 2006).

Předpokládané pořadí preventivní účinnosti karotenoidů: lykopen > γ-karoten > α-karoten > β-karoten > zeaxantin > lutein. Při vysokém příjmu (25 mg/den) karotenoidy mění své účinky z antioxidačních na prooxidační → průkazné zvýšení rizika vzniku rakoviny plic u kuřáků (KOMPRDA, 2012).

Roli antioxidantů plní karotenoidy ve své původní formě, aniž by se přeměnily na vitamin A. Uplatňují se při prevenci nádorových onemocnění kůže, vyvolaného vlivem ultrafialového záření (KASTNEROVÁ, 2012).

Nejznámější antioxidanty jako α-tokoferol, β-karoten a vitamin C tvoří jen relativně malou část antioxidační kapacity, více antioxidantů v potravě je ve formě ostatních karotenoidů, fenolových kyselin, sulfidů, flavonoidů a lignanů (HOLEČEK, ROKYTA, VLASÁK, 2008).

Tab. 3 *Doporučené běžné denní dávky vitaminů* (PATOČKA, STRUNECKÁ, 2011).

	Recommanded dietary allowance (RDA)
Vitamin C	90 mg pro muže 75 mg pro ženy 85 mg v těhotenství 120 mg při kojení u kuřáku+35 mg
Vitamin E	15 mg 19 mg při kojení
Vitamin A (jako retinol, RAE = retinol activity equivalent)	900 µg RAE pro muže 700 µg RAE pro ženy 770 µg RAEv těhotenství 1300 µg RAE při kojení
β-karoten	RDA není stanoveno 1 µg retinolu odpovídají 2 µg β-karotenu, pokud je přijímán jako suplement (tj. doporučená denní dávka by byla 1,4_1,8 mg), ale až 12 µg β-karotenu, pokud je přijímán v dietě (což odpovídá denní dávce 8,4-10,8 mg).

Doporučené denní dávky antioxidačních vitaminů pro zdravé dospělé podle materiálů dostupných na webových stránkách amerického Food and Nutrition Information center (http//fnic.nal.usda.gov). V České republice stanovuje doporučené denní dávky vitaminů a minerálů příloha k vyhlášce č. 450/2004 Sb. o označování výživové hodnoty potravin, podle níž je doporučená dávka vitaminu C 60 mg, vitaminu E 10 mg a vitaminu A 800 µg (PLÁTENÍK, 2009).

Některé stavy však vyžadují užití vyšších dávek vitaminových doplňků. V takových případech jsou antioxidační vitaminy a stopové prvky podávány v dávkách, které překračují doporučené dávky (ZADÁK, 2009).

2.9.4 Flavonoidy a jiné rostlinné fenoly

Rostlinné polyfenoly jsou amorfní látky fenolické povahy, které jsou rozšířeny v nejrůznějších částech rostlin – v kůře, plodech, kořenech, i v patologických útvarech. Jsou v rostlinné říši všudypřítomné, dodávají rostlinám charakteristické zbarvení, někdy příznačnou chuť plodům, ale nejčastěji jsou smyslově nevýrazné (ČEPIČKA, KARABÍN, 2002). Do skupiny flavonoidů se řadí kolem deseti tisíc látek. Mnoho z nich se však vyskytuje v rostlinách, které člověk nekonzumuje, nebo jsou jejich obsahy tak nízké, že biologická účinnost je nevýznamná (KASTNEROVÁ, 2012). Typickými představiteli jsou rutin a kvercetin nebo katechiny čaje (POKORNÝ, 2001). Flavonoidy a polyfenoly jsou považovány za silně antioxidační látky, aktivují endogenní obranný systém. Mají význam pro vazbu prooxidačního železa a snižování hladiny volných radikálů, ochranu GI traktu před volnými radikály (HOLEČEK, ROKYTA, VLASÁK, 2008). Kromě antioxidačních účinků mají fvavonoidy také protizánětlivý, protisrážlivý, antihypertenzní a metabolický účinek (STRUNECKÁ, 2012). Dosud jich bylo izolováno, identifikováno a testováno více než 5 000. Některé z těchto látek byly z hlediska své biologické aktivity studovány už dříve (např. flavonidy byly ve 30. létech minulého století pokládány za vitaminy skupiny P) a jejich antioxidační aktivita využívána např. k ochraně potravních tuků před oxidačním žluknutím (ZLOCH, ČELAKOVSKÝ, TŮMOVÁ, 2005).

Rozdělujeme je na 6 podtříd:

- Flavony (např. apigenin, luteolin)
- Flavonoly (např. quercetin, myricetin)
- Flavanony (narigenin, hesperidin)
- Katechiny nebo flavanoly (např. eikatechin, gallokatechin)
- Anthocyanidini (např. cyanidin, pelargonidin)
- Isoflavony (npř. Genistein, daidzen) (HOLEČEK, ROKYTA, VLASÁK, 2008).

Zdrojem těchto látek jsou zelenina, ovoce, vláknina, čaje, vína a aromatické a léčivé rostliny. V dnešní době je velmi diskutovaným resveratrol, fungicidní látka produkovaná poměrně omezeným počtem rostlinných druhů. Resveratrol ve vinných hroznech je především přítomen ve slupkách bobulí červených odrůd révy, odkud přechází do vína. Oceňují se zejména kardioprotektivní a antikarcinogenní účinky (VELÍŠEK, HAJŠLOVÁ, 2009). Výsledný obsah ve vínu je podstatně vyšší, pokud bylo připraveno nakvášením se slupkami. Resveratrol ve vínu je poměrně stálý. Zdroje jednoho mg je 0,15 až 0,50 l (KASTNEROVÁ, 2012).

Celkový denní příjem polyfenolů z různých zdrojů byl odhadnut na 1 g a je tedy vyšší než příjem antioxidačních vitaminů (PAULOVÁ, BOCHOŘÁKOVÁ, TÁBORSKÁ, 2004). Významné množství antioxidantů je v jahodách, borůvkách, brusinkách, ořechách, hořké čokoládě. Velmi vysoké hladiny má koření a byliny jako sušený hřebíček, máta, šafrán, tymián a další (HOLEČEK, RACEK, 2011). Vysoký obsah antioxidantů v koření a bylinách poskytuje dostatečné dávky i při jejich konzumaci v malém množství (STRUNECKÁ, PATOČKA, 2011). Byliny a koření se též po staletí používají k prodloužení údržnosti potravin. Zvláště účinné jsou rozmarýna a šalvěj, ale i další např. oregano, tymián, hřebíček, kurkuma, také ovesná mouka aj. (VELÍŠEK, HAJŠLOVÁ, 2009). Celkový příjem flavonoidů v různých evropských zemích se pohybuje v rozmezí 0-200 mg/den, s průměrem kolem 50 mg/den. Velkou měrou k tomuto celkovému příjmu přispívají zejména černý čaj (asi polovina celkového příjmu flavonoidů), česnek (čtvrtina celkového příjmu flavonoidů) a jablka (asi desetina celkového příjmu) (KOMPRDA, 2012).

V řadě experimentálních studií bylo také prokázáno, že antioxidační aktivita rostlinných fenolických látek je vyšší než účinek antioxidačních vitaminů. Klinické a epidemiologické studie rovněž prokazují korelaci mezi antioxidační aktivitou látek přijímaných v potravě a prevencí některých onemocnění např. kardiovaskulárních chorob, karcinogeneze, neurologických poruch nebo procesů stárnutí (PAULOVÁ, BOCHOŘÁKOVÁ, TÁBORSKÁ, 2004).

Interpretace výsledků laboratorních vyšetření potravin na jejich celkovou antioxidační kapacitu může směřovat k určitému hierarchickému uspořádání jednotlivých druhů potravin podle klesající nebo stoupající TAC. Sestavení takových žebříčků od nejlepších potravin k nejhorším je lákavé. Avšak takovéto zhodnocení potravin se musí přijímat s opatrností a je nutno respektovat podmíněnost zjištěných hodnot různými okolnostmi, např.:

- oxidačně – redukční podmínky v extraktech potravin a antioxidační potenciál jednotlivých přírodních látek v těchto extraktech nejsou shodné s antioxidační aktivitou těchto látek a jejich metabolitů *in vivo*,
- do krevního oběhu člověka se dostává z potravy jen část požitých přírodních látek (asi 20–50 %) a ta je způsobem, který dosud nebyl uspokojivě objasněn, metabolizována na produkty, o jejichž struktuře a dalších osudech v organismu není dosud dostatek spolehlivých poznatků,
- oxidační činidla používaná k detekci antioxidantů v potravním extraktu *in vitro* jen přibližně simulují rozmanitou směs oxidačních agens působících v organismu *in vivo* (ZLOCH, ČELAKOVSKÝ, TŮMOVÁ, 2005).

Nicméně na jaře roku 2010 publikovala skupina 16 autorů v časopise *Nutritional Journal* přehlednou databázi o výskytu antioxidantů ve 3100 druzích potravin, nápojů, koření a bylin používaných po celém světě (viz. tabulka č. 4).

Tab. 4 *Ukázky obsahu antioxidantů v některých přírodních zdrojích* (STRUNECKÁ, PATOČKA, 2011).

Zdroj	**Antioxidanty v mmol/100 g**
hřebíček	175–465
máta sušená	72–161
skořice mletá	18–140
oregano	40–97
sušené šípky	54–76
bobkový list	25–32
ořechy vlašské	13–33
káva filtrovaná	1–4
espresso	13–16
čokoláda	9–13
slunečnicová semínka	5,4–7,5
sušená jablka	2–6
borůvkový džem	2,7–4,7
švestky	2–3,7
červené víno	1,8–3,7
čaj	0,6–2,6

2.10 Zásady podávání antioxidantů

Potravinové doplňky s antioxidačně působícími látkami jsou dnes užívány miliony lidí. To proto, že se široce rozšířila obava z působení volných kyslíkových radikálů. Antioxidační působení potravinových doplňků a vitaminů je tak považováno za všeobecně přijímanou záruku účinku (STRUNECKÁ, PATOČKA, 2011). Podle Gutteridge a Halliwella (2010) se jedná o průmysl řízený veřejnou posedlostí po antioxidantech, které jsou vydávány za bezpečné, zdraví obnovující molekuly, které buď spolkneme v mega dávkách různých

doplňků, či je přijmeme ve fortifikovaných potravinách. V posledních letech se však hromadí stále více pozorování z rozsáhlých studií o působení antioxidantů, které upozorňují na možná zdravotní rizika spojená s jejich nadměrnou konzumací (STRUNECKÁ, PATOČKA, 2011).

Antioxidační ochrana organismu však představuje složitý komplex mechanismů, které pracují ve vzájemné souhře, doplňují se a mnohdy i potencují, navíc musejí být v rovnováze s prooxidačními látkami, tedy produkcí volných radikálů (McCALL, FREI, 1999).

Bylo zjištěno, že při vysokém a dlouhodobém pravidelném příjmu některých antioxidantů v čistém stavu ve formě různých preparátů dochází ke zvratu a antioxidační účinky se mění na prooxidační, tedy na pravý opak. To bylo prokázáno především u beta-karotenu a vitaminu E, ale také u vitaminu C a některých flavonidů. Mechanismy tohoto zvratu dosud nebyly spolehlivě objasněny. Je však třeba zdůraznit, že tato zjištění nic nemění na doporučeních přijímat co nejvíce antioxidantů potravou, protože v takovém případě předávkování nehrozí (KALAČ, 2003).

Pláteník (2009) uvádí, že podávání potravních doplňků s antioxidačními vitaminy C, E, případně β-karotenem a selenem, které bylo předmětem rozsáhlých a opakovaných studií, je jednoznačně prospěšné jen v případě předchozího deficitu, jinak je buď neúčinné, anebo dokonce škodí. Příčinu tohoto antioxidačního paradoxu je třeba hledat v komplexitě systémů antioxidační ochrany lidského těla, kde jsou nízkomolekulární antioxidanty jen malou součástí, a v dalších interakcích použitých látek s organizmem.

Volné radikály mohou mezi sebou reagovat, být metabolizovány, jejich neutralizace může být dost obtížná. Antioxidační ochrana musí být komplexní a zahrnovat antioxidanty enzymové, ve vodě a v tucích rozpustné, ale i ionty nutné k tomu, aby v organismu mohla proběhnout jejich syntéza (HOLEČEK, 2006).

Podávání antioxidantů u chorob a stavů s předpokládanou nadprodukcí volných radikálů má své teoretické opodstatnění, pokud směřuje k obnovení narušené rovnováhy mezi prooxidačními a antioxidačními ději. Je však třeba vždy mít na mysli, že jakýkoli neuvážený zásah do homeostázy může mít spíše negativní, než příznivé účinky. Nadměrné potlačení produkce volných radikálů by mohlo ovlivnit i jejich potřebné účinky, ke kterým patří např. likvidace fagocytovaných mikroorganismů či signální působení. Naproti tomu nedostatečné dávkování antioxidantů, zejména při jejich prokazatelné depleci, je rovněž neúčinné. Je třeba varovat před neuvážlivým užíváním různých multivitaminových preparátů, jejichž složení je mnohdy nevyvážené a za nimiž lze vidět spíše firemní ekonomické zájmy než skutečnou účinnost (RACEK, 2003).

Podávání antioxidantů však nemusí být účinné, pokud jejich absorpce z gastointestinálního traktu není dostatečná. Někteří autoři doporučují nízké dávky antioxidantů 5x denně. Pokud to není možné, pak dodávat antioxidanty suplementací. U některých nemocí se antioxidanty vyplavují do krve ze tkání, kde je jich pak nedostatek. Důležité jsou interference při vstřebávání, jejich metabolismus v organismu, který může snižovat jejich hladinu, ale i zvyšovat jejich účinnost, ovlivňovat do kterých orgánů se ukládají, jak dlouho se udrží zvýšená antioxidační kapacita. Antioxidanty rozpustné ve vodě je možné podávat kdykoliv s vodou. Antioxidanty rozpustné v tucích je lépe dávat po jídle, aminokyseliny na lačno (cca 3 hodiny), minerály (s výjimkou zinku) při jídle, není vhodné kombinovat podání vitaminu C se železem, rostlinné antioxidanty jsou vhodné zapít čajem. I rychlost vylučování močí a stolicí je důležitá. Původ antioxidantů bývá důležitý, přirozené antioxidanty bývají účinnější než syntetické (HOLEČEK, 2011, on-line).

Nakonec nás tedy výsledky moderního výzkumu biologie kyslíkových radikálů dovádějí k těm nejprostším pravidlům životosprávy, známým tisíce let. Někomu se to může zdát málo, ale střídmost v jídle, dieta bohatá na ovoce a zeleninu a pravidelná, přiměřená fyzická aktivita zůstávají tím nejlepším základním doporučením pro zdravý a dlouhý život. Vyváženou dietu zatím neumíme nahradit žádnou pilulkou a extra podávání antioxidačních vitaminů nad běžné denní doporučené dávky u normálně živených osob medicínské zdůvodnění vlastně nemá (PLÁTENÍK, 2009).

Odborníci se shodují v tom, že účinnost přirozených antioxidantů z ovoce, zeleniny, čaje a celozrnných obilovin je výrazně vyšší než při stejné dávce čistých látek podávaných ve formě potravních doplňků – tablet apod. Jejich výrobci a prodejci to budou zpochybňovat. Pochopitelně, je to jejich velký byznys (KALAČ, 2003).

Zásady podávání antioxidantů:

- Volba vhodného antioxidantu podle místa tvorby volných radikálů.
- Vhodný okamžik podání antioxidantů.
- Doba podávaní antioxidantů.
- Volba vhodného antioxidantu podle druhu působících volných radikálů.
- Volba vhodné dávky antioxidantu.
- Kombinace antioxidantů (RACEK, 2003).

3 PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 Cíle práce

Cílem druhé části je uvést metody či postupy, které jsou nejvýznamnější a dnes nejužívanější a které umožňují stanovit tzv. celkovou antioxidační aktivitu vzorku (in vitro, in vivo) či vedou ke zjištění látek antioxidačního charakteru potažmo oxidačního stresu.

3.2 Metodický přístup

Velkou pozornost musí autor věnovat právě volbě odborné literatury a zaměřit se na aktuální, nejnovější texty respektovaných autorů českých i zahraničních. Autor bude čerpat z odborných knih a periodik v rámci dané tematiky, a to na poli chemie, biologie, medicíny a nutričních oborů, dále z vědeckých sborníků, příspěvků na vědeckých konferencích, skript, v menší míře pak také z webových stránek.

3.3 Analytické vlastnosti laboratorní metody

Každá metoda má určité analytické vlastnosti, které rozhodují o jejím možném aplikačním rozsahu, o stupni správnosti a specifičnosti získaných výsledků, tedy o její vhodnosti pro uvažovanou aplikaci. Tyto analytické vlastnosti mají být nejen známy, ale jejich splnění je i pravidelně kontrolováno. Analytické vlastnosti metod totiž nelze nikdy zcela oddělit od vlastností klinických, jako je např. klinická senzitivita a specifičnost či určení referenčního rozmezí. Oba aspekty se navzájem ovlivňují a doplňují, a tvoří tak vlastně dvě strany jedné mince.

Nejvýznamnější analytické vlastnosti:

- Přesnost metody – přesnost je definována jako míra shody mezi výsledky získanými opakovanou analýzou téhož vzorku za předem stanovených podmínek.
- Pravdivost a správnost metody - pravdivost je definována jako těsnost souhlasu mezi průměrnou hodnotou získanou z velkého počtu výsledků měření a dohodnutou referenční hodnotou. Mírou pravdivosti je velikost odchylky – bias.
- Vztah mezi pravdivostí a přesností.
- Nejistota měření – výsledky analýz jsou vždy zatíženy náhodnými a systematickými chybami, přičemž tyto chyby nelze nikdy beze zbytku eliminovat. Nejistota je definována

jako interval hodnot, v němž se výsledek analýzy s určitou pravděpodobností odůvodněně nachází.

- Analytická citlivost (senzitivita) metody- je důležitá pro určení rozsahů koncentrací, které lze danou metodou stanovit.
- Analytická specifičnost metody – je vlastnost, která vyjadřuje, do jaké míry a jakým způsobem je stanovení určité látky ovlivněno jinými látkami, přítomnými v biologickém materiálu. Takovýto vliv jiných látek na výsledek se nazývá interference. Může ovlivňovat výsledek směrem kladným i záporným, a to v různé míře.
- Srovnávání dvou metod pro stanovení téže látky – je v klinické biochemii velmi časté. Uplatňuje se např. při zavádění nové analytické metody. Novou metodu je třeba porovnat s metodou dosavadní.
- Souvislost mezi analytickými vlastnostmi metod a biologickou variabilitou měřených parametrů (RACEK, 2006).

3.4 Metody stanovení antioxidační aktivity

V literatuře lze nalézt velký počet metod používaných ke stanovení antioxidační aktivity. Jejich rozmanitost vyplývá ze skutečnosti, že nízkomolekulární antioxidanty mohou působit různými mechanismy. Nejčastěji jde o přímou reakci s radikály (zhášení, vychytávání) nebo reakci s přechodnými kovy. Přesnější chemické vymezení mechanismu jejich účinku je však často problematické (PAULOVÁ, BOCHOŘÁKOVÁ, TÁBORSKÁ, 2004). Sekundární antioxidanty mohou být rozděleny podle mechanismu účinku na vychytávače (scavengery), kteří zachycené ROS přemění na neradikálové molekuly, dále na lapače (trappers), kteří přeměňují ROS na relativně stabilní radikály a nakonec na zhášeče (quenchers), kteří zháší vytvořené ROS tím, že jim nabídnou volný elektron k jejich stabilizaci (LÍZALOVÁ, 2010). Proto také postupy hodnotící míru antioxidačního působení jsou založeny na různých principech. Obecně mohou být kategorizovány do dvou skupin – na metody hodnotící schopnost eliminovat radikály a dále na metody posuzující redoxní vlastnosti látek (PAULOVÁ, BOCHOŘÁKOVÁ, TÁBORSKÁ, 2004).

Jiné dělení metod nabízí Fidler a Kolářová (2009), a to na metody chemické a fyzikální. Chemické metody spočívají v použití činidel poskytujících s volnými kyslíkovými radikály barevné produkty, jejichž vzniku brání ve vzorku obsažené antioxidanty. Intenzita zabarvení se měří nejčastěji spektrofotometricky a rozdíl v hodnotách absorbancí měřeného a slepého vzorku pak udává obsah látek s antioxidačními účinky (KARABÍN, DOSTÁLEK,

HOFTA, 2006). Fyzikální metody stanovení antioxidační aktivity nesledují bezprostředně chemickou reakci nebo změny obsahů jednotlivých látek, ale změnu fyzikálních vlastností, které tyto procesy doprovází (FIDLER, KOLÁŘOVÁ, 2009).

Zeman aj. (2009) nabízí dělení metod na metody jednak nepřímé, kdy stanovujeme látky vzniklé jejich účinkem, jednak přímé, kdy přímo stanovujeme jednotlivé volné radikály. Pro sledování oxidačního stresu je tedy možné zvolit několik přístupů:

1. měřit redoxní potenciály antioxidačních systémů,
2. kvantifikovat přítomné radikály ve vzorku,
3. sledovat přítomnost markerů oxidačního poškození systému a
4. měřit aktivitu antioxidačního systému.

Detekce radikálu bývá velmi obtížná vzhledem ke krátkému času jejich existence. V praxi se proto přistupuje k měření následku jejich působení. Byly vyvinuty metody, které měří produkty radikálových reakcí a ukazatele poškozených biomolekul a stanovují změny v antioxidační kapacitě organismu. Metody stanovení celkové antioxidační kapacity jsou založeny na arteficiální tvorbě radikálů v testovaném biologickém materiálu. Měří se pak schopnost systému radikálové reakce zastavit nebo zpomalit. Stanovují se spektrofotometrickými, fluorescenčními či chemiluminiscenčními metodami, chromatograficky a imunochemicky (ŠTÍPEK aj., 2000).

Celková antioxidační kapacita je dnes již rutinně stanovována v klinicko-biochemických laboratořích ve vzorcích krevní plazmy a také i v jiných typech biologického materiálu. Po dlouhou dobu se k tomuto účelu používalo např. standardní radikálové metody s využitím setu firmy Randox, Velká Británie (KOPŘIVA aj., 2012, on-line).

Stanovení obsahu jednotlivých LMWA (Low-molecular Weight Antioxidants) v komplexních matricích, jako jsou např. tělní tekutiny, tkáňové homogenáty, potraviny apod., představuje poměrně náročný analytický problém. Proto se obsah antioxidantů stanovuje nepřímo jako tzv. celková antioxidační kapacita (total antioxidant capacity - TAC), která, jak již bylo zmíněno, představuje schopnost systému vzdorovat oxidačnímu stresu (HRBÁČ, 2007). Nízké hodnoty TAC při normální dietě obvykle korelují s průběhem patologických stavů, při kterých je produkováno zvýšené množství ROS. Pro stanovení TAC existuje velké množství metod, přičemž nejčastěji používanou metodou je TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). TEAC odpovídá antioxidační aktivitě vzorku, která je

vztažena ke standardní látce – Troloxu. Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman2-karboxylová kyselina) je rozpustný analog vitaminu E (HRBÁČ,2007).

Nejpřesnější, ale i nejdražší, je stanovení pomocí EPR (elektronové paramagnetické rezonance). Každá z dalších metod je založena na jiném principu a lze je tedy jen těžko srovnávat. Teprve metody FORT pro stanovení volných radikálů a FORD pro stanovení antioxidační kapacity představují relativně levnou a rychlou metodu stanovení oxidačního stresu, kterou lze provádět i u lůžka pacienta. Metody FORT a FORD nevyžadují drahé přístrojové vybavení, metody jsou standardizované (CE), vyžadují malé množství biologického materiálu. Výsledné interpretace mohou přinést úspory léků či potravinových doplňků, včas upozornit na nebezpečí vzniku nebo rozvinutí řady chorob a na včasné stanovení terapie (HOLEČEK, 2012, on-line).

Je nutno podotknout, že srovnání hodnot poskytovaných jednotlivými metodami je velmi nesnadné, neboť jak antioxidantů, tak reaktivních látek způsobujících oxidační změny je celá řada a prakticky žádná z metod není schopna obsáhnout tento fakt v celé její šíři (KARABÍN, DOSTÁLEK, HOFTA, 2006).

3.4.1 Metody stanovení antioxidační aktivity *in vitro* vs. *in vivo*

Antioxidační kapacita se stanovuje u dvou okruhů vzorků. U potravin a potravinových doplňků *(in vitro)* bývá obsah antioxidantů považován za významnou nutriční hodnotu (HRBÁČ, 2007). Z hlediska těchto poznatků je už po dobu několika let pozornost zaměřena na určení jednotlivých druhů přírodních látek a na separátní hodnocení jejich chemických vlastností a biologických účinků. Tato práce je velmi úporná, pomalá, nákladná a málo perspektivní, neboť počet dosud identifikovaných přírodních látek v rostlinném materiálu je vysoký (přes 6 tisíc) a většina z nich se vyskytuje v mnoha strukturně odlišných formách, často v závislosti na druhu a odrůdě rostliny, na vegetačních podmínkách jejich pěstování, na způsobu jejich zpracování apod. (ZLOCH, ČELAKOVSKÝ, AUJEZDSKÁ, 2004, on-line).

Neméně důležitou skupinu tvoří vzorky tkání a tělních tekutin *(in vivo)*, u kterých se často sleduje změna antioxidační kapacity jako odpověď na změnu či přídavek určité potraviny nebo potravinového doplňku, nebo se sleduje v průběhu patologických stavů (HRBÁČ, 2007). Přestože hodnocení antioxidačních vlastností přírodních látek je v oblasti výzkumu věnována široká pozornost, je třeba připomenout, že řada látek přijímaných v rostlinném materiálu podléhá metabolickým změnám již v trávícím traktu a jejich účinek v organismu je dále podstatně ovlivněn mírou resorpce a dalším metabolismem. Proto výrazná antioxidační aktivita zjištěná *in vitro* nemusí znamenat adekvátně významný účinek *in vivo.*

O metabolických procesech v trávícím traktu, biodostupnosti a farmakokinetice přírodních látek nejrůznějšího charakteru je přitom dosud známo velmi málo (PAULOVÁ, BOCHOŘÁKOVÁ, TÁBORSKÁ, 2004). Biodostupnost je považována za nejvýznamnější faktor způsobující rozpor mezi antioxidační aktivitou *in vitro* a účinkem antioxidantů v lidském organismu a zahrnuje tři základní složky (kroky), a to uvolnění daných látek z potravinové matrice, jejich vstřebání v trávícím traktu a přestup do buněk. Vstřebatelnost uvolněných antioxidantů je v trávícím traktu člověka obecně relativně nízká. Například efektivita vstřebávání ellagové kyseliny a anthokyanů z malin činila jen 1 %, naproti tomu typická absorpce glykosidů kvercetinu se pohybuje v rozmezí 20 až 50 % (RÉBLOVÁ, 2011).

Komprda (2012) uvádí, že fyziologický význam fenolových kyselin spočívající ve schopnosti inhibovat tvorbu mutagenů, resp. karcinogenů v trávícím traktu, tak tento účinek zjištěný v pokusech na zvířatech a ověřený *in vitro,* však v humánních studiích dosud nebyl potvrzen.

Bylo ale také prokázáno, že schopnost odstraňovat reaktivní volné radikály různých látek a reaktivní formy kyslíku a dusíku a chránit nenasycené mastné kyseliny, bílkoviny, nukleové kyseliny aj. biomolekuly v různých tělesných tkáních a buněčných strukturách před oxidačním rozkladem si antioxidanty uchovávají i po požití v potravinách a že podobné vlastnosti mají také produkty jejich trávení a látkové přeměny v lidském organismu. Tyto poznatky byly získány a prověřovány v mnoha pokusech s lidskými dobrovolníky, v experimentech na zvířatech, v testech na tkáňových kulturách a studiem povahy produktů jejich metabolismu a vlastností těchto metabolitů. Byly také podpořeny výsledky mnoha epidemiologických studií, které umožnily komplexněji vysvětlit všeobecně zdravotně prospěšný vliv potravy rostlinného původu (ZLOCH, ČELAKOVSKÝ, TŮMOVÁ, 2005).

Sledování souvislostí mezi složením přijímané stravy a fyziologickým stavem organizmu je základem pro cílené ovlivnění režimu, doprovázeného obohacením stravy o potraviny obsahující množství přirozených antioxidantů a flavonidů, schopných do určité míry zabránit progresi oxidačního poškození organismu (HIEMER, MAROVÁ, ILLEK, 2007).

Ten má potenciálně značný biologický význam, neboť může jednak ve vlastním potravinovém prostředí *in vitro* a také *in vivo* po vstřebání v trávicím ústrojí odstraňovat nebo zmírňovat účinky oxidačních faktorů (zejména radikálů), které vznikají při různých fyziologických procesech či vnějších podnětech a mohou podporovat rozvoj nejrůznějších patologických stavů (KOPŘIVA aj., 2012, on-line).

3.4.2 Základní princip analytické laboratorní biochemie

Zjistit přítomnost určité látky v objektu našeho zájmu a event. stanovit její množství lze totiž pouze měřením. Měřit pak umíme jediným způsobem: systému dodáme definovaným a reprodukovatelným způsobem určitou energii (např. tepelnou, zářivou, elektrickou), tím systém perturbujeme (vyvedeme z rovnovážného či ustáleného stavu) a pak sledujeme buď množství energie, kterou systém absorbuje, nebo množství energie, která se uvolní při následném přechodu systému zpět do stavu s nižší energií či do původního stavu. Jde tedy o to, odlišit množství energie absorbované či uvolněné látkou, která nás zajímá (analytem), od energie absorbované či uvolněné ostatními složkami systému.

Jakýkoli analytický postup lze znázornit tímto obecným schématem:

odběr a úprava vzorků ⇒ **separace analyt(ů) od matrice vzorku** ⇒ **měření** ⇒ **vyhodnocení výsledků**

(ŠTULÍK aj., 2005).

Před každou studií, která má konkrétní cíl, musí být spolu s výběrem vhodných analytických technik vypracována strategie odběru vzorků. Vzorkování je operace, při níž oddělujeme části vhodné velikosti ze zkoumaného celku, a to takovým způsobem, aby získaný soubor vzorků reprezentoval v mezích statistické chyby měřenou vlastnost celku a umožňoval analýzu (ČURDOVÁ, 2007). Naprostá většina *in vitro* metod pro stanovení antioxidační aktivity vyžaduje extrakci analyzovaných tuhých potravin (RÉBLOVÁ, 2011). K izolaci se nejčastěji používají různé druhy extrakce, jako jsou např. extrakce v Soxhletově extraktoru, vysokotlaká extrakce rozpouštědlem, extrakce s využitím ultrazvuku nebo extrakce nadkritickou tekutinou. Extrakce samotná je separační metoda, při které přechází složka ze směsi látek v kapalné či tuhé fázi do jiné kapalné fáze – rozpouštědla. Důležitá je volba vhodného rozpouštědla řídící se charakterem látky, která má být extrahována (KLOUDA, 2003).

Na rozdíl od destilace, krystalizace a sublimace je extrakce velmi výhodná pro izolaci tepelně nestálých látek, protože se může provádět i za laboratorní teploty nebo za chladu. Cílem extrakce je selektivní až specifické oddělení analytu od ostatních složek nebo naopak oddělení rušících látek od analytu (ŠTULÍK aj., 2005). Separace je operace, při které se vzorek dělí alespoň na dva podíly odlišného složení. V řešení analytických problémů při práci

s odebraným vzorkem je nejdůležitější právě separace s na jejím úspěšném zvládnutí závisí správnost a přesnost celé metody (KLOUDA, 2003).

Vyhodnocení laboratorních výsledků a následná interpretace při analýze modelových vzorkům potravin a potravinových surovin rostlinného a živočišného původu je významnou součástí analýzy a účel pro který se analýza na danou složku provádí. Získané výsledky kvalitativních důkazů (průkazů) a kvantitativních analýz hodnotíme podle stanovených kritérií (KOPŘIVA aj., 2010).

Antioxidační aktivita je definována jako schopnost sloučeniny (směsi látek) inhibovat oxidační degradaci různých sloučenin (např. zabraňovat peroxidaci lipidů). Pro vzájemné porovnávání antioxidačních účinků různých směsí byl v souvislosti s analýzou potravinových vzorků zaveden pojem celková antioxidační aktivita TAA (total antioxidant activity), která kvalifikuje kapacitu vzorku biologického materiálu eliminovat radikály (ŠULC aj., 2007).

Pro stanovení antioxidační aktivity (AOA) existuje řada analytických metod. Většina používaných metod je založena na eliminaci radikálů generovaných v reakční směsi – metody DPPH, TEAC, ORAC, PCL, nebo na přímém hodnocení redoxních vlastností metody FRAP, voltametrie, HPLC-ECD. Při hodnocení AOA je posuzováno působení látek různé chemické povahy s odlišnými reakčními mechanismy a používají se metody založené na různém principu. Výsledky stanovení AOA jednotlivými metodami jsou proto považovány za odhad AOA, který závisí na řadě faktorů, jako je typ použitého radikálu, matrice vzorku, iniciátor, přítomnost přechodných kovů, komplexita reakční kinetiky, použitý standard (HOLASOVÁ, FIEDLEROVÁ, 2011).

3.4.3 Problematika stanovení rostlinných fenolických látek

Vzhledem k chemické diversitě antioxidačních komponent přítomných v ovoci není dosud obsah jednotlivých látek nikde k dispozici. Detekce terapeuticky aktivních složek v biologické matrici bývá často komplikovaná, zjištěné kvantitativní hodnoty se v mnohých studiích liší a mnohdy dochází k situaci, že přítomná látka není detekována ani s využitím efektivních separačně-analytických metod. Kromě toho množství jednotlivých antioxidantů v jednotlivých druzích nemusí nutně vyjadřovat celkovou antioxidační kapacitu. Stanovení antioxidační aktivity je jednou z možností pro vyjádření biologické a nutriční hodnoty ovoce. Tato veličina kolísá v závislosti na typu polyfenolických sloučenin přítomných v ovoci, a také na tom, že některé typy fenolických sloučenin vykazují vyšší antioxidační aktivitu než ostatní. Metody jejího stanovení se nejčastěji zakládají na přímé reakci studované látky s radikály

(zhášení nebo naopak jejich vychytávání) nebo na reakci s přechodnými kovy (SOCHOR aj., 2011).

Dnešní úroveň přístrojové techniky používané v analytické chemii umožňuje stanovit obsah a strukturu všech reálně se vyskytujících přírodních látek, a proto tak rychle stoupá jejich počet a počet jejich poznaných metabolitů. Takovýto sice velmi exaktní, ale nákladný postup, je využíván v moderních výzkumných pracovištích, ale má spíše povahu základního výzkumu bez bezprostředního dopadu do běžné praxe oceňování biologické hodnoty potravin. Proto byly během uplynulého desetiletí zavedeny nové metody laboratorního určování antioxidačního potenciálu potravin, které dovolují postihnout a souhrnně vyhodnotit sumu všech antioxidačně účinných složek (v jednom druhu potraviny jich může být i několik set), a to metodami poměrně jednoduchými, levnými a rychlými (ZLOCH, ČELAKOVSKÝ, TŮMOVÁ, 2005).

Na množství vstřebaných antioxidantů však má vliv mnoho faktorů jako stav GIT, jejich původ, skladování a zpracování potravy, věk, složení antioxidantů aj. (RACEK, HOLEČEK, 2011)

V oblasti chemické analýzy a biologického hodnocení jakosti rostlinných produktů byly v posledních letech vypracovány četné metody, které umožňují stanovit celkovou antioxidační aktivitu vzorku. Jsou principiálně značně navzájem odlišné a postupně se vyvíjejí jejich různé modifikace (ŠULC aj., 2007).

3.4.4 Chemické metody

Chemické metody spočívají v použití činidel poskytujících s volnými kyslíkovými radikály barevné produkty, jejichž vzniku brání ve vzorku obsažené antioxidanty. Intenzita zabarvení se měří nejčastěji spektrofotometricky a rozdíl v hodnotách absorbancí měřeného a slepého vzorku pak udává obsah látek s antioxidačními účinky (KARABÍN, DOSTÁLEK, HOFTA, 2006).

3.4.4.1 Metoda DPPH

Tato metoda je považována za jednu ze základních metodik pro posouzení antiradikálové aktivity čistých látek i různých směsných vzorků (PAULOVÁ, BOCHOŘÁKOVÁ, TÁBORSKÁ, 2004). DPPH test je založen na schopnosti stabilního volného radikálu 1,1-difenyl-1-pikryl-hydrazylu reagovat s donory vodíku. DPPH vykazuje silnou absorpci v UV a VIS spektru (ŠULC aj., 2007). Při vlnové délce 517 nm se sleduje úbytek absorbance, přičemž dochází k odbarvování fialového roztoku DPPH radikálu vlivem

antioxidačních látek obsažených ve vzorku. Měření se provádí po uplynutí dané doby spektrofotometricky (TEPE aj., 2006). Nebo se pracuje v kinetickém režimu (PAULOVÁ, BOCHOŘÁKOVÁ, TÁBORSKÁ, 2004). Intenzivní fialové zabarvení měřitelné při 520 nm je způsobeno nepárovým elektronem na dusíku hydrazylu (KARABÍN, DOSTÁLEK, HOFTA, 2006). Antioxidační aktivita se pak vyjádří jako procentický úbytek absorbance podle vzorce nebo pomocí kalibrační řady je přepočtena na ekvivalentní množství Troloxu.

3.4.4.2 Metoda FRAP

Tato technika (Ferric Reducting Antioxidant Potential) je založena na redukci železitých komplexů, např. Fe^{3+} - TPTZ (TPTZ = 2,4,6- tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazin), které jsou bezbarvé a po redukci a případné reakci s dalším činidlem vytvářejí barevné produkty, např. berlínskou modř. Metoda FRAP tedy kvantifikuje schopnost antioxidantů redukovat tento komplex, jehož přeměnou vzniká intenzivně fialově zbarvený produkt, který je detekován spektrofotometricky při vlnové délce 593 nm. Na rozdíl od technik TRAP a ORAC jsou touto metodou měřeny spíše redukční vlastnosti antioxidantů. Velká výhoda FRAP spočívá v její relativní jednoduchosti. (KOPŘIVA, 2012, on-line).

Metoda FRAP kvantifikuje schopnost antioxidantů redukovat bezbarvý železitý komplex FeIII-TPTZ (TPTZ = 2,4,6-tris(2-pyridyl-1,3,5-triazin) Redukcí vzniká intenzivně fialově zbarvený produkt, který je stanoven spektrofotometricky při 793 nm (HRBÁČ, 2007).

Metoda FR nebo FOX (Ferrous oxidation assay) je založena na redukci železitých komplexů jako je TPTZ (2,4,6- tripyridyl-S-triazin), ferrikyanid aj., které jsou téměř bezbarvé a po redukci a event. reakci s dalším činidlem vyváří barevné produkty, jakým může být např. berlínská modř. (ZLOCH, ČELAKOVSKÝ, AUJEZDSKÁ, 2004, on-line)

Metoda má své limity spočívající v tom, že měření probíhá při nefyziologicky nízké hodnotě pH (3,6), nejsou zachyceny s komplexem pomalu reagující polyfenolické a thioly, navíc vznikající Fe^{2+} je *in vivo* jedním z reaktantů Fentonovy reakce. Metoda FRAP tak odráží pouze schopnost látek redukovat ion Fe^{3+} a s celkovou antioxidační kapacitou nemusí korelovat (PAULOVÁ, BOCHOŘÁKOVÁ, TÁBORSKÁ, 2004).

Fidler a Kolářová (2009) taktéž upozorňují na nevhodnost použití této metody pro polyfenolické látky, které reagují s komplexem pomalu, a pro měření vzorků s velmi nízkou hodnotou pH. Naproti tomu jej doporučují jako vhodná pro měření ve vodném prostředí.

3.4.4.3 Metoda TEAC

Je jednou ze základních a nejpoužívanějších metod pro stanovení celkové antioxidační aktivity TAA. Někdy též označována jako ABTS metoda. Testuje schopnost vzorku či látek

zhášet kation-radikál $ABTS^{\bullet+}$ (2,2´-azinobis(3-ethyl-2,3dihydrobenzothiazol-6-sulfonát). Je také ale označována jako metoda TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), vzhledem k tomu, že výsledná antiradikálová aktivita vzorku je srovnávána s antiradikálovou aktivitou syntetické látku Troloxu (6-hydroxy -2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) (PAULOVÁ, BOCHOŘÁKOVÁ, TÁBORSKÁ, 2004).

Tato metoda využívá činidel, která iniciační akcí jiné látky přecházejí ve svou radikálovou formu, která je barevná a relativně stabilní. V přítomnosti antioxidačně aktivních složek extrahovaných ze vzorku potraviny se redukuje, a tím odbarvuje. Rychlost a míra odbarvení jsou úměrné antioxidační aktivitě vzorku. Aby vyjádření této kvality vzorku bylo standardní, stanovuje se shodným postupem TEAC v přítomnosti pouhého askorbátu, Troloxu, gallátu, epikatechinu nebo jiných klasických antioxidantů. Jak již bylo řečeno, nejčastěji používaným prekursorem radikálu je již výše zmíněný tzv. ABTS, tj. 2,2´-azinobis.(3- ethylbenzothiazolin)-6-sulfonát, iniciátorem, který ji přeměňuje na modrozelený radikál $ABTS^{+}$, je látka AAHP, tj. 2,2´-azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid, ale také peroxid vodíku, ferrokyanid, persíran nebo peroxidasa z křenu ve směsi s peroxidem vodíku aj. (ZLOCH, ČELAKOVSKÝ, AUJEZDSKÁ, 2004).

Při vlastním experimentálním měření se užívají dva postupy. V prvním se antioxidant přidává do reakční směsi, ve které byl již vytvořen radikál $ABTS^{\bullet}+$, při druhém postupu je antioxidant v reakční směsi přítomen při generování radikálu $ABTS^{\bullet}+$ (FIDLER, KOLÁŘOVÁ, 2009).

Metoda stanovení TAA vzorků pomocí ATBS je jednoduchá, rychlá v provedení a má široké uplatnění, od hodnocení antioxidační aktivity látek různého původu až po směsné vzorky (PAULOVÁ, BOCHOŘÁKOVÁ, TÁBORSKÁ, 2004).

3.4.4.4 Metoda ORAC

Metoda ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) je fluorescenční metodou. Fluorescence jako absorpce ultrafialového záření vede k excitaci z vibračního stavu na základní elektronové hladině na jednu z mnoha vibračních hladin v elektronovém excitovaném stavu. Jde obvykle o první excitovaný singletový stav. Molekula na vysoké vibrační hladině ztrácí při kolizích s okolními molekulami rychle energii a přechází na nejnižší vibrační hladinu. Flurescence se projeví, nastane-li přechod na základní elektronovou hladinu ze singletového excitovaného stavu vyzářením nadbytečné energie emisí fotonu. Hovoříme o zářivém přechodu na základní hladinu (KLOUDA, 2003).

Metoda ORAC je velmi podobná metodě TRAP (viz. kap. 5.2.5.2.). Na rozdíl od R-PE u metody TRAP je u ORAC jako fluorescentní indikátor používán fluorescein (HRBÁČ, 2007). Při použití metody ORAC se v testovaném systému generují kyslíkové radikály a hodnotí se schopnost testované látky zpomalit nebo zastavit radikálovou reakci (PAULOVÁ, BOCHOŘÁKOVÁ, TÁBORSKÁ, 2004). Radikál se určuje kvantitativně fluorimetricky a hodnotí se rychlost úbytku signálu po přidání testovaného vzorku (ZLOCH, ČELAKOVSKÝ, AUJEZDSKÁ, 2004, on-line).

Metoda byla vyvinuta v National Institute of Aging (součást the National Institutes of Health (NIH), Baltimore, USA). United States Department of Agriculture pravidelně publikuje hodnoty ORAC pro potraviny, výrobci potravin je často uvádějí na obalech. Organizace Oracwatch (www.oracwatch.org) vydává certifikát, že hodnoty ORAC byly ověřeny v jejích laboratořích (HRBÁČ, 2007).

Metoda ORAC měří přímo antioxidační kapacitu proti peroxylovému radikálu generovaného z AAPH 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihydrochlorid při 37 ^{0}C. Jako fluorescenční proba je použit fluorescein (FL). Ztráta fluorescence (FL) indikuje stupeň poškození vzorku (plazmy) z reakce s peroxylovým radikálem. Protektivní účinek antioxidantu je vyhodnocen z plochy pod naměřenou fluorescenční křivkou a je srovnán proti blanku, ve kterém není antioxidant přítomen. Jako standard je použit 1μM Trolox. Výsledek je vyjádřen jako ekvivalent Troloxu. Fluorimeter detekuje při nastavení: excitační vlnová délka = 485 nm a emisní vlnová délka = 520 nm. Výsledné naměřené hodnoty jsou ve skutečném čase měření v minutách a jsou přepočítány (vztaženy, tedy poděleny) k počáteční hodnotě fluorescence (LÍZALOVÁ, 2010). K vyhodnocení výsledků se využívá AUC (Area Under Curve/Plocha pod křivkou) (FERRETI, 2011, on-line).

Detekce je založena na sledování úbytku fluorescence po ataku radikály. Pro generaci peroxylových radikálů se používá již výše zmíněný AAPH, při generaci hydroxylových radikálů pak systém $H_2O_2 + Cu^{2+}$. Vzhledem k tomu, že tyto radikály patří k nejreaktivnějším, patří test ORAC k důležitým parametrům charakterizujícím antioxidanty. Originální metoda ORAC $_{PE}$, která používá jako sondu fykoeritrin (β-PE – oxidaci činidlem ABAP), má široké využití a poskytuje významné informace o antioxidační kapacitě vzorků různého typu. Při stanovení antioxidační kapacitě polyfenolů však byla popsána některá omezení, která se týkají vlastností β-PE (např. omezená fotostabilita). Zavedením jiného typu fluorescenční sondy, a sice fluoresceinu (FL), se metodika $ORAC_{FL}$ zpřesňuje. Uvádí se, že metoda $ORAC_{FL}$ je exaktnější v důsledku přesného a jednoduchého reakčního mechanismu, který spočívá v klasickém přenosu vodíku (PAULOVÁ, BOCHOŘÁKOVÁ, TÁBORSKÁ, 2004).

Lízalová (2010) v rámci studie aplikací metod určených k analýze oxidačního stresu srovnala metodu TRAP a ORAC v biologickém materiálu. Oběma těmito metodami byla stanovena a porovnána antioxidační kapacita ve 108 vzorcích plazmy pacientů s chronickou pankreatidou z I. odběru. Po vyhodnocení a porovnání dat bylo zřejmé, že metoda TRAP je citlivější ve srovnání s metodou ORAC.

3.4.5 Fyzikální metody

3.4.5.1 Elektronová paramagnetická rezonance

Volné radikály lze stanovit přímo metodou EPR (electron paramagnetic spin resonance spectrometry, též ESR – electron spin resonance), což je v současné době nejpřesnější metodou stanovení.

Jednou z metod detekce volných radikálu je elektronová paramagnetická (spinová) rezonanční spektrometrie. EPR (ESR) přímo prokazuje přítomnost volných radikálu a jejich identitu. Principem je vystavení vzorku mikrovlnnému záření v silném magnetickém poli. Sledují se změny kmitočtu tohoto záření při průchodu vzorkem v závislosti na měnící se intenzitě magnetického pole. Energetické přechody nepárových elektronů se projeví jako typický signál na osciloskopu (WEIL, BOLTON, WERTZ,1994).

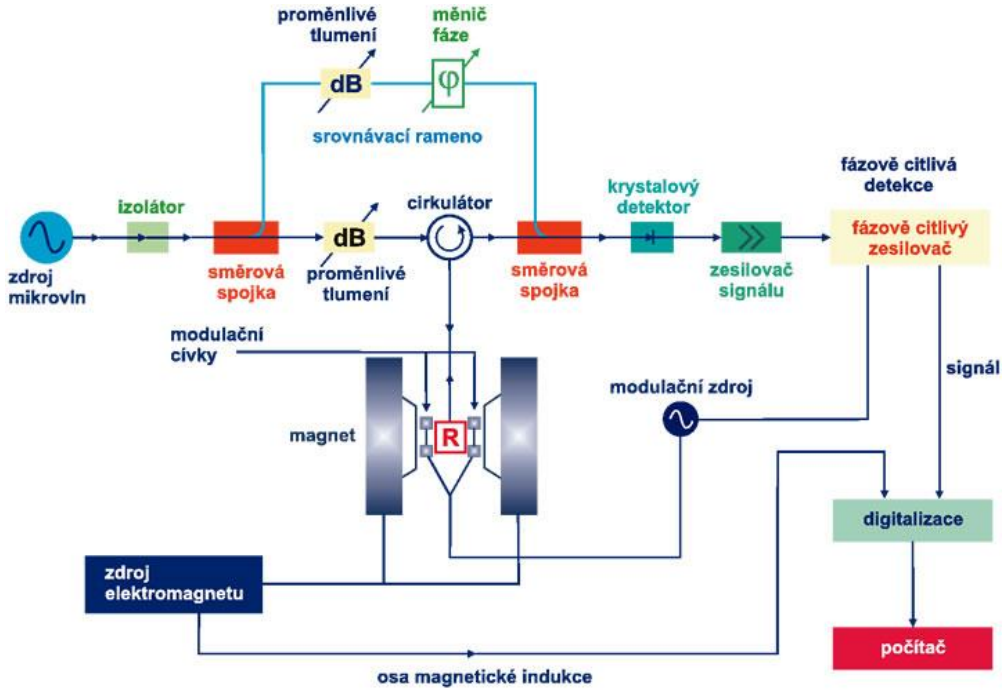
V klasickém ESR experimentu jsou radikály, či vzorky obsahující radikály vkládány do dutiny rezonátoru spektrometru, včetně přírodních či biologických vzorků. Vzhledem k tomu, že běžné sklo rovněž absorbuje mikrovlny, musí být používané kyvety vyrobeny z křemene. Detekční limity metody jsou cca 10^{-9} molu radikálových částic. Vzhledem k této koncentraci je limitujícím faktorem doba života obvykle ne příliš stabilního radikálu, tak, aby při obvyklých elektrochemických koncentracích, objemu kyvety a proudivé hustotě vznikla stacionární koncentrace radikálů dostatečná k detekci a zaznamenání ESR spektra (JANDERKA, 2007).

Principem je schopnost určit přítomnost iontů, které obsahují nepárové elektrony. To je vhodné pro stanovení volných kyslíkových radikálů, popř. jejich komplexů. Jako činidla se nejčastěji používají N-terc-butyl-α-fenylnitron a 2,2-dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyrrol-1-oxid (DMPO). Byl prokázán fakt, že k tvorbě hydroxylového radikálu nedochází ihned po započetí testu, ale až po určitém časovém posunu. Tento čas pak může být využit jako indikátor endogenní antioxidační aktivity vzorku (KARABÍN, DOSTÁLEK, HOFTA, 2006).

Elektronová paramagnetická rezonance má menší využití než NMR. Nemůže být totiž využita pro normální molekuly se spárovanými spiny, ale pouze pro látky se spiny nepárových elektronů. Využívá se pro studium radikálů vznikajících v průběhu chemických

reakcí nebo radiací nebo radikály, které slouží jako sondy pro zkoumání biologických struktur, komplexy s přechodnými kovy nebo molekuly v tripletovém stavu. Vzorek může být plyn, kapalina i pevná látka, ale rotace molekul v plynné fázi způsobuje obtíže (ATKINS, PAULA, 2002).

Existují spektrometry EPR s Fourierovou transformací (FT) i spektrometry CW (z angl. continuous wave). CW – EPR spektormetr je běžnější. Přístroj se skládá z mikrovlnného zdroje (klystronu nebo Gunnova oscilátoru), dutiny, kam se vkládá vzorek ve skleněné nebo ve křemenné kyvetě, mikrovlnného detektoru a elektromagnetu, jehož pole se mění v rozsahu 0,3 T. Spektrum EPR se získá tak, že se zaznamenává absorpce mikrovlnného záření v závislosti na velikosti pole (ATKINS, PAULA, 2010).



Obr.4 *Schéma spektrometru* (CHEMINFO, 2013, on-line).

EPR spektroskopie je založena na absorpci mikrovlnného záření nepárovými elektrony za přítomnosti silných magnetických polí. Tím je umožněno studovat: a) volné radikály různých typů, např.: hydroxylové, superoxidové, nitroxidové radikály, b) paramagnetické komplexy (např. Cu2+, Fe3+, Mn2+ a další), c) excitované stavy (molekuly s vybuzeným elektronem). V případech, že se jedná o relativně stabilní radikály, je možné jejich přímé měření v plynném, kapalném i pevném stavu. U nestabilních radikálů s krátkou dobou života se používá metoda spinového záchytu („Spin Trapping“). Je to metoda chemické stabilizace radikálů, která prodlužuje dobu jejich života. Krátkodobě žijící radikály reagují

s nitrososloučeninami nebo s nitrony, a tím se převedou na stabilní radikály. Nejčastěji používané radikálové lapače jsou: 5,5'-dimethyl-1--pyrrolin-N-oxid (DMPO), 5-(diethoxyfosforyl)-5-methyl--1-pyrrolin-N-oxid (DEPMPO), 2-ethoxykarbonyl-2--methyl-1-pyrrolin-N-oxid (EMPO), N-terc-butyl-□-fenylnitron (PBN) a 1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-oxopiperidin (TEMPONE-H) (viz obr. 1). Spektra EPR těchto aduktů s volnými radikály jsou pro určité druhy radikálů charakteristická. Metoda umožňuje zjistit druh radikálů, jejich koncentraci i časové změny (ZEMAN aj., 2009).

Obdobně jako proton se v magnetickém poli chová elektron. Jeho magnetický moment však míří na opačnou stranu než spin, neboť elektron má záporný náboj. Také u elektronu vzniká ve vnějším magnetickém poli dvouhladinový systém. Na tomto jevu se zakládá spektroskopická sestra NMR, elektronová paramagnetická rezonance (EPR nebo ESR). Hmotnost elektronu je však mnohem menší než u jader a to vede k tomu, že v EPR se běžně používá magnetického pole 0.3 T a frekvencí kolem 9 GHz (vlnová délka asi 3 cm, tedy mikrovlny). Z hlediska použití této metody tu však je podstatný rozdíl. Pomocí NMR je možné studovat většinu molekul, zvláště organických a biomolekul. EPR však „vidí" jen molekulární entity velmi speciální, takové, které mají nenulový elektronový spin, tedy částice s nepárovými elektrony, kterým často říkáme radikály. Na tuto „nevýhodu" lze pohlížet i obráceně. Pro chemiky, kteří se zabývají radikály, je EPR metodou číslo jedna a metoda číslo dvě neexistuje.

EPR metoda je vysoce citlivá a dovede přítomnost radikálů nejenom prokázat, ale i kvantifikovat. Kromě toho můžeme v EPR spektrech v roztocích pozorovat hyperjemnou strukturu (HJS). Ta vzniká díky interakcím spinu nepárového elektronu s magnetickými jádry. Analýzou HJS získáváme informace o struktuře radikálů. (MASARYKOVA UNIVERZITA, 2011, on-line).

Z metod, které jsou efektivně schopny detekovat přítomnost volných radikálů, jednoznačně dominuje EPR spektroskopie. Přímé stanovení volných radikálů se provádí pomocí EPR. EPR spektroskopie, často nazývaná také jako elektronová spinová rezonance (ESR), patří do skupiny magnetických rezonančních metod. Ve všeobecnosti je nejpoužívanější spektrální metodou pro studium charakteru radikálových meziproduktů. Použití EPR je na rozdíl od širokého uplatnění nukleární magnetické rezonance (NMR) omezeno jen na systémy, které mají paramagnetickou povahu (tzn., že obsahují nepárové elektrony). Elektron kolem vlastní osy nerotuje. Jeho nerozlučnou vlastností je však „vnitřní" moment hybnosti – spin. Pravidla chování spinu jsou sice, z pohledu našich makroskopických zkušeností, poněkud zvláštní, avšak velmi jednoduchá a známe je přesně. Je – li více

elektronů pohromadě (např. v molekulách nebo atomech), chovají se tak jako by se řídily věhlasným Pauliho principem a většinou vytvoří páry lišící se pouze opačnou orientací spinu. Valenční elektrony se však někdy nespárují. Docela často proto, že je jich lichý počet. Částice s nevykompenzovaným elektronovým spinem (a pouze takové) lze „vidět“ pomocí elektronové paramagnetické rezonance (CHEMPOINT, 2013, on-line).

Metoda EPR spektroskopie je výhodná jak z hlediska velké citlivosti, kdy v příznivých podmínkách lze měřit paramagnetické systémy s koncentrací až 10^{-9}mol.dm^{-3}, tak z hlediska výpovědí o reaktivitě a molekulové struktuře. Touto metodou se dokázala např. přítomnost volných radikálů v proteinech, v semenech v průběhu jejich klíčení, v listové zeleni, v celulózových vláknech, ve vlně, v ozářených preparátech virů, bakterií, antibiotik, steroidů (CHEMPOINT, 2013, on-line).

Tato metoda, vzhledem k ceně přístroje a obtížím v preanalytické fázi a nemožnosti ji používat pro rutinní vyšetření, slouží jen jako referenční metoda. Nejčastěji jsou proto používané metody nepřímé, tj. následky účinku volných radikálů. Sledují se tzv. TBARS (thiobarbituric acid reactive species), malondialdehyd a další produkty lipoperoxidace, stanovují se karbonyly jako produkty oxidace proteinů aj.

Tato metoda ovšem vyžaduje velmi drahé laboratorní vybavení, stanovení je finančně náročné a běžné rutinní vyšetřování touto metodou není tedy možné. Navíc touto metodou stanovujeme okamžitý stav a nikoliv již způsobená radikálová poškození (HOLEČEK, 2012, on-line). Lze kvalitativně i kvantitativně stanovit různé volné radikály. Zatím v ČR lze provádět sledování změn volných radikálů např. v ocase krysy. Jistě by byly zajímavé pokusy např. tvorby volných radikálů kouřením a sledování jejich ovlivnění podáváním antioxidantů u lidí i v časových intervalech. Tímto způsobem by se vyhodnocovala komplexnost antioxidační ochrany, ale i rychlost a účinnost jednotlivých antioxidantů a jejich kombinací (HOLEČEK, 2006).

Zeman a kol. (2009) v pilotní studii (Stanovení hydroxylových a nitroxidových radikálů u deprese a hyperlipidémie elektronovou paramagnetickou rezonancí) prokázali možnost přímého měření koncentrace hydroxylového a nitroxidového radikálu v lidském séru metodou EPR. Zjistili zvýšení koncentrací nitroxidového radikálu v séru nemocných s depresí, což podporuje hypotézu o působení oxidačního stresu v patogenezi deprese, která je v současné době intenzivně studována. EPR metoda se používá většinou pouze v základním výzkumu orientovaném na chemii, nicméně výsledky práce ukazují na možnost jejího využití i v oblastech klinického výzkumu onemocnění, spojených s oxidačním stresem – ateroskleróza, neurodegenerativní onemocnění, diabetes mellitus a další.

Obr. 5 *Elektronový spektrometr* (EPR FACILITY, 2012, on-line).

3.4.5.2 Chemiluminiscence

Chemiluminiscence, jinak též chemické světlo vzniká přímou přeměnou chemické energie na světelnou. Uvolněná chemická energie převádí atomy nebo molekuly do energeticky bohatšího, tzv. excitovaného stavu, které takto získanou energii uvolňují ve formě světelných kvant (fotonů). Tato metoda se především používá pro stanovení intenzity oxidace lipidů s použitím luminiscenčních činidel isoluminol a pyrazin-3-on (KARABÍN, DOSTÁLEK, HOFTA, 2006).

Chemiluniscence nastává, produkuje-li chemická reakce elektronově excitované látky, které emitují fotony, aby dosáhly základního stavu. S těmito reakcemi se mnohdy setkáváme v bilogických systémech (KLOUDA, 2003).

K starším a dodnes nejpoužívanějším metodám stanovení TAC patří metoda TRAP (Total Radical-Trapping Potential), vyvinutá Waynerem a kol. (HRBÁČ, 2007). TRAP je luminometrická (chemiluminiscenční) metoda – měří přímo antioxidační kapacitu proti peroxylovému radikálu. Princip chemiluminiscenčních metod spočívá v tom, že luminiscenční proba (v našem případě luminol) reaguje s oxidantem za vzniku intermediátu v excitovaném stavu. Excitované elektrony přecházejí zpět na původní hladinu a při přechodu vyzáří určité kvantum světla, které je zesíleno fotonásobičem a detekováno fotodetektorem luminometru.

Světelný signál je převeden na signál elektrický, který je vyjádřen v milivoltech anebo v relativních luminiscenčních jednotkách (RLU) – podle typu přístroje (LÍZALOVÁ, 2010).

V nejpoužívanější variantě této metody je rychlost peroxidace proteinu R-fykoerythrinu (R-PE) vyvolaná termálním rozkladem (za pokojové či mírně zvýšené teploty) 2'-azobis(2-amidinopropanu) hydrochloridu (AAPH) monitorována fluorescenční metodou. Přídavek vzorku obsahujícího LMWA způsobí úplné potlačení peroxidace do doby, než jsou LMWA spotřebovány. Prodleva nástupu peroxidace (lag-fáze) je přímo úměrná antioxidační kapacitě vzorku. TRAP parametr se vyjadřuje v jednotkách TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) – tj. jako koncentrace troloxu, která vyvolá stejnou prodlevu jako vzorek. Relativní antioxidační kapacita se pak vyjadřuje jako koncentrace Troloxu se stejnou antioxidační kapacitou jako má 1 mmol, 1 ml či 1 g stanovovaného vzorku (HRBÁČ, 2007).

Základem metody TRAP je produkce peroxylového radikálu termální dekompozicí ABAP (2,2-azobis-(2-aminodinopropan)hydrochlorid) při 37^0C. Detekce vznikajících radikálů se projeví zesílenou chemiluminiscencí (CL), která je zprostředkována přídavkem luminiscenční proby - luminolem (hydrazid kyseliny 3-aminoftalové) na luminometru. Přidáním vzorku s antioxidačními vlastnostmi dochází k tomu, že antioxidační látky ve vzorku vychytávají peroxylový radikál a zamezují tak oxidaci luminolu. To se projeví jako pokles chemiluminiscenčního signálu na úroveň pozadí. Jakmile se antioxidační látky ve vzorku vyčerpávají, signál začíná stoupat, až dosáhne vrcholu píku a znovu se ustálí na stabilní úrovni až do vyčerpání zdroje peroxylového radikálu. Tato doba je přímo úměrná antioxidační kapacitě testované látky. Z CL křivky je jako parametr této kapacity odčítána doba dosažení 50% původního signálu. Pro posouzení antioxidační kapacity extraktu je používano standardní množství troloxu, který vychytává peroxylové radikály (jedna molekula troloxu neutralizuje dva peroxylové radikály). Z hodnot dosažení 1/2 píku (50% CL signál) pro daný vzorek a pro Trolox se vypočte celková antioxidační kapacita vzorku (LÍZALOVÁ, 2010).

Ke starším a dodnes nejpoužívanějším metodám stanovení TAC patří metoda TRAP (z angl. Total Radical-trapping Potential) s detekcí fluorescenční technikou. Parametr TRAP se vyjadřuje v jednotkách TEAC, tj. jako koncentrace Troloxu, která vyvolá stejnou prodlevu jako samotný vzorek. Relativní antioxidační kapacita se pak vyjadřuje jako koncentrace Troloxu se stejnou antioxidační kapacitou jako má 1 mmol, 1 g či 1 ml stanovovaného vzorku (KOPŘIVA, 2012, on-line).

Karabín, Dostálek a Hofta (2006) využili tuto metodu pro stanovení antioxidační aktivity v pivovarnictví. Bylo zjištěno, že rozhodující vliv na intenzitu oxidace lipidů má

jednak teplota, kdy bylo dosaženo nejvyšší intenzity luminiscence při teplotách okolo 65 ^{0}C, jednak intenzita míchání. To odpovídá podmínkám, které jsou běžné při rmutování, které bylo již dříve považováno za kritický krok z hlediska oxidace lipidových složek při přípravě mladiny.

Srovnání antioxidačních vlastností metodou chemiluminiscence v pivu a víně se věnovali italští autoři, kteří zároveň ověřili pro tyto nápoje vztahy mezi antioxidačními vlastnostmi zjištěnými touto metodou a obsahem polyfenolických složek.

3.4.5.3 Stanovení redox potenciálu

Toto stanovení se uplatňuje především v pivovarském průmyslu. Poprvé bylo stanovení redox potenciálu v pivovarském průmyslu použito již ve třicátých letech minulého století. Nejprve se stanovovalo s pomocí kolorimetrické detekce, postupem času se výzkum soustředil výhradně na elektrochemické stanovení rH (redox potenciál vztažený ke standardní vodíkové elektrodě). Byly určeny tři skupiny látek, které zásadně ovlivňují hodnotu redox potenciálu, a to rozpuštěný kyslík (hodnota rH je lineárně závislá na jeho koncentraci), těžké kovy a jejich komplexy (zejména železo a měď) a látky povahy reduktonů. Bylo rovněž prokázáno, že měřené potenciály vyjadřují pouze okamžitý oxidačně-redukční vliv zmiňovaných látek ve vzorku, proto hodnoty nemohou být použity pro kvantifikaci obecných antioxidačních vlastností vzorku, neboť na něm se podílejí i další, elektrochemicky neaktivní látky. Další výzkum se proto pouze omezil na optimalizaci používaných systémů s tím, že sledování redox potenciálu bude mít pouze informativní charakter a bude používáno jako způsob sledování obsahu rozpuštěného kyslíku (KARABÍN, DOSTÁLEK, HOFTA, 2006).

3.4.6 Lipidově peroxidační metody

Lipoperoxidace postihuje lipidy, které mají tzv. konjugované dvojné vazby (tj. alespoň dvě dvojné vazby mezi vazbou jednoduchou, obecně bývají označovány PUFA – více (poly)-nenasycené mastné kyseliny). Vznikají z nich metabolity, z nichž jsou významné některé aldehyd (malondialdehyd, 4-hydroxynonenal aj.). Aldehydy mají kancerogenní účinky. Malondialdehyd se však rychle odbourává a váže na aminoskupiny bílkovin, čímž pevně spojí dvě části bílkovin a tím poškodí jejich funkci. V krvi jeho hladina kolísá rychle podobně jako glykemie. Lipofusciny se hromadí např. pod kůží a vytváří její stařecké zabarvení. Oxidovaný LDL-cholesterol podporuje vznik aterosklerózy atd. (HOLEČEK, 2011, on-line). Lipoperoxidy jsou nestabilní a rozkládají se za vzniku širokého komplexu různých sloučenin

včetně reaktivních karbonylových sloučenin, jako jsou především některé aldehydy (malondialdehyd (MDA), 4-hydroxynonenal (4-HNE)) (SIEMS, GRUNE, 2003).

Malondialdehyd (MDA) je jedním z hlavních biochemických markerů míry lipoperoxidace a posouzení účinků oxidativního stresu. V organismu způsobuje zesíťování a polymeraci proteinů nebo nukleotidů s následnou mutací. Tento toxický aldehyd má význam už od 60. let minulého století. Vyskytuje se především v enol-formě a primárním zdrojem MDA je peroxidace nenasycených mastných kyselin řady PUFA (KOPŘIVA aj., 2012, on-line). Malondialdehyd představuje potenciálně rizikovou látku v potravinách připravených za vysoké teploty (KOPŘIVA aj., 2010).

Bylo vyvinuto mnoho metod hodnotících vliv antioxidantu na lipidovou peroxidaci, od nejjednodušších, které jsou prováděny s jednoduchými lipidy a v jednoduchých fázových systémech, až po složitější biologické modely simulující situaci *in vivo* a využívající biologické membrány jako matrici. Častým postupem je užití fosfolipidových liposomů nebo studium na mikrosomech. Další modifikací je sledování lipidové peroxidace na tkáňových homogenátech, mitochondriích nebo LDL-částicích (PAULOVÁ, BOCHOŘÁKOVÁ, TÁBORSKÁ, 2004).

Při oxidačním poškození lipidů dochází k jejich peroxidaci – lipidové peroxidaci (resp. peroxidaci lipidů). Peroxidace lipidů je vedle poškození DNA jedním z nejintenzivněji zkoumaných procesů indukovaných volnými radikály. Lipidová peroxidace je chemický proces, při kterém jsou polynenasycené mastné kyseliny (Polyunsaturated Fatty Acids - PUFAs) lipidů poškozovány působením volných radikálů a kyslíku za vzniku hydroperoxidů. Z hydroperoxidů pak dalšími reakcemi vznikají následné sekundární produkty. Nejvíce náchylné jsou membránové lipidy s vysokým obsahem nenasycených mastných kyselin. Reaktivní formy kyslíku napadají především dlouhé mastné kyseliny obsažené ve fosfolipidech, které jsou součástí membrán. Hlavními mastnými kyselinami, které podléhají lipidové peroxidaci v buněčných membránách jsou kyselina linoleová, arachidonová a dokosahexanová. Během ataku reaktivními formami kyslíku, dochází ke zkracování struktury kyselin (LÍZALOVÁ, 2010).

V biologických systémech podléhají nenasycené mastné kyseliny autooxidační radikálové řetězové reakci, která je nazývána peroxidace lipidu. Dvojná vazba oslabuje vazbu C-H a proto PUFA a jiné lipidy podléhají peroxidaci snadněji než jiné biomolekuly. Mezi látky, které jsou schopny iniciovat peroxidaci, patří hydroxylový radikál $HO^{\cdot}$, alkoxylový radikál $RO^{\cdot}$, peroxylový radikál $ROO^{\cdot}$ a pravděpodobně také hydroperoxylový radikál HO2 (ŠTÍPEK aj., 2000).

Lipidová peroxidace mění fluiditu membrán (narušení semipermeability membrán), zvyšuje se propustnost pro ionty, mění se membránový potenciál a dochází až k lyzi buněk (LÍZALOVÁ, 2010). V tkáních dochází k akumulaci tzv. stárnoucích pigmentových skvrn. Objevují se aterosklerotické léze a v tělních tekutinách (zahrnující např. plazmu, moč) jsou přítomny zvýšené hladiny konečných produktů peroxidace (např. MDA, 4-HNE, izoprostany) (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999).

3.4.6.1 TBARS metoda

Jednou z nejužívanějších metod k hodnocení schopnosti látek eliminovat lipidovou peroxidaci je metoda TBA-MDA. Je založena na stanovení jednoho ze sekundárních produktů lipidové peroxidace - malondialdehydu (MDA) - na základě jeho barevné reakce s kyselinou thiobarbiturovou (TBA), měří se absorbance při 532 nm. Spektrofotometrické stanovení aduktů TBA-MDA je jednoduché a citlivé, avšak nespecifické, zahrnuje stanovení všech látek reagujících s TBA (TBARs produkty). Specifičtějším vyhodnocením kvantity aduktu TBA-MDA je metoda HPLC (ZIMA, ŠTÍPEK, CRKOVSKÁ, 1995).

Metody založené na detekci oxidačního poškození organismu jsou nákladné a časově náročné, neboť se u pokusných zvířat vyvolává experimentální oxidační stres a současně nebo následně se v různých dávkách podává testovaný vzorek potraviny. Kritérii oxidačního poškození jsou např. 8-hydroxy-2´-deoxyguanosin v moči, karbonylované proteiny v krvi, tzv. TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) v krvi, hydroperoxidy a konjugované dieny v krvi, F2-isoprostany a etan + pentan ve vydechovaném vzduchu (ZLOCH, ČELAKOVSKÝ, AUJEZDSKÁ, 2004, on-line).

Lipidově peroxidační metody – provádějí se v pufrovaných modelových systémech obsahujících nenasycené mastné kyseliny a testovaný vzorek. Často se přidává homogenát živočišné tkáně, např. jater nebo mozku, a lipidová peroxidace se v ní iniciuje tetrachlormetanem nebo peroxidem. Je možné použít separovaných mikrosomů a iniciace lipoperoxidačních alterací směsí NADPH a železnaté soli nebo jinými systémy. S těmito typy testů jsme na našem pracovišti získali značné zkušenosti, a to v aplikacích na intoxikaci pokusných zvířat různými xenobiotiky a na kompenzace těchto nepříznivých změn esenciálními antioxidanty.

V biologických materiálech TBA nereaguje pouze s MDA, ale i jinými látkami (např. bilirubin) za vzniku TBARS, proto se přesněji uvádí stanovení TBARS či TBARS ekvivalentů MDA, než přímého MDA. Další tvorbě MDA během měření zabráníme přidáním

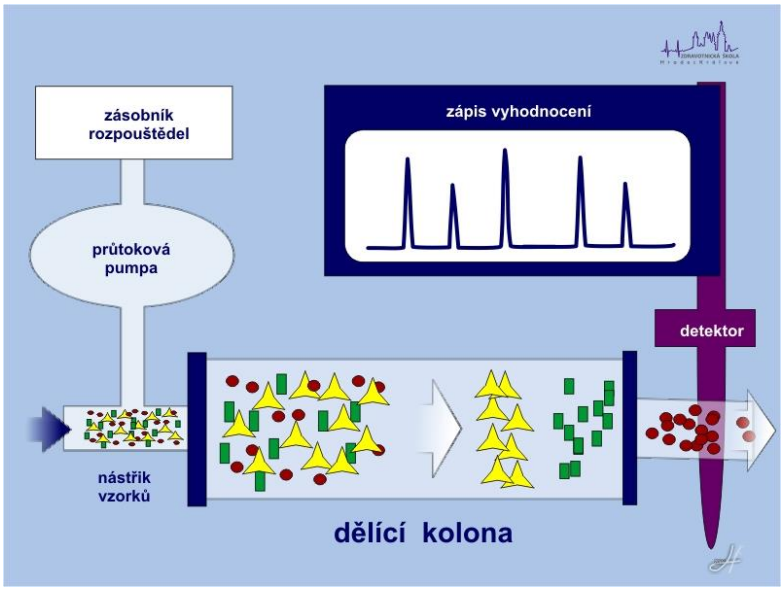
antioxidantu – nejčastěji BHT (butylhydroxytoluen) k reakční směsi. Metoda je četně modifikována, levná a poměrně nenáročná na provedení (KOPŘIVA aj., 2012, on-line).

3.4.6.2 HPLC metoda

Specifičtějším vyhodnocením kvantity aduktů TBA-MDA je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) (PAULOVÁ, BOCHOŘÁKOVÁ, TÁBORSKÁ, 2004). Chromatografie je separační metoda, tedy metoda, při které se oddělují – separují složky obsažené ve vzorku. Separace je operace, při které se vzorek dělí alespoň na dva podíly odlišného složení. V řešení analytických problémů při práci s odebraným vzorkem je nejdůležitější právě separace a na jejím úspěšném zvládnutí závisí správnost a přesnost celé metody. Svým určením je to především metoda kvalitativní a kvantitativní analýzy vzorku (KLOUDA, 2003). HPLC se vyvinula z plynové chromatografie v počátcích 70. let (ŠTULÍK aj., 2005).

Vlastní separace probíhá v separační koloně, která obsahuje stacionární (nepohyblivou) fázi = sorbent a mobilní (pohyblivou) fázi = eluent. V chromatografii se vzorek vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární fáze je nepohyblivá, mobilní fáze je pohyblivá. Vzorek umístíme na začátek stacionární fáze. Pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku mohou být stacionární fázi zachycovány, a proto se při pohybu zdržují. Více se zdrží složky, které jsou stacionární fází poutány silněji. Tím se postupně složky od sebe separují a na konec stacionární fáze se dostávají dříve složky méně zadržované (KLOUDA, 2005).

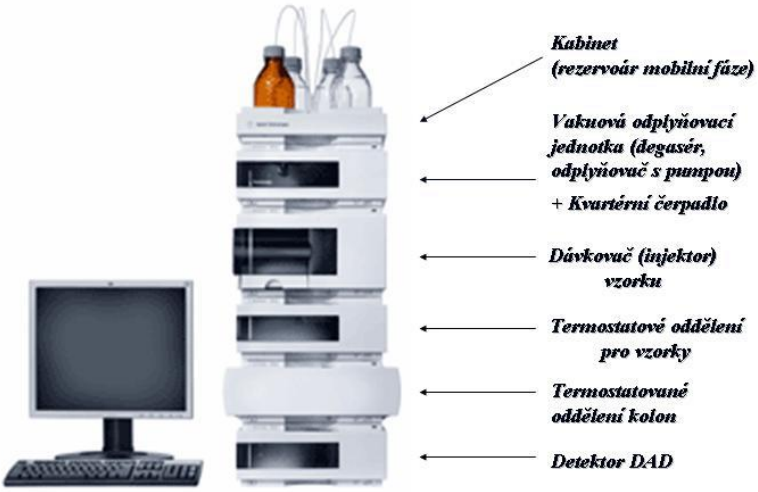
Vysokoúčinný kapalinový chromatograf pracuje tak, že jsou vzorky dávkovány dávkovacím ventilem do mobilní fáze. Ta unáší jednotlivé složky vzorku na kolonu, kde dochází k opakovanému ustanovení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fázi a k separaci analytů dle fyzikálně-chemických vlastností. Po průchodu separační kolonou jsou analyty v mobilní fázi detekovány v průtokové cele detektoru (BAČINA, BUDAYOVÁ, VOKATÁ, 2012, on.line).



Obr. 6 *Schéma HPLC sestavy* (BAČINA, BUDAYOVÁ, VOKATÁ, 2012, on-line).

Produkty lipidové peroxidace – MDA a 4-HNE v plazmě se dají stanovit metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie se spektrofotometrickým UV-VIS detektorem Diode-Array (HPLC-DAD) na kapalinovém chromatografu Agilent Series 1100. Supernatant deproteinizované, hydrolyzované plazmy vstupuje do reakce s reakčním činidlem dinitrofenylhydrazinem (DNPH) dle za vzniku příslušných derivatizačních produktů MDA a 4-HNE. Principem metody je stanovení absorbance derivatizačního produktu MDA-DNPH při vlnové délce 310 nm a 4-HNE-DNPH při vlnové délce 350 nm (LÍZALOVÁ, 2010).

UV-visible (UV-vis) s detektorem Diode Array (DAD) je standardní metodou používanou též pro zjištění flavonoidů (SIVAM, 2002).



Obr. 7 *Kapalinový chromatograf (Agilent Technologies 1100)* (LÍZALOVÁ, 2010).

Základní části kapalinového chromatografu:

- Zásobník mobilní fáze – hojně se využívá skleněné nebo nerezové nádoby. Zásobník musí být dobře uzavřen, aby kapalina v nich mohla dobře odtékat a její páry neunikaly do okolí.
- Vysokotlaké čerpadlo – umožňuje práci s tlaky až do 60 MPa, což umožňuje poměrně velký průtok mobilní fáze (0,1 – 20 ml/min). Mezi nejčastěji používaná čerpadla patří membránová čerpadla a pístová čerpadla s malým pracovním tlakem
- Dávkovač vzorku – potíže způsobuje vliv velkého pracovního tlaku uvnitř kolony (ať 60 MPa), který je třeba při vstřiku vzorku překonat. Byla proto konstruována řada nástřikových zařízení, mezi nejefektivnější patří provádění nástřiku proti normálnímu tlaku nebo smyčkový dávkovač
- Termostat – udržuje teplotu kolony. Teplotní rozsah u moderního termostatu bývá od 10 °C pod okolní teplotou až do 140 °C. Zajišťuje distribuci tepla chromatografickou kolonou a současně předehřívá mobilní fázi před vstupem do kolony.
- Detektor – nejčastěji používané jsou absorpční fotometrický detektor, fluorimetrický detektor, refraktometrický detektor, amperometrický detektor, vodivostní detektor, detektor s diodovým polem (DAD) nebo hmotnostní spektrometr jako detektor (ŠTULÍK aj., 2005).

Metoda je vysoce přesná, specifická, ale finančně náročnější (KOPŘIVA aj., 2012, on-line). Mezi výhody HPLC patří zejména široká oblast použitelnosti: lze analyzovat ionty, látky polární i nepolární, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární (cca 80 % známých látek je možné analyzovat metodou HPLC) (ŠTULÍK aj., 2005).

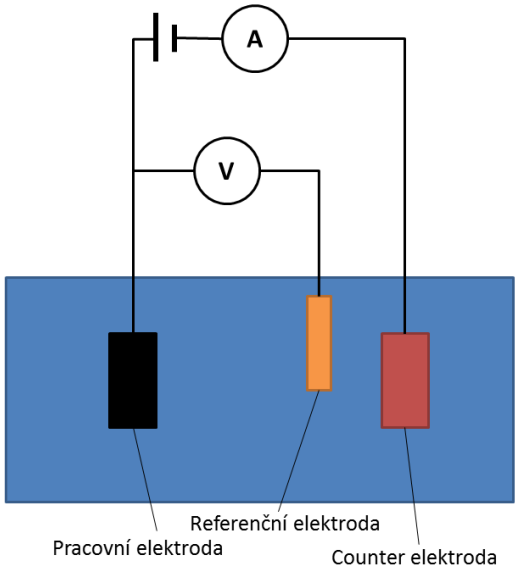
3.4.7 Elektrochemické metody

Skupina elektrochemických metod (elektroanalytických) metod vychází z poznatků odvětví fyzikální chemie – elektrochemie. Podstatou elektrochemických metod je studium toho, jak závisí elektrochemické chování roztoků na jejich složení a koncentraci. Objektem zkoumání je elektrochemický článek – soustava, v níž je analyzovaný roztok v kontaktu s elektrodami. Elektrody zprostředkují jeho spojení s měřícím přístrojem, který sleduje některou z elektrických veličin (proud I, potenciál E, vodivost G, elektrický náboj Q, kapacitu C apod.) (KLOUDA, 2003). Výstižnou definici elektrochemie podává např. Barek, Opekar a Štulík (2005): *„Elektrochemie je fyzikálně chemická disciplína zabývající se těmi chemickými procesy, ve kterých vystupují elektricky nabité částice, tedy především procesy*

oxidačně-redukčními, ději ve kterých dochází k elektrostatickým interakcím částic, a dále transportními procesy, jichž se účastní nabité částice".

3.4.7.1 Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie (CV) je odvozenou metodou od polarografie, za jejíž objev získal český rodák Jaroslav Heyroský v roce 1959 Nobelovu cenu za chemii. Patří do skupiny tzv. potenciodynamických experimentálních metod. Zkoumaný povrch je ponořen do elektrolytu a tvoří tzv. pracovní elektrodu. Typické uspořádaní je vidět na obrázku 4. Mezi pracovní elektrodou a counter elektrodou proudí elektrický proud. Napětí na pracovní elektrodě se nastavuje vzhledem k referenční elektrodě. Referenční elektroda bývá tvořena například kalomelem nebo Ag-AgCl. Counter elektroda je zhotovena nejčastěji z Pt a pracovní elektroda z glasy karbonu, uhlíkové pasty nebo kovových (Pt, Au) krystalů, na které jsou naneseny zkoumané katalytické vrstvy (CYKLICKÁ VOLTAMETRIE, 2012, on-line).



Obr. 8 *Schéma zapojení CV* (CYKLICKÁ VOLTAMETRIE, 2012, on-line).

Vzhledem k faktu, že antioxidanty se snadno účastní redoxních reakcí, jsou tyto látky velmi vhodné pro elektrochemickou detekci. Vhodnou metodou, která je dostatečně jednoduchá a robustní, je cyklická voltametrie na pevné elektrodě (HRBÁČ, 2007). Principem metody je vkládání měnícího se napětí mezi dvojici elektrod ponořenou v roztoku elektrolytu a sleduje se procházející proud. Jedna z elektrod je polarizovatelná a slouží jako pracovní (měrná), druhá je nepolarizovatelná a slouží jako srovnávací. Ze závislosti proudu na napětí (polarogramu, voltamogramu) se usuzuje druh a obsah analytu (tzv. elektroaktivní látky).

Používají se stacionární polarizovatelné (elektrody, rtuťová filmová elktroda) (KLOUDA, 2003). Cyklická voltametrie může poskytnout informace týkající se kinetiky elektronového přestupu a v mnoha případech dokonce informace o mechanismu redoxních změn ve studovaném systému (HRBÁČ, KOHEN, 2000).

Redoxní vlastnosti látek je možno hodnotit právě touto metodou, která indikuje schopnost látek odštěpovat elektrony. Při této metodě se na pracovní elektrodu vkládá potenciálový pulz s určitou rychlostí polarizace a současně se sledují proudové odezvy v roztoku studované látky. Získaný záznam zachycuje křivka – tzv. cyklický voltamogram (PAULOVÁ, BOCHOŘÁKOVÁ, TÁBORSKÁ, 2004). Základem pro voltametrická stanovení jsou $I - E$ křivky (polarizační, voltametrické, polarografické křivky nebo vlny) znázorňující závislost proudu procházejícího elektrodou na jejím potenciálu (KLOUDA, 2005). Redukční schopnost látek se vyhodnocuje dvěma parametry, a to z potenciálu anodického oxidačního píku E_A a jeho anodického proudu I_A. Čím je nižší hodnota E_A , tím látka snadněji odevzdává elektrony a může být lepším antioxidantem. Z hodnoty výšky proudu anodického píku I_A je možné určit koncentraci látek (PAULOVÁ, BOCHOŘÁKOVÁ, TÁBORSKÁ, 2004). Průběh redox procesu je na voltamogramu indikován proudovým píkem typického tvaru. Pozice píku charakterizuje látku kvalitativně. Výška píku je přímo úměrná koncentraci látky v roztoku a lze ji využít ke kvantitativnímu stanovení (HRBÁČ, KOHEN, 2000). Proud píku závisí na rychlosti časové změny potenciálu. V důsledku toho, že difuze je relativně pomalý transportní proces, při dostatečně vysoké rychlosti polarizace nestačí produkty elektrodové reakce zcela oddifundovat od elektrody a za vhodných podmínek je lze při opačném směru potenciálové změny detegovat (BAREK, OPEKAR, ŠTULÍK, 2005).

Naprostá většina nízkomolekulárních antioxidantů (LMWA) - (zejména askorbát, urát, tokoferol, polyfenoly) jsou snadno oxidovatelné elektroaktivní látky. Přímé elektrochemické metody stanovení antioxidační kapacity v podstatě spoléhají na jednoduchý předpoklad, že u mnoha typů vzorků obsahujících LMWA antioxidační kapacita koreluje s výškou a polohou voltametrického píku měřeného na zvolené, zpravidla pevné, elektrodě. Čím snadněji jsou látky oxidovatelné (nižší potenciály, při kterých nastává oxidace), tím bývá jejich antioxidační kapacita (při stejné koncentraci) vyšší. Nachází-li se v určitém typu vzorku dominantní látka, která určuje antioxidační kapacitu, lze s výhodou využívat výšku příslušného CV píku a srovnávat jednotlivé vzorky mezi sebou. Jiným přístupem, který se často používá pro stanovení antioxidační kapacity nápojů je stanovení náboje prošlého při CV experimentu ve zvoleném rozsahu potenciálů a vztažení tohoto náboje na náboj získaný při identickém CV

experimentu s referenční látkou. Příkladem tohoto přístupu je určování antioxidační kapacity vín pomocí parametru Q500, definovaný jako plocha pod voltamogramem stanovovaného vzorku v rozmezí 0-500 mV vs. Ag/AgCl, vztažená na katechin (HRBÁČ, 2007).

Metoda byla vyvinutá pro měření a hodnocení celkové antioxidační aktivity založené na nízkomolekulárních antioxidantech. Metoda byla shledána jakou vhodnou metodou pro hodnocení antioxidační kapacity a uplatněna při mnoha klinických stavech jako například diabetes, degenerativní onemocnění mozku, zánětlivá onemocnění, vředové kolitidě, při iradiační terapii, onemocněních kůže a dále při výzkumu procesu stárnutí. Dále je tato metoda účinným nástrojem pro hodnocení celkové antioxidační kapacity směsí antioxidantů in vitro. Měření sama o sobě jsou snadná a rychlá, navíc nevyžadují manipulaci se vzorky. Metoda by mohla též být použita jako ukazatel oxidačního stresu. Metoda cyklické voltametrie je též účinným nástrojem pro porovnání rozdílných populací, ale slouží i pro odhad schopností biologického vzorku bojovat s reaktivními formami kyslíku a jejich předpokladem k oxidačnímu stresu (KOHEN aj., 2000).

Cyklická voltametrie je vhodná pro získání informace, zda látka je schopna snadno odevzdávat elektrony a poté je možné zvolit určitou metodu na stanovení antioxidační kapacity. Je prokázáno, že v řadě případů hodnoty E_A korelují s antioxidační aktivitou látek určenou jinými metodami, např. s liperoxidací, DPPH (PAULOVÁ, BOCHOŘÁKOVÁ, TÁBORSKÁ, 2004).

Jednoduché CV měření je nyní poměrně bežně používáno zejména u vzorků, u kterých měření klasickými metodami (TRAP, ORAC, FRAP, inhibice chemiluminiscence) znemožňují jejich vlastnosti (turbidita, zbarvení apod.). V několika případech bylo zjištěno, že CV metoda poskytuje lepší výsledky než metody jiné. Nedávno např. autoři Mittal a kol. zjistili, že antioxidační kapacita krevního séra měřená jako první CV pík koreluje s mírou závažnosti akutní pankreatitidy (zánětlivé onemocnění) lépe než standardní měření antioxidační kapacity metodou TRAP (HRBÁČ, 2007).

Obr. 9 *Vyhodnocení metody I- E křivka* (JANDERKA, 2007, on-line).

Mezi výhody této metody patří relativně nízké investiční náklady a snadno měřitelné veličiny: proud-napětí-čas-náboj (JANDERKA, 2007, on-line).

3.4.7.2 HPLC metoda s elektrochemickou detekcí

Elektroaktivní látky je možno velmi přesně a citlivě detekovat použitím amperometrických nebo coulochemických detektorů při analýze HPLC (HPLC-ECD) (PAULOVÁ, BOCHOŘÁKOVÁ, TÁBORSKÁ, 2004). Elektrochemické detektory patří mezi selektivní detektory. Jsou založeny buď na měření vodivosti (pro látky iontové) nebo elektrického proudu odpovídající oxidaci či redukci analytů. Vedle selektivity se dosahuje i velké citlivosti, zejména v oxidačním modu. Pracovní elektroda je např. z ušlechtilého kovu nebo z různých forem uhlíku pro oxidaci látek nebo rtuťová či se rtuťovým filmem pro redukční mod. Využívají se zejména při analýze aromatických aminů a fenolů v environmentálních a biologických vzorcích. Podobně jako v HPLC molekuly a ionty analyzovaných látek jsou unášeny mobilní fází kolonou směrem k detektoru a zároveň jsou zpožďovány interakcí se stacionární fází (ŠTULÍK aj., 2005).

Při HPLC-ECD se na pracovní elektrodu detektoru vkládá určitý kladný potenciál. Pík látky se projeví pouze tehdy, je-li látka při tomto potenciálu oxidována. Látku je možné charakterizovat nejen retenčním časem, ale také potenciálem, při kterém se oxiduje. To umožňuje analyzovat komplexní směsi a identifikovat v nich jednotlivé účinné antioxidační komponenty na základě hodnoty potenciálu aplikovaného na elektrodu. Při analýze neruší zbarvení směsí, ale je nutné dodržet vysokou čistotu reagencií v mobilní fázi (včetně snížení koncentrace stopových prvků). Hodnocení antioxidačních vlastností látek pomocí HPLC-ECD

koreluje s různými jinými metodami na testování celkové antioxidační aktivity látek, např. s metodou DPPH (PAULOVÁ, BOCHOŘÁKOVÁ, TÁBORSKÁ, 2004).

3.4.8 Metoda FORT a FORD

Oxidační stres lze v poslední době stanovit rychle u lůžka pacienta, např. metodami FORT (stanovuje volné radikály) a FORD (stanovuje antioxidační kapacitu).

Metoda FORT je založena na schopnosti tranzistentních kovů, jako je železo, katalyzovat v přítomnosti hydroperoxidů (ROOH) tvorbu kyslíkových radikálů, které dávají s chromogenem ($CrNH_2$) purpurové zabarvení, které lze měřit při 505 nm. Hydroperoxidy jsou poměrně stabilní molekuly a jejich koncentrace v biologickém materiálu představuje poměrně dobrý ukazatel volně radikálového ataku, protože zahrnuje oxidační produkty lipidů, peptidů i aminokyselin.

FORD metoda používá dodané barevné kyslíkové radikály, které antioxidanty ve měřeném vzorku redukují, což se projeví ekvivalentní úbytkem zabarvení, které lze měřit fotometricky. Tímto způsobem není stanovována kyselina močová.

Fyziologické rozmezí výsledků v krvi je zatím stanoveno u metody FORT < 310 (=2,35 mmol/l H_2O_2), u metody FORD pak 1,07–1,53 mmol/l ve vodě rozpustného vitaminu E (Troloxu). Určitou interpretaci poskytuje následující tabulka:

OS = oxidační stres

FORT (jednotky) ↓

Závažnost OS stoupá →	OS v progresi	
Kompenzovaný OS	Zvýšené riziko OS	330
Normální stav	Latentní OS	310
|	|	
1,53	1,07	

← FORD v mmol/l Troloxu

Vedle normálního nálezu lze tedy uvažovat podle výsledků na:

- *latentní* (př. FORT – 200 F.U., FORD – 0,90 mmol/l),
- *kompenzovaný oxidační stres* (př. FORT – 320 F.U., FORD – 1,35 mmol/l),

- na *zvýšené riziko oxidačního stresu* (př. FORT – 320 F.U., FORD – 0,90 mmol/l)
- či na *oxidační stres v progresi* (př. FORT – 370 F.U., FORD –1,1 mmol/l). (HOLEČEK, 2012).

Vysoký oxidační stres nejčastěji nalézáme v těhotenství, u HRT, vytrvalostním výkonu, ihned po fyzické námaze u netrénovaných osob, u farmakoterapie (např. antibiotiky, cytostatiky, analgetiky), u zánětů, kouření a nevyvážené dietě s nesprávnými návyky.

Jaké hodnoty FORT nalézáme u některých stavů

- Chronická venózní insuficience – u mužů 388, u žen – 299
- Chronická bronchitis – 338 ± 42
- Astma – 350
- CHOPN – 386 ± 59
- Kuřáci – 340 ± 52
- Karcinom plic – 500 ±50
- Solidní tumory – 496 ± 92
- Kontraceptivní pilulky – 590 ± 30
- Novorozenci – 140 (v umbilikální krvi)

Kde by bylo možno – kromě výše uvedených oborů – ještě metody FORT a FORD nabízet:

- Farmaceutický průmysl
- Veterinární medicína
- Rostlinná výroba
- Potravinářský průmysl (případně i pivo, víno apod.)
- Praktičtí a dětští lékaři
- Kosmetický průmysl
- Sportovní kluby
- Některé firmy, které prodávají antioxidanty (HOLEČEK, 2012, on-line).

Proto využití metod FORT a FORD se v současné době jeví jako velmi vhodné, protože nevyžaduje drahé přístrojové vybavení, metody jsou do jisté míry standardizované (CE), vyžadují malé množství biologického materiálu, výsledky jsou brzy k dispozici, je možnost i bed-side analýzy. Výsledné interpretace mohou přinést úspory léků či

potravinových doplňků, včas upozornit na nebezpečí vzniku nebo rozvinutí řady chorob a na včasné zařazení terapie.

Oxidační stres má základní důležitost pro preventivní medicínu a péči o zdraví, pro rozhodnutí o způsobu terapie a její kontrolu. Je třeba brát v úvahu individuální rozdíly lidí způsobené dědičností, dietou, okolním prostředím atd., což má pochopitelně vliv i na délku života, vznik nemocí apod. Sledování hodnot FORT a FORD po určitých časových intervalech má tedy své odůvodnění (HOLEČEK, 2011, on-line).

3.4.9 Komerční metody

3.4.9.1 Komerční souprava fy RANDOX

Tato metoda byla doposud hojně využívána v medicínské praxi, zejména při stanovování antioxidačních vlastností v krvi a séru. Metoda za použití komerční soupravy spočívá v reakci methmyoglobinu s peroxidem vodíku za tvorby radikálu ferrylmyoglobinu. Uvedený radikál reaguje s 2,2´-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonátem) (ABTS) v substrátu a vytváří radikál-kation $ABTS^{+}$ modrozelené barvy. Antioxidanty v systému zabraňují tvorbě $ABTS^{\bullet}$, v míře odpovídající jejich koncentraci. Reakce probíhá při 37°C , měří se při vlnové délce 600 nm (KARABÍN, DOSTÁLEK, HOFTA, 2006).

3.4.9.2 Metoda PCL (Photochem)

Firma Analytik Jena AG uvedla analytický systém ke kvantifikaci antioxidantů rozpustných jak ve vodě, tak i v tucích, na jediném společném zařízení nazvaném Photochem (KOPŘIVA aj., 2012, on-line). Jedná se o komerčně dostupný měřící systém užívající zařízení Photochem. Systém zahrnuje fotochemickou generaci superoxidových radikálů. Tyto radikály jsou ze vzorku částečně eliminovány reakcí s antioxidanty přítomnými ve vzorku. Zbývající radikály jsou detegovány s použitím chemiluminiscence. Jako fotosenzibilní i detekční činidlo zbylých radikálů slouží luminol. Zařízení nabízí dva protokoly měření hydrofilní antioxidační aktivity (ACW) a lipofilní antioxidační aktivity (ACL). Luminiscenční signál je měřen po určitý časový interval. V době, kdy jsou antioxidanty vyčerpány, dochází k nárůstu radikálů ve vzorku, až detegovaný signál dosáhne maxima. V protokolu ACW je trvání lag fáze kritériem obsahu antioxidantů. V protokolu ACL je kritériem pro obsah antioxidantů integrál pod signální křivkou. Kvantifikace je založena na kalibračních křivkách kyseliny askorbové (AK) nebo 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman- 2-karboxylové kyseliny (Trolox). Pro oba protokoly jsou dodávány komerční soupravy. PCL metoda je velmi

citlivá, použitelná i při analýzách antioxidační aktivity na hladině nanomolů (HOLASOVÁ, FIEDLEROVÁ, 2011).

Výhody a vlastnosti analytického systému Photochem:

- První přístroj na stanovení antioxidační kapacity jak ve vodě, tak i v tucích rozpustného podílu.
- Fotochemiluminiscenci lze charakterizovat jako rychlou, přesnou, relativně levnou a k životnímu prostředí šetrnou metodu.
- Navíc, na rozdíl od jiných technik, nevyžaduje úzce specifické hodnoty pH a teplot.
- Fotochemická excitace vzorků vede k oxidačním reakcím, které jsou řádově 100 x až 1000 x rychlejší než za běžných podmínek.
- Antioxidanty významně snižují rychlost oxidačních reakcí; toto zpomalení odpovídá celkovému obsahu antioxidačních látek ve vzorku.
- Stanovení celkové (totální) antioxidační kapacity TAC různorodých a komplexních směsí
- Krátká doba měření (kolem 3 min).
- Vysoká citlivost:
- a) enzymové antioxidanty: řádově ~ 0,1 μg (např. SOD);
- b) neenzymové antioxidanty: např. ~ 0,2 nmol kyseliny askorbové.
- Relativně malá spotřeba vzorků.
- Nekomplikovaná a časově nenáročná příprava vzorků.
- Nasávání vzorků, samotné měření a jejich promývání prováděny zcela automaticky.
- Standardizované a k okamžitému použití připravené sety pro různorodé aplikace.
- Zaručená funkčnost v rutinních analýzách.
- Nenáročnost na servis.
- Kompaktní vzhled s nízkými požadavky na prostor.
- Počítačem řízený systém a analýza křivek s pohodlným softwarem (KOPŘIVA aj., 2012, on-line)

Obr. 10 *Analytický systém Photochem, Analytik Jena AG* (KOPŘIVA A KOL., 2012, on-line)

3.4.9.3 Biofotonický skener

Skenování pomocí Pharmanex® Biofotonického skeneru probíhá na malé oblasti dlaně, a proto je skener neinvazivním a praktickým způsobem testování, který je vhodný pro všechny věkové skupiny. V okamžiku, kdy jedinec umístí svou ruku k Pharmanex® Biofotonickému skeneru, dělí jej pouze minuty od odhalení jeho hodnoty karotenoidů v kůži (NU-SKIN, 2006, on-line).

Strunecká (2011) sama vyzkoušela Pharmanex BioScan Quiz nabízený firmou Pharmanex, aby odpověděl na otázku, zda má dostatečný příjem antioxidantů, nebo zda potřebuje jejich pomoc. Přestože odpověděla, že jí ovoce a zeleninu 6 krát denně, nekouří, pobývá na slunci přiměřeně a užívá multivitaminy, dostala odpověď, aby jedla více ovoce a zeleniny, přidala k tomu LifePack Prime supplement a každých šedesát dní se dostavovala na vyšetření Pharmanex BioScanem. A co by musel podle jejich doporučení člověk k dosažení optimálního přísunu antioxidantů do organismu denně zkonzumovat, aby získal stejné množství antioxidantů, jako obsahuje jedna jejich tableta?

- 50 šálků manga
- 27 šálků zeleného hrášku
- 20 malých jablek
- 16 velkých brambor
- 9 šálků vařené rýže
- 21 plátků světlého chleba

- 14 plátků pšeničného chleba
- 23 šálků ananasu
- 13 středně velkých banánů
- 65 šálků chřestu
- 30 šálků mléka
- 10 šálků rajčat
- 10 polévkových lžic arašídového másla
- 59 plátků sýru Čedar
- 11 šálků arašídů
- 16 šálků dýně

Firmě se zjevně jedná pouze o prodej nutričních doplňků. Pokud vím, nebylo nikdy prokázáno, že by jak jejich vyšetření, tak nabízené produkty vedly ke zlepšení zdraví. Považuji to proto za exemplární příklad vyhazování peněz (STRUNECKÁ, 2011)

Obr. 12 *Biofotonický skener a vyhodnocení testu* (NU-SKIN, 2006, on-line).

3.5 Uplatnění metod

Nutriční (výživová) hodnota potraviny vyjadřuje pomocí údajů o množství obsažených látek, do jaké míry je potravina pro výživu člověka významná, a do jaké míry je

prospěšná či nežádoucí. Z tohoto důvodu jsou stále hledány způsoby jak nutriční hodnoty u potravin lépe hodnotit a zahrnout do těchto hodnocení i látky nově objevené. Mezi jednou z velmi důležitých charakteristik je antioxidační aktivita, která je, jak se ukazuje, jedním s hlavních markerů příznivých biologických účinků potravin na zdraví člověka. (SOCHOR aj., 2011) Hodnoty TAC (Total Antioxidant Capacity) jsou prezentovány – ve shodě s praxí jiných pracovišť (až na výjimky výhradně zahraničních) jako fyziologicky interpretovatelná vlastnost potravin, zjistitelná standardní laboratorní metodou na fyzikálně – chemickém základu, která naznačuje potenciální příznivý účinek na zdraví lidí a tento předpokládaný účinek lze kvantifikovat (ZLOCH, ČELAKOVSKÝ, AUJEZDSKÁ, 2004).

Hlavní přísun antioxidantů představuje potrava a nápoje, dalším zdrojem je endogenní tvorba antioxidantů v lidském těle. Ve výživě bývá uváděna kalorická hodnota, množství bílkovin, cukrů, glykemický index aj., ale není udávána antioxidační kapacita (AOC). (RACEK, HOLEČEK, 2011). Spousta metod u potravin a potravinových surovin se nejčastěji zabývá hodnocením zdravotní nezávadnosti a jakosti podle stanovených ukazatelů v příslušných právních předpisech. Hodnoty vycházejí z příslušné legislativy. Bývají uváděné jako fyzikálně-chemické požadavky s uvedením parametru, jeho hodnoty, resp. rozmezí hodnot a jeho jednotky (KOPŘIVA aj., 2010). Holeček a Racek (2011) však nepochybují o tom, že v blízké budoucnosti stanovení AOC získá důležité místo v klinické biochemii.

Metody stanovení látek antioxidačního charakteru najdou své uplatnění v následujících odvětvích:

- Šlechtění

Metody jsou významné pro šlechtitele nových odrůd s cílem hledání nových vlastností. Mohou, díky stanovení antioxidační aktivity, snadno zjistit, která z odrůd je významná pro charakterizaci nových novošlechtění a hybridů. Tímto se může šlechtitelská činnost usměrnit k požadovaným antioxidačním vlastnostem. Metody stanovení antioxidační aktivity najdou své uplatnění u ovocnářských/sadařských podniků, pěstitelů ovoce či samotných odběratelů, kteří mají zájem o vyjádření biologické hodnoty ovoce.

- Potravinářský průmysl

Metody jsou využitelné pro průmyslové hodnocení antioxidačních vlastností výrobků.

- Výživa

Díky stanovení antioxidační aktivity je možnost vyjádřit nutriční hodnotu z hlediska hodnotných obsahových látek. Takto mohou být nalezeny kvalitní odrůdy pro výrobu speciálních potravinových doplňků a nutraceutik. Metody stanovení antioxidační aktivity mohou využít odborníci v oblasti výživy, nutriční specialisté a dietologičtí poradci.

- Zemědělská praxe

Stanovení látek antioxidačního charakteru jsou též využitelná pro Ministerstvo zemědělství ČR, Státní rostlinolékařskou správu, šlechtitele a školkaře jako konkrétní metodický postup pro charakterizaci českých i zahraničních plodin. V neposlední řadě jsou předložené metody určeny jak pro velkovýrobce, tak i pro drobné pěstitele a zahrádkáře, kteří díky nim mohou zhodnotit kvalitu vypěstovaných plodin (SOCHOR aj., 2011).

4 ZÁVĚR

Neuspokojivý zdravotní stav naší populace, zejména značný výskyt tzv. civilizačních nemocí, je často spojován s pojmy „oxidační stres“, „oxidační poškození organismu“ nebo „antioxidační ochrana“ (ZLOCH, ČELAKOVSKÝ, TUMOVÁ, 2005) Antioxidanty přítomné v lidském těle (a také v biologických materiálech) mohou ovlivňovat prevenci organismu, metabolismus, vznik a průběh chorob, a postup léčení. Z těchto důvodů je důležité studovat volné radikály a antioxidanty v lidském těle, jejich druh, reaktivitu, a změny jejich koncentrací v závislosti na vnitřních i vnějších vlivech. Antioxidanty působí jako likvidátory volných radikálů a také obecně reaktivních kyslíkových částic (ROS). Antioxidační kapacitou (AK) se rozumí koncentrace antioxidantů, které rozkládají/likvidují běžné VR, přítomné v lidském těle. Oxidační stres je určitě novým významným vyšetřením pro prevenci. Je možné ho stanovit laboratorně. (HOLEČEK, 2010).

Zároveň se v této souvislosti uvádí mnoho možností cílené a uvědomělé antioxidační obrany např. podporou vlastních antioxidačních enzymů příjmem minerálních látek, které jsou v nich zabudovány, dostatečným příjmem esenciálních antioxidantů, jako jsou vitaminy C a E a karotenoidy nebo suplementací přípravky obsahujícími tyto faktory (ZLOCH, ČELAKOVSKÝ, TŮMOVÁ, 2005). Nakonec nás ale výsledky moderního výzkumu biologie kyslíkových radikálů dovádějí k těm nejprostším pravidlům životosprávy, známým tisíce let. Někomu se to může zdát málo, ale střídmost v jídle, dieta bohatá na ovoce a zeleninu a pravidelná, přiměřená fyzická aktivita zůstávají tím nejlepším základním doporučením pro zdravý a dlouhý život. Vyváženou dietu zatím neumíme nahradit žádnou pilulkou a extra podávání antioxidačních vitaminů nad běžné denní doporučené dávky u normálně živených osob medicínské zdůvodnění vlastně nemá (PLÁTENÍK, 2009).

Jestliže oxidační stres způsobuje poškození tkáně a mitochondriální dysfunkci, neměla by potom jeho léčba být součástí naší léčebné terapie? Přístup dnešní klinické medicíny ke koncepci léčby nadbytku oxidačního stresu jako součástí jednotlivých onemocnění není adekvátní (MANDELKER, 2009).

Antioxidační kapacita se stanovuje u dvou okruhů vzorků. U potravin a potravinových doplňků *(in vitro)* bývá obsah antioxidantů považován za významnou nutriční hodnotu. Neméně důležitou skupinu tvoří vzorky tkání a tělních tekutin (*in vivo*), u kterých se často sleduje změna antioxidační kapacity jako odpověď na změnu či přídavek určité potraviny nebo potravinového doplňku, nebo se sleduje v průběhu patologických stavů (HRBÁČ, 2007).

Při výzkumu antioxidantů (ať již je cílem tohoto výzkumu prodloužení skladovatelnosti potravin a omezení nežádoucích změn lipidů probíhajících během jejich zpracování nebo zvýšení obsahu antioxidantů v potravinách a jejich možný preventivní účinek proti rozvoji některých chorob) se pro stanovení antioxidační aktivity používá nespočet metod a pracovních postupů, které obecně poskytují vzájemně odlišné výsledky (RÉBLOVÁ, 2011).

Co se týče metod stanovení volných radikálů a antioxidační kapacity *in vivo,* tak nejpřesnější je přímé měření pomocí EPR (elektronové paramagnetické rezonance). Tato metoda ovšem vyžaduje velmi drahé laboratorní vybavení, stanovení je finančně náročné a běžné rutinní vyšetřování touto metodou není tedy možné. Navíc touto metodou stanovujeme okamžitý stav a nikoliv již způsobená radikálová poškození. Každá ze stávajících metod je od jiných v něčem výhodná, ale i nevýhodná a výsledky lze obtížně mezi metodami srovnávat. Proto využití metod FORT a FORD se v současné době jeví jako velmi vhodné, protože nevyžaduje drahé přístrojové vybavení, metody jsou do jisté míry standardizované (CE), vyžadují malé množství biologického materiálu, výsledky jsou brzy k dispozici, je možnost i bed-side analýzy. Ovšem bude třeba tyto metody zahrnout do číselníku metod, které hradí pojišťovny. Finanční náročnost je ve srovnání s konkurenčními metodami dostupná a výsledné interpretace mohou přinést úspory léků či potravinových doplňků, včas upozornit na nebezpečí vzniku nebo rozvinutí řady chorob a na včasné nasazení terapie (HOLEČEK, 2012, on-line).

Pro vzájemné porovnávání antioxidačních účinků různých směsí byl některými autory zejména v souvislosti s analýzou potravinových vzorků zaveden pojem celková antioxidační aktivita (Total Antioxidant Activity – TAA). TAA je parametrem, který kvantifikuje kapacitu vzorku biologického materiálu eliminovat radikály. Z velkého počtu již výše popsaných metod mají při stanovení TAA nejčastější použití metody TEAC, FRAP DPPH a ORAC. Pojem celková antioxidační kapacita je však v mnoha publikacích používán v širším významu a rozmanitost používaných metod při jejím stanovení je značná (PAULOVÁ, BOCHOŘÁKOVÁ, TÁBORSKÁ, 2004).

Tab. 6 *Nejčastěji používané metody a jejich princip* (KOMPRDA, 2010).

Název metody	Princip metody
ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)	➢ fluorescein + azo-iniciátor → produkceperoxylových radikálů→poškození fluoresceinu →ztráta fluorescence ➢ fluorescein + azo-iniciátor + antioxidant → ochrana fluoresceinu →ztráta fluorescence je snížena ➢ vynesena závislost intenzity fluorescence na čase => vypočtena plocha pod křivkou rozkladu fluoresceinu s antioxidantem a bez něj ➢ stupeň ochrany působením antioxidantu je kvantifikován pomocí ekvivalentů troloxu (TE)
TEAC (Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity)	➢ činidlo 2,2´-azinobis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát (ABTS) je inkubováno s H_2O_2 v přítomnosti peroxidázy → tvorba radikálového kationtu →měřena absorbance (vysoká) ➢ tatáž reakční směs + antioxidant → potlačení absorbance radikálového kationtu: antioxidant „zháší“ ABTS-radikály
DPPH (difenyl-pikrylhydrazyl)	➢ nepárový elektron ve volném radikálu DPPH má silné absorpční maximum (při 517 nm): červená barva ➢ antioxidant (= „zhášeč“ volných radikálů) dodává vodík, který se páruje s nepárovým elektronem DPPH-radikálu → tvoří seredukovaná forma DPPH-H →molární absorptivita DPPH se podstatně sníží→přechod z červené barvy do žluté
FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay)	➢ antioxidant (= redukční činidlo) redukuje (při nízkém pH) trojmocné železo v tripyridyltriazin-železitém komplexu nadvojmocné železo →tripyridyltriazinželeznatý komplex [Fe(III)-TPTZ →Fe(II)-TPTZ] ➢ Fe(II)-TPTZ má intenzivní modré zbarvení a může být monitorován při 593 nm

Každá z metod má své výhody, ale má také svá omezení, např. náklady na provedení analýzy, dostupnost reakčních činidel apod. Vzhledem k zajištění objektivnosti získaných výsledků se proto v poslední době autoři snaží aplikovat několik metod současně pro

sledování antioxidační aktivity v biologických materiálech a také se snaží o srovnání použitých metodik (ŠULC aj., 2007).

Nicméně Karabín, Dostálek, Hofta (2006) podotýkají, že srovnání hodnot poskytovaných jednotlivými metodami je velmi nesnadné, neboť jak antioxidantů, tak reaktivních látek způsobujících oxidační změny je celá řada a prakticky žádná z metod není schopna obsáhnout tento fakt v celé jeho šíři.

Obecně (tj. jak v modelových experimentech, tak v potravinách, *in vivo,* ale i v dalších možných systémech) ovlivňují antioxidační aktivitu zejména koncentrace antioxidantu, oxidovaný substrát, přítomnost jiných antioxidantů (a s tím související možnost synergismu nebo antagonismu mezi jednotlivými antioxidanty), použité rozpouštědlo (při reakcích v roztoku), homogenita či vícefázovost sledovaného systému, pH, přítomnost dalších látek (např. dalších složek potravin, zejmena pak bílkovin), oxidační činidlo či fyzikální faktor (např. světlo) iniciující oxidaci, teplota, parciální tlak kyslíku, resp. obecně přístup kyslíku (daný např. velikostí povrchu oxidovaného systému), a přítomnost iontů kovů s proměnlivou valencí (RÉBLOVÁ, 2011).

5 SEZNAM POUŽITÝCH INFORMAČNÍCH ZDROJŮ

ATKINS, Peter a Julio de PAULA. *Atkins´ Physical Chemistry.* 7. vyd. Oxford University Press, 2002. ISBN 0-19-879285-9.

ATKINS, Peter a Julio de PAULA. *Fyzikální chemie.* 9. vyd. Oxford University Press, 2010. ISBN 978-80-7080-830-6.

BAREK, Jiří, František OPEKAR a Karel ŠTULÍK. *Elektroanalytická chemie.* Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-1146-5.

BENZIE, I.F.F. a J. J. STRAIN. *Encyklopedia of Human Nutrition*. 2. vyd. Oxford: Elsevier, 2005. ISBN 0-12-150110-8.

ČURDOVÁ, Eva. Odběr a úprava vzorků. In *Automatická spektrometrie II díl.* Český Těšín: 2 Theta, 2007. Kapitola 8, s. 200-270. ISBN 978-80-86380-39-1.

DARLEY-USMAR,Victor a Barry HALLIWELL. Blood radicals. Reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions and vascular system. *Pharm. Res.*, 1996, č. 13, s. 649–662.

ČEPIČKA, Jaroslav a Marcel KARABÍN. Polyfenolové látky piva. *Chemické listy,* 2002, č. 96, s. 90–95.

ČERMÁK, Bohuslav. *Výživa člověka.* České Budějovice: Jihočeská univerzita, 2002. ISBN 80-7040-576-7.

FIDLER, Martin a Lenka KOLÁŘOVÁ. Analýza antioxidantů v chmelu a pivu. *Chemické listy*, 2009, č. 103, s. 232–235.

HALLIWELL, Barry a John GUTTERIDGE. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, Barry a John GUTTERIDGE. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 2010, č. 393, s. 561-564.

HIEMER, Jiří, Ivana MAROVÁ a Josef ILLEK. Množství antioxidantů a antioxidační kapacita vybraných druhů potravin. *Výživa a potraviny*. 2007, č. 5, s. 150–151 ISSN 1211-846X.

HOLASOVÁ Marie a Vlasta FIEDLEROVÁ. Porovnání metod stanovení antioxidační aktivity v ovocných a zeleninových šťávách. *Chemické listy,* 2011, č. 105, s. 766–772.

HOLEČEK, Václav, Richard ROKYTA a René VLASÁK. Antioxidanty a jejich gastrointestinální absorpce a interference jejich účinků. *Československá fyziologie,* 2008, č. 1, s. 24-32.

HOLEČEK, Václav. Oxidační stres u nádorových onemocnění. *Klinická biochemie a metabolismus,* 2010, roč. 18, č. 4, s. 225-230 ISSN 1210-7921.

HOLEČEK, Václav. Volné radikály antioxidanty a jak dále? *Klinická biochemie a metabolismus,* 2006, roč. 14, č. 3, s. 140-145. ISSN 1210-7921.

HOLEČEK, Václav a Jaroslav RACEK. Antioxidační kapacita v potravinách a nápojích. *Klinická biochemie a metabolismus,* 2011, č. 3, s. 202 ISSN 1210-7921.

HRBÁČ, Jan. *Aplikace elektrochemických metod pro stanovení fyziologicky zajímavých látek.* Olomouc, 2007. 109 s. Habilitační práce na přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého v Olomouci.

HRBÁČ, Jan a Ron KOHEN. Biological Redox Activity: Its Importance, Methods, for Its Quantifications and Implications for Health and Disease. *Drug Development Research,* 2000, č. 50, s. 516 – 527.

JORDÁN, Václav. *Antioxidanty zázračné zbraně.* Brno: Jota, 2001. ISBN 80-7217-156-9.

JANDERKA, Pavel. Vybrané aplikace elektroanalytických metod. In *Automatická spektrometrie I. díl*. Český Těšín: 2 THETA, 2007. Kapitola 4.3.1, s. 318-365. ISBN 978-80-86380-39-1.

KALAČ, Pavel. *Funkční potraviny.* České Budějovice: Dona, 2003. ISBN 80-7322-029-6.

KARABÍN, Marcel, Pavel DOSTÁLEK a Pavel HOFTA. *Chemické listy,* 2006, č. 100, s. 184–189.

KASTNEROVÁ, Markéta. *Poradce zdravého životního stylu.* České Budějovice: Nová Forma, 2012. ISBN 978-80-7453-250-4.

KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody.* Ostrava: Pavel Klouda, 2003 ISBN 80-86369-07-2.

KOHEN, Ron et al. Quantification of the overal reactive oxygen species scavanging capacity of biological fluids and tissues. *Free Radical Biology – Medicine.* 2000, roč. 28, č.6, s. 871–879.

KOMPRDA, Tomáš. *Funkční potraviny – cyklus přednášek.* Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2010. ISBN 978-80-7375-219-4.

KOMPRDA, Tomáš. *Základy výživy člověka.* 2. vyd. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2012. ISBN 978-80-7157-655-6.

KOPŘIVA, Vladimír a kol. *Biochemie potravin a biochemické laboratorní metody.* Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2010. ISBN 978-80-7305-125-9.

KVASNIČKOVÁ, Alexandra. Přírodní antioxidanty v potravinách. In *Potravinářství IV*. Praha: ÚZPI, 2000. Kapitola 3, s. 39-62. ISBN 80-7271-003-6.

LACHMAN, Jaromír, Karel HAMOUZ a Matyáš ORSÁK. Červeně a modře zbarvené brambory – významný zdroj antioxidantů v lidské výživě. *Chemické Listy,* 2005, č. 99, s. 474-482.

LÍZALOVÁ, Martina. *Aplikace vybraných metod k analýze oxidačního stresu.* Brno, 2010. 115 s. Disertační práce na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně. Vedoucí dizertační práce doc. RNDr. Antonín Lojek, CSc.

MACUCHOVÁ, Simona. *Studium aktivity enzymových a nízkomolekulárních antioxidačních systému.* Brno, 2010. 147 s. Disertační práce na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně, Ústavu fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí disertační práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

MANDELKER, Lester. *Oxidační stres: role mitochondrií, volných radikálů a antioxidantů.* Praha: Pierot, 2008. ISBN 978-80-7353-135-5.

McCALL, MR., FREI, B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, č. 26, s. 1034–1053.

RACEK, Jaroslav. *Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění.* Praha: Galén, 2003. ISBN 80-7262-231-5.

RACEK, Jaroslav. *Klinická biochemie.* Praha: Galén, 2006. ISBN 80-7262-324-9.

RACEK, Jaroslav a Václav HOLEČEK. Vznik volných radikálů a enzymy. *Klinická Biochemie a Metabolismus*, 1999, č. 7, s. 158–163.

RÉBLOVÁ, Zuzana. Vliv vnějších faktorů na aktivitu antioxidantů. *Chemické Listy,* 2011, č. 105, s. 667-673.

PARKÁNYIOVÁ, J., POKORNÝ, J. Rostliny jako zdroje přírodních antioxidantů. In *Vitamíny 2003 – Přírodní antioxidanty a volné radikály.* Pardubice: Univerzita Pardubice, 2003. ISBN 80-7194-549-8.

PASSWATER, Richard. *O antioxidantech.* Praha: Pragma, 2002. ISBN 80-7205-897-5.

PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické Listy*, 2004, č. 98, s. 174–179.

PLÁTENÍK, Jan. Volné radikály, antioxidanty a stárnutí. *Interní medicína pro praxi.* 2009, roč. 11, č. 1, s. 30–33.

POKORNÝ, Jan. Antioxidanty v potravinách a ve výživě. *Výživa a potraviny.* 2001, č. 2, s. 39–40.

SCHMIDT, Štefan, Jan POKORNÝ a Stanislav SEKRETÁR. Natural antioxidant functionality during food processing. *Chemické listy,* 2006, č. 100, s. 723-732.

SIVAM, Gowsala. Analysis of Flavonoids. In *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals.* New york: Crc Press, 2002. Kapitola 9, s. 363-385. ISBN 1-56676-824-1.

SOCHOR, Jiří. *Screeningová metodika pro stanovení antioxidační aktivity u meruněk.* Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2011. ISBN 978-80-7375-575-1.

STRUNECKÁ, Anna a Jiří PATOČKA. *Doba jedová.* Praha: Triton, 2011. ISBN 978-80-7387-469-8.

STRUNECKÁ, Anna. *Jak přežít dobu jedovou.* Blansko: Almi, 2012. ISBN 978-80-87494-07-03.

ŠŤÍPEK, Stanislav a kol. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci.* Praha, Grada Publishing, 2000. ISBN 80-7169-704-4.

ŠTULÍK, Karel a kol. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-0852-9.

ŠULC, Miloslav a kol. Výběr a zhodnocení vhodných metod pro stanovení antioxidační aktivity fialových a červených odrůd brambor. *Chemické listy.* 2007, č. 101, s. 584–581(2007).

SIEMS, W., GRUNE, T. Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med.*, 2003, roč. 24, č. 4-5, s. 167–175.

TEPE, Bektas a kol. Screeenig of antioxidative properties of the methanolic extracts. *Food Chemistry*, 2006, č. 98, s. 9-13.

TIRZITIS, Gunars a Grzegorz BARTOSZ. Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Biochimica Polonica,* 2010, č. 1, s. 139-142.

VEJRAŽKA, Martin. Signální funkce volných radikálů. *Vesmír*, 2004, č. 83, s.170–172.

VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin I.* 3. vyd. Tábor: Ossis, 2009 ISBN 978-80-86659-15-2.

VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin III.* 3. vyd. Tábor: Ossis, 2009 ISBN 978-80-86659-15-2.

VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-86659-03-8.

WEIL, J., BOLTON, J., WERTZ, J. *Electron Paramagnetic Resonance. Elementary Tudory and Practical Applications.* NY Wiley, 1994.

WANG, D., KREUTZER, D. A., ESSIGMANN, J. M. Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutation Research*, 1998, č. 400, s. 99–115.

WARIS, Gulam a Ahsan HAASEB. Reactive oxygen species: role in the develompent of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis.* 2006, č. 5, s. 231-237.

ZADÁK, Zdeněk a kol. Antioxidants and Vitamins in Clinical Conditions. *Physiological Research,* 2009, č. 58, s. 13-17.

ZIMA, T., ŠTÍPEK, S., CRKOVSKÁ, J. Stanovení produktu lipoperoxidace – malondialdehydu – v biologickém materiálu spektrofotometricky a HPLC. *Klinická Biochemie a Metabolismus,* 1995, č. 3, s. 98–102.

ZITTLAU, Jorg. *Jak se léčit vhodnou stravou.* Brno: Computer Press, 2006. ISBN 80-251-0982-8.

ZLOCH, Z., ČELAKOVSKÝ, J., TŮMOVÁ, O. Celková antioxidační kapacita vybrané skupiny našich potravin. *Výživa a potraviny*, 2005, roč. 60, č. 5, s. 128–130.

ZEMAN, Miroslav a kol. Stanovení hydroxylových a nitroxidových radikálů u deprese a hyperlipidémie elektronovou paramagnetickou rezonancí. *Chemické Listy,* 2009, č. 103, s. 667–671.

ELEKTRONICKÉ ZDROJE:

BAČINA, Aleš, Eva BUDAYNOVÁ a Soňa VOKATÁ. *HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie).* [on-line]. ©2012. [citováno2013-02-21]. Dostupné z: http://labmet.zshk.cz/vyuka/hplc.aspx

EPR FACILITY. *Electron Paramagnetic Resonance.* [on-line]. ©2012. [citováno2013-01-28]. Dostupné z: http://epr.cm.utexas.edu/

FERRETI, Ursula. *Využití metody ORAC pro stanovení relativní antioxidační aktivity rostlinných extraktů.* [on-line]. ©2012. [citováno2013-01-18]. Dostupné z: http://konference.osu.cz/svk/sbornik2013/pdf/budoucnost/fyzika/SVK2013_VMB_Ferretti.pdf

CHEMPOINT. *EPR – spektroskopie*. [on-line]. © 2013. [citováno2013-02-22]. Dostupné z: http://www.chempoint.cz/epr-spektroskopie

CHEMINFO – SERVER CHEMICKÉ SEKCE. *Photochemistry and Photophysics of Organic Compounds.* [on-line]. ©2013. [citováno2013-02-01]. Dostupné z: http://cheminfo.chemi.muni.cz/ianua/epr/obr/blok_schema.jpg

HOLEČEK, Václav. *Metody FORT a FORD, jejich interpretace a možnosti uplatnění v praxi* [on-line]. ©2012. [citováno2013-03-05]. Dostupné z: http://dotdiag.cz/img/prednasky/Interpretace_FORT__FORD.pdf

HOLEČEK, Václav. *Volné radikály, antioxidanty, jejich účinky a možnost jejich sledování metodami Fort a Ford.* [on-line]. © 2011. [citováno2013-01-16]. Dostupné z: http://dotdiag.cz/img/prednasky/O2_radik__ly_u_diabetu_CR3000.pdf

JANDERKA, Pavel. *Cyklická voltametrie*. [on-line]. ©2012. [citováno 2013-01-28]. Dostupné z: http://cheminfo.chemi.muni.cz/ktfch/janderka/Pomucky/Cyklicka%20voltametrie.pdf:

KATEDRA FYZIKY POVRCHŮ A PLAZMATU MFF UK. *Cyklická voltametrie.* [on line]. ©2012. [cit. 2013-01-26]. Dostupné z: http://physics.mff.cuni.cz/kevf/povrchy/metoda/cv

KOPŘIVA, Vladimír a kol. *Vybrané instrumentální metody v biochemických cvičeních.* [on-line]. ©2012. [cit. 2013-02-07]. Dostupné z: http://cit.vfu.cz/ivbp/wp-content/uploads/2011/07/Kopriva-skripta-II-web.pdf

MASARYKOVA UNIVERZITA V BRNĚ. *EPR – spektroskopie*. [on-line]. ©2012. [citováno2013-01-12]. Dostupné z: http://cheminfo.chemi.muni.cz/ianua/epr/

MASARYKOVA UNIVERZITA V BRNĚ. *Elektronová paramagnetická rezonance.* [on-line]. ©2011. [citováno2013-01-13]. Dostupné z: http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js11/fyz_chem/web/fotony/EPR.htm

MAROUNEK, Milan. *Povaha a mechanismus účinku antioxidantů, význam ve výživě zvířat a lidí.* [on-line]. ©2006. [citováno2013-03-13]. Dostupné z: http://www.vuzv.cz/sites/File/vybor/Marounek%20Povaha%20a%20mechanismus%20ucinku%20antioxidantu.pdf

NU-SKIN. *Pharmanex biofotonický skener.* [on-line]. © 2006. [citováno2013-02-08]. Dostupné z: http://www.pxscanner.com/microsites/scanner/cz/about.shtml

VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE. *Spektrofotometrické metody – antioxidační kapacita, volné radikály*. [on-line]. © 2012. [citováno2013-01-10]. Dostupné z: tk/www_324/lab/navody/oborI/Spektrofotometrie.pdf

ZLOCH, Z, ČELAKOVSKÝ, J., AUJEZDSKÁ, A. *Stanovení obsahu polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu.* [on-line]. © 2004. [cit. 2013-02-01]. Dostupné z: http://www.institut-danone.cz/data/studie/pridelene-granty/2004-03.pdf

6 SEZNAM ZKRATEK

ABAP	2,2-azobis-(2-aminodinopropan)hydrochlorid
ACL	lipofilní antioxidační aktivita měřená na přístroji Photochem
ACW	hydrofilní antioxidační aktivita měřená na přístroji Photochem
CV	cyklická voltamometrie
DAD	detektor Diode – Array
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EPR	elektronová paramagnetická (spinová) rezonanční spektrometrie (Electron paramagnetic spin resonance spektrometry) electron spin resonance
4-HNE	4-hydroxy-2-trans-nonenal (4-hydroxynonenal)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High performance liquid chromatography)
HPLC-ECD	HPLC s elektrochemickou detekcí
FRAP	železitý redukční antioxidační potenciál (ferric reducing antioxidant potential)
LMWA	nízkomolekulární antioxidanty (low-molecular weight antioxidants)
MDA	malondialdehyd
NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid
ORAC	měření absorbance kapacity kyslíkového radikálu (Oxygen radical absorbance capacity)
PCL	chemifotoluminiscenční metoda
PUFAs	polynenasycené mastné kyseliny (Polyunsaturated fatty acids)
RNS	reaktivní dusíkové radikály
RONS	reaktivní volné kyslíkové a dusíkové radikály
ROS	reaktivní kyslíkové radikály (reactive oxygen species)
SOD	superoxiddismutáza
TBA	thiobarbiturová kyselina
TAA	celková antioxidační aktivita (total antioxidant activity)
TEAC	trolox equivalent antioxidant capacity
TRAP	Total peroxyl radical-trapping antioxidant parameter
TROLOX	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina