

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Porovnání metod pro stanovení antioxidační aktivity

Bakalářská práce

Belfínová Petra

Výživa a potraviny

Ing. Monika Sabolová, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Porovnání metod pro stanovení antioxidační aktivity" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 15. 7. 2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí své bakalářské práce Ing. Monice Sabolové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a trpělivost při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Janě Kozákové, Ph.D. za pomoc se statistickou analýzou a také své rodině a příteli za podporu během celého studia.

Porovnání metod pro stanovení antioxidační aktivity

Souhrn

Antioxidanty chrání lidský organismus proti oxidačnímu stresu způsobenému působením volných radikálů, které při nadměrném množství poškozují buňky a tím se mohou podílet na vzniku chronických onemocnění. Antioxidanty lze rozdělit na endogenní, tedy přirozeně se vyskytující v těle, a exogenní, které mohou mít zásadní význam při prevenci onemocnění a je nutné je přijímat potravou. Jednotlivé druhy antioxidantů se liší v závislosti na jejich zdroji, množství a polaritě. Také jejich kombinace, působení světla a teplota může ovlivnit výslednou antioxidační aktivitu. Díky této rozmanitosti bylo vyvinuto velké množství různých metod pro stanovení antioxidační aktivity.

Existují dvě základní skupiny metod, jednou z nich jsou metody založené na přenosu atomů vodíku a druhou, větší skupinu tvoří metody založené na přenosu elektronů, které mohou být založeny buď na odbarvování – snížení absorbance nebo naopak na zvýšení absorbance v přítomnosti antioxidantu. Další metody stanovují schopnost antioxidantů vychytávat reaktivní formy kyslíku, jako je peroxid vodíku (H_2O_2), peroxyinitrit (ONOO^\bullet), hydroxylový radikál (HO^\bullet), superoxidový anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) a singletový kyslík ($^1\text{O}_2$). Již méně používané jsou *in vivo* metody, kdy jsou testované vzorky obvykle podávány pokusným zvířatům. Ze všech metod je nejpoužívanější metoda DPPH. Výsledky různých metod se mohou výrazně lišit, proto se doporučuje použití více metod pro stanovení antioxidační aktivity.

V praktické části této práce byl měřen celkový obsah fenolů u vybraných vzorků (zelený čaj, pomerančový džus, kakao a rozmarýn) s použitím Folin-Ciocalteuova činidla v kyvetách a na mikrotitračních destičkách za účelem srovnání. Jako standard byla použita gallová kyselina a celkový obsah fenolů byl vyjádřen jako obsah ekvivalentu gallové kyseliny (GAE) na 100 ml nebo 100 g vzorku. Výsledné hodnoty naměřené na mikrotitračních destičkách byly přibližně dvakrát větší než hodnoty v kyvetách, ale podle výsledků statistické analýzy se tyto metody neliší ($p > 0,05$). Průměrná antioxidační aktivita vzorků klesala v pořadí fresh > džus > čaj 80 °C > čaj 100 °C (vyjádřeno na objem vzorku) a rozmarýn > kakao (vyjádřeno na hmotnost vzorku). Dle statistické analýzy není rozdíl mezi antioxidační aktivitou zelených čajů zalitých vodou o různé teplotě ($p > 0,05$), ani mezi kupovaným a čerstvě vymačkaným pomerančovým džusem ($p > 0,05$).

Klíčová slova: antioxidanty, Folin-Ciocalteuovo činidlo, polyfenoly, volné radikály, zelený čaj

Comparison of methods for determination of antioxidant activity

Summary

Antioxidants protect the human body against oxidative stress caused by free radicals, which can in excessive amount damage cells and participate in development of chronic diseases. Antioxidants can be divided into two groups: endogenous, which are naturally occurring in the body, and exogenous, which can be essential in the prevention of diseases and are ingested through food. Antioxidant activity of individual antioxidants differ depending on their source, amount and polarity. Combination of antioxidants, light exposure and temperature can also affect the resulting antioxidant activity. Due to this diversity, a large number of different methods have been developed to determine the antioxidant activity.

There are two basic groups of methods, one of them are methods based on hydrogen atom transfer. The second, larger group are methods based on electron transfer, which can be either based on decolorisation – a decrease of absorbance or on an increase of absorbance in the presence of antioxidant. Other methods determine the ability of antioxidants to scavenge reactive oxygen species such as hydrogen peroxide (H_2O_2), peroxynitrite ($ONOO^\bullet$), hydroxyl radical (HO^\bullet), superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) and singlet oxygen (1O_2). *In vivo* methods, where the tested samples are usually administered to experimental animals, are less used. Of all the methods, the most frequently used is DPPH method. The results of various methods can be significantly different, therefore the use of multiple methods to determine antioxidant activity is recommended.

In the practical part of this work, comparison of using cuvettes and microtiter plates for determination of the content of total phenolic compounds of selected samples (green tea, orange juice, cocoa, and rosemary) was provided. Gallic acid was used as a standard for quantification by the calibration curve. The total phenolic content values were expressed as gallic acid equivalent (GAE) content per 100 ml or 100 g of sample. The results measured on microtiter plates were approximately twice as big as the values in the cuvettes, but according to the results of statistical analysis, these methods weren't significantly different ($p > 0,05$). The average antioxidant activity of the samples decreased as follows: fresh > juice > tea 80 °C > tea 100 °C (volume) and rosemary > cocoa (weight). According to statistical analysis, there was no difference between the antioxidant activity of green teas poured with water at different temperatures ($p > 0,05$), nor between purchased and freshly squeezed orange juice ($p > 0,05$).

Keywords: antioxidants, Folin-Ciocalteu's reagent, polyphenols, free radicals, green tea

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíl práce	9
2.1	Hypotéza	9
3	Literární rešerše	10
3.1	Volné radikály	10
3.1.1	Tvorba volných radikálů	11
3.2	Antioxidanty v organismu	12
3.2.1	Rozdělení.....	12
3.2.2	Interakce mezi antioxidanty	18
3.2.3	Prooxidační působení antioxidantů	18
3.3	Antioxidanty v potravinách	19
3.3.1	Přírodní antioxidanty v potravinách	19
3.3.2	Tokoly jako vedlejší složky olejnatých semen a jedlých olejů	20
3.3.3	Koření a bylinky	21
3.3.4	Čaje a čajové extrakty	22
3.3.5	Kakao.....	22
3.4	Měření antioxidační aktivity	23
3.4.1	Vyjádření výsledků.....	24
3.5	Metody pro stanovení antioxidační aktivity	24
3.5.1	Metody založené na přenosu atomů vodíku	25
3.5.2	Testy založené na přenosu elektronů.....	27
3.5.3	Metody měření vychytávání ROS	33
3.5.4	Další <i>in vitro</i> metody měření antioxidační aktivity	36
3.5.5	<i>In vivo</i> testy	37
3.6	Porovnání metod pro stanovení antioxidační aktivity	38
3.6.1	Porovnání metod měření v kyvetách a na mikrotitračních destičkách	39
4	Metodika	40
4.1	Materiál	40
4.1.1	Vzorky	40
4.1.2	Použité chemikálie a přístroje	40
4.2	Metody	40
4.2.1	Příprava vzorků	40
4.2.2	Stanovení celkového obsahu fenolů v kyvetách.....	41
4.2.3	Stanovení celkového obsahu fenolů na mikrotitračních destičkách..	41
4.2.4	Statistické vyhodnocení dat.....	42
5	Výsledky	43
5.1	Porovnání metod stanovení celkového obsahu fenolů	43

5.2	Statistické vyhodnocení dat.....	44
5.2.1	Porovnání metod na mikrotitrační destičce a v kyvetách	44
5.2.2	Porovnání vzorků čajů a džusů.....	45
6	Diskuze	47
7	Závěr	49
8	Literatura.....	50
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	63

1 Úvod

Lidský organismus je neustále vystavován oxidačnímu stresu, který je běžnou součástí nepřetržitě probíhajících buněčných procesů. Vedlejším účinkem tohoto procesu je tvorba volných radikálů a dalších reaktivních forem kyslíku, které způsobují oxidační změny. Volné radikály se podílí na vzniku velkého počtu nemocí, jako jsou nádorová onemocnění, kardiovaskulární choroby včetně aterosklerózy, onemocnění nervového systému, mezi které patří Alzheimerova a Parkinsonova choroba, alkoholem indukované onemocnění jater, ulcerózní kolitida a stárnutí. Mechanismy obrany proti účinkům nadměrné oxidace jsou zajištěny působením různých antioxidantů. Mezi endogenní systémy obrany organismu vůči oxidaci patří enzymy, jako je superoxidodismutáza, kataláza a glutathionperoxidáza, dále vitamin E, kyselina močová a sérové albuminy. Kromě toho je důležitý také příjem antioxidantů z potravy. Výsledky studií naznačují, že potraviny, které obsahují antioxidanty, mohou mít při prevenci nemocí zásadní význam, jelikož mohou působit při jejich prevenci nebo mohou oddálit jejich nástup. Navíc mohou antioxidanty přítomné v potravinách bránit jejich oxidaci, která je jednou z hlavních příčin jejich kažení a má za následek žluknutí a/nebo zhoršení nutriční kvality, barvy, chuti, struktury a bezpečnosti potravin.

Metody hodnocení chování antioxidantů spadají do dvou širokých kategorií odrážejících zaměření na aktivitu v potravinách nebo na biologickou aktivitu v lidském těle. Metody měření antioxidační aktivity mohou zahrnovat testování *in vitro* nebo *in vivo*. Metody *in vitro* poskytují užitečné informace o antioxidační aktivitě různých látek, ale údaje získané těmito metodami je obtížné aplikovat na biologické systémy. Na druhou stranu, *in vivo* měření jsou obtížně proveditelná kvůli problémům týkajících se absorpce antioxidantů v buňkách a jejich transportu v organismu.

2 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo zpracování literární rešerše zaměřené na porovnání různých metod používaných ke stanovení antioxidační kapacity se zaměřením na srovnání stanovení celkového obsahu polyfenolů. V praktické části byl spektrofotometricky zjišťován celkový obsah polyfenolů u vybraných vzorků.

2.1 Hypotéza

Standardní spektrofotometrické stanovení antioxidační aktivity pomocí kyvet lze nahradit stanovením za použití mikrotitračních destiček.

3 Literární rešerše

3.1 Volné radikály

Volný radikál lze definovat jako jakýkoli molekulární druh schopný nezávislé existence, který obsahuje nepárový elektron v atomovém orbitalu. Přítomnost nepárového elektronu má za následek určité společné vlastnosti, které sdílí většina radikálů. Mnoho radikálů je vysoce reaktivních a mohou buď elektron darovat, nebo přijímat elektron z jiných molekul, a proto se chovají jako oxidanty nebo redukční látky. V důsledku této vysoké reaktivity má většina radikálů v biologických systémech velmi krátký poločas života (10^{-6} sekund nebo méně), i když některé druhy mohou přežít mnohem déle. Nejdůležitější volné radikály v mnoha chorobných stavech jsou deriváty kyslíku, zejména superoxid a hydroxylový radikál (Young & Woodside 2001).

Superoxid (O_2^-) vzniká přidáním jediného elektronu ke kyslíku. Řetězec přenosu elektronů ve vnitřní mitochondriální membráně provádí redukci kyslíku na vodu. Během tohoto procesu se vytvářejí meziprodukty volných radikálů, které jsou obecně pevně vázány na složky transportního řetězce. Do mitochondriální matrice však neustále uniká několik elektronů, což vede k tvorbě superoxidu (Becker et al. 1999). Jakýkoli biologický systém vytvářející superoxid bude také produkovat peroxid vodíku v důsledku spontánní dismutační reakce (Chance et al. 1979). Peroxid vodíku není sám o sobě volným radikálem, ale je obvykle zahrnut pod obecnou hlavičku ROS (reaktivní formy kyslíku). Je to slabé oxidační činidlo, které by mohlo přímo poškodit bílkoviny a enzymy obsahující reaktivní thiolové skupiny. Jeho nejdůležitější vlastností je však schopnost volně procházet buněčnými membránami, což superoxid obecně nemůže udělat (Halliwell & Gutteridge 1990). Proto se peroxid vodíku vytvořený na jednom místě může rozptýlit do značné vzdálenosti předtím, než se rozloží, čímž se získá vysoce reaktivní hydroxylový radikál, který pravděpodobně zprostředkovává většinu toxických účinků připisovaných peroxidu vodíku (Tatsuzawa et al. 1999).

Hydroxylový radikál ($OH\cdot$) je pravděpodobně konečným přenašečem většiny volných radikálů způsobujících poškození tkáně. Všechny výše popsané reaktivní formy kyslíku uplatňují většinu svých patologických účinků tím, že vedou k tvorbě hydroxylových radikálů. Důvodem je to, že hydroxylový radikál reaguje s extrémně vysokými rychlostními konstantami, s téměř každým typem molekuly, který lze najít v živých buňkách včetně cukrů, aminokyselin, lipidů a nukleotidů. Ačkoli k tvorbě hydroxylových radikálů může dojít několika způsoby, zdaleka nejdůležitějším mechanismem *in vivo* bude pravděpodobně přechodným kovem katalyzovaný rozklad superoxidu a peroxidu vodíku (Stohs & Bagchi 1995).

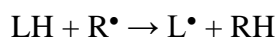
Produkce volných radikálů probíhá nepřetržitě ve všech buňkách jako součást normální buněčné funkce, především při aerobním metabolismu (Fang et al. 2002). Nadměrná produkce volných radikálů pocházejících z endogenních zdrojů však může hrát roli v mnoha nemocech. Je to dáno tím, že jak již bylo zmíněno, volné radikály působí na biologicky významné sloučeniny, především lipidy, bílkoviny a nukleové kyseliny, pozměňují jejich strukturu a tím modifikují jejich funkci (Paulová et al. 2004; Zampelas & Micha 2015). Ačkoli k produkci volných radikálů dochází v důsledku endogenních reakcí, které hrají důležitou roli v normální funkci buněk, je důležité si uvědomit, že exogenní faktory (tj. faktory prostředí) mohou také podporovat tvorbu radikálů. Např. ultrafialové záření vede k tvorbě singletového kyslíku a dalších reaktivních forem kyslíku v kůži (McCaughan 1999). Také látky znečišťující atmosféru,

jako je ozon a oxid dusičitý, vedou k tvorbě radikálů a vyčerpání antioxidantu v bronchoalveolární výstelce, což může zhoršit respirační onemocnění. Cigaretový kouř obsahuje milimolární množství volných radikálů spolu s dalšími toxickými látkami (Pourcelot et al. 1999). Různá xenobiotika mohou rovněž způsobit poškození tkáně v důsledku tvorby volných radikálů, včetně paraquat, paracetamolu, bleomycinu a antracyklinů (Young & Woodside 2001).

3.1.1 Tvorba volných radikálů

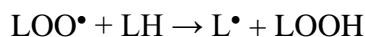
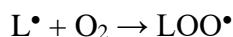
Jak již bylo zmíněno, vznik volných radikálů může být iniciován řadou chemických a fyzikálních jevů. Jedná se o neenzymatickou řetězovou reakci, která postupně probíhá v krocích: iniciace, propagace, větvení a terminace. Reakce může být zahájena působením vnějších činitel, jako je teplo, světlo nebo ionizující záření, nebo chemickou iniciací kovovými ionty nebo metaloproteiny (Kanner et al. 1987).

3.1.1.1 Iniciace



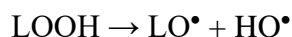
Kde LH představuje molekulu substrátu, například lipid, s R^\bullet jako iniciačním oxidačním radikálem. Oxidace lipidu vytváří vysoce reaktivní allylový radikál (L^\bullet), který může rychle reagovat s kyslíkem za vzniku lipidového peroxylového radikálu (LOO^\bullet) (Antolovich et al. 2002).

3.1.1.2 Propagace



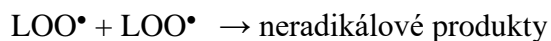
Peroxylové radikály jsou velmi reaktivní sloučeniny, které mohou dále oxidovat lipidy, čímž se vytvářejí primární produkty oxidace lipidů - hydroperoxydy lipidů (LOOH), které se dále štěpí na širokou škálu sloučenin, včetně alkoholů, ketonů, aldehydů, alkylformiátů a alkoxylového radikálu (L^\bullet) (Antolovich et al. 2002).

3.1.1.3 Větvení



Rozpad lipidových hydroperoxidů často zahrnuje katalýzu iontů přechodných kovů, v reakcích analogických s peroxidem vodíku, což vede ke vzniku peroxidových a alkoxylových radikálů (Antolovich et al. 2002).

3.1.1.4 Terminace



Terminační reakce často zahrnují spojení dvou radikálů za vzniku neradikálových produktů (Antolovich et al. 2002).

3.2 Antioxidanty v organismu

Antioxidanty chrání lidské tělo jak před volnými radikály a ROS, tak i před poškozením reaktivními formami dusíku (RNS) a chloru (RCS) tím, že zabraňují jejich tvorbě nebo podporují jejich rozklad. Antioxidant lze definovat jako: „jakoukoli látku, která, je-li přítomna v nízkých koncentracích ve srovnání s koncentracemi oxidovatelného substrátu, výrazně zpožďuje nebo inhibuje oxidaci tohoto substrátu.“ Výraz „oxidovatelný substrát“ zahrnuje téměř vše, co se nachází v potravinách a živých tkáních, včetně bílkovin, lipidů, sacharidů a DNA. K ochraně buněčných složek před poškozením indukovaným volnými radikály je zapotřebí široká škála antioxidační ochrany, endogenní i exogenní, protože radikály reagují neselektivním způsobem, což vede k poškození téměř jakékoli buněčné složky (Young & Woodside 2001).

Antioxidanty lze rozdělit několika způsoby. Jedním z nich je rozdělení antioxidantů do dvou tříd dle jejich působení na primární nebo řetězec štěpící antioxidanty a sekundární nebo preventivní antioxidanty (Apak et al. 2013). Primární antioxidanty (AH), jsou-li přítomny ve stopových množstvích, mohou buď zpozdít nebo inhibovat iniciační krok reakcí s lipidovým radikálem nebo inhibovat propagační krok prostřednictvím reakce s peroxylovými nebo alkoxylovými radikály. Sekundární nebo preventivní antioxidanty jsou sloučeniny, které zpomalují rychlost oxidace (Frankel & Meyer 2000).

Další způsob rozdělení antioxidantů, který je v této práci podrobněji popsán, je rozdělení dle funkce v organismu. Takto je lze rozdělit do tří hlavních skupin: antioxidační enzymy, antioxidanty štěpící řetězce a bílkoviny vázající přechodný kov (Young & Woodside 2001).

3.2.1 Rozdělení

3.2.1.1 Antioxidační enzymy

3.2.1.1.1 Kataláza

Kataláza byla první antioxidační enzym, který byl charakterizován, a katalyzuje dvoustupňovou přeměnu peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Sestává ze čtyř bílkovinných podjednotek, z nichž každá obsahuje porfyrinovou hemovou (železnatou) skupinu a molekulu NADPH (nikotinamidadeninukleotidfosfát) (Kirkman et al. 1987). Kataláza je z velké části lokalizována v buněčných organelách peroxisomech, které také obsahují většinu enzymů schopných generovat peroxid vodíku. Doposud není zcela jasné, jaké je množství katalázy v cytoplazmě a dalších subcelulárních kompartmentech, protože peroxisomy se snadno protrhnou během manipulace s buňkami (Young & Woodside 2001).

3.2.1.1.2 Glutathionperoxidáza a glutathion reduktáza

Všudypřítomný tripeptid glutathion (GSH), který je nejhojnějším thiolem s nízkou molekulovou hmotností téměř ve všech buňkách, se podílí na široké škále enzymatických reakcí. Hlavní funkcí GSH je sloužit jako redukční činidlo v oxidačně redukčních procesech, což vede k tvorbě glutathion disulfidu (GSSG). GSH chrání buňky před volnými radikály,

peroxydy a dalšími toxickými sloučeninami. Glutathion také hraje důležitou roli v ledvinách a podílí se na transportním systému zapojeném do reabsorpce aminokyselin (Young & Woodside 2001).

Glutathionperoxidáza je selenoenzym, jehož v játrech jsou dvě třetiny přítomny v cytosolu a jedna třetina v mitochondriích. Dále se vyskytuje v ledvinách, plicích, v žaludku a ve střevech (Howie et al. 1990). U glutathionperoxidázy rozlišujeme čtyři různé izoenzymy: buněčná glutathionperoxidáza, extracelulární glutathionperoxidáza, fosfolipid hydroperoxidová glutathionperoxidáza a gastrointestinální glutathionperoxidáza (Young & Woodside 2001). Glutathionperoxidázy katalyzují oxidaci glutathionu na úkor hydroperoxidu, kterým může být peroxid vodíku nebo například lipidový hydroperoxid (Takahashi & Cohen 1986).

3.2.1.1.3 Superoxiddismutáza

Superoxiddismutázy katalyzují přeměnu superoxidu na peroxid vodíku. Peroxid vodíku musí být poté odstraněn katalázou nebo glutathionperoxidázou. V savčích tkáních jsou tři formy superoxiddismutázy, každá se specifickým subcelulárním umístěním a různou distribucí v tkáních (Young & Woodside 2001).

- I. Superoxiddismutáza mědi a zinku (CuZnSOD) se nachází v cytoplasmě a organelách prakticky všech savčích buněk. Má molekulovou hmotnost přibližně 32 000 kDa a má dvě bílkovinné podjednotky, z nichž každá obsahuje katalyticky aktivní měď a atom zinku (Liou et al. 1993; Young & Woodside 2001).
- II. Mangan superoxiddismutáza (MnSOD) se nachází v mitochondriích téměř všech buněk a má molekulovou hmotnost 40 000 kDa. Skládá se ze čtyř bílkovinných podjednotek, z nichž každá pravděpodobně obsahuje jeden atom manganu. Aminokyselinová sekvence MnSOD je zcela nepodobná sekvenci CuZnSOD a není inhibována kyanidem, což umožňuje odlišit aktivitu MnSOD od aktivity CuZnSOD ve směsích těchto dvou enzymů (Weisiger & Fridovich 1973; Young & Woodside 2001).
- III. Extracelulární superoxiddismutáza (EC-SOD) je měď a zinek obsahující SOD odlišná od výše popsané CuZnSOD. EC-SOD je syntetizována pouze několika typy buněk, včetně fibroblastů a endoteliálních buněk, a je exprimována na buněčném povrchu, kde je vázána na heparansulfáty. EC-SOD je hlavní superoxiddismutázou detekovanou v extracelulárních tekutinách a je uvolňována do oběhu z povrchu cévního endotelu po injekci heparinu (Karlsson et al. 1993).

3.2.1.2 Antioxidanty inhibující řetězovou reakci volných radikálů

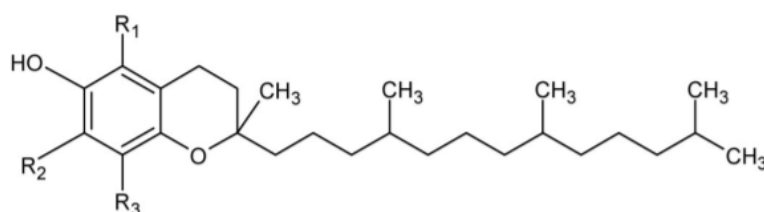
Kdykoli volný radikál interaguje s jinou molekulou, mohou být generovány sekundární radikály, které pak mohou reagovat s jinými molekulami za vzniku ještě radikálnějších forem. Klasickým příkladem takové řetězové reakce je peroxidace lipidů a reakce se bude dále šířit, dokud se dva radikály nezkombinují za vzniku stabilního produktu nebo dokud nebudou radikály neutralizovány antioxidantem štěpícím řetězec (De Zwart et al. 1999). Antioxidanty štěpící řetězec jsou malé molekuly, které mohou přijímat elektron z radikálu nebo darovat elektron radikálu s tvorbou stabilních vedlejších produktů (Halliwell 1995). Obecně se náboj

spojený s přítomností nespárovaného elektronu disociuje na vychytávači a výsledný produkt nebude snadno přijímat ani darovat elektron na jinou molekulu, což brání dalšímu šíření řetězové reakce. Takové antioxidanty lze vhodně rozdělit dle rozpustnosti na hydrofilní a lipofilní antioxidanty (Young & Woodside 2001).

3.2.1.2.1 Lipofilní antioxidanty

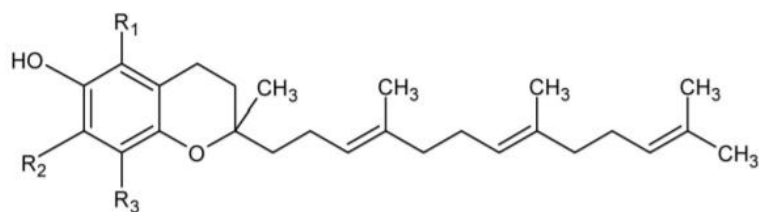
Tyto antioxidanty zachycují radikály v membránách a lipoproteinových částicích a jsou zásadní při prevenci peroxidace lipidů. Nejdůležitějším lipofilním antioxidantem je pravděpodobně vitamin E (Esterbauer et al. 1991). Vitamin E se vyskytuje v přírodě v osmi různých formách, které se velmi liší mírou jejich biologické aktivity. Tokoferoly (α , β , γ a δ ; Obrázek 1) mají chromanový kruh a fytylový zbytek a liší se počtem a polohou methylových skupin na chromanovém kruhu. Tokotrienoly (α , β , γ a δ ; Obrázek 2) jsou strukturálně podobné, ale obsahují nenasycené vazby. Obě třídy sloučenin jsou rozpustné v tucích a mají výrazné antioxidační vlastnosti (Horwitt 1991). Reagují rychleji než polyenové mastné kyseliny s peroxylovými radikály, a proto narušují řetězovou reakci peroxidace lipidů. Kromě své antioxidační úlohy se může vitamin E také podílet na stabilizaci membrán (Uranoso et al. 1992). V buněčných membránách a lipoproteinech je základní antioxidační funkcí vitaminu E zachycení peroxylových radikálů a přerušení řetězové reakce peroxidace lipidů (Burton & Ingold 1986). Deficience vitaminu E u lidí je vzácná, ačkoli může způsobit hemolýzu (Swann & Kendra 1998).

Vitamin E nezabrání počáteční tvorbě alkylových radikálů v lipofilním prostředí, ale minimalizuje tvorbu sekundárních radikálů. α -Tokoferol je nejúčinnějším lipofilním antioxidantem *in vivo* a je také nejhojnějším v lidském organismu. Rychle reaguje s peroxylovým radikálem za vzniku relativně stabilního tokoferoxylového radikálu, přičemž přebytek náboje spojený s dalším elektronem je rozptýlen v chromanovém kruhu. Tento stabilizovaný radikál by mohl následně reagovat několika způsoby. α -Tokoferol by mohl být regenerován reakcí na vodné rozhraní s askorbovou kyselinou nebo jiným hydrofilním antioxidantem, jako je redukovaný glutathion nebo urát (Kagan & Tyurina 1998). Alternativně by se dva α -tokoferoxylové radikály mohly spojit za vzniku stabilního dimeru, nebo by mohl být radikál úplně oxidován za vzniku tokoferol chinonu (Young & Woodside 2001).



R ₁	R ₂	R ₃	Název
H	H	H	tokol
CH ₃	CH ₃	CH ₃	α -tokoferol
CH ₃	H	CH ₃	β -tokoferol
H	CH ₃	CH ₃	γ -tokoferol
H	H	CH ₃	δ -tokoferol

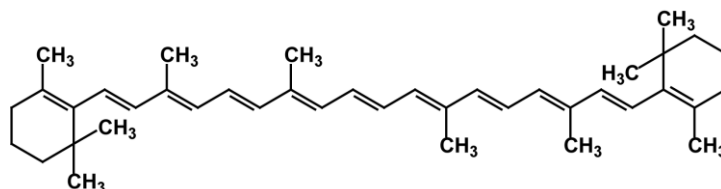
Obrázek 1 Struktura tokoferolu (Tomšej 2017)



R ₁	R ₂	R ₃	Název
H	H	H	tokotrienol
CH ₃	CH ₃	CH ₃	α-tokotrienol
CH ₃	H	CH ₃	β-tokotrienol
H	CH ₃	CH ₃	γ-tokotrienol
H	H	CH ₃	δ-tokotrienol

Obrázek 2 Struktura tokotrienolu (Tomšej 2017)

Karotenoidy jsou skupinou antioxidantů rozpustných v tucích, z nichž je nejdůležitější β-karoten (Obrázek 3), i když nejméně 20 dalších karotenoidů můžeme nalézt v membránách a lipoproteinech. Jsou to zvláště účinné vychtávače singletového kyslíku, ale mohou také zachycovat peroxylové radikály při nízkém tlaku kyslíku s účinností podobnou účinnosti α-tokoferolu (Fukuzawa et al. 1998). Protože tyto podmínky převládají v mnoha biologických tkáních, mohly by karotenoidy hrát roli při prevenci peroxidace lipidů *in vivo* (Chaudière & Ferrari-Iliou 1999). Některé karotenoidy sehrávají důležitou roli jako prekurzory vitamínu A (retinol). Vitamin A vykazuje antioxidační vlastnosti ve tkáních a lipozomech (Keys & William 1999).



Obrázek 3 Struktura β-karotenu (Polimerek 2006)

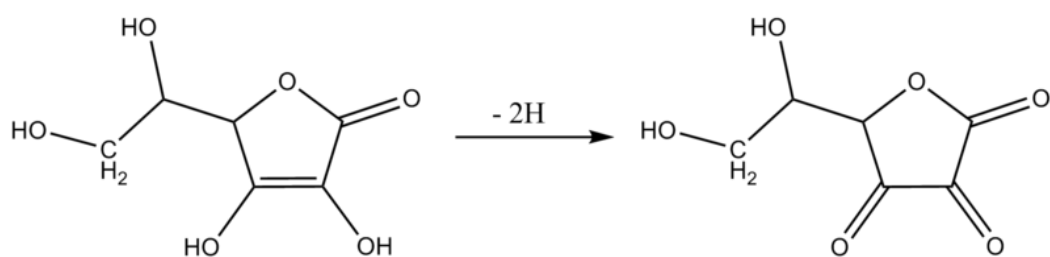
Flavonoidy jsou velkou skupinou polyfenolických antioxidantů vyskytujících se v mnoha druzích ovoce, zeleniny a nápojů, jako je čaj a víno. Bylo identifikováno více než 4 000 flavonoidů a jsou rozděleny do několika skupin podle své chemické struktury, včetně flavonolů (kvercetin a kemferol), katechinů (flavan-3-oly), flavonů (apigenin) a isoflavonů (genistein). Kromě flavonoidů mohou mít k celkové antioxidační aktivitě malý příspěvek jiné fenolické sloučeniny přijímané v potravě, například taniny, lignany a fenolické kyseliny (Hertog et al. 1993; Young & Woodside 2001).

Ubiquinol-10, redukovaná forma koenzymu Q10, je také antioxidantem rozpustným v tucích. Ačkoli je přítomen v nižších koncentracích než α-tokoferol, může zachycovat lipidové peroxylové radikály s vyšší účinností než α-tokoferol nebo karotenoidy, a může také regenerovat membránově vázaný α-tokoferol z tokoferylového radikálu. Ve skutečnosti, kdykoli je plazma nebo izolovaný lipoprotein s nízkou hustotou (LDL) vystaven radikálům generovaným v lipidové fázi, ubiquinol-10 je první antioxidant, který se spotřebuje, což

naznačuje, že by mohl mít zvláštní význam při prevenci peroxidace lipidů. Avšak práce na dalším objasnění jeho úlohy byla omezena snadností, s jakou se ubiquinol-10 oxiduje během manipulace se vzorkem nebo při analýze (Thomas et al. 1996).

3.2.1.2.2 Hydrofilní antioxidanty

Tyto antioxidanty přímo zachycují radikály přítomné ve vodné fázi. Kvalitativně nejdůležitějším antioxidantem tohoto typu je vitamin C (askorbová kyselina) (Levine et al. 1999). U lidí působí askorbová kyselina jako nezbytný kofaktor pro několik enzymů katalyzujících hydroxylační reakce. Ve většině případů poskytuje elektrony pro enzymy, které vyžadují protetické kovové ionty v redukované formě k dosažení plné enzymatické aktivity. Nejznámější role askorbové kyseliny spočívá v tom, že je kofaktorem pro prolyl a lysyl oxidázy při syntéze kolagenu. Kromě těchto dobře definovaných účinků však závisí na přítomnosti askorbové kyseliny několik dalších biochemických drah (Levine 1994). Kromě role enzymatického kofaktoru je její další hlavní funkce antioxidační. Ukázalo se, že vychytává superoxid, peroxid vodíku, hydroxylový radikál, kyselinu chlornanovou, vodné peroxidové radikály a singletový kyslík. Během svého antioxidačního působení podléhá redukci dvou elektronů, zpočátku na semidehydroaskorbylový radikál a následně na dehydroaskorbát (Obrázek 4). Semidehydroaskorbylový radikál je relativně stabilní v důsledku rozptylu náboje spojeného s přítomností jediného elektronu na tři atomy kyslíku. Lze jej snadno detekovat pomocí elektronové spinové rezonance v tělních tekutinách v přítomnosti zvýšené produkce volných radikálů. Dehydroaskorbát je relativně nestabilní a snadno hydrolyzuje na kyselinu diketogulonovou, která se následně štěpí na kyselinu šťavelovou. Byly popsány dva mechanismy, kterými lze dehydroaskorbát redukovat zpět na askorbát; jeden je zprostředkovan selenoenzymem thioredoxin reduktázou a druhý je enzymaticky zprostředkovaná reakce, která používá redukovaný glutathion (May et al. 1998a). Dehydroaskorbát v plazmě je pravděpodobně rychle zachycen červenými krvinkami před rozložením, takže je přítomno jen velmi malé množství, pokud vůbec nějaké, dehydroaskorbátu v plazmě (Koshiishi et al. 1998).



Obrázek 4 Oxidace askorbové kyseliny na dehydroaskorbát (Vejražka 2009)

Kromě askorbové kyseliny jsou v plazmě přítomny i další antioxidanty ve vysokých koncentracích. Kyselina močová účinně vychytává radikály a přeměňuje se na alantoin (Grootveld & Halliwell 1987). Urát může být zvláště důležitý při zajišťování ochrany proti určitým oxidačním činidlům, jako je ozon (Cross et al. 1992). Předpokládá se, že prodloužení délky života, ke kterému došlo během evoluce člověka, lze částečně vysvětlit ochranným působením kyseliny močové v lidské plazmě (Ames et al. 1981). Část antioxidačního účinku

urátu může být způsobena tvorbou stabilních nereaktivních komplexů se železem, ale je to také přímý vychytávač volných radikálů (Young & Woodside 2001).

Dalšími hydrofilními antioxidanty štěpícími řetězce v plazmě jsou thiolové skupiny vázané na bílkoviny. Sulfhydrylové skupiny přítomné v plazmatických bílkovinách mohou fungovat jako antioxidanty štěpící řetězec tím, že darují elektron k neutralizaci volných radikálů, což má za následek tvorbu sirtých (thiyl) radikálů bílkoviny. Albumin je převládající plazmatická bílkovina a významně přispívá k plazmatickým sulfhydrylovým skupinám, ačkoli má také několik dalších antioxidačních vlastností. Albumin obsahuje 17 disulfidických můstků a má jediný zbytek cysteinu, a právě tento zbytek je zodpovědný za schopnost albuminu stabilizovat peroxylové radikály. Tato vlastnost je důležitá s ohledem na roli, kterou hraje albumin při transportu volných mastných kyselin v krvi. Kromě toho má albumin schopnost vázat ionty mědi, a tak inhibovat peroxidaci lipidů a tvorbu hydroxylových radikálů. Je to také silný vychytávač fagocytujícího produktu kyseliny chlorné a poskytuje hlavní obranu plazmy proti tomuto oxidantu. Protože samotný albumin je poškozen, když působí jako antioxidant, byl považován za „obětní molekulu,“ která zabraňuje poškození způsobenému životně důležitějším formám antioxidantů. Vysoká plazmatická koncentrace albuminu a relativně krátký poločas života znamenají, že jakékoli poškození nebude pravděpodobně mít biologický význam. Práce *in vitro* však ukázaly, že bílkovinné sirté radikály mohou samy o sobě působit jako potenciální zdroj reaktivních oxidantů. Sirtý radikál může odtrhnout elektron z polyenové mastné kyseliny a zahájit proces peroxidace lipidů, což je reakce, kterou lze inhibovat askorbovou kyselinou a retinolem (Riedl et al. 1996). Bylo prokázáno, že antioxidační účinky albuminu a dalších bílkovin se při vysokých koncentracích snižují, a uvažuje se, že je to proto, že sirté radikály mohou oxidativně poškodit jiné molekuly. Význam těchto zjištění pro antioxidační roli albuminu *in vivo* zůstává nejasný (Young & Woodside 2001).

3.2.1.3 Bílkoviny vázající kovy

Bílkoviny vázající se na přechodný kov (feritin, transferin, laktoferin a ceruloplasmin) působí jako klíčová složka antioxidačního obranného systému tím, že brání interakci přechodných kovů, jako je železo a měď, s peroxidem vodíku a superoxidem. Volné železo je schopné stimulovat produkci volných radikálů, které způsobují oxidační poškození, např. v důsledku peroxidace lipidů (Atanasiu et al. 1998).

Feritin je jednou z hlavních bílkovin metabolismu železa. Nachází se ve všech buňkách těla a ve zvláště vysokých koncentracích v játrech, slezině a v kostní dřeni. Jedná se o komplex tvořený apoferitinem a trojmocným železem Fe^{3+} (Worwood 1979).

Transferin je plazmatický glykoprotein vázající železo, který je přijímán buňkami přes specifické receptory. Uvolňování železa je závislé na pH a bílkovina neobsahující železo je recyklována z buňky a uvolněna do oběhu za účelem opětovného použití (Crichton & Charlotteaux-Wauters 1987). Pokud není vázán na železo, je transferin znám jako apotransferin. Hlavním místem syntézy jsou játra, ale může být produkován i v jiných tkáních a orgánech, například v mozku (Moos et al. 2007).

Laktoferin je železo vázající glykoprotein ze skupiny transferinů, který je exprimován a vylučován žláзовými epiteliálními buňkami. Nejvíce se vyskytuje v savčím mléce a mlezivu. Původně byl považován za bílkovinu vázající železo v mléce s bakteriostatickými vlastnostmi,

ale je stále více zřejmé, že laktoferin je multifunkční bílkovina, které bylo přiřazeno několik fyziologických rolí. Patří mezi ně regulace homeostázy železa, obrana hostitele před širokou škálou mikrobiálních infekcí, protizánětlivá aktivita, regulace buněčného růstu a diferenciaci a ochrana před vývojem a metastázováním nádorů. Zatímco vazba železa je pravděpodobně ústřední pro některé z biologických rolí laktoferinu, další aktivity, včetně specifických interakcí se savčími receptory a mikrobiálními složkami, také přispívají k pleiotropické funkční povaze této bílkoviny (Ward et al. 2005).

Ceruloplasmin je sérová ferroxidáza, která obsahuje více než 95 % mědi nacházející se v plazmě. Navzdory potřebě mědi pro funkci ceruloplasminu, tato bílkovina nehraje zásadní roli v jejím transportu nebo metabolismu, ale může fungovat jako antioxidační enzym, který může katalyzovat oxidaci dvojmocného železa. Některé studie však naznačují, že ceruloplasmin může také vykazovat silnou prooxidační aktivitu a způsobit oxidaci LDL (Ehrenwald et al. 1994; Fox et al. 1995). Pacienti se sníženou koncentrací této bílkoviny trpí Wilsonovou chorobou, která se vyznačuje abnormálním hromaděním mědi v játrech, což způsobuje poškození jaterních buněk, poruchy funkce centrálního nervového systému a hemolytickou anémii (Hellman & Gitlin 2002).

3.2.2 Interakce mezi antioxidanty

Přestože byly účinky antioxidantů štěpících řetězec zvažovány v textu výše samostatně, je důležité si uvědomit, že *in vivo* bude mezi jednotlivými antioxidanty pravděpodobně docházet ke komplexním interakcím. Příkladem může být schopnost askorbové kyseliny recyklovat tokoferolový radikál na rozhraní voda-tuk, takže je schopna regenerovat tokoferol (May et al. 1998b). To by mohlo být rozhodující pro zajištění toho, aby byly koncentrace tokoferolu udržovány v lipoproteinech a membránách. Podobným způsobem může glutathion regenerovat askorbovou kyselinu z dehydroaskorbové. Mezi antioxidanty proto pravděpodobně bude existovat složitá souhra, což ztěžuje předpovědět, jak budou antioxidanty fungovat *in vivo*. Nelze proto říct, který antioxidant je nejdůležitější, jelikož to bude záviset na okolnostech existujících v určitém mikroprostředí, v určitém čase a na povaze oxidačního poškození, ke kterému dochází (Young & Woodside 2001).

3.2.3 Prooxidační působení antioxidantů

Druhou důležitou vlastností antioxidantů štěpících řetězec je jejich schopnost působit jako prooxidyanty. Za určitých okolností může přítomnost antioxidantu paradoxně vést ke zvýšenému oxidačnímu poškození. Například se uvádí, že podávání askorbové kyseliny může někdy vést ke zvýšení oxidačního poškození, zejména pokud se podává také železo. Podobně bylo jasně prokázáno *in vitro*, že tokoferol by mohl podporovat oxidaci LDL v nepřítomnosti hydrofilního antioxidantu, jako je askorbová kyselina. Zda jsou tyto reakce důležité *in vivo*, není dosud jasné. Při navrhování a interpretaci výsledků klinických hodnocení suplementace antioxidantů však musí být zvažována možnost, že antioxidanty mohou mít prooxidační účinky *in vivo* (Neužil et al. 1997; Young & Woodside 2001).

3.3 Antioxidanty v potravinách

Oxidace patří mezi chemické reakce, které mohou ovlivnit kvalitu potravy, zejména její výživovou hodnotu, senzorycké vlastnosti jako jsou barva, chuť či struktura a také bezpečnost potravin (Antolovich et al. 2002). Kromě autooxidace může dojít ke zhoršení kvality lipidů v potravinách působením světla, zvýšenou aktivitou lipoxygenázy nebo oxidace za vysokých teplot, například při smažení potravin. Mnohé produkty vytvořené v důsledku oxidačních reakcí v potravinách jsou si svým charakterem podobné. Všechny oxidační procesy by tedy měly být kontrolovány, aby byly potravinářské lipidy chráněny před nežádoucími změnami (Kelley et al. 1999; Shahidi 2000).

Výrobci potravin používají potravinářské antioxidanty, aby zabránili zhoršování kvality produktů a udržovali jejich výživovou hodnotu. Antioxidanty mohou být v potravinách přítomny jako přirozeně se vyskytující složky potravin nebo mohou být do potravin přidávány přírodní nebo syntetické antioxidanty za účelem ochrany jejich lipidových složek před oxidací, a tím zhoršením kvality potravin (Shahidi 2000).

Mezi nejčastěji používané syntetické antioxidanty patří butylhydroxyanisol (BHA), butylhydroxytoluen (BHT), propylgalát (PG) a *terc*-butylhydrochinon (TBHQ), které se běžně používají v potravinářství. Použití syntetických antioxidantů v potravinách sahá až do 40. let 20. století, kdy bylo zjištěno, že BHA zpomaluje oxidaci. Bylo také zřejmé, že je třeba potlačit škodlivé účinky přechodných kovů, jako je železo a měď. Následně bylo zjištěno, že určité kyseliny, jako je kyselina citronová, kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) nebo jejich deriváty, působí v kombinaci s fenolickými antioxidanty jako deaktivátory kovů nebo chelatační činidla (Ito et al. 1986; Shahidi 2000).

3.3.1 Přírodní antioxidanty v potravinách

Přirozeně se vyskytující inhibitory oxidace v potravinách obvykle pocházejí z rostlinných složek. Mohou být také produkovány v důsledku chemických změn probíhajících v potravinách v průběhu jejich zpracování (např. Maillardovy reakční produkty) nebo mohou být extrahovány z nepotravinových složek (např. z nepotravinářských rostlin). Nelze však ignorovat přítomnost přírodních antioxidantů, jako je karnosin (dipeptid s chelatačními vlastnostmi) ve svalových tkáních zvířat, jako je drůbež. Kromě toho je potřeba brát v úvahu také úlohu antioxidantních vitaminů, minerálních látek a enzymů. Neaktivnější antioxidanty přijímané potravou patří do rodiny fenolických a polyfenolických sloučenin. Fenolické sloučeniny vyskytující se v potravinách patří do skupiny fenylypropanoidů (C6-C3) a jsou deriváty kyseliny skořicové. Tyto sloučeniny jsou tvořeny z fenylyalaninu a v menší míře u některých rostlin z tyrosinu. Fenolové kyseliny, fenylypropanoidy a flavonoidy v potravinách se mohou vyskytovat ve volné formě, ale často jsou glykosylovány s různými cukry, zejména glukózou. Fenolové kyseliny mohou být také přítomny v esterifikovaných i jinak vázaných formách. Tokoferoly, karotenoidy a vitamin C jsou další skupiny sloučenin, které se také široce vyskytují v rostlinných materiálech i ve zvířecích tkáních. (Shahidi 2000).

Epidemiologické a klinické studie prokázaly, že fenolické antioxidanty vyskytující se v obilovinách, ovoci a zelenině jsou hlavními faktory přispívajícími ke snížení výskytu chronických a degenerativních chorob (Shahidi 2000).

Přírodní antioxidanty vyskytující se v potravinách mohou být použity jako složka vícesložkových potravin za účelem jejich stabilizace nebo mohou být extrahovány a přidávány do potravin. Například ovesný a amarantový olej obsahující vysoké množství antioxidantů, jako jsou tokoferoly a skvalen, mohou být přidány do některých dalších olejů, aby je stabilizovaly. Kromě toho mohou být extrakty zeleného čaje, rozmarýnu a šalvěže použity v různých potravinách za účelem potlačení oxidace. Také mohou být pro zpomalení oxidace volně ložených olejů, emulzí a dalších produktů použity směsi tokoferolů, jakož i kombinace tokoferolů s lecitinem a askorbovou kyselinou (Shahidi 2000).

Antioxidační aktivita konkrétní sloučeniny, směsi sloučenin nebo přírodního zdroje obsahujícího tyto sloučeniny obecně souvisí s jejich schopností zachytit volné radikály, rozložit je nebo potlačit singletový kyslík nebo případně působit jako chelátory kovů nebo synergisty s dalšími přítomnými složkami. Antioxidanty z přírodních zdrojů jsou často přítomny v kombinacích zahrnujících mnoho různých sloučenin. Každá sloučenina může být přítomna společně s jejím prekurzorem (prekurzory) a reakčním produktem (produkty). Způsob působení přírodních zdrojů antioxidantů se tedy může lišit a může zahrnovat různé mechanismy působení v závislosti na typu a zdroji použitého materiálu (Shahidi 2000).

Rostlinné materiály obsahují mnoho typů antioxidantů s různou antioxidační aktivitou. V posledních letech bylo studováno mnoho zdrojů antioxidantů rostlinného původu. Mezi nimi byly rozsáhle studovány zejména oleje a olejnatá semena, koření a bylinky, cereálie, zrna a také bílkovinné hydrolyzáty a čaje (Shahidi 2000).

3.3.2 Tokoly jako vedlejší složky olejnatých semen a jedlých olejů

Jedlé oleje a olejnatá semena poskytují bohatý zdroj nezmýdelnitelných složek, které obsahují různé účinné látky, které mohou být použity k zabránění nebo zpomalení oxidace. K doprovodným složkám lipidů v olejích a olejnatých semenech patří především tokoferoly a tokotrienoly (souhrnně známé jako tokoly), dále fenolické látky a flavonoidy, steroly, fosfolipidy, karotenoidy a triterpenylalkoholy a také sloučeniny kyseliny fytové. Každý olej může obsahovat několik tříd těchto sloučenin. Doprovodné látky lipidů mohou být během procesu výroby jedlých tuků a olejů separovány a použity pro potravinářské a nutriční aplikace (Shahidi 2000).

Tokoly se široce vyskytují v rostlinných tkáních a jsou to monofenolické a lipofilní sloučeniny. Jak již bylo zmíněno výše, existuje osm různých tokolů, které mají aktivitu vitamínu E a všechny nebo některé z nich jsou přítomny v různých jedlých olejích. Pokud jde o aktivitu vitamínu E, je α -tokoferol nejúčinnější přítomnou sloučeninou, zatímco aktivita ostatních tokolů je ve srovnání s α -tokoferolem nižší. β -Tokoferol dosahuje 15–40 % aktivity α -tokoferolu, γ -tokoferol 1–20 %, δ -tokoferol 15–30 %, α -tokotrienol 1 %, β -tokotrienol 15–30 %, γ -tokotrienol 1–5 % a δ -tokotrienol 1%. Aktivita přirozeně se vyskytujícího α -tokoferolu je asi o 30 % vyšší než syntetického α -tokoferolu. Aktivita tokolů jako antioxidantů závisí na jejich chemické povaze a koncentraci. Podrobné zkoumání výsledků literatury však ukazuje, že tokoferoly mohou při vysokých koncentracích vykazovat prooxidační aktivitu a že jejich aktivita je závislá na teplotě (Jung & Min 1990). Antioxidační aktivita tokoferolů obecně převyšuje aktivitu tokotrienolů.

Výskyt tokolů v rostlinných olejích je rozmanitý, ale živočišné tuky obecně obsahují pouze α -tokoferol, ačkoli chované ryby mohou absorbovat a zadržovat jiné tokoferoly ve svém těle, převážně γ -tokoferol. V rostlinných olejích jsou obvykle hojně zastoupeny α -, γ - a δ -tokoferoly, zatímco β -tokoferol je zastoupen méně, s výjimkou oleje z pšeničných klíčků. Obecně je v olejích mnohem méně tokotrienolů než tokoferolů, s výjimkou palmového oleje a oleje z pšeničných klíčků. Je třeba také poznamenat, že celkový obsah tokolů v rostlinných olejích se zvyšujícím se jódovým číslem nebo stupněm nenasycení. Tokoly v rostlinných olejích jsou obecně izolovány během jejich zpracování. Většina dostupných směsných tokoferolů na trhu se získává jako vedlejší produkt při zpracování sójového oleje. Použití tokoferolů ze sójového oleje pro stabilizaci jiných jedlých olejů je běžně používaným postupem. Směs tokoferolů však lze také získat i z jiných olejů (Shahidi 2000).

Zatímco tokoly působí jako primární antioxidanty, kyselina askorbová může redukčně regenerovat oxidované tokoly. V literatuře byla také popsána synergie mezi tokoferoly a fosfolipidy (Hudson & Mahgoub 1981; Hildebrand et al. 1984). Fosfolipidy brání degradaci tokoferolů, a tím prodlužují trvanlivost jedlých olejů a produktů na bázi lipidů (Shahidi 2000).

Značnou část doprovodných látek lipidů tvoří kromě tokoferolů také steroly (v živočišném tuku cholesterol, v rostlinných tucích fytosteroly). V poslední době vzrostl zájem o fytosteroly, vzhledem k jejich pozitivnímu vlivu na zdraví člověka (snižování hladiny cholesterolu v krvi) a na trh byly uvedeny výrobky, jako je margarín obohacený fytosteroly (Shahidi 2000). Fytosteroly zahrnují více než 250 různých sterolů, z toho nejvíce se vyskytujícími zástupci jsou β -sitosterol, stigmasterol a kampesterol. Dle výzkumu Yoshida & Niki (2003) bylo zjištěno, že tyto sloučeniny vykazují antioxidační účinky při oxidaci methyl-linoleátu v roztoku. Jejich aktivita byla porovnána s 2,2,5,7,8-pentamethyl-chromanolem (PMC). Z naměřených hodnot byla vypočtena hodnota účinku a ta se snižuje v pořadí PMC > fytosterol ~ kampesterol ~ β -sitosterol > stigmasterol. Fytosteroly také při smažení zpomalují oxidaci olejů, což bylo testováno s použitím sójového oleje, který je kvůli vysokému obsahu nenasycených mastných kyselin velmi nestabilní (White & Artrong 1986). Také avenasterol obsažený v rýžovém oleji působí jako antioxidant při vyšších teplotách nebo při smažení (Gordon & Magos 1983).

3.3.3 Koření a bylinky

Ačkoli koření a bylinky byly přidávány do potravin od starověku, aby se zlepšila nebo upravila jejich chuť, jejich antioxidační aktivita byla poprvé popsána až v roce 1943. Mezi bylinkami a kořením, které našly své uplatnění jako složka zlepšující oxidační stabilitu potravin, jsou nejdůležitější extrakty rozmarýnu a šalvěže. Zdá se, že antioxidační aktivita šalvěžových extraktů je způsobena stejnými sloučeninami, které jsou přítomny v rozmarýnu. Je známo, že některé z účinných látek přítomných v těchto bylinkách, jako je karnosol a karnosová kyselina, jsou dobrými vychytávací peroxylových radikálů. Také oregano má silnou antioxidační aktivitu, lepší než BHA. Sloučeniny odpovědné za antioxidační aktivitu oregana jsou zejména polyhydroxybenzoová a skořicová kyselina. Kromě toho bylo zjištěno, že rosmarinová kyselina a její deriváty jsou přítomny společně s protokatechovou a kávovou kyselinou; byl také identifikován glukosid protokatechové kyseliny (Hildebrand et al. 1984).

3.3.4 Čaje a čajové extrakty

Čaje v různých formách, nefermentovaný (zelený), polofermentovaný (oolong) a fermentovaný (černý), jsou široce konzumovány po celém světě v podobě nápoje. Kromě toho se v posledních letech komerčně dodávají i extrakty z listu čajovníku (*Camellia sinensis* L.) jako zdroj antioxidantů, které potlačují oxidaci tuků. Čaj je jedním z rostlinných materiálů, který obsahuje velmi vysoké množství polyfenolů. Listy čerstvého zeleného čaje obecně obsahují přibližně 36 % polyfenolů v sušině (He & Shahidi 1997). Nejvíce zastoupenými polyfenoly v zeleném čaji jsou katechiny, z nichž dominuje epigalokatechin galát (EGCG; 48–55 %), následovaný epigalokatechinem (EGC; 9–12 %), epikatechin galátem (ECG; 9–12 %), epikatechinem (EC; 5–7 %) a také malým množstvím katechinu (0,3–0,6 %) a gallové kyseliny (0,3–0,5 %). V listech zeleného čaje se nachází i značné množství kofeinu (7–9 %). Během výroby čaje oolong nebo černého čaje se část katechinů v čajových listech kondenzuje za vzniku theaflavinů a thearubiginů. Obsah theaflavinů v oolongu a černém čaji je 0,84 a 1,64 %, zatímco obsah thearubiginů je 17,5 a 27,8 % (Shahidi 2000). Antioxidační aktivita zeleného čaje často převyšuje aktivitu černého čaje a jeho extraktů (Wanasundara & Shahidi 1998).

Extrakty zeleného čaje mohou za přítomnosti světla vykazovat i prooxidační aktivitu. Důvodem prooxidační aktivity zeleného čaje je přítomnost chlorofylů, které působí jako fotosenzibilizátory (Wanasundara & Shahidi 1998). Studie na zvířecích modelech ukázaly, že zelený čaj a EGCG mohou inhibovat vznik tumoru během stadia iniciace, propagace a progresu. Ačkoli jsou katechiny antioxidanty, které mohou zhaset některé druhy volných radikálů a chelátovat přechodné kovy, existují důkazy, že některé z účinků těchto sloučenin mohou souviset s vyvoláním oxidačního stresu. Zdá se, že takové prooxidační účinky jsou odpovědné za vyvolání apoptózy (buněčné smrti) nádorových buněk. Tyto prooxidační účinky mohou také indukovat endogenní antioxidační systémy, které poskytují ochranu před karcinogenezí (Lambert & Elias 2011). Jak již bylo uvedeno výše, přírodní antioxidanty se skládají ze směsi různých fenolických látek a jim příbuzných sloučenin, které mohou působit synergicky a vzájemně se doplňovat. Tyto fenolické sloučeniny mohou být složeny z různých látek s různou hydrofilně-lipofilní rovnováhou (vzájemným poměrem hydrofilních a lipofilních složek, pomocí něhož lze vysvětlit chování tenzidu na rozhraní fází). Účinnost antioxidačních systémů v samotném oleji versus v emulzi olej ve vodě by tedy také závisela na jejich průměrné hodnotě hydrofilně-lipofilní rovnováhy (Shahidi 2000).

3.3.5 Kakao

Kakao se získává ze sušených, částečně fermentovaných semen kakaovníku (*Theobroma cacao*) a vyrábí se z něho čokoláda. Spotřeba kakaových výrobků a čokolády přispívá k výživě člověka poskytováním lipidů, cukrů, minerálních látek (draslík, hořčík, měď a železo) a antioxidantů, zejména polyfenolů (epikatechin, katechin a kvercetin), které mohou vykazovat stejnou nebo dokonce vyšší antioxidační kapacitu než některé druhy ovoce nebo zeleniny. Také bylo zjištěno, že antioxidační aktivita kakaa může být 4-5krát vyšší než antioxidační aktivita černého čaje, 2-3krát vyšší než antioxidační aktivita zeleného čaje a téměř dvakrát vyšší než antioxidační aktivita červeného vína (Lee et al. 2003). Obsah polyfenolů v surových kakaových bobech se podstatně liší od obsahu v kakaovém prášku nebo čokoládě, které se vyrábějí fermentací, sušením a pražením (Subhashini et al. 2010). Těmito úpravami se obsah polyfenolů

snižuje (Żyżelewicz et al. 2016). Ačkoli většina studií naznačuje, že zdraví prospěšné účinky kakaa nebo výrobků z něj lze přičíst polyfenolům, je třeba poznamenat, že kakao a výrobky z kakaa jsou nejen bohaté na polyfenoly, ale jsou také bohaté na methylxanthiny (theobromin a kofein), které mají fyziologické účinky na různé tělesné systémy, včetně centrálního nervového, kardiovaskulárního, gastrointestinálního, respiračního a renálního systému (Belščak et al. 2009).

3.4 Měření antioxidační aktivity

Aktivita různých typů antioxidantů se může významně lišit v závislosti na tom, na co působí, zda se jedná o triacylglyceroly, methylestery, volné mastné kyseliny nebo lipidy začleněné do různých biologických částic, jako jsou lipoproteiny nebo jaterní mikrozomy. Antioxidační aktivita je tedy silně ovlivněna složením testovacího systému a relativní aktivita antioxidantů s různou polaritou se v různých vícefázových systémech výrazně liší. Platné vyhodnocení antioxidační aktivity proto vyžaduje použití několika různých testovacích metod, které zahrnují různé mechanismy inhibice oxidace lipidů (Frankel & Meyer 2000).

Antioxidační aktivitu nelze měřit přímo, ale spíše pomocí účinků antioxidantu při kontrole rozsahu oxidace. Metody pro stanovení antioxidační aktivity jsou extrémně rozmanité. Některé metody zahrnují zřetelný oxidační krok, po kterém následuje měření výsledku, například oxidace kyseliny linolové a následné stanovení konjugovaných dienu. V jiných případech neexistuje jasné rozlišení mezi jednotlivými kroky postupu. Pro hodnocení antioxidační aktivity může být využito měření substrátu, oxidačního činidla a iniciátoru, meziproductů či finálních productů oxidační reakce (Clarkson 1995). Například při monitorování antioxidační aktivity v potravinách je možné použít měření peroxidového čísla, thiobarbiturového čísla, jodového čísla, obsahu volných mastných kyselin (číslo kyselosti), obsahu polymeru, viskozity, absorpce při 232 a 268 nm, barvy, složení mastných kyselin a poměru nenasycených na nasycených mastných kyselin (např. C18:2/C16:0) (Che Man & Tan 1999).

Většina testů používá zrychlenou oxidaci zahrnující iniciátor, který je ovlivněn zvýšenou teplotou a parciálním tlakem kyslíku, přidáním katalyzátorů na bázi přechodných kovů (Bowry & Stocker 1993), vystavením světlu pro podporu fotooxidace (Chacón et al. 2000) a variabilním třepáním pro zlepšení kontaktu reaktantu s volnými radikály (McDonald et al. 2001). Oxidační mechanismy se však mohou měnit se zvyšováním teplot (Dziedzic & Hudson 1984) a tím ovlivnit výsledky, které mohou být ovlivněny také účinky substrátu (Marinova & Yanishlieva 1996) a analytickou technikou (Schwarz et al. 2001). Kovové ionty, jako je měď a železo, jsou jedny z nejčastějších iniciátorů oxidačních reakcí v potravinovém i biologickém systému. Tyto ionty katalyzují iniciaci a rozklad hydroperoxidů, což vede k tvorbě velkého množství těkavých productů (Nishiike et al. 1997).

Použití substrátu (látky, která je oxidována působením volných radikálů) je považováno za nezbytné při stanovení antioxidační aktivity (Frankel & Meyer 2000), a proto se testy jako ABTS (kyselina 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová)), které obvykle substrát neobsahují, nazývají jako umělé, protože nepřiměřeně napodobují procesy *in vivo*. Poté, co je substrát oxidován za standardních podmínek, měří se rozsah nebo rychlost oxidace (konečný bod) chemickými, instrumentálními nebo senzorickými metodami. Proto je základní složkou

jakékoli metody oxidační iniciátor, vhodný substrát a vhodný způsob měření koncového bodu. Také při interpretaci dat je třeba postupovat opatrně a měřit řadu oxidačních parametrů, aby se lépe vyhodnotila antioxidační aktivita (Frankel & Meyer 2000; Antolovich et al. 2002).

3.4.1 Vyjádření výsledků

Metody vyjádření antioxidační aktivity se zdají stejně rozmanité jako metody měření. U všech způsobů vyjádření antioxidační aktivity je snaha naznačit účinnost látek, které brání oxidaci substrátu za stanovených podmínek. Praktické měření antioxidační aktivity musí prokázat alespoň dvě věci: zda má zkoušená látka detekovatelný antioxidační nebo prooxidační účinek za zkušebních podmínek; a srovnání kvantitativního účinku nebo pravděpodobného účinku specifikovaných koncentrací různých testovaných materiálů na substrát. Většina metod pro vyjádření výsledků je založena na měřeních pomocí běžných zkušebních postupů, které zahrnují přímé nebo nepřímé měření rychlosti nebo rozsahu. Zdá se však, že neexistují žádné standardní jednotky pro vyjádření výsledků nezávislých na zkušebním postupu (Antolovich et al. 2002).

3.5 Metody pro stanovení antioxidační aktivity

Jak je již uvedeno výše, ke sledování a srovnávání antioxidační aktivity potravin se používají různé metody. Termíny „antioxidační aktivita“ a „antioxidační kapacita“ mají různé významy: antioxidační aktivita se zabývá kinetikou reakce mezi antioxidantem a prooxidantem nebo radikálem, který redukuje nebo vychytává, zatímco antioxidační kapacita měří účinnost termodynamické přeměny oxidačního činitele na reakce s antioxidantem. Měření antioxidační aktivity/kapacity potravin a biologických tekutin (např. lidského séra) se provádí za účelem smysluplného srovnání obsahu antioxidantů v potravinách a pro diagnostiku a léčbu chorob spojených s oxidačním stresem v klinické biochemii (Apak et al. 2013).

ROS mohou vést k oxidaci postranních řetězců aminokyselin, tvorbě síťových vazeb mezi bílkovinami a oxidaci peptidových vazeb bílkovin. Oxidační změny, které jsou závislé na věku, jako je zvýšení počtu karbonylových skupin bílkovin a pokročilých oxidačních produktů bílkovin a snížení všech thiolů v plazmě, významně koreluje s celkovou antioxidační kapacitou plazmy (Pandey et al. 2010). Interakce mezi různými antioxidanty poskytuje větší ochranu proti útokům ROS/RNS než jakákoli sloučenina samotná (čímž je měření celkové antioxidační kapacity (TAC) ještě důležitější). Chemická rozmanitost antioxidantů (relativní hojnost jejich glykosidů a izomerů) ztěžuje oddělení a kvantifikaci antioxidantů od potravin/biologických matric, kde může být jejich společný účinek důležitější. Je proto žádoucí měřit TAC přímo v rostlinných extraktech (potravinách) a biologických tekutinách (Apak et al. 2013).

Pro rozumnou volbu metody měření antioxidantů by se měly řešit následující důležité otázky:

1. Jaké jsou skutečné ochranné vlastnosti antioxidantů? Proti čemu antioxidant ochraňuje?
2. Jaké substráty jsou oxidovány a jaké produkty jsou inhibovány?
3. Jaké je umístění antioxidantu v systému?
4. Jaký je účinek jiných vzájemně reagujících komponent?
5. Jaké podmínky jsou relevantní pro aplikace v reálném životě?

Další otázky, které je třeba řešit v biologických systémech jsou následující:

1. Jaký je skutečný dopad biologické oxidace?
2. Jaké jsou skutečné účinky antioxidantů?
3. Jaký je mechanismus ochrany? Jaké jsou relativní oxidační produkty lipidů, bílkovin, DNA a interakčních produktů?
4. Jaká je dostupnost substrátů pro antioxidanty a prooxidanty? (Frankel & Meyer 2000).

Nejnovější antioxidační testy, vyvinuté pro snadné použití a rychlý screening velkého množství materiálů, mají jak koncepční, tak technická omezení. Koncepční problémy vyvolávají otázky týkající se odůvodnění a konstrukce antioxidačních testů, včetně:

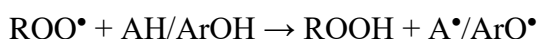
- Všechny metody při současném použití byly navrženy za předpokladu, že antioxidační účinek *in vivo* probíhá stejným vychytáváním volných radikálů, jaké je znázorněno v roztoku, avšak vychytávání radikálů *in vivo* spojené s absorbovanými antioxidanty (na rozdíl od buněčné kultury *in vitro*) nebylo prokázáno.
- Velmi nízká biologická dostupnost, absorpce, distribuce a neznámý metabolismus antioxidantů představují závažná omezení toho, jaké reakce mohou tyto sloučeniny kompetitivně zprostředkovat *in vivo*; ve skutečnosti může nízká absorpce způsobit, že chemická reakce měřená v testech je irelevantní mimo gastrointestinální trakt.
- Polyfenoly jsou chemicky reaktivní a podléhají jiným reakcím než vychytávání radikálů, z nichž jedna je vazba na bílkoviny; jsou aktivní *in vivo* a musí být brány v úvahu při navrhování testovacích vzorků a aplikací.
- Většina současných *in vitro* testů měří chemické reakce nepřesně v koncentračních rozsazích (absolutních i relativních) o mnoho řádů vyšší, než které jsou běžné v podmínkách *in vivo*.
- Reakční doba v testech trvá od 4 minut do mnoha hodin, zatímco životnost kyslíkových radikálů, s nimiž se normálně vyskytují *in vivo* a v potravinách, je velmi krátká (Apak et al. 2013).

Metody pro stanovení antioxidační aktivity lze rozdělit podle typu reakce:

- metody založené na přenosu atomů vodíku (HAT – hydrogen atom transfer)
- metody založené na přenosu elektronů (ET – electron transfer) (Apak et al. 2013).

3.5.1 Metody založené na přenosu atomů vodíku

Tyto metody měří schopnost antioxidantu odstranit volné radikály darováním atomů H. Mechanismy antioxidačního účinku HAT, při kterém je atom vodíku (H) na fenolu (Ar–OH) převeden na radikál ROO•, lze shrnout reakcí



kde aryloxy radikál (ArO•) vytvořený reakcí antioxidačního fenolu s peroxylovým radikálem je stabilizován rezonancí. AH a ArOH představují chráněné biomolekuly a fenolické antioxidanty. Účinné fenolické antioxidanty musí reagovat rychleji než biomolekuly s volnými radikály, aby je ochránily před oxidací. Protože v metodách měření antioxidantů založených na HAT reagují fluorescenční sonda i antioxidanty s ROO•, antioxidační aktivita může být

stanovena z konkurenční kinetiky změřením křivky fluorescenčního rozkladu sondy v nepřítomnosti a přítomnosti antioxidantů, integrací oblasti pod touto křivkou a nalezení rozdílu mezi nimi (Huang et al. 2005). Testy založené na HAT zahrnují metodu ORAC (oxygen radical absorbance capacity) a metodu TRAP (total peroxy radical-trapping antioxidant parameter) s použitím R-fykoerythrinu jako fluorescenční sondy, krokinového bělicího testu s použitím 2,2'-azobis(2-amidinopropan)hydrochloridu (AAPH) jako látky generující volné radikály (Apak et al. 2013).

3.5.1.1 Metoda ORAC

Metodu ORAC (oxygen radical absorbance capacity) lze použít k měření antioxidační aktivity potravin a jiných chemických látek. Měření může být provedeno s použitím buď fykoerythrinu nebo fluoresceinu jako fluorescenčních látek. Test se provádí za použití 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylové kyseliny (Troloxu, ve vodě rozpustného analogu vitamínu E) jako kontrolního standardu pro stanovení ekvivalentu Troloxu (TE), ze kterého se vypočte hodnota ORAC. Čím vyšší je hodnota ORAC, tím větší je antioxidační aktivita vzorku (Alam et al. 2013).

Základní test používá bisazidový iniciátor, jako je AAPH pro generování peroxylových radikálů, při zahřívání v přítomnosti dostatečného množství kyslíku. Peroxylové radikály pak reagují s fluorescenční sondou a snižují její fluorescenci. Snižování fluorescence je sledováno spektrofotometricky (excitace při 485 nm a emise při 520 nm) a antioxidační aktivita je stanovena jako úbytek fluorescence v přítomnosti antioxidantu. Testy mohou být prováděny ručně s jednotlivými vzorky v kyvetách, nebo mohou být automatizovány na mikrotitračních destičkách (Apak et al. 2013).

Původně se používá pro určení antioxidační aktivity hydrofilních antioxidantů. Kromě původní verze, která detekuje reakce ROO^\bullet , byly testy ORAC modifikovány pro detekci $\bullet\text{OH}$ a dalších radikálů úpravou iniciátorů a pro detekci lipofilních antioxidantů jejich zapouzdřením (a tedy solubilizací) těchto sloučenin v náhodně methylovaném β -cyklodextrinu (Huang et al. 2002; Ou et al. 2002a).

Výsledky se vyjadřují v mmol TE na litr nebo gram vzorku. Jedinečnost této metody spočívá v tom, že celková antioxidační kapacita vzorku je měřena po dokončení oxidační reakce. Výsledky jsou kvantifikovány měřením ochrany produkované antioxidanty a řeší se tím mnoho problémů spojených s kinetikou nebo měřením zpoždění reakce. Na druhou stranu je metoda ORAC drahá a časově náročná (Cao et al. 1993).

3.5.1.2 Metoda TRAP

Metoda TRAP (total radical-trapping antioxidant parameter) je založena na ochraně poskytované antioxidanty během fluorescenčního rozkladu R-fykoerythrinu (R-PE) během řízené peroxidační reakce. Fluorescence R-fykoerythrinu (excitace při 495 nm, emise při 575 nm) (Schlesier et al. 2002) je ukončena ABAP [2,2'-azo-bis(2-amidinopropan)hydrochloridem] jako radikálovým generátorem při 37 °C. Tato inhibiční reakce je měřena za přítomnosti antioxidantů. Antioxidační potenciál je hodnocen spektrofotometrickým měřením intenzity odbarvení (Alam et al. 2013). Testy TRAP jsou v zásadě variantami testů ORAC, ale používají širší škálu iniciátorů, sond a měření koncových bodů (včetně těch, které

se používají v metodách ORAC a TEAC – trolox equivalent antioxidant capacity) (Apak et al. 2013).

3.5.2 Testy založené na přenosu elektronů

Ve většině testů založených na přenosu elektronů je antioxidační účinek simulován vhodnou sondou s redoxním potenciálem, konkrétně antioxidanty reagují s fluorescenční nebo barevnou sondou (oxidačním činidlem) namísto peroxylových radikálů. Spektrofotometrické měření antioxidační aktivity probíhá na principu barevné změny oxidantu při jeho redukci antioxidantem. Stupeň změny barvy (buď zvýšení nebo snížení absorbance sondy při dané vlnové délce) koreluje s koncentrací antioxidantů ve vzorku. Mezi odbarvovací metody stanovení antioxidační aktivity patří metoda TEAC s použitím radikálu ABTS, tj. kyseliny 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové), metoda s použitím radikálu 2,2-di(4-terc-oktylfenyl)-1-pikrylhydrazyl (DPPH) (Brand-Williams et al. 1995; Bondet et al. 1997; Sánchez-Moreno et al. 1998) a metoda DMPD (N,N-dimethyl-p-fenylendiamin). Zatímco při stanovení celkového obsahu fenolů pomocí Folin-Ciocalteu činidla (TPC – total phenolic compounds) (Folin & Ciocalteu 1927; Singleton et al. 1999), použití metody FRAP (ferric reducing antioxidant potential) (Benzie & Strain 1996; Benzie & Szeto 1999) a CUPRAC (cuperic ion reducing antioxidant capacity) dochází ke zvýšení absorbance při předem stanovené vlnové délce, jak antioxidant reaguje s chromogenním činidlem (Apak et al. 2004).

Testy založené na ET obecně stanovují pevný čas pro příslušnou redoxní reakci a měří termodynamickou konverzi (oxidaci) během tohoto období. Testy založené na ET zahrnují ABTS/TEAC, DPPH (ačkoli někteří vědci považují první dva testy za smíšené testy založené na HAT/ET), stanovení celkového obsahu fenolů pomocí Folin-Ciocalteuova činidla (TPC, total phenolic content), FRAP, ferrikyanid a CUPRAC pomocí různých chromogenních redoxních činidel s různými standardními potenciály. Ačkoli redukční kapacita vzorku nesouvisí přímo s jeho schopností vyladit radikálů, je to velmi důležitý parametr pro stanovení antioxidační aktivity (Apak et al. 2013).

3.5.2.1 Metoda TEAC

Metoda TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) využívá spektrofotometr k měření ztráty barvy při 734 nm po přidání antioxidantů do modrozeleného chromoforu ABTS. Původní test (někdy označovaný jako TEAC I) používal metmyoglobin-H₂O₂ k vytvoření HO•, který pak reagoval s ABTS (kyselina 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová) za vzniku kationtového radikálu, ABTS^{•+}. Výsledky kvantifikace však byly nejednoznačné, protože antioxidanty mohly reagovat s původním radikálovým oxidantem stejně jako s ABTS^{•+}, což způsobilo zvýšení antioxidační aktivity (Strube et al. 1997). Test byl revidován tak, aby čistě vytvářel ABTS^{•+} nejprve použitím oxidačních činidel, jako je persíran draselný (Re et al. 1999) a oxid manganičitý (Miller et al. 1996; Benavente-García et al. 2000), poté přidáním antioxidantů a změřením přímé reakce s radikálem. Ve variantách tohoto přístupu se jako oxidační činidla používají také Br₂•⁻, H₂O₂ + avidin-peroxidáza (Arnao et al. 1996; Kadnikova & Kostić 2002) a peroxylové radikály (Campos & Lissi 1997). Z nich je preferována persulfátová oxidace pro její vysoké výtěžky ABTS^{•+} a radikálovou/antioxidační inertnost. Tento formát (TEAC II) tvoří základ pro současné testy TEAC (Apak et al. 2013).

Provedení metody TEAC II je jednoduché. Zásobní roztoky koncentrovaného ABTS^{•+} jsou vytvářeny a skladovány v chladničce (stabilní několik měsíců) (Re et al. 1999). Pro reakci se zásobní roztok zředí vodou nebo pufrům na změřitelnou absorbanci, zaznamenaná se počáteční absorbance roztoku ABTS^{•+} při 734 nm, přidá se antioxidant a měří se pokles absorbance po reakčních obdobích pohybujících se od čtyř minut do několika hodin. Hodnoty TEAC se počítají z poměru reakce testované sloučeniny (měřeno jako inhibice) k poměru reakce Troloxu (Apak et al. 2013).

Jiný způsob provedení metody TEAC spočívá v přidání pevného oxidu manganického (80 mg) do 5 mM vodného zásobního roztoku ABTS (20 ml s použitím 75 mM Na/K pufru o pH 7) za vzniku ABTS^{•+}. Ke kontrole může být použit Trolox, pro který se vytvoří standardní kalibrační křivka při koncentracích 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 a 350 μ M. Vzorky se zředí podle antioxidační aktivity v pufru Na/K na pH 7. Zředěné vzorky se smíchají s 200 μ l roztoku radikálového kationtu ABTS^{•+} na 96jamkových mikrotitračních destičkách a absorbance se odečte (při 750 nm) po 5 minutách ve čtečce mikrodestiček. Hodnoty TEAC mohou být vypočteny ze standardní křivky Troloxu a vyjádřeny v ekvivalentech Troloxu (v mM) (Seeram et al. 2006; Alam et al. 2013).

Celkově metoda TEAC nabízí mnoho výhod, které přispívají k její široké popularitě při screeningu antioxidační aktivity u široké škály materiálů. TEAC je provozně jednoduchá metoda, reakce jsou rychlé (většina metod používá 30 minut nebo méně) a fungují v širokém rozmezí pH. ABTS^{•+}, jako jednotlivě pozitivně nabitý kationtový radikál, je rozpustný ve vodě i organických rozpouštědlech a není ovlivněn iontovou silou, proto se používá ke stanovení antioxidační aktivity v lipofilních i hydrofilních médiích (Apak et al. 2013).

TEAC má však také některé nevýhody. Vysoký extinkční koeficient ABTS^{•+} omezuje vhodné rozmezí koncentrací antioxidantů. Koncentrace antioxidantů mimo tento rozsah vyžaduje příliš mnoho nebo příliš málo ABTS^{•+} pro přesná optická měření. Ačkoli byl test TEAC široce používán v mnoha podobách, jeho vhodnost a přesnost jsou zpochybňovány. Je doporučeno, aby byl test modifikován podobným způsobem, jaký je popsán níže pro DPPH, a jeho použití by mělo být omezeno na srovnání sloučenin s velmi podobnou strukturou (Apak et al. 2013).

3.5.2.2 Metoda DPPH

DPPH (1,1-difenyl-2-picrylhydrazyl) byl jedním z prvních syntetických radikálů používaných ke studiu strukturálních účinků na aktivitu fenolických antioxidantů (Blois 1958). Jedná se o stabilní volný radikál s tmavě fialovou barvou, jehož reakce s jinými radikály, redukčními činidly nebo sloučeninami schopnými HAT vede ke ztrátě barvy při 515 nm. Stejně jako ABTS^{•+}, DPPH[•] reaguje s donory elektronů i vodíku, i když pomaleji (Barclay et al. 1999; Litwinienko & Ingold 2003).

Metoda pro stanovení antioxidační aktivity s použitím DPPH radikálu patří mezi nejjednodušší a nejlevnější a díky tomu je velice populární a široce používaná. Krystaly DPPH se rozpustí v methanolu nebo ethanolu, zaznamenaná se počáteční absorbance DPPH[•], přidá se vzorek testovaného antioxidantu, směs se inkubuje po dobu 30 minut a zaznamenaná se konečná absorbance. Antioxidační aktivita se uvádí buď jako IC₅₀ (koncentrace antioxidantu potřebná

ke snížení absorpance DPPH na polovinu) nebo jako % ztráty původní absorpance. Ve výsledcích se uvádí pouze rozsah reakce a ignoruje se rychlost reakce (Apak et al. 2013).

Stejně jako u ABTS⁺, měření před-a-po chybí důležitá kinetika reakce a může podceňovat rychle reagující antioxidanty, zatímco ty, které reagují pomalu, nadhodnocuje. Postupy, které se pokoušejí zohlednit delší reakce prodloužením času inkubace, zdůrazňují stechiometrii na úkor rychlosti reakce. Toto zaměření není užitečné pro hodnocení a předpovídání účinnosti antioxidantů, protože pokud reakční rychlost domnělých antioxidantů není srovnatelná s životností cílových radikálů, ať už DPPH[•], HO[•] nebo lipidových radikálů, radikálová inhibice nenastane. DPPH[•] je stabilní radikál, takže pomalé antioxidační reakce s ním mohou být experimentálně detekovatelné. Relevance těchto pomalých reakcí na potlačení krátkodobých hydroxylových a lipidových radikálů v potravinách a tkáních je však velmi sporná. I když důvodem pro dlouhou inkubační dobu je detekce působení antioxidačních produktů, radikály v reálných systémech nepřežijí dostatečně dlouho, aby se s těmito produkty setkaly, a samotné produkty reagují, takže se nehromadí, aby inhibovaly radikály, protože se vytvářejí v reakcích. Proto je třeba změnit orientaci metody DPPH, aby se určily časné reakce s nestabilními radikály, jako jsou HO[•], HOO[•], LO(O)[•] a NO[•]. To znamená zaznamenávat reakce nejlépe po dobu 4 minut, a ne více než 6–10 minut. Výzkum v chemii rozpoznal mechanické složitosti této složky rychlé reakce, jakož i potíže s jejím měřením. Proto se rutinně používají pulzní radiolýza a metody zastaveného toku k detekci nejčasnějších druhů radikálů v rychlých reakcích, včetně DPPH[•] (Barclay et al. 1999; Litwinienko & Ingold 2003). K dispozici jsou levné sestavy injekčních stříkaček se zastaveným průtokem, takže antioxidační testy používající DPPH by měly být přesunuty do této technologie s okamžitým zaznamenáním absorpance ve čtečkách mikrodestiček (Apak et al. 2013).

3.5.2.3 Metoda DMPD

Tento způsob měření antioxidační aktivity využívá N,N-dimethyl-*p*-fenylendiamin (DMPD). Radikálový kation této sloučeniny v přítomnosti vhodného okysličovadla (např. chloridu železitého) vytvoří roztok se stabilním červenofialovým zbarvením. Antioxidační sloučeniny, které jsou schopné přenášet atom vodíku na DMPD^{•+} způsobují odbarvení roztoku. Výsledky se měří spektrofotometricky při 505 nm a porovnávají se s hodnotami Troloxu. Tato metoda je rychlá, levná a zajišťuje citlivost a reprodukovatelnost při měření antioxidační aktivity hydrofilních sloučenin (Fogliano et al. 1999).

3.5.2.4 Stanovení celkového obsahu fenolů

Pro nepřímé stanovení celkového obsahu fenolů (TPC – Total Phenolic Content) se využívá spektrofotometrická metoda s použitím Folin-Ciocalteuova činidla (F-C). Toto činidlo se připraví tak, že se nejprve rozpustí 100 g wolframanu sodného (Na₂WO₄·2H₂O) a 25 g molybdenanu sodného (Na₂MoO₄·2H₂O) v 700 ml destilované vody. Poté se roztok okyselí 50 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové (HCl) a 50 ml 85% kyseliny fosforečné (H₃PO₄). Okyselený roztok se vaří 10 hodin, ochladí se a přidá se 150 g Li₂SO₄·4H₂O. Výsledný roztok má intenzivně žlutou barvu. Reakce mezi polyfenoly a F-C činidlem probíhá při pH 10, čehož je dosaženo přidáním uhličitanu sodného. Za těchto základních podmínek vede disociace

fenolického protonu k tvorbě fenolátového iontu, který je schopen redukovat F-C činidlo (Sánchez-Rangel et al. 2013). Principem této metody je reakce mezi antioxidantem a oxidačním činidlem za vzniku modrého zbarvení, které vykazuje absorpci světla s maximem při 765 nm. Intenzita absorpce světla při této vlnové délce je úměrná koncentraci antioxidantů (Waterhouse 2002). Jako fenolický standard se používá buď gallová kyselina nebo tříslová kyselina (Ramirez-Sanchez et al. 2010).

Tato metoda byla vytvořena za účelem zlepšení metody Folin a Denis (F–D) (Folin & Denis 1912), která měla za úkol nepřímo určit celkovou koncentraci bílkovin měřením obsahu tyrosinu a tryptofanu. Princip obou metod je založen na reakci mezi oxidačním činidlem a tyrosinem/tryptofanem, což má za následek tvorbu modré barvy úměrné koncentraci bílkovin. Hlavní rozdíl mezi metodami F–C a F–D je podíl molybdenanu (Mo) použitého k přípravě činidla. Folin a Ciocalteu zvýšili obsah Mo, aby se zabránilo tvorbě bílé sraženiny pozorované při stanovení F – D (Folin & Ciocalteu 1927). Metoda F–C byla poté aplikována a upravena pro stanovení celkového obsahu fenolů v potravinách, například ve víně (Singleton & Rossi 1965). Kromě toho byla tato metoda také přizpůsobena k měření lipofilních antioxidantů (Berker et al. 2013). Metoda s použitím činidla F-C může být dále modifikována na měření na mikrotitračních destičkách, která je také rychlá, levná a vhodná pro porovnání velkého množství vzorků. V porovnání s konvenčními metodami je spolehlivá na 95 % (Bobo-García et al. 2015).

Výhodou této metody je její rychlost a snadné provedení. K jejímu provedení nejsou potřeba žádná drahá činidla ani speciální přístroje. Metoda Folin-Ciocalteu poskytuje pouze hrubý odhad celkových fenolových sloučenin přítomných v extraktu. Látky jako cukry, aromatické aminy, oxid siřičitý, kyselina askorbová a organické kyseliny nebo zásady, mohou také reagovat s F-C činidlem (Roura et al. 2006). Kromě toho různé fenolické sloučeniny v tomto testu reagují různě, v závislosti na počtu hydroxylových skupin, které mají (Singleton & Rossi, 1965), a celkový obsah fenolů nezahrnuje nezbytně všechny antioxidanty, které mohou být přítomny v extraktu (Tawaha et al. 2007).

3.5.2.5 Metoda FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

Tato metoda měří schopnost antioxidantů redukovat železitý tripyridyltriazin. Je založena na redukci komplexu železitého tripyriltriazinu a chloridu 2,3,5-trifenyl-1,3,4-triaza-2-azoniacyklopenta-1,4-dienu (TPTZ) na železnou formu při nízkém pH. Tato redukce je monitorována měřením změny absorpce při 593 nm pomocí spektrofotometru. Antioxidační test může být proveden následující metodou podle Benzie a Strain (1999). Tři mililitry připraveného činidla FRAP se smíchají se 100 μ l zředěného vzorku; absorbance při 593 nm se zaznamenává po 30minutové inkubaci při 37 °C. Hodnoty FRAP lze získat porovnáním změny absorpce v testované směsi s absorpcemi získanými ze zvyšujících se koncentrací Fe^{3+} a vyjádřených jako mM Fe^{2+} ekvivalentů na kg (pevné potraviny) nebo na l (nápoje) vzorku (Benzie & Strain 1999; Alam et al. 2013). Výhodou této metody je její jednoduchost, rychlost, levnost a není nutná předběžná úprava vzorků. Metoda FRAP nevyžaduje vysoce specializované vybavení nebo dovednosti, ani přesné měření času a reakcí (Benzie & Strain 1999). Hlavní nevýhoda spočívá v tom, že měřená redukční kapacita nemusí nevyhnutně odrážet antioxidační aktivitu (Frankel & Meyer 2000).

3.5.2.6 Metoda CUPRAC

Metoda CUPRAC (Cupric reducing antioxidant capacity) je jednoduchý a široce použitelný test pro stanovení antioxidační kapacity vzorků obsahujících flavonoidy, fenolové kyseliny, hydroxyskořicovou kyselinu, thioly, syntetické antioxidanty a vitaminy C a E (Christodouleas et al. 2012). CUPRAC test pro stanovení TAC lze úspěšně použít na všechny typy biologicky důležitých antioxidantů (tj. askorbová kyselina, α -tokoferol, β -karoten, redukovaný GSH, kyselina močová a bilirubin), bez ohledu na jejich chemickou podstatu a rozpustnost (Apak et al. 2005).

Chromogenní oxidační činidlo použité pro CUPRAC test je bis(neocuproin)měďnatý kation (Cu(II)-Nc) a CUPRAC chromofor Cu(I)-neocuproin (Nc) kation. Toto činidlo je použitelné při pH 7 a oranžovo-žlutá barva je způsobena vznikem komplexu Cu(I)-Nc (Apak et al. 2013).

Chromogenní oxidační činidlo metody CUPRAC, tj. Cu(II)-Nc, reaguje s redukčními antioxidanty. Během reakce se reaktivní skupiny Ar-OH polyfenolických antioxidantů oxidují na odpovídající chinony (Ar=O) a Cu(II)-Nc se redukuje na vysoce barevný chelát $\text{Cu}(\text{Nc})_2^+$, který vykazuje maximální absorpci při 450 nm. I když je koncentrace iontů Cu^{2+} ve stechiometrickém přebytku nad koncentrací Nc v činidle CUPRAC, skutečným oxidantem jsou druhy $\text{Cu}(\text{Nc})_2^{2+}$ a ne samotný Cu^{2+} (Tutem et al. 1991). Výsledkem je, že polyfenoly jsou oxidovány mnohem rychleji a efektivněji s Cu(II)-Nc než s Cu^{2+} a množství zbarveného produktu [tj. chelátu Cu(I)-Nc], které se objevuje na konci redoxní reakce, odpovídá množství zreagovaného Cu(II)-Nc. Uvolněné protony jsou pufrovány v médiu octanu amonného. Při metodě CUPRAC jsou oxidační reakce v podstatě úplné do 30 minut pro většinu antioxidantů přítomných v potravinách a biologických matricích (Apak et al. 2013). Bylo vyvinuto několik variant pro měření TAC biologických tekutin, jako je lidské sérum nebo plazma. Lipofilní antioxidanty, α -tokoferol a β -karoten, byly testovány v dichlormethanu. Hydrofilní antioxidanty séra byly testovány v centrifugátu po vysrážení bílkovin perchlorovou kyselinou (Apak et al. 2005).

3.5.2.6.1 CUPRAC antioxidační senzor

Byl vyvinut levný optický senzor pomocí imobilizovaného chromogenního činidla, komplexu Cu(II)-Nc, pro hodnocení antioxidační kapacity neenzymatických antioxidačních sloučenin, jejich syntetických směsí a skutečných vzorků. Cu(II)-Nc činidlo bylo imobilizováno na katexové polymerní matici (Nafion, sulfonovaný kopolymer na bázi tetrafluorethylenu) a absorbance spojená s tvorbou vysoce zbarveného chelátu Cu(I)-Nc v důsledku reakce s antioxidanty byla měřena na membráně senzoru při 450 nm. Koeficienty TEAC měřené pro různé antioxidační sloučeniny naznačují, že reaktivita Nafion imobilizovaného činidla je srovnatelná s reaktivitou standardního testu CUPRAC na bázi roztoku. Vyvinutý senzor byl použit ke screeningu celkové antioxidační aktivity některých komerčních ovocných džusů, jako jsou pomerančové, třešňové, broskvové a meruňkové džusy, a ukázalo se, že je účinným nástrojem pro měření celkové antioxidační aktivity potravin a rostlinných vzorků bez nutnosti předúpravy. Ukázalo se, že CUPRAC test založený na optickém senzoru není nepříznivě ovlivněn běžnými potravinovými složkami, jako je citrát, oxalát, organické kyseliny a redukující cukry (Bener et al. 2010).

3.5.2.6.2 On-line metody HPLC-CUPRAC

Úsilí zaměřené na individuální identifikaci a kvantifikaci antioxidantů v rostlinných matricích může vést k problémům, protože antioxidantní aktivita sloučenin se může během jejich izolace a čištění v důsledku rozkladu snížit. Postupy pro separaci a kvantifikaci antioxidantů by tedy měly být prováděny současně. V nedávné době byly některé testy modifikovány pro postkolonové on-line HPLC aplikace. Nejrozšířenějšími testy v postkolonových aplikacích jsou metody odštěpení volných radikálů založené na vychytávání chromogenních volných radikálů DPPH nebo ABTS. Je obtížné přesně kvantifikovat antioxidantní aktivitu kvůli krátkým dobám života těchto radikálů. Kromě toho se reakční kinetika může u těchto radikálových činidel lišit v závislosti na složení rozpouštědla a pH. Metoda kombinující separaci složek v komplexní matici a hodnocení antioxidantní kapacity poskytuje významné výhody pro takový výzkum. On-line metoda HPLC-CUPRAC kombinuje chromatografickou separaci, analýzu složek a identifikaci antioxidantů v rostlinných extraktech. V tomto systému reagují antioxidantní sloučeniny oddělené HPLC s Cu(II)-Nc činidlem podél reakční cívky a činidlo je redukováno antioxidanty na žlutě zbarvený komplex Cu(I)-Nc, který má absorpční maximum při 450 nm. Separace polyfenolů se provádí na koloně C18 s použitím MeOH a 0,2 % kyseliny *o*-fosforečné. Limity detekce polyfenolů při 450 nm (v rozmezí 0,17–3,46 μM) po postkolonové derivatizaci byly srovnatelné s limity UV detekce při 280 nm bez derivatizace. Tato metoda je rychlá, levná, univerzální, nenáročná, používá stabilní činidla a umožňuje online kvalitativní a kvantitativní odhad antioxidantních složek komplexních rostlinných vzorků. Významné výhody online metod spočívají v tom, že lze měřit antioxidantní aktivitu jedné sloučeniny a vypočítat její příspěvek k celkové aktivitě komplexní směsi, a také lze porovnávat aktivitu jedné sloučeniny s aktivitou jiných složek v matici. Kromě toho lze stanovení látky, která nevykazuje žádnou antioxidantní aktivitu, pozorovat současně, protože chybí negativní pík jako výsledek CUPRAC měření při 450 nm a zároveň je přítomen pozitivní pík detekovaného při 280 nm (Çelik et al. 2010).

3.5.2.6.3 Výhody metody CUPRAC

Činidlo CUPRAC je dostatečně rychlé, selektivní a neoxiduje jednoduché cukry a kyselinu citronovou, také je mnohem stabilnější a snadno přístupnější než chromogenní radikálová činidla (např. ABTS, DPPH atd.). Schopnost redukovat měď pro biologický vzorek může nepřímou, ale účinně odrážet celkovou antioxidantní sílu vzorku, i když do testu nejsou zapojeny žádné radikály. Tato metoda je snadno použitelná v konvenčních laboratořích, které používají standardní kolorimetry a nevyžaduje sofistikované vybavení a vysoce kvalifikované operátory. Činidlo reaguje stejně dobře jak s hydrofilními, tak lipofilními antioxidanty (Özyürek et al. 2011).

3.5.2.7 Měření antioxidantní kapacity železito-ferrozinem

Pro jednoduché, levné a všestranné stanovení antioxidantů v potravinách byla vyvinuta metoda měření antioxidantní kapacity železito-ferrozinem (Berker et al. 2010). V přítomnosti ferrozínového (FZ) ligandu železitý iont snadno oxiduje antioxidanty a je sám redukován na Fe(II)-FZ, což poskytuje velmi vysokou molární absorptivitu a tím se zvýší citlivost většiny antioxidantů. Stanovení redukční kapacity na ferrikyanid/pruskou modř bylo modifikováno tak,

aby byla získána reprodukovatelnější, lineární a aditivní reakce antioxidantů s ohledem na koncentraci (İşil Berker et al. 2010). Současné použití ferrikyanidu a železitých iontů jako chromogenních oxidantů poskytlo příznivější redoxní podmínky pro větší množství antioxidantů. Srážení pruské modři bylo zabráněno přidáním dodecylsulfátu sodného a optimální pH bylo upraveno na 1,7 pro udržení redoxní aktivity železitých iontů a zabránění jejich hydrolyzy (Apak et al. 2013).

3.5.3 Metody měření vychytávání ROS

Existuje šest hlavních reaktivních druhů kyslíku způsobujících oxidační poškození v lidském těle (superoxidový anion, peroxid vodíku, peroxylové radikály, hydroxylové radikály, singletový kyslík a peroxynitrit). Aby bylo možné komplexně vyhodnotit schopnost antioxidantu vychytávat volné radikály ve vzorku potravy, musí být navrženy testy tak, aby zahrnovaly tyto ROS. Většina testů je však zatím určena k měření schopnosti vzorku reagovat s jedním oxidantem (buď organickým radikálem, nebo redoxními aktivními sloučeninami) (Huang et al. 2005).

3.5.3.1 Metoda vychytávání peroxidu vodíku (H_2O_2)

Lidé jsou vystaveni působení H_2O_2 nepřímo v životním prostředí (téměř 0,28 mg/kg/den) a je přijímán většinou z listové zeleniny, kde vzniká jako produkt normálních fyziologických procesů, převážně fotosyntézy (Junglee et al. 2014). Peroxid vodíku může vstoupit do lidského těla vdechováním par a kontaktem s očima nebo kůží. H_2O_2 se rychle rozkládá na kyslík a vodu katalázou, což může vést k tvorbě hydroxylových radikálů (OH^\bullet), které mohou iniciovat peroxidaci lipidů a způsobit poškození DNA v těle (Alam et al. 2013). Roztok peroxidu vodíku (40 mM) se připraví ve fosfátovém pufru (50 mM pH 7,4). Koncentrace peroxidu vodíku se stanoví absorpcí při 230 nm pomocí spektrofotometru. K peroxidu vodíku se přidá extrakt vzorku (20–60 $\mu\text{g/ml}$) v destilované vodě a po 10 minutách se stanoví absorbance při 230 nm proti slepému roztoku obsahujícímu fosfátový pufr bez peroxidu vodíku (Ruch et al. 1989).

3.5.3.2 Aktivita vychytávání radikálů peroxynitritu

Peroxynitrit ($ONOO^\bullet$) je cytotoxická sloučenina se silnými oxidačními vlastnostmi vůči různým buněčným složkám (včetně sulfhydrylů, lipidů, aminokyselin a nukleotidů), a může způsobit smrt buněk, peroxidaci lipidů, karcinogenezi a stárnutí. Je vytvářen *in vivo* endoteliálními buňkami, Kupfferovými buňkami, neutrofily a makrofágy. Peroxynitritový radikál je relativně stabilní ve srovnání s jinými volnými radikály, ale jakmile protonuje, vzniká vysoce reaktivní kyselina peroxodusitá ($ONOOH$), která se rozkládá s velmi krátkým poločasem (1,9 s) při 37 °C za vzniku různých cytotoxických látek, a která může vyvolat oxidaci thiolové (SH) skupiny bílkovin, nitraci tyrosinu, peroxidaci lipidů a také nitrosační reakce, ovlivňující buněčný metabolismus a přenos signálu. V konečném důsledku může přispět k poškození buněk a tkání poškozením řetězce DNA a buněčnou smrtí, např. v thymocytech a kortikálních buňkách. Její nadměrná tvorba může být také zapojena do vzniku a rozvoje několika onemocnění, jako je Alzheimerova choroba, revmatoidní artritida, nádorová

onemocnění a ateroskleróza. Kvůli nedostatku endogenních enzymů odpovědných za inaktivaci ONOO• je vývoj specifických vycytávačů ONOO• velmi důležitý (Alam et al. 2013).

Metoda popsaná v práci Kooy et al. (1994) zahrnuje použití zásobního roztoku dihydroxyrhodaminu 123 (DHR 123, 5 mM) v dimethylformamidu, který je propláchnut dusíkem a skladován při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pracovní roztok s DHR 123 (konečná koncentrace $5\text{ }\mu\text{M}$) se zředí ze zásobního roztoku a umístí se na led ve tmě bezprostředně před experimentem. Pufrový roztok, 50 mM fosforečnan sodný (pH 7,4), obsahující 90 mM chloridu sodného a 5 mM chloridu draselného se 100 μM kyseliny diethylentriaminpentaoctové (DTPA), se před použitím propláchne dusíkem a umístí na led. Aktivita eliminace ONOO• oxidací DHR 123 se měří na fluorescenčním spektrofotometru na mikrodestičkách s excitační a emisní vlnovou délkou 485 nm a 530 nm při pokojové teplotě. Konečná intenzita fluorescence se měří 5 minut po přidání peroxynitritu anebo 3-morfolino-sydnoniminu (SIN-1). Oxidace DHR 123 rozkladem SIN-1 se postupně zvyšovala, zatímco ONOO• rychle oxidoval DHR 123 se stabilní konečnou intenzitou fluorescence v průběhu času (Kooy et al. 1994).

3.5.3.3 Aktivita vycytávání hydroxylových radikálů (HO•)

Hydroxylový radikál je jednou z reaktivních forem kyslíku v biologickém systému, který reaguje s polyenovými mastnými kyselinami fosfolipidů buněčné membrány a způsobuje poškození buněk. Schopnost antioxidantů vycytávat hydroxylové radikály se měří metodou Kunchandy a Rao (1990). Reakční směs (1,0 ml) se skládá ze 100 μl 2-deoxy-D-ribózy (28 mM v 20 mM pufru $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-KOH}$, pH 7,4), 500 μl extraktu, 200 μl ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA) (1,04 mM) a 200 μM FeCl_3 (1:1 v/v), 100 μl H_2O_2 (1,0 mM) a 100 μl askorbové kyseliny (1,0 mM), která se inkubuje při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 hodiny. Přidá se 1,0 ml kyseliny thiobarbiturové (1 %) a 1,0 ml kyseliny trichloroctové (2,8 %) a inkubuje se při $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 20 minut. Po ochlazení se měří absorbance při 532 nm proti slepému vzorku (Rao & Kunchandy 1990). V biologickém systému je přímé vycytávání hydroxylových radikálů nerealistické kvůli jejich vysoké reaktivitě a krátké době životnosti. Na druhou stranu je možné zabránit tvorbě hydroxylových radikálů buď deaktivací volných kovových iontů [např. Fe (II)] chelatací nebo přeměnou H_2O_2 na jiné neškodné sloučeniny (jako je voda a kyslík). Kataláza přeměňuje H_2O_2 na O_2 a H_2O a kovové chelátory vážou kovové ionty tak, že se vůči H_2O_2 stávají inertními. Tak mohou některé živiny obsahující chelátory kovů působit jako antioxidanty (Huang et al. 2005).

3.5.3.3.1 Metoda HORAC

HORAC (hydroxyl radical averting capacity) test měří kovově chelatační aktivitu antioxidantů v podmínkách Fentonových reakcí za použití komplexu Co(II) a tím i ochranné schopnosti proti tvorbě hydroxylových radikálů. Roztok peroxidu vodíku 0,55 M se připraví v destilované vodě a 4,6 mM Co(II) se připraví rozpuštěním 15,7 mg $\text{CoF}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ a 20 mg kyseliny pikolinové ve 20 ml destilované vody. Fluorescein – 170 μl (60 nM, konečná koncentrace) a 10 μl vzorku se inkubují při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut přímo ve čtečce mikrotitračních destiček. Po inkubaci se přidá 10 μl H_2O_2 (konečná koncentrace 27,5 mM) a 10 μl roztoku Co(II) (konečná koncentrace 230 μM). Počáteční fluorescence se změří a poté se odečítají hodnoty každou minutu po třepání. Pro slepý vzorek se používá roztok fosfátového

pufri. K vytvoření standardní křivky se použije 100, 200, 600, 800 a 1 000 μM standardních roztoků antioxidantu např. gallové kyseliny (ve fosfátovém pufru 75 mM, pH 7,4). Jedna jednotka HORAC odpovídá oblasti chráněné standardním antioxidantem (obvykle kyselina gallová) o koncentraci 1 μM a aktivita vzorku je vyjádřena jako standardní ekvivalent antioxidantu na gram čerstvé hmotnosti vzorků (Ou et al. 2002b; Alam et al. 2013).

3.5.3.4 Metoda vychytávání superoxidového aniontu ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

Tato metoda spočívá v redukci cytochromu c superoxidem a jeho inhibici přidáním antioxidantu. Není ale vhodná pro kvantifikaci neenzymatických antioxidantů, protože mohou redukovat přímo cytochrom c. Tyto antioxidanty také inhibují xantinoxidázu (Yamashita et al. 1998). Místo cytochromu c lze použít nefluorescenční hydroethidin, který je superoxidem oxidován za vzniku fluorescenční sloučeniny neznámé struktury s absorpčním maximem při 586 nm (Zhao et al. 2003). Přidání SOD (antioxidantu) inhibuje oxidaci hydroethidinu. Tento způsob může zabránit problému přímé redukce sondy antioxidantem, problémem však zůstává inhibice xantinoxidázy antioxidanty (Huang et al. 2005). Ačkoli superoxidový radikálový anion $\text{O}_2^{\bullet-}$ nemůže přímo iniciovat oxidaci lipidů, v přítomnosti kovových iontů může vznikat vysoce reaktivní hydroxylový radikál $\bullet\text{OH}$, ale vychytávání $\text{O}_2^{\bullet-}$ není jediný mechanismus pro inhibici oxidace lipidů v biologických systémech nebo potravinách (Laughton et al. 1989; Meyer et al. 1994). Proto fenolické sloučeniny v rostlinných extraktech, které mají vlastnost vychytávat $\text{O}_2^{\bullet-}$, nejsou nezbytně účinné při prevenci oxidace lipidů. Kromě těchto nedostatků by měla být měření vychytávání superoxidu interpretována opatrně, protože tvorba superoxidových radikálů probíhá nepřetržitě během měření a nelze dosáhnout rovnováhy (Frankel & Meyer 2000).

3.5.3.5 Stanovení kapacity vychytávání singletového kyslíku ($^1\text{O}_2$)

Singletový kyslík se běžně vytváří v přítomnosti světla a fotosenzibilizátorů. Předpokládá se, že je často zodpovědný za poškození kůže způsobené UV zářením (Sies et al. 2004), tvorbu šedého zákalu (Zigman 2000) a citlivost na světlo vyplývající z požití nebo absorpce fotochemikálií, léčiv a pesticidů, které fungují jako fotosenzibilizátory (Ebermann et al. 1996). V nepřítomnosti světla může být $^1\text{O}_2$ v biologickém systému generován rozkladem peroxidu vodíku kovy nebo chlornanem (Aubry 1985; Martinez et al. 2000). Singletový kyslík může být zhasen přenosem jeho excitační energie na jinou molekulu (která je v excitovaném stavu), nebo se může přidat k antioxidantům vytvářejícím endoperoxidy. Například β -karoten je významný antioxidant schopný zhaset $^1\text{O}_2$. Charakteristická fosforescence singletového kyslíku je při 1270 nm. K měření aktivity zhasení $^1\text{O}_2$ se používá rychlost snížení intenzity světla. Dále byla uvedena citlivější metoda, kdy je měření kapacity zhasení $^1\text{O}_2$ provedeno sledováním zpožděné fluorescence tetra-terc-butylftalokyaninu při 703 nm. Tato metoda je proveditelná s použitím běžně dostupných přístrojů nebo v systémech, kde je obtížné detekovat luminiscenci při 1270 nm (Fu et al. 1997).

3.5.4 Další *in vitro* metody měření antioxidační aktivity

3.5.4.1 Metoda TBARS

Metoda TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) je nejčastěji používanou metodou k detekci oxidace lipidů (Kishida et al. 1993). Princip spočívá v měření malondialdehydu (MDA), který vzniká při oxidaci lipidového substrátu. Předpokládá se, že k tvorbě MDA z mastných kyselin s méně než třemi dvojnými vazbami dochází sekundární oxidací primárních karbonylových sloučenin (Fernández et al. 1997). MDA reaguje s kyselinou thiobarbiturovou (TBA) za vzniku růžového zbarvení, které se měří spektrofotometricky při jeho absorpčním maximu (532-535 nm) (Guillén-Sans & Guzmán-Chozas 1998). Metoda zahrnuje dva odlišné kroky: oxidace substrátu přidáním iontu přechodného kovu (mědi nebo železa) nebo zdroje volných radikálů, a poté je rozsah oxidace stanoven po přidání TBA spektrofotometrickým měřením. Oxidace je inhibována přidáním antioxidantu, a proto je pozorováno snížení absorbance. Tato metoda je široce používaná, i když reakce není příliš specifická a reakční podmínky (např. teplota, doba reakce, působení světla) mají významný vliv na vývoj zbarvení (Asakawa & Matsushita 1980; Slater 1984).

3.5.4.2 Metoda RP

Metoda RP (reducing power) je založena na principu zvýšení absorbance reakčních směsí. Zvýšení absorbance znamená zvýšení antioxidační aktivity. Při této metodě tvoří antioxidační sloučenina barevný komplex s ferikyanidem draselným, kyselinou trichloroctovou a chloridem železitým. Zvýšení absorbance reakční směsi indikuje redukční sílu vzorků. V metodice popsané Oyaizuem (1986) se k 1,0 ml vzorku rozpuštěného v destilované vodě přidá 2,5 ml 0,2 M fosfátového pufru (pH 6,6) a 2,5 ml $K_3Fe(CN)_6$ (1 % hm/obj). Výsledná směs se inkubuje při 50 °C po dobu 20 minut, následně se přidá 2,5 ml kyseliny trichloroctové (10 % hm/obj). Směs se odstředí při 3000 ot/min po dobu 10 minut, aby se shromáždila horní vrstva roztoku (2,5 ml), smíchá se s destilovanou vodou (2,5 ml) a 0,5 ml $FeCl_3$ (0,1 % hm/obj). Absorbance se pak měří při 700 nm proti slepému vzorku (Jayaprakasha et al. 2001; Alam et al. 2013).

3.5.4.3 Fosfomolybdenová metoda

Pro kvantitativní stanovení antioxidační kapacity lze využít i spektrofotometrickou metodu založenou na redukci Mo(VI) na Mo(V) antioxidanty vzorku a následné tvorbě komplexu zeleného fosfátu Mo(V) při kyselém pH. Celková antioxidační kapacita může být stanovena metodou popsanou ve studii Prieto et al. (1999). 0,1 ml roztoku vzorku (100 µg) je smícháno s 1 ml činidla (0,6 M kyselina sírová, 28 mM fosforečnan sodný a 4 mM molybdenan amonný). Zkumavka se uzavře a inkubuje se ve vroucí vodní lázni při 95 °C po dobu 90 minut. Po ochlazení vzorku na pokojovou teplotu se měří absorbance vodného roztoku při 695 nm proti slepému pokusu, který obvykle obsahuje 1 ml roztoku činidla a příslušný objem stejného rozpouštědla použitého pro vzorek a je inkubován za stejných podmínek jako vzorek. U vzorků s neznámým složením lze antioxidační kapacitu vyjádřit jako ekvivalenty α -tokoferolu (Prieto et al. 1999; Alam et al. 2013).

3.5.4.4 Měření hexanalů a souvisejících konečných produktů

Při rozkladu primárních produktů oxidace lipidů se vytváří komplexní směs sekundárních produktů oxidace zahrnující epoxidy, ketony, uhlovodíky a aldehydy, jako je hexanal. Hexanal je nejčastěji měřeným konečným produktem oxidace lipidů a pro jeho stanovení se používají jak senzorické, tak fyzikálně-chemické metody (Robards et al. 1988). Zatímco jiné metody pro měření antioxidační aktivity mohou být nespecifické, fyzikálně-chemické měření hexanalů nabízí výhodu jediného, dobře definovaného konečného produktu. Další výhodou je tvorba hexanalů, která je obvykle řádově vyšší než u většiny ostatních sekundárních oxidačních produktů (Snyder et al. 1985). Výjimkou je pentan, který se vytváří v koncentracích srovnatelných s koncentracemi hexanalů. Protože pentan je velmi stabilní konečný produkt, může být pro monitorování antioxidační aktivity vhodnější než hexanal, například u sójového oleje, kde je pentan jedním z hlavních sekundárních oxidačních produktů (Jackson & Giacherio 1977). Ve skutečnosti může být sledování pouze jednoho nebo dvou analytů nedostačující (Antolovich et al. 2002).

3.5.5 *In vivo* testy

U všech metod *in vivo* jsou vzorky, které mají být testovány, obvykle podávány pokusným zvířatům (myším, potkanům atd.) v určitém dávkovacím režimu, který je popsán v příslušné metodě. Po určité době se zvířata obvykle usmrtí a ke stanovení se použije jejich krev nebo tkáň (Alam et al. 2013).

3.5.5.1 Schopnost plazmy redukovat železo

Jeden z nejrychlejších testů, velmi užitečný pro rutinní analýzu, je stanovení schopnosti plazmy redukovat železo. Antioxidační aktivita se odhaduje měřením zvýšení absorbance způsobené tvorbou železitých iontů z činidla FRAP obsahujícího TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazin) a hexahydrát chloridu železnatého (Jagtap et al. 2010).

Metoda popsána Benzie a Strainem (1996) zahrnuje použití vzorků krve, které se odebírají do heparinizovaných skleněných zkumavek po 0, 7 a 14 dnech léčby. Tři ml čerstvě připraveného FRAP činidla [1 ml (10 mM) roztoku TPTZ ve 40 mM HCl, 1 ml 20 mM $\text{FeCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 10 ml 0,3 M acetátového pufru (pH 3,6)] o teplotě 37 °C se smíchá s 375 μl destilované vody a 25 μl testovaného vzorku. Absorbance vyvinuté barvy v organické vrstvě se měří po 180 sekundách při 593 nm. Teplota se udržuje na 37 °C (Benzie & Strain 1996).

3.5.5.2 Měření aktivity katalázy

Katalázová aktivita může být stanovena v lyzátu erytrocytů pomocí Aebiho metody. Padesát μl lyzátu se přidá do kyvety obsahující 2 ml fosfátového pufru (pH 7,0) a 1 ml 30 mM H_2O_2 . Katalázová aktivita se měří při 240 nm po dobu 1 minuty. Pro stanovení katalázové aktivity byl použit molární extinkční koeficient H_2O_2 , 43,6 M cm^{-1} . Jedna jednotka aktivity se rovná 1 mmol H_2O_2 degradovaného za minutu a je vyjádřena jako jednotky na miligram bílkoviny (Aebi 1984; Alam et al. 2013).

3.5.5.3 Test na glutathion reduktázu (GR)

Postup spočívá v homogenizaci vzorku v 9 ml 0,25 M ledově studené sacharózy na g vzorku. Homogenát se odstředí 45 minut při 14 000 ot/min. Vzorek se suspenduje v malém objemu 0,25 M sacharózy a odstředí. Supernatanty se spojí a pH se upraví na hodnotu 5,5 studenou 0,2 M kyselinou octovou a znovu se odstředí (45 minut při 14 000 ot/min). Rychlost oxidace NADPH pomocí GSSG při 30 °C se používá jako standardní měřítko enzymatické aktivity. Reakční systém (1 ml) obsahuje: 1,0 mM GSSG, 0,1 mM NADPH, 0,5 mM EDTA, 0,10 M pufr fosforečnanu sodného (pH 7,6) a vhodné množství vzorku glutathion reduktázy, aby se změnila absorbance o 0,05 až 0,03/min. Oxidace 1 μ M NADPH/min se za těchto podmínek používá jako jednotka aktivity glutathion reduktázy. Specifická aktivita je vyjádřena v ml/mg bílkoviny (Kakkar et al. 1984).

3.6 Porovnání metod pro stanovení antioxidační aktivity

Stanovení celkové antioxidační aktivity je často smysluplnější pro hodnocení zdravotně prospěšných účinků díky kooperativnímu působení jednotlivých druhů antioxidantů. Nejčastěji jsou používány metody *in vitro* a z nich metoda DPPH, protože je nejjednodušší, a ne příliš nákladná (Alam et al. 2013). Relativní antioxidační aktivita mnoha fenolových sloučenin se značně liší podle různých testovacích metod. Neexistuje tedy shoda mezi relativní aktivitou různých flavonoidů, antokyanů, hydroxyskořicové kyseliny a čajových katechinů na inhibici oxidace LDL indukované mědí *in vitro* ve srovnání s celkovou antioxidační kapacitou. Rozporuplné výsledky byly také pozorovány u antioxidačního potenciálu polyfenolů zeleného čaje inhibovat oxidaci LDL *in vitro* a jejich účinnost při zachycování radikálu ABTS pomocí metody TEAC (Salah et al. 1995). Na rozdíl od testů hodnocení hroznových džusů při inhibici oxidace LDL, které ukázaly, že vitamin C neměl žádnou aktivitu (Frankel et al. 1998), byl zaznamenán významný účinek vitaminu C, když byl hodnocen metodou TEAC (Miller et al. 1995). Tyto údaje poukazují na fakt, že pořadí antioxidační aktivity je silně závislé na testovacím systému a na substrátu, který má být antioxidanty chráněn. Jak již bylo uvedeno dříve, polyfenolické flavanoly mohou kromě vychytávání volných radikálů inhibovat oxidaci LDL několika dalšími mechanismy (Teissedre et al. 1996). Na druhou stranu některá měření celkové antioxidační kapacity měří pouze aktivitu vychytávání radikálů ve vodných systémech. Nesrovnalost v hodnocení antioxidantů může být vysvětlena nejen množstvím mechanismů účinných pro tyto polyfenolické sloučeniny, ale také vlivem mezifázových vlastností vícefázových LDL částic ve srovnání s vodnými testovacími systémy používanými pro metody TEAC a ORAC (Frankel & Meyer 2000).

Z důvodu složitosti skutečných potravin je zrychlené testovací systémy obtížné standardizovat a každé měření antioxidantů by mělo být kalibrováno pro každý lipid nebo potravinu. Zrychlené oxidační podmínky by se měly blížit podmínkám skladování, za kterých má být potravina chráněna. V biologických systémech se mohou fenolické sloučeniny podílet na antioxidační aktivitě různými způsoby, včetně prevence tvorby oxidantu, vychytávání aktivovaných oxidantů, redukce aktivních meziproductů a indukce opravných systémů. Lepším přístupem je měření specifických produktů oxidace v relevantních biologických systémech *in vitro* i *in vivo* (Frankel & Meyer 2000).

Velké úsilí vynaložené při testování nových přírodních antioxidantů zdůrazňuje potřebu zdokonalených testovacích metod. Několik v současnosti používaných metod a modelových systémů nemusí vyhodnotit skutečné ochranné účinky antioxidantů a získaná data mohou být zmatena mnoha faktory, včetně složení testovacího systému, substrátu, který má být chráněn, a způsobu indukce oxidace. Ve zjednodušených modelových systémech mohou být fenomény rozhraní potlačeny při interpretaci antioxidačních mechanismů a aktivity, které se zdají být silně ovlivněny komplexními vlastnostmi rozhraní a fázového rozložení. Při testování antioxidační aktivity potenciálních potravinových antioxidantů nebo bioaktivních sloučenin může být prvním cílem vytvoření modelového systému, ze kterého lze odvodit základní chemické principy. Na druhé straně skutečnou účinnost antioxidantů nelze řádně posoudit, pokud podmínky, tj. složitost systému, nejsou co nejbližší podmínkám, za kterých je požadována ochrana proti autooxidaci. Cílení antioxidantů, aby se zabránilo konkrétním krokům tvorby volných radikálů a procesům oxidačního poškození, vyžaduje podrobné porozumění mechanismům oxidace. Specifické lipidové modelové systémy by měly, pokud možno, co nejbližší napodobovat potravinové nebo fyziologické cílové systémy, které mají být chráněny. Existují různé typy oxidace a měli bychom nejprve definovat cíle oxidace (lipidy, bílkoviny, DNA) před výběrem metod pro posouzení ochranných vlastností antioxidantů za podmínek jejich možného působení a použití. Celková antioxidační kapacita fytochemikálií založená pouze na jedné vlastnosti, jako je jejich schopnost vychytávat umělé radikály, neposkytuje žádné informace o tom, jaký lipid nebo jiný substrát je chráněn. Pro hodnocení antioxidantů nemůže existovat zkratkový přístup. Vzhledem k velkým rozdílům ve výsledcích při měření antioxidační aktivity přírodních antioxidantů v potravinách a biologických systémech jsou potřebné validované postupy a zkušební protokoly, aby se do tohoto chaosu v této důležité oblasti dostal nějaký řád. Naše porozumění účinkům antioxidačních sloučenin lze zlepšit pouze tehdy, pokud se použije specifičtější metodologie, která je schopna definovat, jaké produkty jsou vytvářeny a inhibovány antioxidanty v závislosti na podmínkách, systémech a cílech ochrany (Frankel & Meyer 2000).

3.6.1 Porovnání metod měření v kyvetách a na mikrotitračních destičkách

Spektrofotometrická stanovení antioxidační aktivity v kyvetách jsou někdy nahrazována měřením na mikrotitračních destičkách. Důvodem je snadná manipulace s větším množstvím vzorků současně a nižší spotřeba materiálu. Metodu lze ještě urychlit použitím vícekanálové pipety. Zatímco při spektrofotometrickém měření v kyvetách prochází světelný paprsek jejich paralelními stěnami, na mikrotitračních destičkách prochází povrchem kapaliny vzorku. Nevýhodou tedy je tvorba menisků vlivem povrchového napětí a tím zkomplikovaná interakce světla se zakřiveným povrchem kapaliny. Může tak dojít k chybám při porovnání naměřených hodnot mezi vzorky s rozdílným meniskem. U většiny testů je však neobvyklé, aby se povrchové napětí vzorků podstatně lišilo (Cottingham et al. 2004).

4 Metodika

V praktické části práce byl u vybraných vzorků stanoven celkový obsah fenolických látek spektrofotometricky. Vzorky byly měřeny v kyvetě a také na mikrotitrační destičce.

4.1 Materiál

4.1.1 Vzorky

Antioxidační aktivita byla analyzována u pěti vzorků: zelený čaj (Teekanee), holandské kakao s obsahem kakaového másla 20-22 % (Kávoviny), rozmarýn sušený (Vitana), 100 % pomerančový džus (Rauch), čerstvě vymačkaná šťáva z pomeranče (UGO). Vzorky byly nakoupeny den před měřením, pouze čerstvá šťáva z pomeranče byla pořízena v den měření.

4.1.2 Použité chemikálie a přístroje

Folin & Ciocalteu's činidlo (Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina gallova (Honeywell Riedel-de Haën[®], Německo)

Uhličitan sodný bezvodý (Chemapoi, Singapur)

Methanol p.a. (Penta, Česká republika)

Spektrofotometr Specol 1300 (An Endress Hauser Company, Německo)

Ultrazvuková vodní lázeň Sonorex Super RK 100 (Bandelin, Německo)

Tecan Infinity M200, program Magelan (Tecan, Austria)

4.2 Metody

4.2.1 Příprava vzorků

4.2.1.1 Zelený čaj

Bylo připraveno celkem 6 vzorků čaje, z toho 3 byly zalaty podle návodu na obalu vařící vodou (100 °C) a zbylé 3 byly zalaty vodou o teplotě 80 °C. Čaj byl louhován 3 minuty, jak bylo uvedeno v návodu na obalu.

4.2.1.2 Kakao

Do 3 kádinek bylo naváženo 1,5 g kakao (vzorek A = 1,4995 g, vzorek B = 1,5337 g, vzorek C = 1,5089 g). Po přidání 20 ml demineralizované vody se vzorky ponořily do ultrazvukové vodní lázně na 10 minut a extrakt ze vzorků se zfiltraval přes filtrační papír do kádinek. Ke vzorku se opět přidalo 20 ml demineralizované vody, vzorek byl opět vložen do ultrazvukové vodní lázně a následně zfiltrován do kádinek na objem 40 ml.

4.2.1.3 Rozmarýn

Vzorky rozmarýnu byly připraveny stejně jako vzorky kakaa (vzorek A = 1,5063 g, B = 1,539 g, C = 1,5076 g).

4.2.1.4 Džusy

Pomerančový džus i šťáva z pomeranče byly přefiltrovány přes filtrační papír.

4.2.2 Stanovení celkového obsahu fenolů v květech

Obsah veškerých fenolů byl stanoven spektrofotometricky při vlnové délce 760 nm s použitím Folinova-Ciocalteuova činidla dle metodiky popsané Dormanem et al. (2003) a Stratilem et al. (2008).

Nejprve byl připraven 20 % roztok uhličitanu sodného rozpuštěním 20,31 g uhličitanu sodného ve 100 ml odměrné baňce pomocí demineralizované vody. Pro přípravu roztoku kyseliny gallové pro kalibraci bylo v 100 ml odměrné baňce rozpuštěno 0,0123 g kyseliny gallové v 20 ml metanolu a doplněno po rysku demineralizovanou vodou. Do 25 ml odměrných baněk bylo pipetováno 250, 500, 1000 a 1 500 μ l zásobního roztoku kyseliny gallové, 1,5 ml Folinova činidla a 3,75 ml 20 % roztoku uhličitanu sodného. Objem se doplnil po rysku demineralizovanou vodou.

Dále byly připraveny 3 slepé vzorky pipetováním 1,25 ml Folinova činidla a 3,75 ml připraveného 20 % roztoku uhličitanu sodného do 25 ml odměrných baněk, které byly doplněny po rysku demineralizovanou vodou.

Z připravených extraktů kakaa, rozmarýnu a čaje bylo pipetováno 30 a 50 μ l (pro každý vzorek dvě paralelní stanovení) do 10 ml odměrných baněk, bylo přidáno 0,5 ml Folinova činidla a 1,5 ml 20 % roztoku uhličitanu sodného. Do 10 ml odměrných baněk bylo pipetováno 75 a 100 μ l pomerančového džusu, 0,5 ml Folinova činidla a 1,5 ml 20 % roztoku uhličitanu sodného. Do odměrných baněk o objemu 25 ml bylo pipetováno 186 a 250 μ l čerstvé pomerančové šťávy a přidáno 1,25 ml Folinova činidla a 3,75 ml 20 % roztoku uhličitanu sodného. Všechny odměrné baňky byly doplněny po rysku demineralizovanou vodou, stejně jako u slepých pokusů a kalibračních vzorků. Důkladně promíchané vzorky se nechaly stát hodinu ve tmě při pokojové teplotě, poté se přelily do kyvet a měřily při 760 nm proti slepému vzorku. Celkový obsah polyfenolů byl vyjádřen jako obsah ekvivalentu kyseliny gallové (GAE) na 100 ml nebo 100 g vzorku. Pro každý vzorek bylo provedeno celkem 6 paralelních stanovení.

4.2.3 Stanovení celkového obsahu fenolů na mikrotitračních destičkách

Nejprve byl připraven 12 % roztok uhličitanu sodného rozpuštěním 12,007 g v 88 ml destilované vody. Poté bylo naváženo 0,0242 g kyseliny gallové do 100 ml odměrné baňky a objem byl doplněn po rysku demineralizovanou vodou. Do transparentní mikrotitrační destičky s 96 jamkami se pipetovalo nejprve 100 μ l destilované vody do každé jamky. K destilované vodě bylo přidáno 100 μ l každého vzorku, které byly ještě dvakrát zředěny a 25 μ l Folinova-Ciocalteuova činidla (čistého, nezředěného). Kyselina gallová o počáteční koncentraci 200 μ g/ml byla použita jako standard, bylo použito 100 μ l a její koncentrace se 9 krát zředila na polovinu (celkem 2 krát 10 vzorků standardu). Mikrotitrační destička byla vložena do orbitální třepačky (cca 50 ot/min) na 10 minut. Po promísení bylo přidáno 75 μ l připraveného 12 % roztoku uhličitanu sodného a destička byla uložena na 1 hodinu do tmy při teplotě 37 °C.

Poté byla změřena absorbance při 700 nm. Celkový obsah polyfenolů byl vyjádřen jako obsah ekvivalentu kyseliny gallové (GAE) na 100 ml nebo 100 g vzorku.

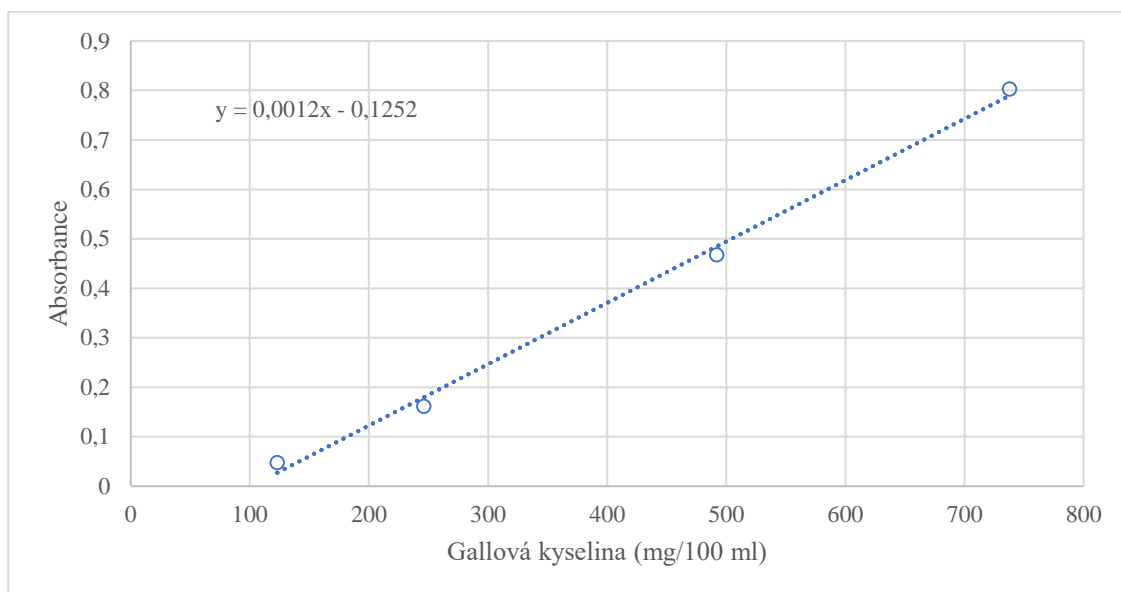
4.2.4 Statistické vyhodnocení dat

Statistické vyhodnocení vzorků bylo provedeno pomocí softwaru R, verze 4.0.2 (<https://www.r-project.org/>). Výsledky testování hypotéz byly vyhodnocovány na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Normalita dat (jednotlivých proměnných) byla určena pomocí Shapiro-Wilkova testu. Jelikož data neměla normální rozdělení, byly hypotézy testovány pomocí neparametrických testů. Pro porovnání metod měření v kyvetách a v mikrotitrační destičce byl použit Kruskalův-Wallisův test (nazýván také jednofaktorová neparametrická ANOVA). Wilcoxonův dvouvýběrový test byl použit pro zjištění rozdílů mezi vzorky různě připravovaných zelených čajů (čaj 80 °C a čaj 100 °C vodou) a džusů (džus a fresh). Pro tento test byla použita společně data z obou metod, aby se zvýšil počet pozorování ($n = 21$ pro čaje a $n = 21$ pro džusy) a tím i věrohodnost výsledků testu.

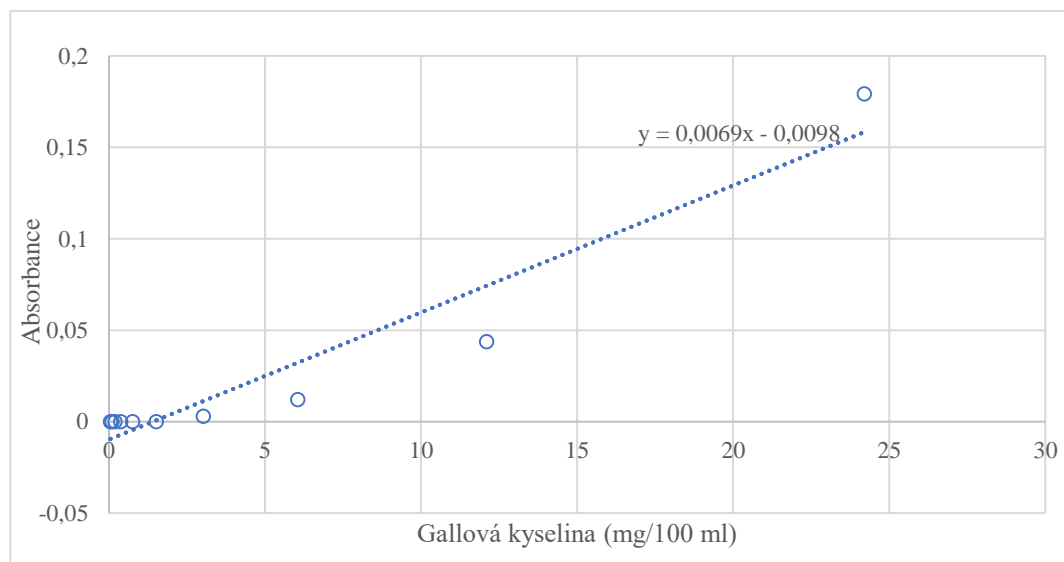
5 Výsledky

5.1 Porovnání metod stanovení celkového obsahu fenolů

Z naměřených absorbancí roztoků gallové kyseliny byla sestrojena kalibrační křivka (Graf 1), na základě které byl vypočten obsah ekvivalentů gallové kyseliny (GAE) na 100 ml (příp. 100 g) u jednotlivých vzorků měřených v kyvetách. Obdobná kalibrační křivka (Graf 2) byla sestrojena i pro vzorky měřené na mikrotitrační destičce.



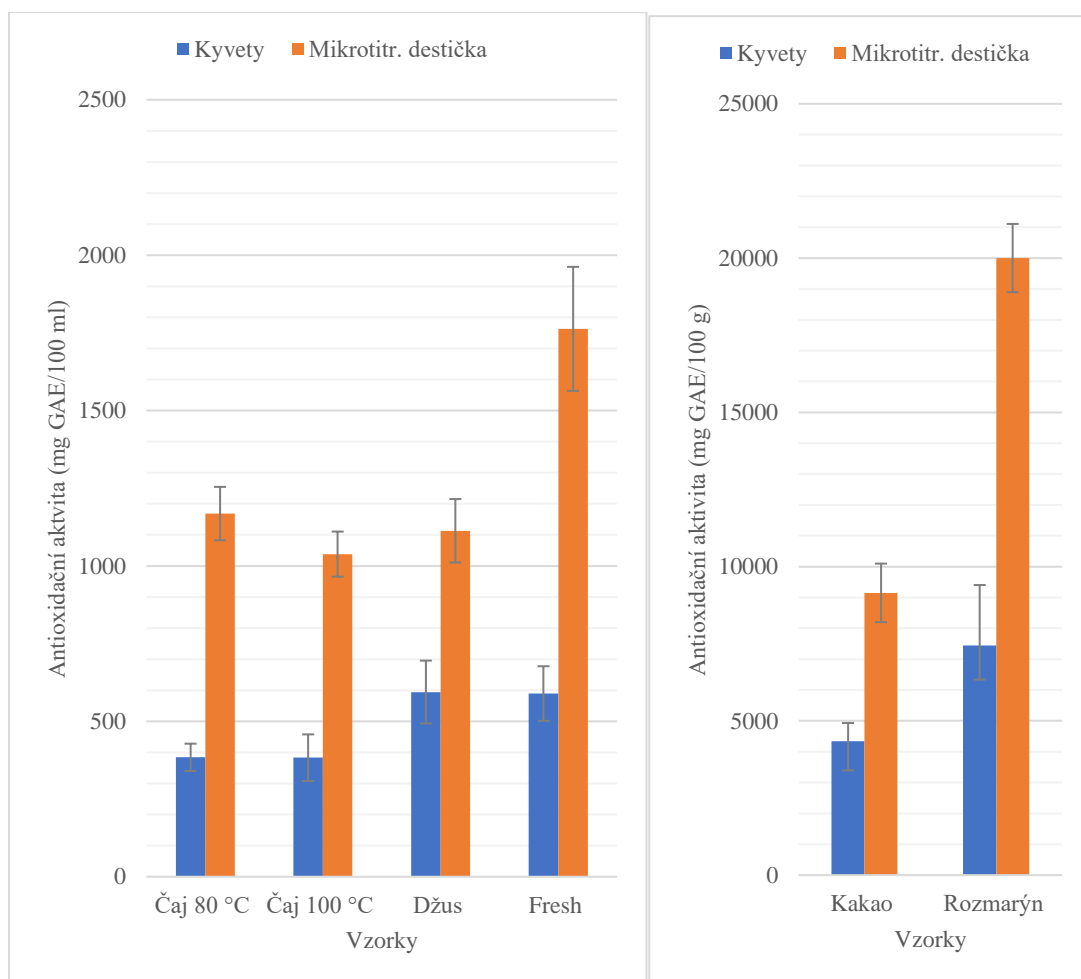
Graf 1 Kalibrační křivka gallové kyseliny pro stanovení v kyvetách



Graf 2 Kalibrační křivka gallové kyseliny pro stanovení na mikrotitrační destičce

Jak je patrné na Grafu 3, jak při stanovení celkového obsahu fenolů v kyvetách, tak při jeho stanovení na mikrotitračních destičkách se antioxidační aktivita zeleného čaje zalitého vodou o teplotě 80 °C téměř nelišila od čaje zalitého vařící vodou. To samé platilo pro čerstvě

vymačkanou šťávu z pomeranče a koupený pomerančový džus. Rozmarýn vykazoval větší antioxidační aktivitu než kakao.



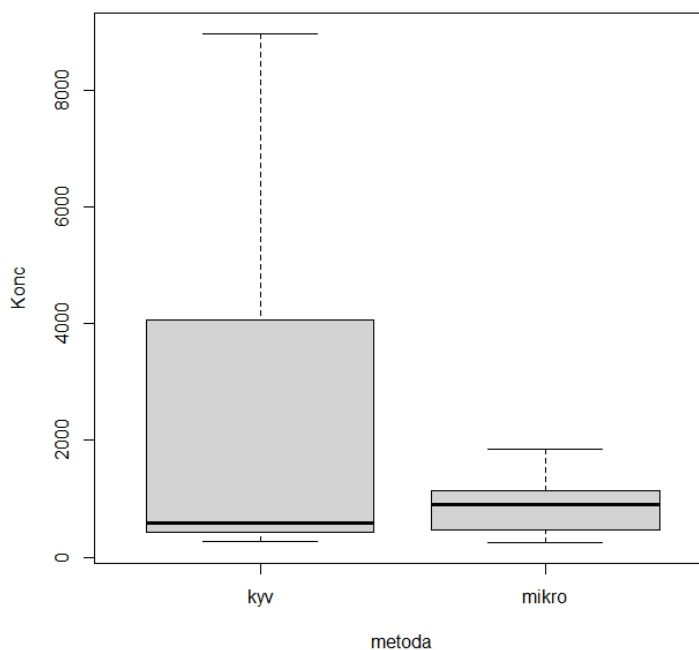
Grafy 3 Porovnání celkového obsahu fenolů stanoveného dvěma způsoby (GAE, ekvivalent gallové kyseliny)

Z Grafu 3 je také zřejmé, že naměřené hodnoty na mikrotitračních destičkách jsou přibližně dvakrát větší než hodnoty naměřené klasickou metodou stanovení polyfenolů v kyvetách.

5.2 Statistické vyhodnocení dat

5.2.1 Porovnání metod na mikrotitrační destičce a v kyvetách

Rozdíl mezi oběma metodami nebyl statisticky významný ($p = 0,9617$). Rozsah koncentrací pro jednotlivé metody je patrný z Obrázku 5.

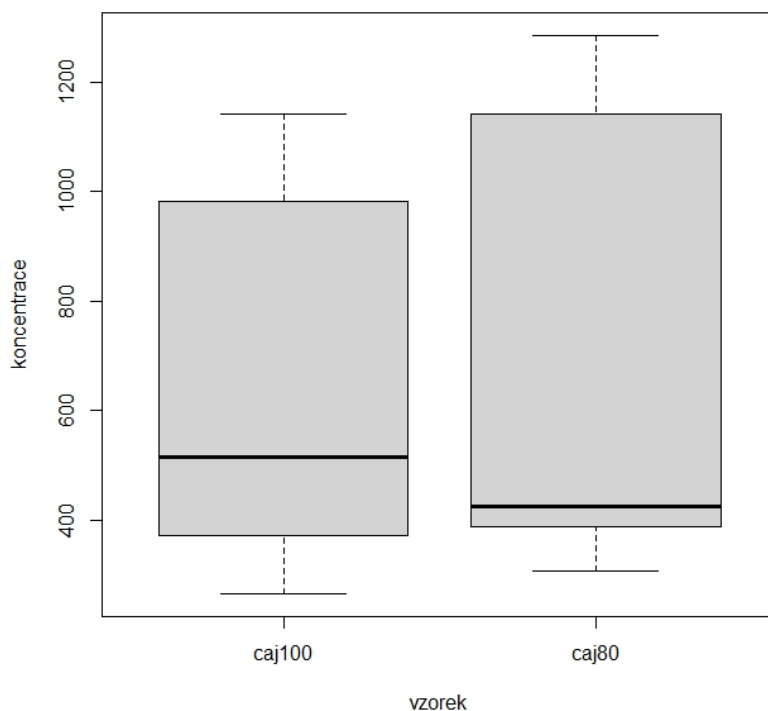


Obrázek 5 Porovnání metod

(konc, mg GAE/100 ml nebo g; kyv, metoda v kyvetách; mikro, metoda na mikrotitrační destičce; spodní vodorovná čára, minimum; spodní hrana obdélníka, 25% kvantil; tlustá čára, medián; horní hrana obdélníka, 75% kvantil; horní vodorovná čára, maximum)

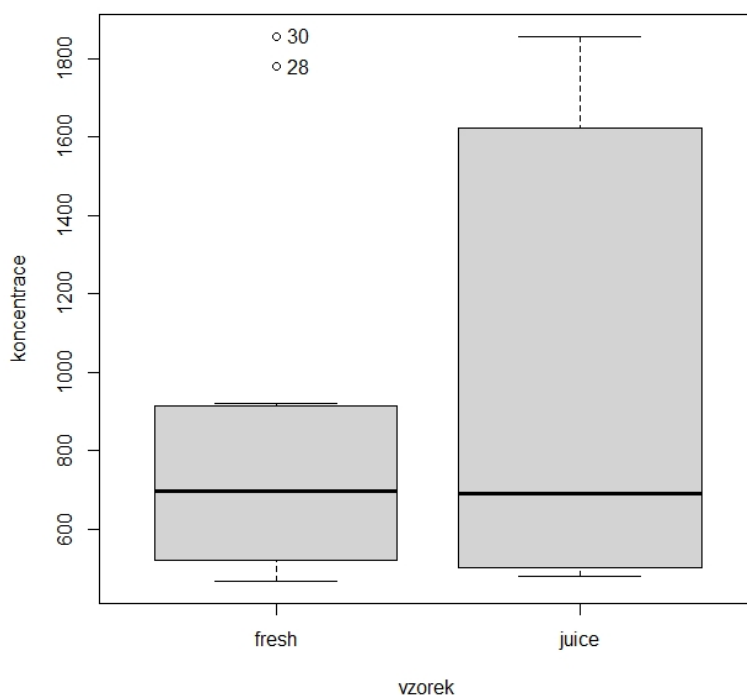
5.2.2 Porovnání vzorků čajů a džusů

Pro porovnání vzorků byly sloučeny výsledky obou metod, aby se zvýšil počet pozorování. To bylo provedeno kvůli zvýšení důvěryhodnosti výsledků testů z důvodu zvýšení počtu pozorování a také neprokázání statisticky významného rozdílu mezi metodami u těchto vzorků. Rozdíl antioxidační aktivity mezi čaji zalitými vodou o různé teplotě (80 °C a 100 °C) nebyl prokázán (p -hodnota = 0,7045; Obrázek 6), stejně tak nebyl prokázán rozdíl mezi koupeným džusem a čerstvě vymačkanou šťávou z pomeranče (p -hodnota = 0,9170; Obrázek 7)



Obrázek 6 Porovnání vzorků zeleného čaje

(caj100, čaj zalitý vařící vodou; caj80, čaj zalitý vodou o teplotě 80 °C; koncentrace, mg GAE/100 ml vzorku; spodní vodorovná čára, minimum; spodní hrana obdélníka, 25% kvantil; tlustá čára, medián; horní hrana obdélníka, 75% kvantil; horní vodorovná čára, maximum)



Obrázek 7 Porovnání džusů

(fresh, čerstvě vymačkaná šťáva z pomeranče; juice, kupovaný pomerančový džus; koncentrace, mg GAE/100 ml vzorku; spodní vodorovná čára, minimum; spodní hrana obdélníka, 25% kvantil; tlustá čára, medián; horní hrana obdélníka, 75% kvantil; horní vodorovná čára, maximum)

6 Diskuze

Antioxidační aktivita použitých vzorků byla měřena stejnou metodou v několika literárních zdrojích, ale s odlišnými výsledky. Například ve studii od Almajano et al. (2008) bylo v kyvetách naměřeno $208,3 \pm 5,13$ mg GAE/100 ml zeleného čaje (což je skoro polovina hodnoty naměřené v kyvetách v této práci – $384,2 \pm 44$ mg GAE/100 ml zeleného čaje zalitého vodou o teplotě $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $383,1 \pm 75$ GAE/100 ml čaje zalitého vroucí vodou), zatímco Atoui et al. (2005) naměřili v kyvetách téměř dvojnásobek, tedy $506,7 \pm 13,3$ mg GAE/100 ml zeleného čaje. Ve výzkumu Farcas et al. (2015) bylo naměřeno $45,90 \pm 1,95$ mg GAE/100 ml zeleného čaje. Ve většině studií na měření obsahu TPC zeleného čaje je obsah GAE uveden na jednotku hmotnosti, výsledné hodnoty naměřené v této práci pro zelený čaj zalitý vodou o teplotě $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ jsou $439,08 \pm 50,27$ mg GAE/g v kyvetě a $1335,51 \pm 98,18$ mg GAE/g v mikrotitrační destičce. Pro zelený čaj zalitý vroucí vodou jsou výsledné hodnoty $437,81 \pm 85,70$ mg GAE/g v kyvetě a $1186,28 \pm 83,03$ mg GAE/g na mikrotitrační destičce. Výsledné hodnoty antioxidační aktivity zeleného čaje jsou velmi rozdílné u různých autorů, naměřené hodnoty jsou $173,16$ mg GAE/g biomasy (Bharti & Singh 2020), $26,33 \pm 1,73$ mg GAE/g extraktu (Nibir et al. 2017), $334,19 \pm 6,0$ mg GAE/g extraktu (Baldemir et al. 2017), $2348,6 \pm 69,9$ mg GAE/g sušiny (Shaheen et al. 2016) a $513,4 \pm 25,7$ mg GAE/g sušiny (Pekal et al. 2012).

Obsah živin a antioxidantů v pomerančích a výrobcích z nich je ovlivněn odrůdou a dobou sklizně. Tím se zabývali Mennah-Govela & Bornhorst (2017) a měřili celkovou antioxidační aktivitu čerstvě vymačkaných šťáv z pomerančů pomocí F-C činidla na mikrotitračních destičkách. Jejich naměřené hodnoty byly v rozmezí $55,1 - 80,0$ mg GAE/100 ml se v porovnání s výsledky v této práci velice lišily (až dvacetkrát nižší hodnoty než $1762,9 \pm 199,5$ mg GAE/100 ml čerstvě vymačkané pomerančové šťávy). Podobné hodnoty naměřil v kyvetách i Rekha et al. (2012), kde šťáva ze zralého pomeranče obsahovala 82 mg GAE/100 ml a 96 mg GAE/100 ml šťávy z nezralého pomeranče. Tyto vzorky však byly ponořeny na 1 minutu do vodní lázně s vařící vodou.

Ke stanovení antioxidační aktivity vzorků v pevném skupenství se k extrakci používají různá rozpouštědla. Bývá tomu tak i v případě kakaa. S použitím hexanalů bylo ve studii Bubonja-Sonje et al. (2011) na mikrotitrační destičce naměřeno 3248 mg GAE/100 g kakaa (asi 3krát méně než v této práci – $9148,2$ mg GAE/100 g vzorku). Cádiz-Gurrea et al. (2017) naopak naměřili na mikrotitrační destičce několikanásobně vyšší hodnoty ($75\ 833 \pm 8\ 250$ mg GAE/100 g kakaa) s použitím dimethylsulfoxidu jako rozpouštědla.

Ze všech použitých vzorků v této práci se nejčastěji měří antioxidační aktivita rozmarýnu pomocí F-C činidla. Bubonja-Sonje et al. (2011) s použitím metanolu jako rozpouštědla naměřili celkový obsah polyfenolů u rozmarýnu na mikrotitrační destičce $45\ 000$ mg GAE/100 g sušiny (přibližně dvakrát větší než hodnoty naměřené v této práci – $20000,6 \pm 1105,6$ mg/100 g). Stejně rozpouštědlo bylo použito také ve studii Shan et al. (2005), ve které byl v kyvetách naměřen celkový obsah polyfenolů 5070 ± 36 mg GAE/100 g sušiny a ve výzkumu Zheng & Wang (2001) bylo naměřeno stejným způsobem 219 ± 15 mg GAE/100 g čerstvé hmotnosti rozmarýnu. Ve studii od Tawaha et al. (2007) byl jako rozpouštědlo použit také metanol ($3\ 910 \pm 360$ mg/100 g sušiny) a také voda ($4\ 890 \pm 230$ mg GAE/100 g sušiny) pro stanovení celkového obsahu fenolů v rozmarýnu v kyvetách. Dále byl v kyvetách opět porovnáván vliv

použitého rozpouštědla na celkový obsah fenolů kolektivem Moreno et al. (2006). Celkový obsah polyfenolů byl při použití metanolu $12\,000 \pm 5\,000$ mg GAE/100 g sušiny, vody $3\,000 \pm 2\,000$ mg/100 g sušiny a acetonu $19\,000 \pm 8\,000$ mg GAE/100 g sušiny rozmarýnu. Yi & Wetzstein (2011) také měřili TPC rozmarýnu a byl porovnáván metanol (3 960 mg GAE/100 g sušiny) a etanol (3 430 mg GAE/100 g sušiny) a jejich extrakční účinky. Rodríguez-Rojo et al. (2012) porovnávali na mikrotitračních destičkách antioxidační aktivitu s použitím etanolu a vody jako rozpouštědel čerstvých listů rozmarýnu (voda 55 ± 11 mg GAE/100 g, etanol 45 ± 6 mg GAE/100 g), listů zbavených oleje (voda 96 ± 9 mg GAE/100 g, etanol 129 ± 8 mg GAE/100 g) a rozemletých listů zbavených oleje (voda 770 ± 90 , etanol 260 ± 70). Etanol byl jako rozpouštědlo také použit ve studii od Hendel et al. (2016), kde bylo naměřeno 12 900 mg GAE/100 g sušiny (způsob měření není uveden). Gallego et al. (2013) také použili celkový obsah fenolů v rozmarýnu při použití etanolu jako rozpouštědla na mikrotitračních destičkách a naměřili $21\,900 \pm 610$ mg GAE/100 g listů rozmarýnu a $19\,800 \pm 1\,450$ mg GAE/100 g stonků rozmarýnu. Celkový obsah fenolů ve vzorcích rozmarýnu extrahovaného ve vodě byl Dormanem et al. (2003) měřen v kyvetách a výsledné hodnoty byly 18 500 mg GAE/100 g sušiny.

Odlišnost výsledků stanovení celkového obsahu fenolů lze vysvětlit několika způsoby. Každý vzorek může mít jiné vlastnosti a způsob přípravy. Velký vliv mohou mít i vlivy prostředí, jako jsou klimatické podmínky a agrotechnické postupy při pěstování. Může se lišit metodika stanovení, způsob a doba extrakce vzorků (Cádiz-Gurrea et al. 2017) a výběr rozpouštědla (Pérez et al. 2007). Obsah polyfenolů a jejich antioxidační aktivita může být také ovlivněna teplotou a délkou doby skladování vzorků (Klimczak et al. 2007). Rozdílné výsledky mohou vznikat také odlišným způsobem měření, kdy v kyvetách prochází světelný paprsek jejich paralelními stěnami, zatímco na mikrotitračních destičkách prochází povrchem kapaliny vzorku (Cottingham et al. 2004).

Zalítí zeleného čaje vařící vodou může snížit jeho antioxidační aktivitu, ale jen v nepatrném množství. Čerstvě vymačkaná šťáva z pomeranče mohla být ovlivněna působením vzduchu a tím může snížena její antioxidační aktivita. Dle obou metod má rozmarýn přibližně dvakrát větší obsah polyfenolů než kakao, ale hmotnost jedné porce je naopak téměř zanedbatelná na rozdíl od jedné porce kakaa.

U použitých vzorků nebyla v literatuře nalezena žádná porovnání pro stanovení TPC s použitím stejné metody pro měření v kyvetách a mikrotitračních destičkách. Ve studii od Attard (2013) byly porovnávány tyto metody měřením antioxidační aktivity rostlinných extraktů (slupky lilku, pomerančové slupky a listy olivovníku), kde bylo zjištěno, že je mezi výsledky metod měření významná korelace. Při porovnávání antioxidační aktivity u džusů z bobulového ovoce byly získané údaje z metod v kyvetách a mikrotitračních destičkách srovnatelné (Horszwald & Andlauer 2011). Ani Magalhães et al. (2010) nezjistili rozdíl mezi těmito dvěma metodami.

7 Závěr

- Antioxidanty jsou velmi různorodé látky s odlišnými vlastnostmi a jejich měření pouze jedním způsobem je téměř nemožné. Proto bylo vyvinuto a neustále je vylepšováno velké množství odlišných metod a pro získání přesnějších výsledků se doporučuje použití alespoň dvou různých metod.
- Nejčastěji používané (dle počtu citací) jsou tyto tři metody v pořadí podle klesající frekvence: DPPH > vychytávání hydroxylových radikálů > vychytávání superoxidových radikálů. Ze všech *in vitro* metod je metoda DPPH nejjednodušší a přiměřeně nákladná.
- Z výsledků praktické části vyplývá, že celkový obsah fenolů měřený měřený na mikrotitračních destičkách byl přibližně dvojnásobně vyšší než při použití kyvet.
- Průměrná antioxidační aktivita vzorků je sestupně: fresh > džus > čaj 80 °C > čaj 100 °C (vyjádřeno na objem vzorku) a rozmarýn > kakao (vyjádřeno na hmotnost vzorku).
- Dle statistické analýzy se měření v kyvetách a na mikrotitračních destičkách neliší ($p = 0,9617$).
- Celkový obsah polyfenolů v zelených čajích zalitých vodou různé teploty se neliší ($p = 0,7045$), stejně tak se neliší ani celkový obsah fenolů mezi kupovaným pomerančovým džusem a čerstvě vymačkanou šťávou z pomeranče ($p = 0,917$).
- Kvůli odlišnosti výsledků metod by bylo vhodné použít větší počet vzorků pro potvrzení výsledků a následně srovnat jiné metody pro stanovení antioxidační aktivity v kyvetách a na mikrotitračních destičkách.
- Metoda na mikrotitračních destičkách je vhodnější k měření velkého množství vzorků za poměrně krátkou dobu. Výhodou je také menší spotřeba chemikálií.

8 Literatura

- Aebi H. 1984. Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology* **105**:121–126.
- Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. 2013. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal* **21**:143–152.
- Almajano MP, Carbó R, Jiménez JAL, Gordon MH. 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry* **108**:55–63.
- Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. 1981. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**:6858–6862.
- Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S & Robards K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* **127**:183-198.
- Apak R, Gorinstein S, Böhm V, Schaich KM, Özyürek M & Güçlü K. 2013. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **85**:957–998.
- Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE. 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**:7970–7981.
- Arnao MB, Cano A, Hernández-Ruiz J, García-Cánovas F, Acosta M. 1996. Inhibition by L-Ascorbic Acid and Other Antioxidants of the 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic Acid) Oxidation Catalyzed by Peroxidase: A New Approach for Determining Total Antioxidant Status of Foods. *Analytical Biochemistry* **236**:255–261.
- Atanasiu RL, Stea D, Mateescu MA, Vergely C, Dalloz F, Briot F, Maupoil V, Nadeau R, Rochette L. 1998. Direct evidence of caeruloplasmin antioxidant properties. *Molecular and Cellular Biochemistry* **189**:127–135.
- Atoui AK, Mansouri A, Boskou G, Kefalas P. 2005. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry* **89**:27–36.
- Attard E. 2013. A rapid microtitre plate Folin-Ciocalteu method for the assessment of polyphenols. *Central European Journal of Biology* **8**:48–53.
- Aubry JM. 1985. Search for Singlet Oxygen in the Decomposition of Hydrogen Peroxide by Mineral Compounds in Aqueous Solutions. *Journal of the American Chemical Society* **107**:5844–5849.
- Baldemir A, Köse NB, İldiz N, İlgün S, Yusufbeyoğlu S, Yılmaz V, Ocoy I. 2017. Synthesis and characterization of green tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) extract and its major

- components-based nanoflowers: A new strategy to enhance antimicrobial activity. *RSC Advances* **7**:44303–44308.
- Barclay LRC, Edwards CE, Vinqvist MR. 1999. Media effects of antioxidant activities of phenols and catechols. *Journal of the American Chemical Society* **121**:6226–6231.
- Becker LB, Vanden Hoek TL, Shao ZH, Li CQ, Schumacker PT. 1999. Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **277**:2240–2246.
- Belščak A, Komes D, Horžić D, Ganić KK, Karlović D. 2009. Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Research International* **42**:707–716.
- Benavente-García O, Castillo J, Lorente J, Ortuño A, Del Rio JA. 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry* **68**:457–462.
- Benzie IFF, Strain JJ. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* **239**:70–76.
- Benzie IFF, Strain JJ. 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology* **299**:15–27.
- Benzie IFF, Szeto YT. 1999. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**:633–636.
- Berker KI, Güllü K, Demirata B, Apak R. 2010. A novel antioxidant assay of ferric reducing capacity measurement using ferrozine as the colour forming complexation reagent. *Analytical Methods* **2**:1770–1778.
- Berker KI, Ozdemir Olgun FA, Ozyurt D, Demirata B, Apak R. 2013. Modified Folin-Ciocalteu antioxidant capacity assay for measuring lipophilic antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**:4783–4791.
- Bharti R, Singh B. 2020. Green tea (*Camellia assamica*) extract as an antioxidant additive to enhance the oxidation stability of biodiesel synthesized from waste cooking oil. *Fuel* **262**:116658. Elsevier.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**:1199–1200.
- Bobo-García G, Davidov-Pardo G, Arroqui C, Vírveda P, Marín-Arroyo MR, Navarro M. 2015. Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **95**:204–209.

- Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• free radical method. *LWT - Food Science and Technology* **30**:609–615.
- Bowry VW, Stocker R. 1993. Tocopherol-mediated peroxidation. The prooxidant effect of vitamin E on the radical-initiated oxidation of human low-density lipoprotein. *Journal of the American Chemical Society* **115**:6029–6044.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food, Science and Technology* **28**:25–30.
- Bubonja-Sonje M, Giacometti J, Abram M. 2011. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry* **127**:1821–1827.
- Burton GW, Ingold KU. 1986. Vitamin E: Application of the Principles of Physical Organic Chemistry to the Exploration of Its Structure and Function. *Accounts of Chemical Research* **19**:194–201.
- Campos AM, Lissi EA. 1997. Kinetics of the reaction between 2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. *International Journal of Chemical Kinetics* **29**:219–224.
- Cao G, Alessio HM, Cutler RG. 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* **14**:303–311.
- Cádiz-Gurrea MDLL, Borrás-Linares I, Lozano-Sánchez J, Joven J, Fernández-Arroyo S, Segura-Carretero A. 2017. Cocoa and grape seed byproducts as a source of antioxidant and anti-inflammatory proanthocyanidins. *International Journal of Molecular Sciences* **18**:1–14.
- Çelik SE, Özyürek M, Güçlü K, Apak R. 2010. Determination of antioxidants by a novel on-line HPLC-cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay with post-column detection. *Analytica Chimica Acta* **674**:79–88.
- Crichton RR, Charlotheaux-Wauters M. 1987. Iron transport and storage. *European Journal of Biochemistry* **164**:485–506.
- Clarkson PM. 1995. Antioxidants and Physical Performance. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **35**:131–141.
- Cottingham MG, Bain CD, Vaux DJT. 2004. Rapid method for measurement of surface tension in multiwell plates. *Laboratory Investigation* **84**:523–529.
- Cross CE, Reznick AZ, Packer L, Davts PA, Suzuki YJ, Halliwell B. 1992. Oxidative damage to human plasma proteins by ozone. *Free Radical Research* **15**:347–352.
- De Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. 1999. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology and Medicine* **26**:202–226.

- Dorman HJD, Peltoketo A, Hiltunen R, Tikkanen MJ. 2003. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chemistry* **83**:255–262.
- Dziedzic SZ, Hudson BJB. 1984. Phosphatidyl ethanolamine as a synergist for primary antioxidants in edible oils. *Journal of the American Oil Chemists Society* **61**:1042–1045.
- Ebermann R, Alth G, Kreitner M, Kubin A. 1996. Natural products derived from plants as potential drugs for the photodynamic destruction of tumor cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **36**:95–97.
- Ehrenwald E, Chisolm GM, Fox PL. 1994. Intact human ceruloplasmin oxidatively modifies low density lipoprotein. *Journal of Clinical Investigation* **93**:1493–1501.
- Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Striegl G, Waeg G. 1991. Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *American Journal of Clinical Nutrition* **53**:314–321.
- Fang YZ, Yang S, Wu G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* **18**:872–879.
- Farcas AC, Socaci SA, Tofana M, Muresan C, Cuceu A, Salanta L, Pop A. 2015. Comparative evaluation of biofunctional compounds content from different herbal infusions. *Bulletin UASVM Food Science and Technology* **72**:237–241.
- Fogliano V, Verde V, Randazzo G, Ritieni A. 1999. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**:1035–1040.
- Folin O, Ciocalteu V. 1927. On Tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry* **73**:627–648.
- Folin O, Denis W. 1912. On Phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *The Journal of Biological Chemistry* **12**:239–243.
- Fox PL, Mukhopadhyay C, Ehrenwald E. 1995. Structure, oxidant activity, and cardiovascular mechanisms of human ceruloplasmin. *Life Sciences* **56**:1749–1758.
- Fu Y, Krasnovsky AA, Foote CS. 1997. Quenching of singlet oxygen and sensitized delayed phthalocyanine fluorescence. *Journal of Physical Chemistry A* **101**:2552–2554.
- Fukuzawa K, Inokami Y, Tokumura A, Terao J, Suzuki A. 1998. Rate constants for quenching singlet oxygen and activities for inhibiting lipid peroxidation of carotenoids and α -tocopherol in liposomes. *Lipids* **33**:751–756.
- Frankel EN, Bosanek CA, Meyer AS, Silliman K, Kirk LL. 1998. Commercial grape juices inhibit the in vitro oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**:834–838.

- Frankel EN, Meyer AS. 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**:1925–1941.
- Gallego MG, Gordon MH, Segovia FJ, Skowrya M, Almajano MP. 2013. Antioxidant properties of three aromatic herbs (rosemary, thyme and lavender) in oil-in-water emulsions. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **90**:1559–1568.
- Gordon MH, Magos P. 1983. The effect of sterols on the oxidation of edible oils. *Food Chemistry* **10**:141–147.
- Grootveld M, Halliwell B. 1987. Measurement of allantoin and uric acid in human body fluids. A potential index of free-radical reactions in vivo? *Biochemical Journal* **243**:803–808.
- Halliwell B. 1995. How to characterize an antioxidant: an update. *Biochemical Society symposium* **61**:73–101.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods in Enzymology* **186**:1–85.
- He Y, Shahidi F. 1997. Antioxidant activity of green tea and its catechins in a fish meat model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**:4262–4266.
- Hellman NE, Gitlin JD. 2002. Ceruloplasmin metabolism and function. *Annual Review of Nutrition* **22**:439–458.
- Hendel N, Larous L, Belbey L. 2016. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its in vitro inhibitory effect on *Penicillium digitatum*. *International Food Research Journal* **23**:1725–1732.
- Hertog MGL, Feskens EJM, Kromhout D, Hollman PCH, Katan MB. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *The Lancet* **342**:1007–1011.
- Hildebrand DH, Terao J, Kito M. 1984. Phospholipids plus tocopherols increase soybean oil stability. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **61**:552–555.
- Horszwald A, Andlauer W. 2011. Characterisation of bioactive compounds in berry juices by traditional photometric and modern microplate methods. *Journal of Berry Research* **1**:189–199.
- Horwitt MK. 1991. Data Supporting Supplementation of humans with vitamin E. *The Journal of Nutrition* **121**:424–429.
- Howie AF, Forrester LM, Glancey MJ, Schlager JJ, Powis G, Beckett GJ, Hayes JD, Wolf CR. 1990. Glutathione S-transferase and glutathione peroxidase expression in normal and tumour human tissues. *Carcinogenesis* **11**:451–458.
- Huang D, Boxin OU, Prior RL. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**:1841–1856.

- Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. 2002. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**:4437–4444.
- Hudson BJB, Mahgoub SEO. 1981. Synergism between phospholipids and naturally occurring antioxidants in leaf lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **32**:208–210.
- Chacón JN, Gaggini P, Sinclair RS, Smith FJ. 2000. Photo- and thermal-oxidation studies on methyl and phenyl linoleate: Anti-oxidant behaviour and rates of reaction. *Chemistry and Physics of Lipids* **107**:107–120.
- Chance B, Sies H, Boveris A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews* **59**:527–605.
- Che Man YB, Tan CP. 1999. Effects of natural and synthetic antioxidants on changes in refined, bleached, and deodorized palm olein during deep-fat frying of potato chips. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **76**:331–339.
- Christodouleas D, Fotakis C, Papadopoulos K, Dimotikali D, Calokerinos AC. 2012. Luminescent methods in the analysis of untreated edible oils: A review. *Analytical Letters* **45**:625–641.
- Işıl Berker K, Güçlü K, Tor I, Demirata B, Apak R. 2010. Total antioxidant capacity assay using optimized ferricyanide/Prussian blue method. *Food Analytical Methods* **3**:154–168.
- Ito N, Hirose M, Fukushima S, Tsuda H, Shirai T, Tatematsu M. 1986. Studies on antioxidants: Their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology* **24**:1071–1082.
- Jagtap UB, Panaskar SN, Bapat VA. 2010. Evaluation of antioxidant capacity and phenol content in jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) fruit pulp. *Plant Foods for Human Nutrition* **65**:99–104.
- Jayaprakasha GK, Singh RP, Sakariah KK. 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry* **73**:285–290.
- Jung MY, Min DB. 1990. Effects of α -, γ -, and δ -Tocopherols on oxidative stability of soybean oil. *Journal of Food Science* **55**:1464–1465.
- Junglee S, Urban L, Sallanon H, Lopez-Lauri F. 2014. Optimized assay for hydrogen peroxide determination in plant tissue using potassium iodide. *American Journal of Analytical Chemistry* **05**:730–736.
- Kadnikova EN, Kostić NM. 2002. Oxidation of ABTS by hydrogen peroxide catalyzed by horseradish peroxidase encapsulated into sol-gel glass. Effects of glass matrix on reactivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **18**:39–48.
- Kagan VE, Tyurina YY. 1998. Recycling and Redox Cycling of Phenolic Antioxidants. *ANNALS of the New York Academy of Sciences* **854**:425–434.

- Kakkar P, Das B, Viswanathan PN. 1984. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* **21**:130–132.
- Kanner J, German JB, Kinsella JE. 1987. Initiation of Lipid Peroxidation in Biological Systems. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **25**:317–364.
- Karlsson K, Sandström J, Edlund A, Edlund T, Marklund SL. 1993. Pharmacokinetics of extracellular-superoxide dismutase in the vascular system. *Free Radical Biology and Medicine* **14**:185–190.
- Kelley EE, Wagner BA, Buettner GR, Burns CP. 1999. Nitric oxide inhibits iron-induced lipid peroxidation in HL-60 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **370**:97–104.
- Keys S, William Z. 1999. Antioxidant activity of retinol, glutathione, and taurine in bovine photoreceptor cell membranes. *Experimental Eye Research* **68**:693–702.
- Kirkman HN, Galiano S, Gaetani GF. 1987. The function of catalase-bound NADPH. *Journal of Biological Chemistry* **262**:660–666.
- Klimczak I, Małecka M, Szlachta M, Gliszczyńska-Świgło A. 2007. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis* **20**:313–322.
- Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. 1994. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biology and Medicine* **16**:149–156.
- Koshiishi I, Mamura Y, Liu J, Imanari T. 1998. Evaluation of an acidic deproteinization for the measurement of ascorbate and dehydroascorbate in plasma samples. *Clinical Chemistry* **44**:863–868.
- Lambert JD, Elias RJ. 2011. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. *Arch Biochem Biophys* **501**:65–72.
- Laughton MJ, Halliwell B, Evans PJ, Robin J, Houlst S. 1989. Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochemical Pharmacology* **38**:2859–2865.
- Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY. 2003. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**:7292–7295.
- Levine M. 1994. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **314**:605–613.
- Levine M, Rumsey SC, Daruwala R, Park JB, Wang Y. 1999. Criteria and recommendations for vitamin C intake. *Journal of the American Medical Association* **281**:1415–1423.
- Liou W, Chang LY, Geuze HJ, Strous GJ, Crapo JD, Slot JW. 1993. Distribution of CuZn superoxide dismutase in rat liver. *Free Radical Biology and Medicine* **14**:201–207.

- Litwinienko G, Ingold KU. 2003. Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstractions. 1. The reactions of phenols with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (dpph•) in alcohols. *Journal of Organic Chemistry* **68**:3433–3438.
- Magalhães LM, Santos F, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC. 2010. Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta* **83**:441–447.
- Marinova EM, Yanishlieva NV. 1996. Antioxidative activity of phenolic acids on triacylglycerols and fatty acid methyl esters from olive oil. *Food Chemistry* **56**:139–145.
- Martinez GR, Ravanat JL, Medeiros MHG, Cadet J, Di Mascio P. 2000. Synthesis of a naphthalene endoperoxide as a source of ¹⁸O-labeled singlet oxygen for mechanistic studies. *Journal of the American Chemical Society* **122**:10212–10213.
- May JM, Cobb CE, Mendiratta S, Hill KE, Burk RF. 1998a. Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. *Journal of Biological Chemistry* **273**:23039–23045.
- May JM, Qu ZC, Mendiratta S. 1998b. Protection and recycling of α -tocopherol in human erythrocytes by intracellular ascorbic acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **349**:281–289.
- McDonald S, Prenzler PD, Antolovich M, Robards K. 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry* **73**:73–84.
- Mennah-Govela YA, Bornhorst GM. 2017. Fresh-Squeezed Orange Juice Properties Before and During In Vitro Digestion as Influenced by Orange Variety and Processing Method. *Journal of Food Science* **82**:2438–2447.
- Meyer AS, Rørbæk K, Adler-Nissen J. 1994. Critical assessment of the applicability of superoxide dismutase as an antioxidant in lipid foods. *Food Chemistry* **51**:171–175.
- Miller NJ, Diplock AT, Rice-Evans CA. 1995. Evaluation of the Total Antioxidant Activity as a Marker of the Deterioration of Apple Juice on Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**:1794–1801.
- Miller NJ, Sampson J, Candeias LP, Bramley PM, Rice-Evans CA. 1996. Antioxidant properties of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters* **384**:240–242.
- Moos T, Nielsen TR, Skjørringe T, Morgan EH. 2007. Iron trafficking inside the brain. *Journal of Neurochemistry* **103**:1730–1740.
- Moreno S, Scheyer T, Romano CS, Vojnov AA. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research* **40**:223–231.
- Neužil J, Thomas SR, Stocker R. 1997. Requirement for, promotion, or inhibition by α -tocopherol of radical-induced initiation of plasma lipoprotein lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine* **22**:57–71.

- Nibir YM, Sumit AF, Akhand AA, Ahsan N, Hossain MS. 2017. Comparative assessment of total polyphenols, antioxidant and antimicrobial activity of different tea varieties of Bangladesh. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **7**:352–357. Elsevier B.V.
- Nishiike T, Kondo S, Yamamoto T, Shigeeda A, Yamamoto Y, Takamura H, Matoba T. 1997. Effects of metal ions and pH on the stability of linoleic acid hydroperoxide in the water phase. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **61**:1973–1976.
- Ou B, Hampsch-woodill M, Flanagan J, Deemer EK, Prior RL, Huang D. 2002b. Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**:2772–2777.
- Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. 2002a. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**:3122–3128.
- Özyürek M, Güçlü K, Tütem E, Başkan KS, Ercag E, Çelik SE, Baki S, Yildiz L, Karaman S, Apak. 2011. A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical Methods* **3**:2439–2453.
- Pandey KB, Mehdi MM, Maurya PK, Rizvi SI. 2010. Plasma protein oxidation and its correlation with antioxidant potential during human aging. *Disease Markers* **29**:31–36.
- Paulová H, Bochořáková H & Táborská E. 2004. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek *in vitro*. *Chem. Listy* **98**:174-179.
- Pekal A, Drozd P, Pyrzynska K. 2012. Comparison of the antioxidant properties of commonly consumed commercial teas. *International Journal of Food Properties* **15**:1101–1109.
- Pérez MB, Calderón NL, Croci CA. 2007. Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food Chemistry* **104**:585–592.
- Polimerek. 2006. Commons.wikimedia.org: File:Alpha-carotene.png. Wikipedia. Available from <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Alpha-carotene.png> (accessed May 2006)
- Pourcelot S, Faure H, Firoozi F, Ducros V, Tripier M, Hee J, Cadet J, Favier A. 1999. Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine and 5-(hydroxymethyl) uracil in smokers. *Free Radical Research* **30**:173–180.
- Ramirez-Sanchez I, Maya L, Ceballos G, Villarreal F. 2010. Fluorescent detection of (-)-epicatechin in microsamples from cacao seeds and cocoa products: Comparison with Folin-Ciocalteu method. *Journal of Food Composition and Analysis* **23**:790–793. Elsevier Inc. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2010.03.014>.
- Rao MNA., Kunchandy E. 1990. Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *International Journal of Pharmaceutics* **58**:237–240.

- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* **26**:1231–1237.
- Rekha C, Poornima G, Manasa M, Abhipsa V, Devi JP, Kumar HTV, Kekuda TRP. 2012. Ascorbic acid, total phenol content and antioxidant activity of fresh juices of four ripe and unripe citrus fruits. *Chemical Science Transactions* **1**:303–310.
- Riedl A, Shamsi Z, Anderton M, Goldfarb P, Wiseman A. 1996. Differing features of proteins in membranes may result in antioxidant or prooxidant action: Opposite effects on lipid peroxidation of alcohol dehydrogenase and albumin in liposomal systems. *Redox Report* **2**:35–40.
- Rodríguez-Rojo S, Visentin A, Maestri D, Cocero MJ. 2012. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *Journal of Food Engineering* **109**:98–103.
- Roura E, Andrés-Lacueva C, Estruch R, Lamuela-Raventós RM. 2006. Total polyphenol intake estimated by a modified Folin–Ciocalteu assay of urine. *Clinical Chemistry* **52**:749–752.
- Ruch RJ, Cheng S jun, Klaunig JE. 1989. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from chinese green tea. *Carcinogenesis* **10**:1003–1008.
- Salah N, Miller NJ, Paganga G, Tijburg L, Paul Bolwell G, Riceevans C. 1995. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants **322**:339-346.
- Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **76**:270–276.
- Sánchez-Rangel JC, Benavides J, Heredia JB, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velázquez DA. 2013. The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods* **5**:5990–5999.
- Seeram NP, Henning SM, Niu Y, Lee R, Scheuller HS, Heber D. 2006. Catechin and caffeine content of green tea dietary supplements and correlation with antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**:1599–1603.
- Shaheen N, Tukun AB, Islam S, Irfan NM, Khan IN, Hasan T. 2016. Evaluation of functional potentiality of selected commonly consumed foods of Bangladesh. *Functional Foods in Health and Disease* **6**:735-753.
- Shahidi F. 2000. Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung - Food* **44**:158–163.
- Shan B, Cai YZ, Sun M, Corke H. 2005. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**:7749–7759.
- Schlesier K, Harwat M, Böhm V, Bitsch R. 2002. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research* **36**:177–187.

- Schwarz K et al. 2001. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *European Food Research and Technology* **212**:319–328.
- Sies H, Stahl W. 2004. Carotenoids and UV protection. *Photochemical & Photobiological Sciences* **3**:749-752.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. 1999. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology* **299**:152–178.
- Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **16**:144-158.
- Stohs SJ, Bagchi D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine* **18**:321–336.
- Stratil P, Kubáň V, Fojtová J. 2008. Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods. *Czech Journal of Food Sciences* **26**:242–253.
- Strube M, Haenen GRMM, Van Den Berg H, Bast A. 1997. Pitfalls in a method for assessment of total antioxidant capacity. *Free Radical Research* **26**:515–521.
- Subhashini R, Mahadeva Rao US, Sumathi P, Gunalan G. 2010. A comparative phytochemical analysis of cocoa and green tea. *Indian Journal of Science and Technology* **3**:188–192.
- Swann IL, Kendra JR. 1998. Anaemia, vitamin E deficiency and failure to thrive in an infant. *Clinical and Laboratory Haematology* **20**:61–63.
- Takahashi K, Cohen HJ. 1986. Selenium-dependent glutathione peroxidase protein and activity: immunological investigations on cellular and plasma enzymes. *Blood* **68**:640–645.
- Tawaha K, Alali FQ, Gharaibeh M, Mohammad M, El-Elimat T. 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry* **104**:1372–1378.
- Teissedre PL, Frankel EN, Waterhouse AL, Peleg H, German JB. 1996. Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **70**:55–61.
- Thomas SR, Neuzil J, Stocker R. 1996. Cosupplementation with coenzyme Q prevents the prooxidant effect of α -tocopherol and increases the resistance of LDL to transition metal-dependent oxidation initiation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **16**:687–696.
- Tomšej J. 2017. Tokoferoly a jejich funkce v antioxidačním systému rostlin [BSc. Thesis]. Masarykova univerzita, Brno.

- Tutem E, Apak R, Baykut F. 1991. Spectrophotometric determination of trace amounts of copper(I) and reducing agents with neocuproine in the presence of copper(II). *Analyst* **116**:89–94.
- Uranoso S, Inomoris Y, Katos Y, Hasegawas Y, Matsuos M. 1992. Vitamin E: Inhibition of retinol-induced hemolysis and membrane-stabilizing behavior. *The Journal of Biological Chemistry* **267**:18356–18370.
- Vejražka M. 2009. Wikiskripta.eu: Soubor:Oxidace kyseliny askorbové.png. WikiSkripta. Available from https://www.wikiskripta.eu/w/Soubor:Oxidace_kyseliny_askorbov%C3%A9.png (accessed October 2009)
- Wanasundara UN, Shahidi F. 1998. Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chemistry* **63**:335–342.
- Ward PP, Paz E, Conneely OM. 2005. Multifunctional roles of lactoferrin: A critical overview. *Cellular and Molecular Life Sciences* **62**:2540–2548.
- Waterhouse AL. 2002. Determination of total phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* **6**:1–8.
- White PJ, Artrong LS. 1986. Effect of selected oat sterols on the deterioration of heated soybean oil. *Journal of the American Oil Chemist's Society* **63**:525–529.
- Worwood M. 1979. Serum Ferritin. *CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **24**:171–204.
- Yamashita N, Murata M, Inoue S, Burkitt MJ, Milne L, Kawanishi S. 1998. α -Tocopherol induces oxidative damage to DNA in the presence of copper(II) ions. *Chemical Research in Toxicology* **11**:855–862.
- Yi W, Wetzstein HY. 2011. Effects of drying and extraction conditions on the biochemical activity of selected herbs. *HortScience* **46**:70–73.
- Yoshida Y, Niki E. 2003. Antioxidant effects of phytosterol and its components. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **49**:277–280.
- Young IS, Woodside JV. 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology* **54**:176–186.
- Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B. 2003. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: Potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radical Biology and Medicine* **34**:1359–1368.
- Zheng W, Wang SY. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**:5165–5170.

Zigman S. 2000. Lens UVA photobiology. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* **16**:161–165.

Żyżelewicz D, Krysiak W, Oracz J, Sosnowska D, Budryn G, Nebesny E. 2016. The influence of the roasting process conditions on the polyphenol content in cocoa beans, nibs and chocolates. *Food Research International* **89**:918–929.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid
ABAP	2,2'-azobis(2-aminopropan)hydrochlorid
ABTS	kyselina 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová)
AH	primární antioxidant
BHA	butylhydroxyanisol
BHT	butylhydroxytoluen
CUPRAC	snížení antioxidační kapacity pomocí měďnatých iontů (cupric reducing antioxidant capacity)
DHR	dihydroxyrhodamin
DMPD	N, N-dimethyl- <i>p</i> -fenylendiamin
DPPH	2,2-di(4- <i>terc</i> -oktylfenyl)-1-pikrylhydrazyl
DTPA	kyselina diethylentriaminpentaoctová
EC	epikatechin
ECG	epikatechin galát
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGC	epogalokatechin
EGCG	epigalokatechin galát
ET	přenos elektronů (electron transfer)
F-C	Folin-Ciocalteu
FRAP	snížení antioxidační kapacity pomocí železitých iontů (ferric reducing antioxidant power)
FZ	ferrozin
GAE	ekvivalenty gallové kyseliny (gallic acid equivalents)
GR	glutathion reduktáza
GSH	glutathion
GSSG	glutathion disulfid
HAT	přenos atomů vodíku (hydrogen atom transfer)
IC ₅₀	polovina maximální inhibiční koncentrace
L•	allylový radikál
LDL	lipoprotein o nízké hustotě (low-density lipoprotein)
LH	molekula substrátu (např. lipid)
LOO•	lipidový peroxidový radikál
LOOH	lipidový hydroperoxid
MDA	malondialdehyd
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
Nc	neocuproin
ORAC	kapacita absorpce kyslíkových radikálů (oxygen radical absorption capacity)
PG	propylgalát
PMC	2,2,5,7,8-pentamethyl-chromanol
RCS	reaktivní formy chloru
RNS	reaktivní formy dusíku

ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
R•	oxidační radikál
RP	reducing power
R-PE	R-fykoerythrin
SIN-1	3-morfolino-sydnonimin
SOD	superoxid dismutáza
TAC	celková antioxidační kapacita (total antioxidant capacity)
TBA	kyselina thiobarbiturová
TBARS	kyselina thiobarbiturová (reaktivní)
TBHQ	<i>tert</i> -butylhydrochinon
TE	ekvivalent Troloxu
TEAC	trolox-ekvivalentní antioxidační kapacita (trolox equivalent antioxidant capacity)
TPC	celkový počet fenolických sloučenin (total phenolic compounds)
TPTZ	chlorid 2,3,5-trifenyl-1,3,4-triaza-2-azoniacyklopenta-1,4-dien/(2,4,6-tripyridyl-s-triazin)
TRAP	antioxidační parametr popisující vychytávání radikálů (total radical-trapping antioxidant parameter)
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina