

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



Molekulární vodík – nejlepší antioxidant?

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:

Bc. Michaela Reblová

Studijní obor:

Analytická chemie

Forma studia:

Prezenční

Vedoucí práce:

doc. Ing. David Milde, Ph.D.

Olomouc 2017

Bibliografická identifikace:

Autor: Michaela Reblová

Název práce: Molekulární vodík – nejlepší antioxidant?

Typ práce: Diplomová

Vedoucí práce: doc. Ing. David Milde, Ph.D.

Pracoviště: Katedra analytické chemie

Rok obhajoby práce: 2017

Klíčová slova: Volné radikály, antioxidanty, molekulární vodík, antioxidační aktivita, DPPH, FRAP

Počet stran: 64

Počet příloh: 1

Jazyk: Český

Bibliographical identification:

Autor: Michaela Reblová

Title: Molecular hydrogen – the best antioxidant?

Type of thesis: Diploma

Supervisor: doc. Ing. David Milde, Ph.D.

Department: Department of Analytical Chemistry

The year of presentation: 2017

Keywords: Free radicals, antioxidants, molecular hydrogen, total antioxidant activity, DPPH, FRAP

Number of pages: 64

Number of appendices: 1

Language: Czech

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Molekulární vodík – nejlepší antioxidant vypracovala sama pod vedením pana doc. Ing. Davida Mildeho, Ph.D. Tato práce byla napsána za pomoci odborné literatury a dalších informačních zdrojů. Všechny citace jsou uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

V Olomouci dne

Podpis: _____
Michaela Reblová

Poděkování

Nejprve bych ráda poděkovala RNDr. Pavlíně Baizové, Ph.D. za námět diplomové práce na téma molekulární vodík. Dále bych ráda touto cestou poděkovala panu doc. Ing. Davidu Mildemu, Ph.D. za cenné rady, odbornou pomoc a připomínky, které mi během celé práce s ochotou poskytoval. Poděkování patří taktéž paní RNDr. Janě Skopalové, Ph.D. za cenné rady, které mi s ochotou poskytovala v oblasti elektrochemie. V poslední řadě bych chtěla poděkovat rodině Fedorových za poskytnutí informací o molekulárním vodíku.

Souhrn

Tato práce byla zaměřená na stanovení celkové antioxidační aktivity v tabletách potravinového doplňku Recovery, který je schopen v kyselém prostředí uvolňovat molekulární vodík. Pomocí spektrálních metod DPPH a FRAP byla u tablet Recovery s HydroFX a Recovery H2 stanovena celková antioxidační aktivita, která je vyjádřena na ekvivalentní množství askorbové kyseliny [$\text{mg AAE}\cdot\text{g}^{-1}$ vzorku]. U metody DPPH byla provedena optimalizace jednotlivých podmínek měření a u obou metod byla stanovena jejich preciznost. Atomovou absorpční spektrometrií byl u tablet obou přípravků stanoven obsah hořčíku a vápníku. Pomocí potenciometrie byla naměřena závislost redoxního potenciálu na čase u jednotlivých tablet Recovery. Získané výsledky byly porovnány s dostupnými literárními údaji o antioxidační aktivitě.

Summary

The aim of this work was to determine the total antioxidant activity of different food supplements Recovery which are capable of releasing of molecular hydrogen in the acidic environment. The spectral methods DPPH and FRAP, were implemented to determine total antioxidant capacity (expressed as an equivalent amount of ascorbic acid [AAE mg.g⁻¹ of sample]) in pills of Recovery with *HydroFX and Recovery H2*. For method DPPH measurement conditions were optimized and for both methods precision under repeatability conditions was estimated. Atomic absorption spectrometry was used to determine the content of magnesium and calcium in *Recovery with HydroFX and Recovery H2*. The dependence of redox potential versus time was measured by potentiometry for both Recovery pills. The obtained results of AAE were compared with literature data.

Obsah

1. Úvod	9
2. Teoretická část	10
2.1 Volné radikály.....	10
2.1.1 Vznik volných radikálů	10
2.1.2 Rozdělení volných radikálů.....	11
2.1.2 Působení volných radikálů v organismu	15
2.2 Antioxidanty.....	16
2.2.1 Rozdělení antioxidantů.....	17
2.3 Oxidační stres.....	20
2.4 Molekulární vodík	21
2.4.1 Výroba vodíku a jeho aplikace.....	21
2.4.2 Vlastnosti a výzkum molekulárního vodíku.....	22
2.4.3 Tablety Recovery s HydroFX™ 1. generace	23
2.4.4 Tablety Recovery 2. generace	24
2.4.5 Další výrobky molekulárního vodíku.....	26
2.4.6 Klinický výzkum molekulárního vodíku.....	26
2.5 Antioxidační aktivita	29
2.6 Metody pro stanovení antioxidační aktivity.....	29
2.6.1 Metoda DPPH	30
2.6.2 Metoda FRAP.....	30
2.6.3 Metoda ABTS/TEAC.....	31
2.6.4 Metoda ORAC.....	32
2.6.5 CUPRAC.....	33
2.6.6 TRAP.....	33
2.6.7 Cyklická voltametrie	33
3. Experimentální část	35
3.1 Použité chemikálie	35
3.2 Použité přístroje k měření	36
3.3. Analyzované vzorky	36
3.3.1 Recovery s HydroFX.....	36

3.3.2	Recovery H2.....	37
3.4	Příprava a úprava roztoků	37
3.4.1	Příprava roztoků pro metodu DPPH.....	37
3.4.2	Příprava roztoků pro metodu FRAP	38
3.4.3	Příprava roztoků pro AAS.....	38
3.4.4	Úprava vzorků	39
3.5	Pracovní postupy měření	39
3.5.1	Optimalizace kalibračních závislosti metody DPPH	39
3.5.2	Pracovní postup metody DPPH.....	40
3.5.3	Optimalizace kalibračních závislostí metody FRAP.....	40
3.5.4	Pracovní postup metody FRAP	41
3.5.5	Pracovní postup metody AAS	41
3.5.6	Pracovní postup potenciometrie	41
4.	Výsledky a diskuse	43
4.1	Metoda DPPH	43
4.1.1	Optimalizace podmínek.....	43
4.2	Metoda FRAP	46
4.2.1	Optimalizace podmínek u metody FRAP.....	46
4.3	Srovnání metod DPPH a FRAP	48
4.3.1	Opakovatelnost metody DPPH a FRAP.....	48
4.3.2	Porovnání antioxidační aktivity různými metodami	49
4.4	Stanovení Ca a Mg pomocí AAS	52
4.5	Potenciometrie	53
5.	Závěr	56
6.	Literatura.....	57
7.	Seznam použitých zkratk	62
8.	Přílohy	64

1. Úvod

Mnoho nemocí, které znepríjemňují náš život, je zapříčiněno účinky volných radikálů. Volné radikály jsou látky, které se přirozeně tvoří v našem těle (atom, molekula, ion). Jsou obsaženy v různém množství a mohou způsobit vážné problémy, kterým je potřeba zabránit. Pro zdraví organismu je dobré, aby tyto látky byly odstraněny hned po jejich vzniku. Schopnost zničit volné radikály mají antioxidanty.

Vodík je nejvíce zastoupený prvek ve vesmíru (až 75 % hmoty). Na Zemi je vodík přítomen v jednoatomové formě (voda, anorganické i organické sloučeniny). Zemská atmosféra obsahuje méně než $1 \mu\text{m}\cdot\text{m}^{-1}$ vodíku. Je to bezbarvý plyn, bez chuti a zápachu, vysoce hořlavý dvouatomový plyn. Molekulární vodík je méně aktivní, chová se spíše jako inertní plyn v nepřítomnosti katalyzátorů nebo i při běžné teplotě. Vodík nereaguje s většinou sloučenin, včetně plynného kyslíku při pokojové teplotě, ale reaguje teprve až za zvýšené teploty (527°C) a exploduje s kyslíkem řetězovou reakcí.

Molekulární vodík se dostal v současné době do popředí vědeckého výzkumu. Můžou za to především jeho antioxidační a protizánětlivé účinky. Další jeho pozitivní předností je působení proti překyselení organismu. Vodík ale i voda bohatá na vodík je studována v souvislosti s rakovinou, cévními onemocněními, neurodegenerativními onemocněními, alergickými onemocněními a dalších.

Cílem této diplomové práce je přispět k výzkumu molekulárního vodíku z hlediska jeho antioxidační aktivity a redoxního potenciálu.

2. Teoretická část

2.1 Volné radikály

Tyto látky se v poslední době staly předmětem lékařského výzkumu. Z fyzikálního hlediska jsou volné radikály atomy či molekuly, které obsahují alespoň jeden nepárový elektron. Jsou to částice elektronově nestabilní. Většinou se jedná o vysoce reaktivní látky, které mohou oxidovat nebo redukovat další atomy či molekuly. Tím dochází ke stabilizaci molekul. Jedná se o velmi rychlý děj, který probíhá v řádech mikro či milisekund. Díky velké reaktivitě má většina radikálů velmi krátkou životnost (tabulka 1) ^{1,2}.

Tabulka 1: Biologický poločas reaktivních forem kyslíku a dusíku ³

volné radikály	biologický poločas [s]
hydroxylový radikál	10^{-9}
superoxodový radikál	10^{-6}
alkoxylový radikál	10^{-6}
singletový kyslík	10^{-5}
alkylperoxylový radikál	7
radikál oxidu dusnatého	1 – 10

Jedná se o látky, které reagují s různými biologickými strukturami, a to především s mastnými kyselinami, lipidy, aminokyselinami, nukleovými kyselinami, proteiny, ale i s řadou nízkomolekulárních metabolitů. V živých organismech se radikály podílí na přenosu energie. Dále fungují jako faktory imunitní ochrany a signální molekuly buněčné regulace. Mohou za určitých okolností působit jako toxické látky a dezinformační agenti, kteří dokáží nenávratně poškodit organismus nebo způsobit až jeho smrt ^{1,4}.

2.1.1 Vznik volných radikálů

Volný radikál může vzniknout třemi způsoby (obrázek 1) ².

- Homolytickým štěpením kovalentní vazby – fragment má 1 nepárový elektron. Ke štěpení je potřeba podávat velké množství energie (např.: vysoká teplota, ionizační záření, ultrafialové záření).
- Přidáním jednoho elektronu k molekule (redukce) a ztrátou jednoho elektronu z molekuly (oxidace).
- Další reakcí pomocí iniciace celého řetězce. Tyto látky se snaží doplnit nepárový elektron několika způsoby (propagace) – chtějí se navázat na strukturu odlišné

molekuly, předat či odebrat elektron jiné molekule. Reakcí 2 radikálů s nepárovým elektronem dojde ke vzniku tzv. „normální molekuly“. Dojde k ukončení radikálové reakce tzv. terminace.



Obrázek 1: Vznik volných radikálů⁵

2.1.2 Rozdělení volných radikálů

Je známo, že v organismu vzniká řada reaktivních forem kyslíku (ROS – reactive oxygen species) a reaktivních forem dusíku (RNS – reactive nitrogen species). Tyto látky mají fyziologický a patogenetický význam.

Obecně se dá říct, že ROS jsou velmi reaktivní molekuly, ale neplatí to u všech. Při jejich reakcích mohou vzniknout reaktivní látky, ale i neradikálové molekuly, které jsou vázány kovalentní vazbou. Radikál může být neutrální částice, nebo ion záporně či kladně nabitý (obrázek 2). Radikál se označuje ve vzorci tečkou (identifikace nepárového elektronu). Pokud je daná látka současně i iontem, je ve vzorci zahrnuto i znaménko (tabulky 2, 3)¹.

2.1.2.1 Reaktivní formy kyslíku

Tabulka 2: Reaktivní formy kyslíku

volné radikály	(ne)-radikály
superoxid $O_2^{\cdot-}$ hydroxylový radikál HO^{\cdot} hydroperoxyl HO_2^{\cdot} peroxyl ROO^{\cdot} alkoxyl RO^{\cdot}	peroxid vodíku H_2O_2 kyselina chlorná $HClO$ ozón O_3 singletový kyslík 1O_2

Superoxid

$O_2^{\cdot-}$ se tvoří ze superoxidové formy redukcí kyslíkem. Může být tvořen autooxidační reakcí nebo vzniká v mitochondriálním elektronovém řetězci (rovnice 1). Superoxid je reaktivní, jestliže se dostane do styku s jinými volnými radikály (NO, Fe). Je výchozí látkou pro vznik dalších ROS (hydroxylový radikál, hydroperoxidový radikál, peroxid vodíku – rovnice 2). Jeví se méně nebezpečně než hydroxylový radikál, jehož poločas rozpadu je 10^{-6} s^{1,5}.



Má redukční i oxidační vlastnosti. V přítomnosti superoxiddizmutázy (SOD) podléhá dizmutaci, což znamená, že jedna molekula poskytuje druhý elektron. Superoxid je vysoce selektivní. Ve tkáních působí prospěšně, ale i škodlivě. Poškozuje i biomolekuly, ale působí pomaleji než hydroxylový radikál⁶.



Peroxid vodíku

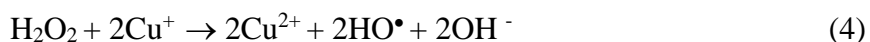
H_2O_2 je slabá kyselina, která obsahuje vazbu O-O. Peroxid není brán jako radikál, protože obsahuje párový elektron, ale je důležitou biologickou molekulou. Má schopnost degradovat některý hemoprotein (např.: hemoglobin, myoglobin), aby došlo k uvolnění železa (Fentonova reakce – viz HO^{\cdot})^{1,5}.

Hydroxylový radikál

HO^{\cdot} patří mezi neúčinnější formy kyslíku. Ihned reaguje s okolními molekulami. Ve tkáni se slučuje se všemi sousedními biomolekulami nebo z ní vytrhne elektron a tím ji aktivuje. Je schopen poškozovat pyrimidinové i purinové báze v nukleových kyselinách (nepřesný zápis genetické informace)^{6,7}. Vzniká rozpadem H_2O_2 za pomoci působení jednoho elektronu (rovnice 3).



Často je tvořen Fentonovou reakcí peroxidu vodíku s železem nebo mědí (rovnice 4, 5). Reakcí s kyslíkem a kyseliny chlorné s příspěvkem ionizačním zářením vzniká peroxy-nitrit (ONOO^-)⁵.

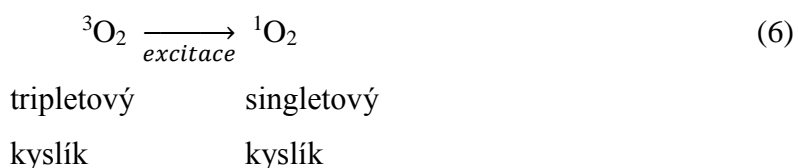


Je biologicky důležité odstranit hydroxylové radikály, protože superoxidový anion a peroxid vodíku je schopný detoxikovat antioxidační obranné enzymy. Nicméně, žádný enzym nedetoxikuje hydroxylové radikály.

Singletový kyslík

Molekula kyslíku má vlastnost diradikálu, protože vlastní dva nepárové valenční elektrony. Proto se může snadno změnit v reaktivní formu kyslíku. Stačí mu dodat energie nebo přidat/odebrat elektron. Existují další dva typy – singletový a tripletový kyslík. Singletový kyslík vzniká z tripletového kyslíku (rovnice 6). Odlišují se od sebe směrem uspořádání elektronů⁸.

Jedná se o reaktivní formu kyslíku, kdy kyslíková molekula přechází do excitovaného stavu. Singletový kyslík může existovat ve dvou reaktivních formách s odlišným uspořádáním energetických hladin. Tento kyslík vykazuje vysokou cytotoxicitu, která je zapříčiněna relativně dlouhou dobou života. Může vznikat při některých fotochemických, biochemických reakcích v organismu (např.: v dýchacím řetězci)^{8,9}.



Peroxylový radikál

Tento radikál vzniká navázáním kyslíku do místa nepárového elektronu volného radikálu. Snaží se získat chybějící elektron z jiné molekuly, čímž dojde ke vzniku nového radikálu. Tato řetězová reakce je ukončena vazbou dvou radikálů nebo reakcí s antioxidantem¹⁰.

2.1.2.2 Reaktivní formy dusíku

Tabulka 3: Reaktivní formy dusíku

volné radikály	(ne)-radikály
oxid dusnatý NO [•] oxid dusičitý NO ₂ [•]	nitrosyl NO ⁺ nitroxid NO kyselina dusitá HNO ₂ oxid dusitý N ₂ O ₃ nitronium, NO ₂ ⁺ peroxynitrit ONOO ⁻ alkylperoxynitrit ROONO

Oxid dusnatý

NO je vysoce reaktivní bezbarvý plyn, který v těle působí jako signální molekula a je hlavním zdrojem RNS. NO[•] je relativně nestabilní a toxický, bioaktivní volný radikál. Má lipofilní povahu, díky níž se může procházet přes buněčné membrány bez membránových transportérů ¹¹. V těle se tvoří pomocí enzymového mechanismu. V přítomnosti kyslíku a příslušné aminokyseliny (albumin, cystein, glutation) je přeměněn na NO a aminokyselinu. Oxid dusnatý je škodlivý pouze při uvolňování ve velkém množství (pozor na ONOO⁻ - rovnice 7). Jsou identifikovány 3 typy NO – v nervové soustavě, v tkáních a produkovaný fagocyty ⁴. V lidském organismu se podílí na udržování krevního toku či tlaku.

Peroxynitrit

ONOO⁻ je nitrační a oxidační činidlo. Díky oxidačním vlastnostem poškozují radikál široké spektrum biomolekul, bílkovin i DNA. Vzniká během rychlé reakce O₂^{•-} a NO[•] (cit. 3).

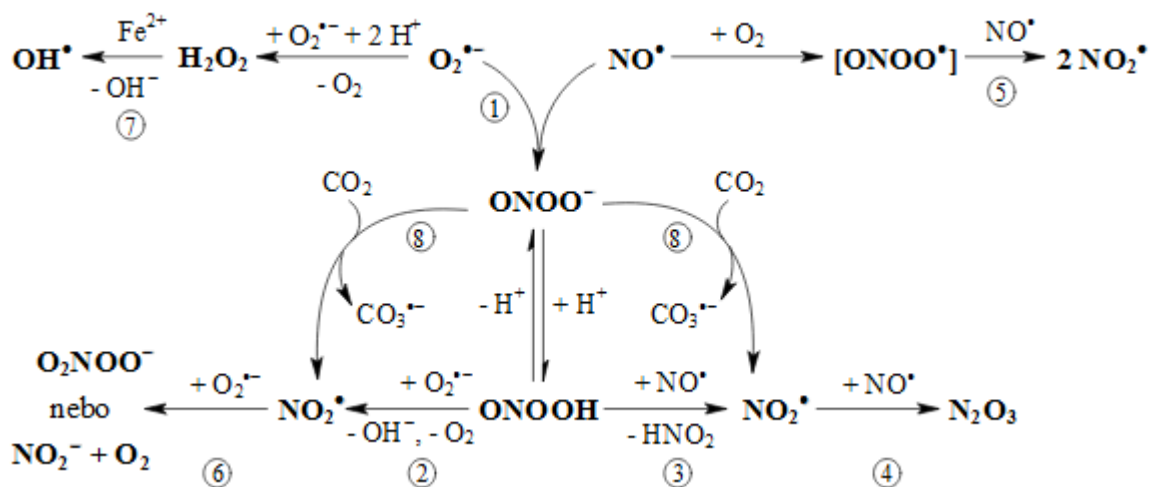


Protonovaný peroxynitrit je za fyziologického pH tzv. kyselina peroxodusitá a dále se rozkládá na hydroxylový radikál a oxid dusičitý (též radikál – rovnice 8, 9) ¹.



Tyto formy jsou velmi reaktivní a mohou vést k poškození DNA nebo iniciovat peroxidaci lipidů.

Rovnice 9: Reakce superoxidu s oxidem dusnatý¹²



Poznámka¹²:

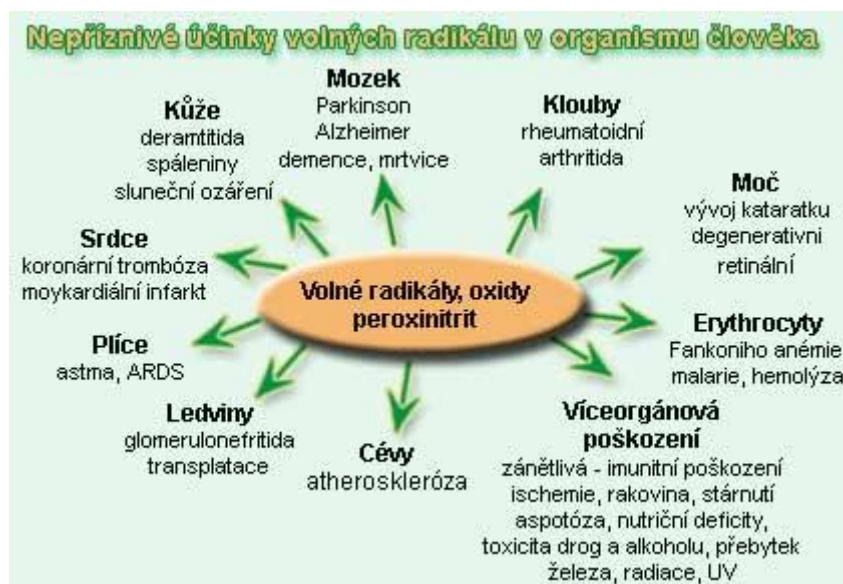
- 1) Hlavním produktem reakce ekvivalentního množství NO^{\bullet} a $O_2^{\bullet-}$ je peroxodusitan
- 2) Při mírném nadbytku jednoho z reaktantů vzniká NO_2^{\bullet}
- 3) Při mírném nadbytku jednoho z reaktantů vzniká NO_2^{\bullet}
- 4) Vyšší nadbytek NO^{\bullet} vede ke vzniku N_2O_3
- 5) Při vysoké koncentraci NO^{\bullet} a O_2 dochází k autooxidaci NO_2^{\bullet}
- 6) Jestliže koncentrace $O_2^{\bullet-}$ převažuje nad NO^{\bullet} - vzniká peroxydusičnan nebo dusitan
- 7) Při nadbytku a $O_2^{\bullet-}$ dochází ke vzniku HO^{\bullet} a následně k vyvolání oxidačního stresu
- 8) Vysoká koncentrace CO_2 způsobuje vznik NO_2^{\bullet}

2.1.2 Působení volných radikálů v organismu

Volné radikály se v organismu tvoří samovolně při látkové přeměně, ochraně před bakteriemi nebo při explozi ultrafialovým zářením. K tvorbě radikálů přispívají nemoci, stres, znečištěné životní prostředí ale i psychická a fyzická zátěž. Některé radikály jsou nedílnou součástí metabolismu, některé se objevují nebo jsou případy, kdy se zvyšují při průběhu nemoci. Nepříznivý vliv má kyslík, který reaguje s některými sloučeninami a vytváří ROS^{7,10}.

Opakovaný stres, onemocnění a stárnutí zvyšuje tvorbu volných radikálů a dochází ke snížení eliminace radikálů. Volné radikály poškozují zdravé buňky (vznik rakovinových buněk, oslabení imunitního systému). Mají za následek opotřebování tělních buněk, špatnou výživu, změnu pružnosti vaziva (kůže, klouby), změnu ve vnitřních orgánech, poškození DNA či tukové části membrán (obrázek 2)^{10,13}. Ideální partner pro aktivní kyslík by měl být „aktivní vodík“. Ten může být vyroben při elektrolýze vody na katodě.

Volné radikály nemají jen záporné účinky. Náš organismus si je denně vytváří, aby bojovaly s cizími buňkami a podílely se na chemických reakcích v metabolismu. Tím je plněna správná funkce našeho organismu. Volné radikály způsobují potíže, pokud jsou v organismu v nadbytku. Všechny radikály jsou tvořeny uvnitř organismu a pocházejí z tzv. endogenních (vnitřních) a exogenních (okolních) zdrojů^{7,13}.



Obrázek 2: Působení volných radikálů na organismus¹⁴

2.2 Antioxidanty

Jedná se o látky, které omezují působení volných radikálů. Mají za úkol snižovat pravděpodobnost vzniku volných radikálů nebo je převádět do méně reaktivní či nereaktivní formy. Mají schopnost blokovat volné radikály⁵. Některé antioxidanty působí jako prevence před útokem volných radikálů. Antioxidant je schopen poskytnout radikálu elektron, který potřebuje, aniž by došlo k poškození samotného antioxidantu, tedy pokud má organismus jeho dostatečné množství. Antioxidanty mají za úkol zpomalit stárnutí a chránit naše tělo před procesem oxidace. Obecně jsou to látky rozpustné ve vodě i v tucích¹⁵.

Antioxidanty (BHA – butyl-hydroxyanisol, BHT – butyl-hydroxytoluen, vitamín C) se přidávají do potravin pro lepší uchování produktu (tabulka 4) nebo pro pozitivnější účinky na zdraví člověka. Vyskytují i ve formě enzymů (SOD, kataláza, glutathion peroxidáza), které působí v našem organismu a jsou produkovány v buňkách podle genetického kódu našeho DNA⁷. Další využití antioxidantů je při výrobě vitamínových doplňků výživy, fytotherapii a mnoho dalších^{12,15}. Vitamíny C, E a B skupiny patří mezi antioxidanty, které mají pro náš organismus zásadní význam. Dalším zdrojem jsou karotenoidy (vznik vitamínu A), některé

živiny (stopové prvky Se, Zn, Cu, Fe, Mn), flavonoidy a koenzym Q10, který se tvoří v těle společně s glutathionperoxidázou ^{10,12}.

Tabulka 4: Antioxidanty přítomné v potravě („Éčka“)

označení „éčka“	antioxidant
300	L-askorbová kyselina (vitamín C)
301	L-askorbát sodný
302	L-askorbát vápenatý
304	6-palmitan L-askorbové kyseliny
306	tokoferol (přírodní vitamín E)
307	α-tokoferol (syntetický vitamín E)
308	γ-tokoferol (syntetický vitamín E)
309	δ-tokoferol (syntetický vitamín E)
310	propylgallát
311	oktylgallát
312	dodecylgallát
320	butyl-hydroxyanisol (BHA)
321	butyl-hydroxytoluen (BHT)
322	lecitin
325	mléčnan sodný
326	mléčnan draselný
327	mléčnan vápenatý
330	kyselina citrónová
331a	citrát sodný (kyselý)
331b	citrát sodný (dvojsodný)
331c	citrát sodný (trojsodný)
332	citrát draselný kyselý, normální
333	mono-, di-, trikalciium citrát
334	kyselina vinná

2.2.1 Rozdělení antioxidantů

Jde o velmi různorodé skupiny látek a je tedy velmi obtížné najít vhodné kritérium, podle kterého je rozřadit do skupin. Antioxidanty můžeme rozdělit podle následujících hledisek (dle J. Racka) ¹⁶:

a) Ovlivnění tvorby volných radikálů:

Primární – brání vzniku volných radikálů (např.: chelatační látky, inhibitory NADPH-oxidázy)

Sekundární – likviduje již vzniklé volné radikály. Jedná se o látky s redukčními účinky, ale zahrnujeme sem i katalyzátory. (např.: enzym SOD)

Terciární – eliminuje či opravuje molekuly, které jsou poškozené volnými radikály (např.: endonukleáza).

b) Podle vstupu do organismu:

Exogenní – přiváděn do organismu zvenčí pomocí potravy (např.: vitamíny C a E).

Endogenní – organismus si látky vytváří sám (např.: enzym kataláza).

c) Podle rozpustnosti:

Lipofilní (hydrofobní) – rozpustné v tucích – poměrně pomalu se dostávají na místo účinku. Působí v membránách a lipoproteinech. Někdy jsou označovány jako membránové antioxidanty (např.: vitamín E, karotenoidy).

Hydrofilní – rozpustné ve vodě – poměrně snadno a rychle se dostávají do našeho organismu, ale hůře procházejí přes buněčnou membránu do buněk a CNS. Působí v lipoproteinech a membránách (např.: vitamín C).

Amfifilní – spojení vlastností předchozích skupin (např.: melatonin).

d) Podle místa výskytu:

Extracelulární – obsažen mimo buňku, význam je menší než intracelulární.

Intracelulární – působí uvnitř buňky. Hlavní význam je ochrana před volnými radikály.

e) Podle velikosti molekuly:

Nízkomolekulární – (např.: vitamín C, β -karoten).

Vysokomolekulární – v první řadě zahrnuje enzymy, které se podílejí na antioxidační ochraně (např.: SOD).

f) Podle mechanismu účinku:

Katalyzátory – látky, které se při dané reakci nespotebovávají (např.: enzymy, sloučeniny kovů napodobující enzymy mechanismem účinku).

Chelatační látky – váží přechodné kovy (např.: Cu, Fe, Ni a brání v uplatnění ve Fentonově reakci). Obdobně působí i některé bílkoviny (např.: laktoferin).

Inhibitory enzymů

g) Praktický způsob dělení antioxidantů:

Antioxidanty nelze dělit pouze podle jednoho kritéria, jak vyplývá z výše uvedených příkladů. Dělení by bylo zcela nedostatečné, a navíc se jednotlivá kritéria překrývají. Pro zjednodušení dělení antioxidantů lze použít:

Přirozené antioxidanty – látky, které jsou našim tělem produkovány nebo jsou přijímány v potravě a jsou zapojeny do lidského metabolismu (např.: vitamíny).

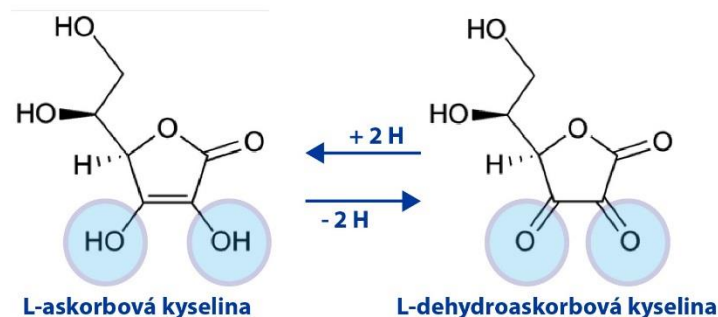
Syntetické antioxidanty – zde můžeme zařadit léčiva, látky přirozené (chemicky či jinak modifikované – tedy nové s jinými vlastnostmi).

Pro stanovení antioxidační aktivity látek se používá jako srovnávací standard askorbová kyselina nebo Trolox.

Askorbová kyselina (vitamín C – E 300)

Její přesný název je L-askorbová kyselina. Jde o bílou krystalickou látku, která je rozpustná ve vodě. Askorbová kyselina má redukční účinky, díky nimž dochází k snadné oxidaci na dehydroaskorbát (rovnice 10). Látka je citlivá na teplo ⁷.

Rovnice 10: Oxidace askorbové kyseliny ¹⁷



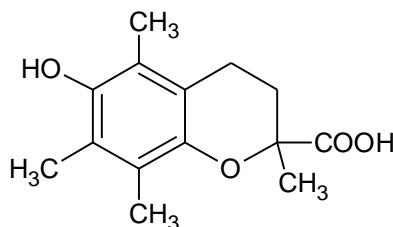
Zdrojem vitamín C je čerstvého ovoce. V organismu ji můžeme najít v játrech, v plazmě. Vitamín C je nezbytný k životu, protože plní spoustu důležitých funkcí v našem organismu. Je nezbytný pro prevenci, podporuje funkci imunitního systému, hojení ran, tvorbu kolagenu, napomáhá ke vstřebávání železa z tenkého střeva, správnému fungování nervového systému, správné funkce psychiky, přispívá ke správné funkci cév, kůže, zubů, kostí aj. Člověk si nedokáže askorbovou kyselinu syntetizovat, protože postrádá L-gulonolaktonoxidázovou aktivitu, tudíž ji musí přijímat v potravě ^{10,15}.

Askorbová kyselina se využívá jako účinný antioxidant (snižování oxidaci tuků), konzervační prostředek (zpracování mouky, zachování barvy masa, přísada do ovocných

šťáv). Chrání membrány a lipidy před oxidací, kterou způsobují radikály hydroxyly a peroxyly². Nedostatek vitamínu C se může projevit nemocí tzv. kurděje, která se projevuje např.: únavou, ztrátou zubů, krvácením dásní⁷.

Trolox

Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) je ve vodě rozpustný derivát vitamínu E (obrázek 3) se silnými antioxidačními vlastnostmi. Využívá se jako antioxidační standard, ke kterému je vztažena antioxidační aktivita vzorku (viz kapitola 2.6.2). Často se používá v biologické nebo biochemické aplikaci pro snížení oxidačního stresu. Trolox je účinný v podpůrné léčbě určitých typů rakoviny.



Obrázek 3: Standardní látka Trolox

2.3 Oxidační stres

Oxidační stres je fyziologický stav, který nastává při nerovnováze mezi ROS a antioxidační ochranou⁶. Oxidační stres má za následek růst koncentrace volných radikálů (ROS, RNS) v buňkách. Nadbytek oxidačního stresu může poškodit buňky i membrány, tkáň, mitochondrie, DNA, proteiny a další⁶. Je všeobecně známo, že ROS jsou jednou z příčin nemocí souvisejících s životním stylem, rakoviny a stárnutí¹⁵.

Akutní oxidační stres může vzniknout při: těžkém cvičení, infarktu myokardu, zastavení krvácení, onkologickém onemocnění, transplantaci orgánů, hyperglykemii, infekci a dalších případech¹⁸. Na druhé straně, přetrvávající oxidační stres je hlavní příčinou mnoha běžných chorob – rakoviny a stárnutí. Oxidační stres působí na jednotlivé buňky, ale i na orgánové a imunitní systémy. Většina klinických studií s antioxidanty neprokázala výrazný úspěch v oblasti prevence oxidační poruch spojených se stresem^{6,15}.

Oxidační stres lze změřit: poměr GSH/GSSG (okysličený glutathion) – Glutathion (GSH) je buněčný antioxidant, podle kterého se měří oxidační stres. Nerovnováha oxidantů a antioxidantů může být stanovována v plazmě. Jedná se tedy o stanovení poměru oxidované a

redukované formy (přítomnost NADPH). Většina buněk se nachází v homeostáze nebo v rovnováze. Pokud je více volných radikálů než antioxidantů, hodnoty redoxní reakce ukazují na možný oxidační stres⁶. Poměr GSH/GSSG v krvi může být biomarkerem cukrovky, Parkinsonovy nemoci, Alzheimerovy choroby nebo nádorových onemocnění¹⁹.

2.4 Molekulární vodík

Vodík, jako chemický prvek, je nejmenší atom ve vesmíru, nejjednodušší prvek v přírodě ale také prvek života. V současné době zaujímá molekulární vodík významná místa v lékařském výzkumu. Podle vědeckých studií se molekulární vodík jeví jako účinný antioxidant, který bojuje s oxidačním stresem. Další jeho pozitivní vlastnosti jsou jeho antioxidační a protizánětlivé účinky. Podle posledních studií může mít vodík pozitivní vliv na řadu onemocnění (Parkinsonova nemoc, onkologické onemocnění, zánět střev a jater, diabetes aj.)²⁰.

2.4.1 Výroba vodíku a jeho aplikace

Jediný způsob aplikace molekulárního vodíku do organismu bylo pomocí inhalace vody bohaté na vodík. Ta byla vyrobena pomocí elektrolyzy. Jak vyplývá ze studií, cílem bylo vytvořit velmi čistý plyn, který by obsahoval maximálně 5 % nečistot a účinnost by dosahovala 90 – 95 %^{21,22}. V současné době existuje několik způsobů, jak přijímat vodík do organismu:

- a. *Inhalace plynného vodíku* – vodík vstupuje do lidského těla přes dýchání nebo krevní oběh. Veškeré faktory (např.: kardiopulmonální funkce, vnější podmínky), které ovlivňují dýchání a krevní oběh u pacienta, mohou mít vliv na skutečný rozsah absorpce vodíku. Mnoho lidských studií bylo provedeno pomocí inhalace vodíku v potápěčské medicíně a výsledkem byla řada zkušeností s léčením nemocí pomocí plynného vodíku i ve srovnání s jinými plyny (kyslík, helium a oxid uhličitý). Při použití plynného vodíku jsou vyžadována přísná bezpečnostní pravidla. Nevýhodou při vdechování plynu vodíku je nejistota dávkování příjmu vodíku. Dva nejdůležitějšími parametry při inhalaci vodíku jsou celkový objem směsi a koncentrace vodíku²⁰.
- b. *Pití vody bohaté na vodík* – voda obohacená o vodík může být připravena několika způsoby – rozpuštěním vodíku za vysokého tlaku, rozpuštěním elektrolyzovaného vodíku ve vodě nebo reakcí kovového hořčíku s vodou. Hlavním problémem je stabili-

ta uvolněného vodíku ve vodě, kdy po určité době dochází k postupnému snižování koncentrace vodíku^{20,23}.

- c. *Injekčně* – tento způsob aplikace je málo účinný ve srovnání s předchozími. Podává se injekčně vodný fyziologický roztok bohatý na vodík. Tato klinická aplikace není ovlivněna vlastními faktory pacientů. Dávka příjmu vodíku může být přesně řízena. Injekce s fyziologickým roztokem bohaté na vodík byly aplikovány v různých typech orgánových poranění, zánětlivých onemocnění, arteriosklerózy, hypertenze, poškození jater, diabetu aj²⁰.
- d. *Koupele* – vodík má silnou difuzní kapacitu, a proto může být absorbován přes kůži do krevního toku.
- e. *Zvýšení množství vodíku ve střevech* – léky nebo potraviny, které nemohou být absorbovány tenkým střevem, jsou přepravovány do tlustého střeva, kde může být vodík produkován střevními bakteriemi. Vodík by měl ve střevech plnit funkci antioxidantu (zabránění kardiovaskulárních příhod)²⁰.
- f. *Další aplikace – např.:* oční kapky

2.4.2 Vlastnosti a výzkum molekulárního vodíku

Molekulární vodík se podle japonských vědeckých studií chová jako velmi účinný antioxidant. Výzkumem bylo zjištěno, že má schopnost velmi rychle proniknout pomocí difúze biologickými membránami do všech tkání, buněk a také do mozkové tkáně. Vodík dokáže difundovat do cytosolu, mitochondrií a buněčného jádra k DNA²⁰. Tuto schopnost jiný antioxidant nemá. Molekulární vodík pracuje jako selektivní antioxidant, který odstraní nebezpečné radikály (ROS), ale účinně zachovává¹⁰. Je schopný v těle produkovat oxidačně-redukční potenciál (NORP), díky němuž dokáže organismus reagovat s volnými radikály. Vodík není toxický ani při vyšších koncentracích^{18,24,25}. Je schopen selektivně snižovat hladinu hydroxylových radikálů in vitro a vykazovat terapeutickou antioxidační aktivitu^{26,27}.

Podle studií molekulární vodík eliminuje zvýšený obsah kyseliny mléčné, což se projevuje při velké zátěži. Dochází k vyplavování mléčné kyseliny do svalových buněk, což může způsobit únavné překyselení, bolesti až křeče svalstva. Má schopnost po zátěži rychle

regenerovat tkáně a odstraňovat další škodlivé látky (močovina, amoniak, kreatinkináza), které způsobují únavu ²⁸.

V posledních studiích byla snaha prokázat, že inhalace plynného vodíku v malých koncentracích (nutné dodržení bezpečnosti) má léčebné účinky na některé choroby ²⁹: diabetes, zánět jater a střev, záněty kloubů, infarkt myokardu, obezitu, onkologické onemocnění ³⁰, mozkovou mrtvici, Parkinsonovu nemoc a další ^{10,20}. Během 8 let co se vědci zabývají molekulárním vodíkem, bylo publikováno několik desítek vědeckých prací ^{20,31,32}.

2.4.3 Tablety Recovery s HydroFX™ 1. generace

Dušan Miljkovič si nechal v roce 2010 patentovat výrobek Recovery s HydroFX™. Podle propagačních materiálů má Recovery s HydroFX™ výjimečné minerální složení a obsahuje čistý přírodní hořčík. Jedná se o aktivní biologickou směs, která je schopna generovat molekulární vodík. Při požití tablety v zažívacím traktu by mělo dojít k reakcím, které uvolňují mnoho bublinek molekulárního vodíku. Tyto bublinky díky své malé hmotnosti, by se měly šířit po celém těle ve velmi krátkém čase (milisekundy) a pronikat přes veškeré tkáně a buňky v těle. Vodík produkuje v těle záporný redoxní potenciál, který má za úkol chránit naše tělo před volnými radikály a oxidačním stresem ²⁸. Recovery dokáže zvýšit pufrační kapacitu vnitřního prostředí, selektivně snižuje hladinu hydroxylových radikálů in vitro, vykazuje terapeutickou antioxidační aktivitu a snaží se udržet optimální pH krve, které je kolem 7,4 ²⁷. U vodíku nebyly zatím zjištěny žádné negativní účinky ³².

Přípravky na bázi molekulárního vodíku jsou na českém trhu velmi krátkou dobu. Nejsou zcela známé jeho účinky na lidský organismus, ale co se o něm zatím ví, je podle výrobců průlomové. V současné době je princip výroby patentován firmou H2 Europe (dříve Sevenpoint 2 z USA). Recovery s HydroFX™ nebude podle výrobce nikdy distribuován v lékárnách ani v maloobchodech, ale pouze u obchodních partnerů H2 Europe ²⁷. V tom bych viděla především výhodu pro partnery firmy H2 Europe a nevýhodu pro odběratele tablet především v poskytování informací o daném výrobku a jeho účincích.

Dávkování tablet vyplývá především z testování na myších. Podle příbalové dokumentace je dávkování tablet Recovery poměrně jednoduché. Tablety se mohou využívat od věku 3 let. Bezpečná dávka Recovery je maximálně 9 tablet denně. Tablety se podle výrobců doporučují brát na lačno a zapít ionizovanou vodou bez chlóru (silný antioxidant). Složení tablety Recovery s HydroFX o hmotnosti 450 mg (obrázek 4) je podle výrobce následující: fosforečnan vápenatý (0,198 mg), mikrokystalická celulóza (139,50 mg), uhličitán hořečnatý

(70,875 mg), hořčík ve formě prášku (23,625 mg), stearan hořečnatý (16,65 mg) a oxid křemičitý (1,35 mg).



Obrázek 4: Balení Recovery ²⁷

2.4.4 Tablety Recovery 2. generace

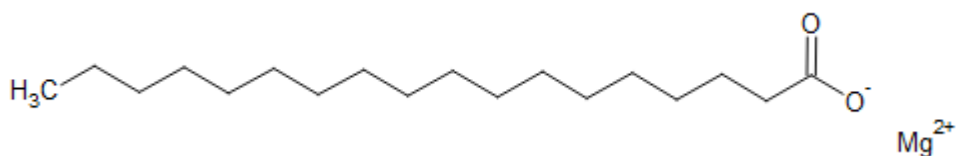
Na podzim roku 2016 firma H2 Europe představila novou sérii tablet Recovery. Rozdíl mezi původním a novým balením je ve složení tablet. Tablety Recovery 2. generace jsou obohaceny o další přidané látky, které ovlivňují jejich rozpustnost ve vodě. Tyto nové tablety by měly být lépe využitelné pro lidský organismus. U tablet by měl být naměřen nižší redoxní potenciál, a proto by tablety měly být účinnější vůči původnímu vzorku Recovery ²⁷.

Nové tablety Recovery byly schváleny pouze pro vnější použití. Využití těchto tablet má více forem (koupele, postřiky, obklady aj.). Podle návodu je jejich použití velmi snadné. Minerální tabletu necháme rozpustit ve vodě (1 tableta do 5 l vody) po dobu 5 – 10 minut. Výsledkem jsou koupele v roztocích, které jsou obohacené o hořčík. Koupele by mohly přispět ke zlepšení přirozené kožní bariéry, podporovat hydrataci a regeneraci kůže. Distributoři tablet doporučují tablety Recovery i pro vnitřní použití, kdy do plastové nádoby, která obsahuje neperlivou vodu (bez chlóru), přidám jednu tabletu Recovery. Nádoba se rychle uzavře a nechá se asi 5 minut odstát, kdy dochází k uvolňování molekulárního vodíku. Doporučuje se vodu obohacenou o vodík vypít do 10 minut, kdy v žaludku dojde ještě k dalšímu vývoji molekulárního vodíku. Tento způsob aplikace vodíku je ovšem na vlastní nebezpečí. Složení nové tablety Recovery s HydroFX o hmotnosti 400 mg (obrázek 5) je podle výrobce následující: kyselina jablečná, D-glukóza, hořčík ve formě prášku, stearyl fumarát sodný, fumarová kyselina a voda.

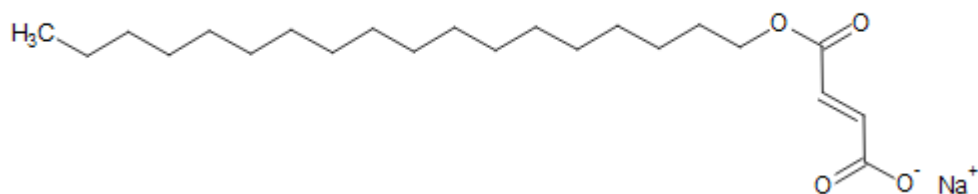


Obrázek 5: Nové balení Recovery²⁷

Stearylumarát sodný $C_{22}H_{39}NaO_4$ (obrázek 7) patří mezi nejnovější kluzní látky, které se využívají k výrobě a lisování tablet. Koncentrace látky se využívá v rozmezí 0,5 – 2 %, tedy nižší než stearan hořečnatý (obrázek 6). Stearylumarát sodný, který je hydrofilnější než stearan hořečnatý, umožňuje rychlejší absorpci vody do tablet vzorku. Doba rozpadu tablet se stearylumarátem je nižší než se stearanem hořečnatým. Při použití stearylumarátu mají tablety vyšší pevnost a zvyšuje se rychlost uvolňování léčivé látky ze vzorku tablety. K vytlačení tablety z matrice je potřebná síla vyšší u stearylumarátu sodného než u stearanu hořečnatého³⁴.



Obrázek 6: Stearan hořečnatý³⁴



Obrázek 7: Stearylumarát sodný³⁴

2.4.5 Další výrobky molekulárního vodíku

Firma H2 Europe není jedinou firmou, která vyrábí molekulární vodík v tabletách. Na trhu existují i další produkty, které garantují uvolňování vodíku z tablet. Jako např.: patentovaná kombinace přírodních materiálů Active H₂ (obrázek 8). Složení tablety Active H₂ o hmotnosti 450 mg je podle výrobce následující: směs čistého hořčičku, kyselina jablečná, kyselina fumarová a maltóza. V balení je obsaženo 60 tablet ³⁵.



Obrázek 8: Active H₂ ³⁵

2.4.6 Klinický výzkum molekulárního vodíku

Detekční techniky pro stanovení molekulárního vodíku

Standardní metody pro stanovení koncentrace vodíku v klinických vzorcích jsou plynová chromatografie a elektrochemické metody. Stanovení přesné koncentrace vodíku je nezbytné jak pro vědecký výzkum, tak i pro praktické využití vodíku ²⁰.

Plynová chromatografie je technika, která je používána pro rozsáhlé stanovení koncentrace vodíku v roztoku krve. Tato technika je schopna kvantitativně analyzovat až stopové množství koncentrace vodíku.

Elektrochemické metody jsou často využívány ke stanovení koncentrace vodíku u vzorků tkání a krve. Pomocí standardního roztoku vodíku o různých koncentracích byla získána kalibrační křivka, ze které byly vyhodnoceny naměřená data, čímž došlo k získání absolutní koncentrace vodíku ve vzorku. To představuje velkou výhodu pro vodíkové snímače pro detekci koncentrace vodíku v kapalině nebo v tkáni. Podle principu lze vodíkové senzory rozdělit na elektrochemické, polovodičové, termoelektrické nebo typ optického vlákna ²⁰.

Studie: Vliv inhalace vodíku na poškozená játra a mozek

V experimentu na myších byla snaha prokázat vliv inhalace vodíku na poškozená játra. Těm byl blokován na 90 minut přísun krve a následně byl krevní průtok játrům obnoven na 180 minut. Výsledkem byla zjištěna v játrech nižší jaterní hladina (S-ALT – alaninaminotransferáza) a nižší obsah malondialdehydu. Byla provedena inhalace helia, ale tento příznivý efekt se nepotvrdil²¹. Antioxidační efekt byl také potvrzen v modelových pokusech na potkaních, u kterých bylo navozeno umělé poškození mozku na tkáňových kulturách, které byly uvedeny do akutního oxidačního stresu třemi nezávislými metodami. Vodík redukoval selektivně HO[•], který vykazoval největší cytotoxický účinek ze skupiny ROS^{20,21}.

Studie: vliv vody obohacené o vodík na hladinu cholesterolu?

Cílem studie bylo zjistit, jaké charakteristické účinky během 10 týdnů má voda obohacená o vodík (0,9 – 1,0 litr/den) na obsah, složení a biologickou aktivitu lipoproteinů v séru u 20 pacientů (12 mužů, 8 žen ve věku 20 ≥ 43) s metabolickým syndromem. Člověk s metabolickým syndromem má zvýšené riziko vzniku kardiovaskulárních chorob, mrtvice a diabetu 2. typu. Pro správné vyhodnocení výsledků musela být splněna alespoň jedna podmínka – hypertenze (diastolický krevní tlak 80-89 mmHg a systolický krevní tlak 139 mm Hg), diabetes (hladina glukózy nalačno od 5,2 do 6,9 mmol.l⁻¹), LDL-C > 2,59 mmol.l⁻¹. Všichni účastníci museli podepsat písemný souhlas s jejich účastí v této studii. Pacienti konzumovali vodu obohacenou vodíkem (0,9 – 1,0 litr/den) po dobu 10 týdnů. Vzorky séra byly odebírány na počátku studie (0 týden) a po uplynutí 10 týdnů na lačno. Následně byla provedena analýza odebraného séra, která ukázala spotřebu vodíku. Ta vedla ke snížení HDL-cholesterolu (HDL-C „hodný“) a LDL-cholesterolu (LDL-C „zlý“). Zlepšení hodnot HDL-cholesterolu bylo posouzeno 4 nezávislými hodnotami. Bylo zjištěno, že voda obohacená o vodík vede ke zvýšení antioxidačního enzymu SOD a ke snížení reaktivní thiobarbiturové kyseliny v celém séru a LDL-cholesterolu. Spotřeba vodíku neovlivnila hodnotu glukózy. Výsledkem této studie bylo zjištění, že vodík má blahodárné účinky na snížení koncentrace lipidů³⁶.

Studie: vliv inhalace vodíku na akutní poranění plic

Akutní poranění plic (ALI) je velmi vážné onemocnění, u kterého mají jedinci parciální arteriální (tepenný) tlak < 300 mm Hg . V této studii byla zkoumána hypotéza, která za pomoci inhalace vodíku, měla u myší zmírnit akutní poranění plic vyvolané liposacharidem (LPS). Pro experiment byli vybráni myši samci ve věku 8 – 10 týdnů o hmotnosti 20 – 25 g. Zakoupený směsný plyn, který obsahoval 2 % vodíku, se rozpustil ve fyziologickém roztoku a

koncentrace nového roztoku byla upravena na 5 mg.ml^{-1} . V samotném experimentu byli myši samci pod vlivem anestezie, kdy jim byl proveden výplach průdušnice fyziologickým roztokem. Měření se skládalo z několika částí ³⁷:

- a. třicet šest myší bylo náhodně vybráno a rozděleno do tří skupin – falešná skupina (fyziologický roztok + 2 % vodíku ve směsi plynů), kontrolní skupina (LPS + normální vzduch) a experimentální skupina (LPS + 2 % vodíku ve směsi plynů). Cílem bylo sledovat úmrtnost myší každých 12 hodin po dobu 96 hodin.
- b. tato část je určena k testům a imunochemickému vyšetření. Třicet šest myší bylo rozděleno do tří skupin. Šest myší bylo usmrceno po stimulaci LPS.
- c. myši pod vlivem anestezie byly umístěny do inhalačního zařízení, kde 2 hodiny spontánně dýchaly.

Plicní tkáně byly testovány na poměr mokré/suché (W/D), oxidační stres, imunohistochemii, histologii a „western blot” vyšetření. Pomocí testů a vyšetření bylo zjištěno, že vodík zvýšil životnost myší, snížil v plicích poměr W/D, snížil obsah malonaldehydu a obsah nitrotyrosinu. Vodík inhiboval myeloperoxidázu a díky SOD udržuje činnost v plicní tkáni. Vodík oslabuje histopatologické změny a zmírňuje apoptózu plicních buněk. Výsledky ukazují, že vodík zlepšil inhalaci LPS-indukované ALI a může se projevit svou ochrannou funkcí proti ROS ³⁷.

Studie: účinek vodíku na diabetickou retinopatii u potkanů?

Diabetická retinopatie je nejčastější příčina cévního onemocnění sítnice a může vést až k úplné slepotě. Studie byla zaměřena na posouzení ochranného účinku roztoku vodíku u diabetických potkanů, kteří byli indukováni streptozotocinem. Samci potkanů byli rozděleni do tří skupin – nediabetická kontrolní skupina (kontrola bez DM – diabetes mellitus), diabetická kontrolní skupina (kontrola DM) a diabetická skupina potkanů (DM – vodíkový fyziologický roztok). Po dobu 4 týdnů byl potkanům v DM vodíkové skupině aplikován injekčně do oblasti pobřišnice vodíkový roztok (roztok nasycený vodíkem chloridu sodného v množství 5 ml.kg^{-1} denně). Cévní sítnicová permeabilita byla hodnocena pomocí měření úniku do sítnice (Evans blue). Odumírání sítnice pak bylo hodnoceno speciálními postupy. Pomocí barvení hematoxylinem a eosinem byla sledována tloušťka sítnice. Výsledky léčby ukázaly, že vodíkový fyziologický roztok by mohl snížit aktivitu kaspázy, snížit vaskulární permeabilitu a apoptózu sítnice. V budoucnu by možná mohl vodíkový fyziologický roztok vést ke klinické léčbě diabetické retinopatie ³⁸.

2.5 Antioxidační aktivita

Antioxidační aktivita byla definovaná jako schopnost látky (i směsi látek) inhibovat oxidační degradaci rozdílných sloučenin. Dále by se měly rozlišovat dva pojmy – antioxidační kapacita a reaktivita. Kapacita udává informaci o časovém intervalu trvání antioxidačního účinku. Reaktivita charakterizuje počátek dynamiky v průběhu antioxidačního procesu při koncentraci antioxidantu³⁹.

Pro porovnání antioxidačních účinků různých směsí byl zaveden pojem celková antioxidační aktivita (TAA). TAA určuje schopnost látky eliminovat radikály. Obecně existuje mnoho faktorů, které ovlivňují antioxidační aktivitu. Typickými příklady jsou – koncentrace antioxidantu, přítomnost dalších antioxidantů či jiných látek, pH, rozpouštědlo, homogenita, teplota či doba stání a mnoho dalších⁴⁰.

2.6 Metody pro stanovení antioxidační aktivity

Pro stanovení antioxidační aktivity bylo vyvinuto řadu metod. Obecně lze metody rozdělit do dvou skupin:

- a. metody, které dokáží hodnotit schopnost eliminovat radikály
- b. metody, které posuzují redoxní vlastnosti látek

Nejčastější metody pro její stanovení jsou TRAP (Total Radical Trapping Parameter), TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity). Dále se antioxidační aktivita dá stanovit z celkového množství antioxidantů ve vzorku (TAC), které se stanovují chemickými metodami s fluorimetrickou či spektrometrickou detekcí. Mezi tyto metody patří ABTS/TEAC, FRAP (Total Radical Trapping Parameter), CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity) a DPPH [radikál 1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl]^{41,42}.

Existují 2 základní principy, které popisují reakci antioxidantu s volnými radikály (redukčními činidly). Jednotlivé metody lze podle mechanismů rozdělit na⁴¹:

- a) metody, které jsou založeny na principu přenosu atomu vodíku, mají schopnost antioxidantu likvidovat volné radikály předáním atomu vodíku. Tento mechanismus se nejčastěji uplatňuje u sloučenin fenolického typu (Ar-OH) s ROO[•] radikálem. To je typické pro metody ORAC a TRAP.
- b) metody založené na principu přenosu elektronu, využívají redukční schopnosti antioxidantů. Ke vzorku, který obsahuje antioxidant, je přidáno činidlo (kovový ion, vhodné radikály např.: radikál kation ABTS^{•+} aj.) přenosem elektronu.

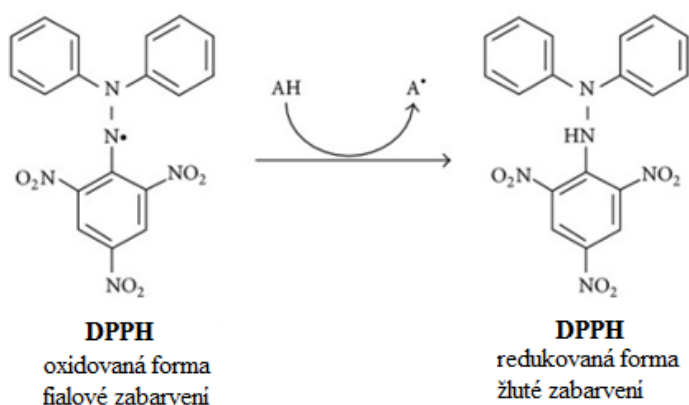
Činidlo (oxidant) se redukuje, dochází ke změně zbarvení a barevná změna je spektrometricky detekovatelná. Patří sem ABTS/TEAC, FRAP, CUPRAC a DPPH⁴¹.

2.6.1 Metoda DPPH

Metoda DPPH je považována za jednu ze základních metod, kterou stanovujeme celkovou antioxidační aktivitu čistých látek, ale i různých směsí. Zhruba před 50 lety tuto metodu poprvé popsal Marsden Blois⁴³.

Metoda je založena na reakci antioxidantu se stabilním dusíkovým radikálem DPPH[•] [1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl] měřené spektrometricky při vlnové délce 517 nm, kde dosahuje maxima absorbance. Při této reakci dochází k redukci barevného fialového radikálu na nažloutlou neutrální molekulu DPPH-H (rovnice 11). Pokles absorbance (odbarvení) a rychlost je přímo úměrná antioxidační účinnosti stanovované látky⁴⁴. Reakce je nejčastěji detekována spektrometricky, ale lze ji provádět i na mikrotitračních destičkách, metodou ESR či HPLC²⁹. Jedná se o jednoduchou metodu, ale mohou nastat jistá omezení. Jedním z nich je, že antioxidanty můžou reagovat velmi rychle (např.: peroxylové radikály). Přesto je tato metodika používána v potravinářském, pivovarském průmyslu a dalších⁴³. Antioxidační aktivita směsných vzorků se stanovuje na standard askorbové kyseliny nebo na Troloxu^{45,46}.

Rovnice 11: Struktura DPPH a redukce na neutrální molekulu²⁶

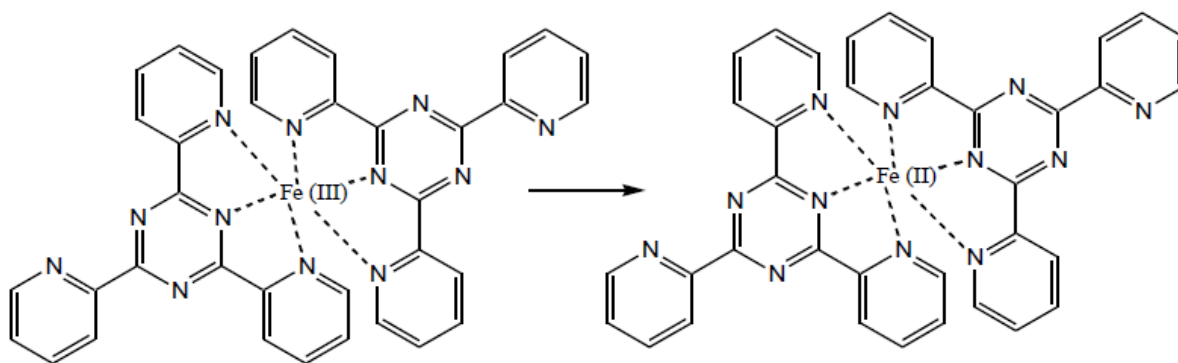


2.6.2 Metoda FRAP

FRAP je zkratka, která označuje ferric reducing antioxidant power nebo také můžeme v literatuře najít pod názvem ferric reducing ability of plasma. Patří mezi jednoduchou metodu, která je založena na hodnocení redukčních účinků antioxidantů. Na rozdíl od ostatních metod zde není využitý žádný radikál, protože je měřena redukční síla antioxidantů. Poprvé

tato metoda byla popsána v roce 1996 Benziem a Strainem pro měření redukční síly krevní plazmy. V dalších letech byla upravována a použita na měření antioxidantů rostlinných výtažků ⁴⁶. Princip metody je založen na redukci bezbarvých železitých komplexů ze vzorku (Fe^{3+} -TPTZ) pomocí antioxidantů. Při vlnové délce 593 nm dochází k nárůstu absorpance, což odpovídá antioxidační aktivitě modrého komplexu Fe^{2+} -TPTZ (rovnice 12). Měření probíhá za nízkého pH (3,6) a je doprovázeno barevnou změnou ²⁹. Metoda FRAP měří spíše redukční schopnost antioxidantů, než antioxidační aktivitu látek. Naměřené hodnoty se pak vyhodnotí do grafu – závislost absorpance na koncentraci Fe^{2+} iontů. Následně se vypočítá redukční schopnost antioxidantů ⁴⁶.

Rovnice 12: Redukce bezbarvého komplexu Fe^{3+} - TPTZ na modrý Fe^{2+} - TPTZ komplex ⁴⁷

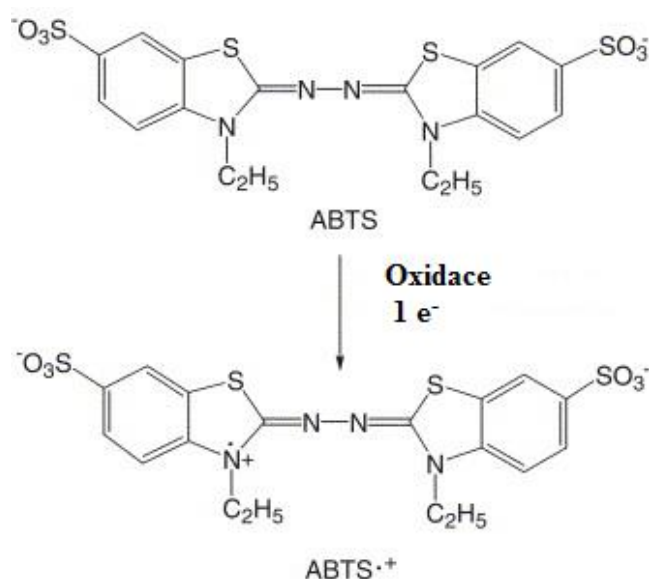


2.6.3 Metoda ABTS/TEAC

Patří k základním a nejpoužívanějším metodám, které se používají na stanovení TAA. Můžeme ji zařadit do skupiny, která eliminuje syntetický radikál. Metoda je založena na zhášení syntetického stabilního radikálového kationtu $\text{ABTS}^{+\cdot}$ [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazol-6-sulfonová kyselina)] (rovnice 13). Metoda je někdy označována jako TEAC, jelikož výsledná antioxidační aktivita vzorku je vztahována k antioxidační aktivitě troloxu ¹⁸.

Antioxidanty, které zhášejí $\text{ABTS}^{+\cdot}$ radikál, můžeme stanovovat spektrometricky na základě změn absorpčního spektra radikálu. $\text{ABTS}^{+\cdot}$ radikál je stálý a má intenzivně modré zabarvení. Absorpční maxima radikálu jsou u vlnových délek 415, 645, 734 a 815 nm. Měřeno je nejčastěji kolem 714 nm ⁴⁸. Radikál kation je rozpustný ve vodě ale i v organických rozpouštědlech. Lze ho použít při mnoha stanoveních antioxidační aktivity lipofilních i hydrofilních vzorků. Tato metoda byla poprvé popsána panem Millerem a kol ⁴⁹.

Rovnice 13: Jednoelektronová oxidace ABTS na ABTS^{•+} radikál kation⁵⁰



2.6.4 Metoda ORAC

Tato metoda byla poprvé navržena v pracích Cao a kol.⁵¹ a Ghiselliho a kol.⁵². V systému jsou generovány kyslíkové radikály a hodnotí se schopnost stanovované látky zpomalit či zastavit radikálovou reakci⁵³. U metody se používá bis azidový iniciátor AAPH [2,2'- azobis (2-amidinopropan)-dihydrochlorid], který se zahřívá za dostatečného množství kyslíku a tím dochází ke vzniku peroxidových radikálů. Vzniklé radikály reagují s fluorescenční sondou a tím dochází ke zhašení fluorescence. Pokles fluorescence se pak sleduje spektrometricky. Dochází k porovnání poklesu fluorescence reakční směsi obsahující jen peroxidové radikály a fluorescenční sondou s klesající fluorescencí směsi, která obsahuje navíc antioxidant. Ovšem v přítomnosti antioxidantu je pokles absorbance pomalejší. Antioxidační kapacita stanovuje plochu mezi křivkami, která vyjadřuje zhašení fluorescence v obou případech⁵⁴.

Původní metoda ORAC používá jako fluorescenční sondu protein β -fykoerythrin. Protein byl nahrazen fluoresceinem kvůli problémům s citlivostí na světlo, reakcím s polyfenoly a konzistentností výsledků⁵⁴. Fluorescein je stabilní fluorescenční indikátor, který má vysoký kvantový výtěžek a dosahuje reprodukovatelnějších výsledků.

Metoda se používá ke stanovení antioxidační aktivity různých vzorků (potravinářské a zemědělské výrobky, farmaceutické produkty, krevní sérum). Jako kontrolní látka se používá standard trolox. Nevýhodou metody je, že není možné stanovit lipofilní antioxidanty. Muselo by dojít k modifikaci metody⁴¹.

2.6.5 CUPRAC

Metoda CUPRAC využívá redukčních vlastností podobně jako metoda FRAP s rozdílem použití mědi místo železa. Je popsána autory Apak a kol., ve které se používá činidlo neocuproinu (Nc) jako chelatačního činidla. Podstatou metody je redukce mědi z oxidačního stavu dva do stavu jedna antioxidantem, který je obsažen ve vzorku. Dochází k měření absorbance chromoforu Cu(I)-Nc chelátu jako výsledek redoxní reakce CUPRAC s antioxidantem a činidlem Cu(II)-Nc. Maximum absorbance chromoforu odpovídá při vlnové délce 490 nm. Metoda byla aplikovaná na stanovení antioxidační aktivity antioxidantů v potravinářství ale i v krevním séru^{55,56}.

2.6.6 TRAP

Tato metoda byla poprvé popsána Waynerem a kol⁵⁷. Je založena na principu metody ORAC, ale používá se širší spektrum iniciátorů a sond. Stanovuje tedy schopnost antioxidantu ovlivnit reakci mezi peroxidovými radikály a cílovou sondou. Iniciační radikály jsou generovány selektivnějšími azidy (AAPH), enzymy (křenová peroxidasa), singletovým kyslíkem nebo NO[•] radikálem. Jako cílová sonda se používá dichlorofluorescein diacetát, fluorescein, luminol nebo β-fykoerythrin⁵⁴.

Obdobně jako u metody ORAC, dochází ke zhášení fluorescence sondy pomocí volných radikálů, ale v přítomnosti antioxidantu je zhášení fluorescence potlačeno. Oxidace sondy je tedy sledována opticky či pomocí fluorescence. Jako kalibrační standard se používá Trolox. U metody TRAP musí být splněno několik předpokladů:

- sonda musí reagovat s peroxidovým radikálem i při nízkých koncentracích,
- pro dosažení největší intenzity se musí projevit spektroskopická změna mezi původní a oxidovanou sondou,
- při oxidaci sondy se nesmí projevit žádná radikálová řetězová reakce.

Metoda TRAP se používá pro stanovení antioxidační aktivity plazmy a krevního séra. Jsou měřeny nízkomolekulární antioxidanty jako např.: askorbová kyselina, glutathion nebo β-karoten⁴¹.

2.6.7 Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie je vhodnou metodou pro získání informací o látce, která je ochotná odštěpovat elektrony. Je prokázáno, že v mnoha případech hodnoty potenciálů (E_A)

koreluje s antioxidační aktivitou látek, která je stanovena jinými metodami např.: DPPH^{58,59}.

Redukční schopnost látek můžeme vyhodnotit dvěma způsoby^{58,59}:

- Potenciál oxidační anodický pík E_A
- Anodický proud I_A

Čím je nižší hodnota E_A , tím látka snadněji odevzdává elektrony a může být tedy lepším antioxidantem. Z výšky anodického proudu I_A můžeme zjistit koncentraci látky.

3. Experimentální část

Tato diplomová práce byla zaměřena na stanovení antioxidační aktivity rozdílných tablet molekulárního vodíku od firmy H2 Europe. Ke stanovení antioxidační aktivity jsme získali dvě zcela odlišné balení Recovery popsané v samostatné kapitole (viz. kapitola 3.3.1 a 3.3.2). K testování tablet Recovery byly použity dvě metody, které se používají ke stanovení antioxidační aktivity (DPPH, FRAP). Následně byl pomocí atomové absorpční spektrometrie stanoven obsah vápníku a hořčíku v tabletách Recovery. Nakonec byl pomocí potenciometrie naměřen redoxní potenciál tablet.

3.1 Použité chemikálie

1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl, p.a	SIGMA-ALDRICH [®] , Německo
Askorbová kyselina, p.a	PENTA, Česká republika
Methanol, čistota: p.a	VWR, Česká republika
Kyselina ortofosforečná, p.a	PENTA, Česká republika
Hydroxid sodný, p.a	PENTA, Česká republika
pH kalibrační roztoky (4,0; 7,0)	Merck spol. s.r.o., Česká republika
Kyselina chlorovodíková 35 %, p.a	PENTA, Česká republika
Kyselina dusičná 65 %, p.a	PENTA, Česká republika
Monohydrát dihydrogenfosforečnanu vápenatého, p.a	Lachema, Česká republika
Kyselina octová 99 %, p.a	PENTA, Česká republika
Trihydrát octanu sodného, p.a	PENTA, Česká republika
2,4,6-tris-(2-pyridyl)-s-triazin, p.a	SIGMA-ALDRICH [®] , Německo
Hexahydrát chloridu železitého, p.a	SIGMA-ALDRICH [®] , Německo
Chlorid draselný, p.a	Lachema n.p., Česká republika
Uvolňovací činidlo LaCl ₃ o koncentraci 25 g.l ⁻¹	Analytika, Česká republika
CRM – kalibrační roztok, ASTASOL [®] - Mg	Analytika, Česká republika
CRM – kalibrační roztok, ASTASOL [®] - Ca	Analytika, Česká republika

3.2 Použité přístroje k měření

Stanovení antioxidační aktivity bylo prováděno spektrometricky pomocí UV/VIS spektrometru Lambda 25 (Perkin Elmer, USA) v křemenných kyvetách o tloušťce 1 cm. Naměřená data byla vyhodnocena pomocí softwaru UV WinLab a graficky zpracována programem MS Excel.

Pro stanovení obsahu vápníku a hořčíku v tabletách Recovery byl použitý metoda atomové absorpční spektrometrie. Pro měření se provedlo pomocí spektrometru SavantAA (GBC, Austrálie).

Pro přípravu tlumivých roztoků byl použit pH-metr InoLab 720 s kombinovanou skleněnou elektrodou (WTW, Německo).

Pro stanovení redoxního potenciálu tablet Recovery byl použit přístroj ISES Professional (školní experimentální systém PC.IN/OUT, Česká Republika). Byl použitý elektroodový systém s měrnou platinovou elektrodou a srovnávací kalomelovou elektrodou.

Všechny chemikálie včetně vzorků byly váženy na elektronických analytických váhách značky KERN (Kern & Sohn, GmbH, Německo).

Pro důkladné rozpuštění připravovaných roztoků či vzorků byla využívána ultrazvuková lázeň značky Sonorex (Bandelin, Německo). K zahřátí připravených roztoků na teplotu 37 °C se použil vyhřívací blok značky EVATERM (Labicom s.r.o., Česká Republika).

3.3. Analyzované vzorky

3.3.1 Recovery s HydroFX

K dispozici byly tablety ze dvou různých šarží:

1. Tablety šarže LOT dále nečitelné byly vyrobeny v USA pro dovozce SevenPoint 2 Europe s.r.o. se sídlem v Ostravě. Podle výrobců jsou tablety Recovery unikátní mix minerálů, jež vylučují plynný vodík v redoxních reakcích. Složení těchto tablet je uvedeno v kapitole 2.4.3. Recovery je podle příbalového letáku definován jako doplněk stravy, ale tablety nejsou vhodné jako náhrada pestré stravy. Tyto tablety nejsou rozpustné ve vodě, ale pouze částečně v kyselém prostředí. Balení obsahovalo 90 tablet, kdy jedna tableta vážila přibližně 450 mg.

2. Tablety šarže 42609EXP7 byly vyrobeny pro stejnou firmu. Minimální trvanlivostí tablet byla datována do roku 2016. Další informace jsou totožné jako v předchozím případě.

3.3.2 Recovery H2

Tablety šarže LOT 2161108 byly vyrobeny v Kanadě pro firmu H2 Europe se sídlem v Ostravě (The Molecular Hydrogen Company). Minimální trvanlivost tablet je datována do EXP 11/2019. Tyto tablety jsou částečně rozpustné ve vodě. Recovery H2 jsou definovány jako minerální tablety do vody. Balení obsahovalo 90 tablet, kdy jedna tableta vážila přibližně 400 mg (kapitola 2.4.4).

3.4 Příprava a úprava roztoků

3.4.1 Příprava roztoků pro metodu DPPH

Pracovní roztok volného radikálu DPPH

Roztok volného radikálu DPPH o koncentraci $1,16 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním navážky v methanolu. Pro důkladné rozpuštění byla použita ultrazvuková lázeň.

Příprava fosfátového tlumivého roztoku

Fosfátový tlumivý roztok o $\text{pH} = 3$ byl připraven titrací připravenými roztoky $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ kyseliny fosforečné a 50 % hydroxidu sodného. Pro titraci byl použit z kalibrovaný pH metr.

Kalibrační řada standardu askorbové kyseliny

Zásobní roztok standardu askorbové kyseliny o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním navážky v tlumivém roztoku o $\text{pH} = 3$. Pro úplné rozpuštění pevné látky byla použita ultrazvuková lázeň. Z připraveného zásobního roztoku byla připravená postupným ředěním kalibrační řada o koncentraci $5 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$, $2 \cdot 10^{-5}$, $3 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$.

Příprava Clark-Lubs tlumivého roztoku ($0,2 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HCl} + 0,2 \text{ mol.l}^{-1} \text{ KCl}$)

Zásobní roztok tlumivého roztoku o $\text{pH} = 2$ byl připraven do 500 ml odměrné baňky. Roztok chloridu draselného byl připraven navážením 7,456 g do 500 ml odměrné baňky. Roztok kyseliny chlorovodíkové byl připraven odpipetováním vypočteného množství do 100 ml

odměrné baňky. Do 500 ml odměrné baňky bylo přidáno 58,5 ml připraveného roztoku $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ HCl a celkový objem byl doplněn roztokem $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ KCl.

3.4.2 Příprava roztoků pro metodu FRAP

Příprava pracovního roztoku FRAP

Pracovní roztok FRAP byl připraven smícháním 10 dílů připraveného acetátového tlumivého roztoku o $\text{pH} = 3,6$; 1 dílu 10 mmol.l^{-1} roztoku TPTZ ve 40 mmol.l^{-1} HCl a 1 díl 20 mmol.l^{-1} roztoku FeCl_3 .

Příprava acetátového tlumivého roztoku

Acetátový tlumivý roztok o $\text{pH} = 3,6$ byl připraven do 500 ml odměrné baňky. Podle vypočítaného množství pevného octanu sodného bylo jeho množství rozpuštěno v destilované vodě. K tomuto množství bylo odpipetováno 8 ml kyseliny octové a celkový objem byl doplněn destilovanou vodou po rysku baňky.

Kalibrační řada askorbové kyseliny

Zásobní roztok standardu askorbové kyseliny o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním navážky v destilované vodě. Z tohoto roztoku byla připravena postupným ředěním destilovanou vodou kalibrační řada o koncentraci $5 \cdot 10^{-4}$; $4 \cdot 10^{-4}$; $3 \cdot 10^{-4}$; $2 \cdot 10^{-4}$; $1 \cdot 10^{-4}$; $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$.

3.4.3 Příprava roztoků pro AAS

Zásobní roztok vápníku

Ze zásobního standardu vápníku (CaCO_3 v HNO_3) o koncentraci 1 g.l^{-1} byl připraven roztok o koncentraci 100 mg.l^{-1} (max. ředění v jednom kroku $100\times$). Z tohoto roztoku byla připravena kalibrační řada o rozdílných koncentracích dle tabulky 5. Do baňky byly přidány 2 ml uvolňovacího činidla LaCl_3 (uvolnění vápníku z komplexů) a celkový objem byl doplněn destilovanou vodou po rysku.

Zásobní roztok hořčíku

Ze zásobního roztoku hořčíku o koncentraci 1 g.l^{-1} byl připraven roztok o koncentraci 10 mg.l^{-1} (max. ředění v jednom kroku $100\times$). Z připraveného roztoku byla připravena

kalibrační řada o rozdílných koncentracích dle tabulky 5. Další postup byl totožný jako u stanovení vápníku.

Zásobní roztok dihydrogenfosforečnan vápenatý

Byl připraven zásobní roztok dihydrogenfosforečnanu vápenatého o koncentraci vápníku 1 g.l^{-1} , ze kterého byl připraven roztok o koncentraci 100 mg.l^{-1} . Další postup byl totožný jako u stanovení vápníku.

Tabulka 5: Hmotnostní koncentrace Ca a Mg

prvek	standard 1	standard 2	standard 3	standard 4	standard 5
Ca [mg.l⁻¹]	1	2	5	8	10
Mg [mg.l⁻¹]	0,05	0,1	0,25	0,5	0,75

3.4.4 Úprava vzorků

Jednotlivé tablety Recovery byly zhomogenizovány v achátové třecí misce a přesypány do plastových mikrozkušavek.

3.5 Pracovní postupy měření

3.5.1 Optimalizace kalibračních závislosti metody DPPH

Jako kalibrační standard byla použita askorbová kyselina, která byla rozpuštěna ve fosfátovém tlumivém roztoku. U askorbové kyseliny byly studovány rozdílné koncentrační rozsahy kalibrací. Vybarvovací reakce byla provedena v 5 ml odměrných baňkách, kde bylo smícháno 2,5 ml methanolického roztoku DPPH o koncentraci $1,16 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$, přídavek askorbové kyseliny podle příslušné koncentrace (tabulka 6) a celkový objem byl doplněn fosfátovým tlumivým roztokem o $\text{pH} = 3$. Takto připravené roztoky byly inkubovány ve tmě při laboratorní teplotě $24 \text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 minut nebo při teplotě $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ v časovém intervalu 20 minut a 10 minut chladnutí na laboratorní teplotu. Po uplynutí doby inkubace byla měřena absorbance při konstantní vlnové délce 524,3 nm vůči slepému vzorku. Srovnávací kviveta obsahovala methanolický roztok. Naměřená data byla vyhodnocena pomocí softwaru UV WinLab a graficky zpracována programem MS Excel.

Tabulka 6: Přídavek askorbové kyseliny

koncentrace [mol.l⁻¹]	askorbová kyselina [μl]
5.10 ⁻⁶	12,5
1.10 ⁻⁵	25,0
2.10 ⁻⁵	50,0
3.10 ⁻⁵	75,0
4.10 ⁻⁵	100
5.10 ⁻⁵	125

3.5.2 Pracovní postup metody DPPH

Do 25 ml odměrných baněk bylo naváženo množství vzorku tablet Recovery. K tomuto množství bylo odpipetováno 12,5 ml methanolického roztoku volného radikálu DPPH, 200 μl koncentrované H₃PO₄ nebo 630 μl zředěné HCl (podle výpočtu) a následně celkový objem byl doplněn fosfátovým tlumivým roztokem o pH = 3. Inkubace vzorků probíhala ve tmě při laboratorní teplotě 24 °C po dobu 30 minut nebo při teplotě 37 °C v časovém intervalu 20 minut a 10 minut chladnutí na laboratorní teplotu. V průběhu inkubace byly baňky promíchány. Po uplynutí doby inkubace byly vzorky spolu s roztoky kalibrační řady kyseliny askorbové (kalibrační rozsah 5.10⁻⁵ – 5.10⁻⁶ mol.l⁻¹) proměřeny spektrometricky v křemenných kyvetách při vlnové délce 524,3 nm proti slepému vzorku (methanolický roztok). Výsledkem byly naměřené hodnoty absorbancí. Pomocí vypočítané regresní křivky z kalibrační křivky byla vypočítaná antioxidační aktivita vzorků (TAA) a následně přepočítaná na AAE (ascorbic acid equivalents v mg.g⁻¹).

3.5.3 Optimalizace kalibračních závislostí metody FRAP

U metody FRAP byl použitý kalibrační standard askorbové kyseliny. Dále byl standard askorbové kyseliny vyzkoušen a úspěšně použit pro tuto metodu. Jako v předchozím případě byly studovány rozdílné koncentrační rozsahy kalibrací askorbové kyseliny. Stanovení bylo prováděno v 10 ml odměrných baňkách, kam bylo odpipetováno 6 ml pracovního roztoku FRAP, 200 μl standardu askorbové kyseliny a celkový objem byl doplněn destilovanou vodou. Připravené roztoky byly promíchány a temperovány při 37 °C nebo laboratorní teplotě 24 °C po dobu 30 minut. Poté byla změřena absorbance při konstantní vlnové délce 593 nm proti slepému vzorku. Srovnávací kyveta obsahovala acetátový tlumivý roztok. Naměřená data byla vyhodnocena pomocí softwaru UV WinLab a graficky zpracována programem MS Excel.

3.5.4 Pracovní postup metody FRAP

U metody FRAP byla sledována změna absorbance při vlnové délce 593 nm, která má za následek jednoelektronovou redukci žlutě zbarveného komplexu Fe(III)-TPTZ na modrý Fe(II)-TPTZ²⁴.

Do 10 ml odměrných baněk bylo naváženo množství vzorku tablet Recovery. K tomuto množství bylo napipetováno 6 ml pracovního roztoku FRAP a celkový objem byl doplněn destilovanou vodou. Připravené roztoky byly promíchány a inkubovány při laboratorní teplotě nebo při teplotě 37 °C pomocí vyhřívací bloku po dobu 30 minut. Poté byly vzorky spolu s kalibračními roztoky standardu askorbové kyseliny (kalibrační rozsah $5 \cdot 10^{-4}$ – $5 \cdot 10^{-5}$ mol.l⁻¹) proměřeny spektrometricky v křemenných kyvetách při konstantní vlnové délce 593 nm proti slepému vzorku (acetátový tlumivý roztok).

Výsledkem byly naměřené hodnoty absorbancí. Pomocí vypočítané regresní křivky z kalibrační křivky byla vypočítaná antioxidační aktivita vzorků (TAA) a následně přepočítaná na AAE (ascorbic acid equivalents v mg.g⁻¹).

3.5.5 Pracovní postup metody AAS

AAS měří úbytek intenzity elektromagnetického záření, které jsou způsobeny absorpcí volnými atomy v plynném stavu. Úbytek primárního záření je mírou koncentrace volných atomů prvku, který záření absorboval. Toto popisuje Lambert-Beerův zákon.

Do 25 ml odměrné baňky bylo naváženo množství vzorku z tablety Recovery. Pro lepší uvolnění vápníku byly odpipetovány a přidány ke vzorku 2 ml uvolňovacího činidla LaCl₃, pro okyselení bylo přidáno 250 µl koncentrované HNO₃ a celkový objem byl doplněn destilovanou vodou. Následně připravené vzorky s kalibračními roztoky vápníku a hořčíku byly proměřeny atomovým absorpčním spektrometrem za využití plamenové atomizace v plameni acetylen-vzduch. Výsledkem je stanovení koncentrace vápníku a hořčíku v tabletách Recovery.

3.5.6 Pracovní postup potenciometrie

Do nádobky bylo napipetováno 50 ml Clark-Lubsova tlumivého roztoku. Pro stanovení redoxního potenciálu byl sestaven elektrodový systém, který se skládal z měrné platínové elektrody a srovnávací kalomelové elektrody. Nejprve byl roztok probublán dusíkem kvůli přítomnému kyslíku, který je schopen reagovat s uvolňovaným vodíkem. Po ustálení redoxního potenciálu byla přidána navážka tablet Recovery. Po přidavku docházelo

k postupnému snižování redoxního potenciálu v závislosti na přidané navážce. Došlo k postupnému uvolňování vodíku do roztoku a následně jeho úniku z roztoku. Naměřené redoxní potenciály byly graficky zpracovány programem ISES (tabulka 7).

Tabulka 7: Podmínky měření

doba měření	3600 s
vzorkování	1 Hz
voltmetr	-500 až +500 mV

4. Výsledky a diskuse

4.1 Metoda DPPH

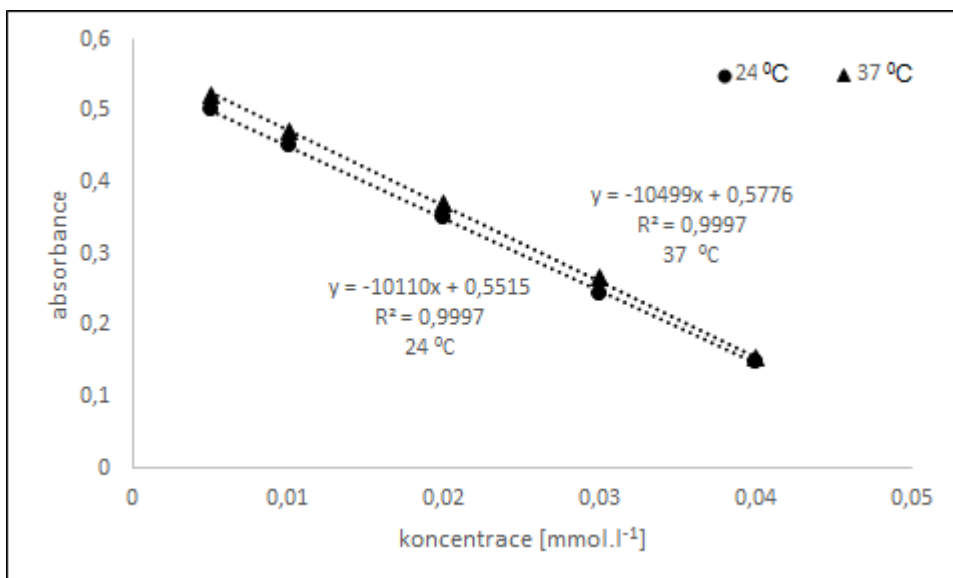
4.1.1 Optimalizace podmínek

Před samotným stanovením byla potřeba zjistit, při kterém pH tlumivého roztoku vykazují methanolický roztok volného radikálu DPPH o koncentraci $1,16 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$, standard askorbové kyseliny a samotný vzorek nejvyšší stabilitu. Samotné stanovení bylo prováděno v plastových mikrozkušavkách. Podle provedených výpočtů a experimentů bylo zjištěno, že vhodný poměr askorbové kyseliny a tlumivého roztoku je 1:10 v 1 ml methanolického roztoku DPPH.

Byla provedena řada experimentů, která identifikovala odbarvování vzorku tablet Recovery. Bylo zjištěno, že připravené roztoky se musí míchat v určitém pořadí. Nejprve byl odměřen methanolický roztok DPPH o koncentraci $1,16 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$, dále příslušná kyselina a nakonec tlumivý roztok o $\text{pH} = 3$. Pro udržení kyselého prostředí byla přidána kyselina (H_3PO_4 , HCl), protože samotný tlumivý roztok nedokázal udržet kyselé prostředí v roztoku. Odbarvovací reakce musela probíhat v kyselém prostředí kvůli uvolňování bublinek plynného vodíku z roztoku.

4.1.1.1 Kalibrační závislost

Pro stanovení antioxidační aktivity byl zvolen srovnávací standard askorbové kyseliny. Tento standard je dobře rozpustný ve vodě. Aby došlo k zabránění oxidaci na její redukovanou formu, askorbová kyselina byla rozpuštěna ve fosfátovém tlumivém roztoku. Kalibrační závislost byla stanovována u standardu askorbové kyseliny za laboratorní teploty $24 \text{ }^\circ\text{C}$ a teploty $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (obrázek 9). Z kalibrační závislosti byly získány rovnice lineární regrese a koeficient determinace (R^2). Tyto informace byly využity pro vyhodnocení výsledků.



Obrázek 9: Kalibrační křivka standardu askorbové kyseliny při laboratorní teplotě a teplotě 37 °C.

4.1.1.2 Optimalizace doby inkubace

Na stanovení TAA u vybraných vzorků byl sledován vliv doby inkubace ($t = 10 - 40$ minut) tablet Recovery. Rostoucí navážky (1 až 4 mg) byly inkubovány v příslušném čase při laboratorní teplotě a následně byly proměřeny na UV/Vis spektrometru postupem pro metodu DPPH. Z rovnice lineární regrese askorbové kyseliny byly naměřené absorbance tablet přepočítány na TAA a následně na AAE. Z vyhodnocených výsledků vyplívá, že antioxidační aktivita dosahuje nejvyšších hodnoty u 1 mg vzorku a s rostoucí navážkou postupně klesá (tabulka 8). Doba inkubace neměla vliv na antioxidační aktivitu u navážky 2 mg a dosahovala přibližně stejných výsledků (tabulka 9). Pro další stanovení byla využívána inkubace při 30 minutách vzhledem k největší stabilitě.

Tabulka 8: Vliv doby inkubace na AAE tablet Recovery s HydroFX 1. šarže

navážka [mg]	AAE [mg.g ⁻¹]
1	54
2	34
3	17
4	13

Tabulka 9: Vliv inkubace na AAE u navážky 2 mg vzorku Recovery s HydroFX 1. šarže

doba inkubace [min]	AAE [mg.g ⁻¹]
10	34
20	33
30	32
40	31

4.1.1.3 Volba vhodné kyseliny

Kyselina fosforečná (H₃PO₄)

Kvůli uvolňování bublinek vodíku z roztoku muselo být zajištěno pH v kyselé oblasti. Byl testován přídavek kyseliny fosforečné (150 µl, 250 µl, 300 µl a 400 µl) do připravených roztoků vzorku (tabulka 10). Po stanovení podle postupu metody DPPH bylo zjištěno, že u přídavku 150 µl H₃PO₄ byly zaznamenány veliké odchylky ve stanovení AAE, které byly pravděpodobně způsobeny malým přídavkem kyseliny (neudržení pH). Zatímco u objemu 250, 300 a 400 µl byla metoda robustní na mírné odchylky objemu H₃PO₄. Kvůli pomalejší disociaci bude reakce kyseliny fosforečné s hořčíkem probíhat pomaleji. Díky tomu, že hořečnaté ionty s fosforečnanem tvoří sraženinu (součin rozpustnosti 10^{-25,2}). Pro stanovení AAE bylo dále přidáváno 200 µl H₃PO₄.

Tabulka 10: Přídavek H₃PO₄ na navážku 2 mg Recovery s HydroFX 1. šarže

přídavek kyseliny H ₃ PO ₄ [µl]	AAE* [mg.g ⁻¹]	pH
150	34,3 ± 6,5	2,40
250	35,3 ± 2,2	2,28
300	37,3 ± 1,2	2,25
400	38,0 ± 1,4	2,26

* Průměrné hodnoty AAE se směrodatnou odchylkou ze 3 opakování

Kyselina chlorovodíková (HCl)

V žaludku je přítomná kyselina chlorovodíková, která se smíchává s potravou za dosáhnutí pH v rozmezí 2 – 4, což je optimální pro působení enzymů (lipáz, pepsinů). Naším cílem bylo nastavit podmínky podobné v žaludku pro uvolnění bublinek vodíku v rozmezí pH 2 – 4. Protože koncentrovaná HCl byla pro reakci metody DPPH příliš „silná“ a způsobovala nežádoucí urychlenou reakci odbarvování roztoku do žluta, bylo potřeba HCl podle příslušného výpočtu naředit na koncentraci 1,164 mol.l⁻¹, což odpovídalo acidobazickým rovno-

váham H_3PO_4 . Dále byl testován přídavek zředěné HCl (600 μl , 630 μl a 660 μl) k připraveným vzorkům (tabulka 11). Bylo zjištěno, že nejideálnější robustní přidávaný objem byl 630 μl zředěné HCl .

Tabulka 11: Přídavek HCl na navážku 2 mg Recovery s HydroFX 1. šarže

přídavek kyseliny HCl [μl]	AAE* [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$]	pH
600	48,7 \pm 1,7	2,60
630	44,7 \pm 0,5	2,52
660	44,5 \pm 0,4	2,50

* Průměrné hodnoty AAE se směrodatnou odchylkou ze 3 opakování

4.1.1.4 Vliv teploty na antioxidační aktivitu

Byl studován vliv teploty u dvou rozdílných vzorků Recovery připravených postupem metody DPPH. V obou případech vybarvovací reakce probíhala ve tmě při dané teplotě (tabulka 12). Je viditelné, že teplota snižuje hodnoty AAE v obou případech.

Tabulka 12: Srovnání AAE Recovery s přídavkem 630 μl HCl

laboratorní teplota 24 $^{\circ}\text{C}$ *		teplota 37 $^{\circ}\text{C}$ *	
Recovery s HydroFX 1. šarže [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$]	Recovery H2 [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$]	Recovery s HydroFX 1. šarže [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$]	Recovery H2 [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$]
46,6 \pm 0,7	28,4 \pm 0,4	34,9 \pm 0,5	19,3 \pm 0,2

* Průměrné hodnoty AAE se směrodatnou odchylkou ze 6 opakování

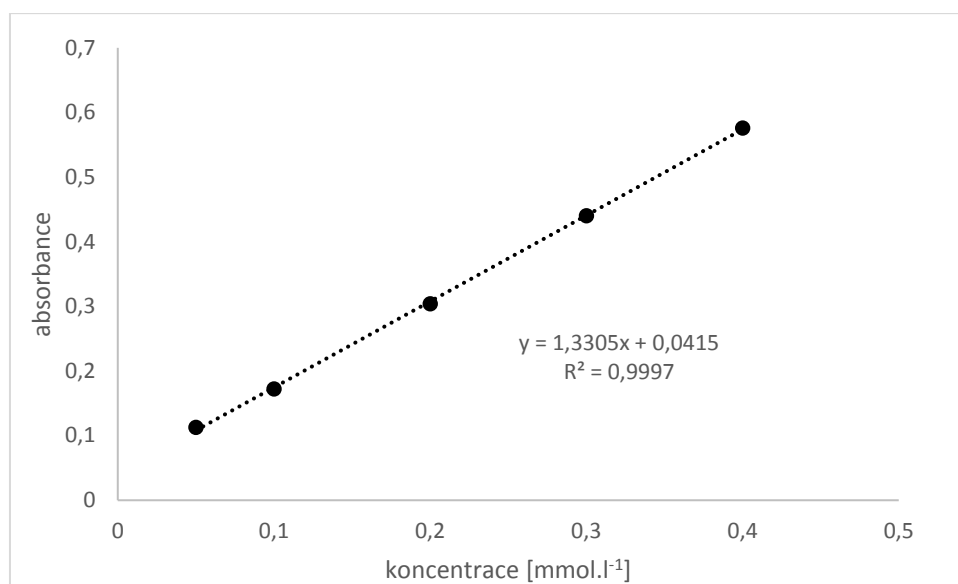
4.2 Metoda FRAP

4.2.1 Optimalizace podmínek u metody FRAP

U této metody byly použity podmínky dle citace 24.

4.2.1.1 Kalibrační závislost

Pro stanovení antioxidační aktivity byl zvolen srovnávací standard askorbové kyseliny. Aby došlo k zabránění oxidaci na její redukovanou formu, askorbová kyselina byla rozpuštěna v acetátovém tlumivém roztoku. Kalibrační závislost byla stanovována u vzorků Recovery za teploty 37 $^{\circ}\text{C}$ (obrázek 10). Z výsledné kalibrační závislosti byla získaná rovnice lineární regrese a koeficient determinace (R^2). Tyto informace byly využity dále ke zpracování výsledků.



Obrázek 10: Kalibrační křivka standardu askorbové kyseliny při 37 °C

4.2.1.2 Vliv navážky na antioxidační aktivitu

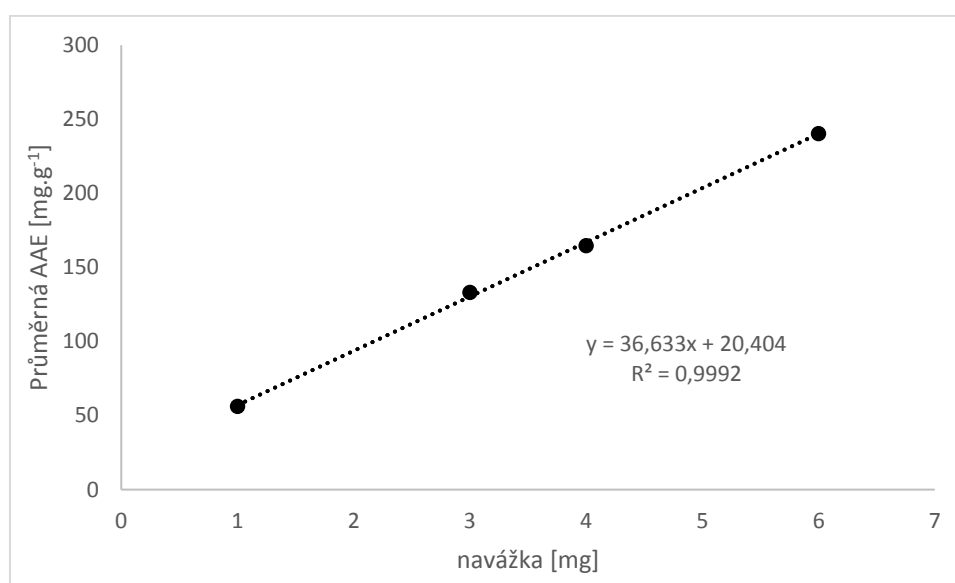
Byl studován vliv teploty na rostoucí navážku (1 – 6 mg) tablet Recovery s HydroFX 1. šarže. U navážek větších jak 3 mg došlo při zahřátí připravených vzorků na teplotu 37 °C a následné zchladnutí na laboratorní teplotu ke vzniku shluků, které negativně ovlivňovaly spektrometrické stanovení (tabulka 13). Tento jev je způsoben kvůli nerozpustným látkám ve vzorku Recovery s HydroFX 1. šarže. Rozptyl světla na těchto nerozpustných částicích způsobí to, že na detektor dopadá záření o nižší intenzitě. To odpovídá vyšší absorpci záření. Proto u našich vzorků docházelo k rozdílnému naměření absorbancí (porušování Lambert-Beerova zákona). Byl studován vliv laboratorní teploty na rostoucí navážky (nad 3 mg), ale výsledek byl stejný jako v předchozím případě. Z tohoto experimentu vyplývá, že rostoucí navážky tablet Recovery s HydroFX 1. šarže jsou pouze částečně rozpustné v tlumivém roztoku.

Byl zjišťován vliv rostoucí navážky (1 – 6 mg) tablet Recovery H2. Připravené roztoky vzorků byly měřitelné a nevznikaly v nich shluky jako v předchozím případě. Lze říct, že s rostoucí navážkou roste antioxidační aktivita (obrázek 11).

Tabulka 13: Vliv navážky na AAE při teplotě 24 °C a 37 °C

navážka [mg]	laboratorní teplota 24 °C	teplota 37 °C	
	Recovery s HydroFX 1. šarže [mg.g ⁻¹]*	Recovery s HydroFX 1. šarže [mg.g ⁻¹]*	Recovery H2 [mg.g ⁻¹]*
1	431,3 ± 3,7	59,5 ± 0,2	56,2 ± 0,3
2	236,3 ± 2,7	68,7 ± 0,2	91,3 ± 0,4
3	-	-	134,1 ± 1,1
4	-	-	179,2 ± 2,2
6	-	-	218,4 ± 10,5

* Průměrné hodnoty AAE se směrodatnou odchylkou ze 3 opakování



Obrázek 11: Grafické znázornění vlivu navážky na AAE u Recovery H2

4.3 Srovnání metod DPPH a FRAP

4.3.1 Opakovatelnost metody DPPH a FRAP

Z naměřených hodnot absorbancí jednotlivých vzorků Recovery, byla vypočítána relativní směrodatná odchylka (RSD), která odráží preciznost metody (tabulka 14, 15). RSD byla vypočítána dle následujícího vzorce:

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (14)$$

kde s je směrodatná odchylka, \bar{x} je aritmetický průměr ze 6 opakování pro metody DPPH a FRAP.

Tabulka 14: Opakovatelnost metody DPPH s přidavkem H_3PO_4 , HCl

Vzorek	počet opakování	RSD [%] H_3PO_4	RSD [%] HCl
Recovery s HydroFX 1. šarže	6	1,4	1,4
Recovery s HydroFX 2. šarže	6	1,9	1,5
Recovery H2	6	1,5	1,5

Tabulka 15: Opakovatelnost metody FRAP při 37 °C

vzorek	počet opakování	RSD [%]
Recovery s HydroFX 1. šarže	6	1,1
Recovery s HydroFX 2. šarže	6	0,9
Recovery H2	6	0,5

Opakovatelnost definuje preciznost za podmínek opakovatelnosti. Opakovatelnost je vlastností měřicí metody, ne výsledku měření. Ze šesti opakování byla vypočítaná RSD v rozmezí 0,5 – 1,9 %. Z těchto vyhodnocených výsledků lze předpokládat, že opakovatelnost metody DPPH a FRAP je pro naši studii dostatečná. Pro jednotlivé metody byly nastaveny určité podmínky (promíchání vzorků, inkubace vzorků ve tmě za zvolený čas aj.), které přinesly uspokojivé výsledky. Ve srovnání s výsledky opakovatelnosti metody DPPH u vzorků cereálií (viz. níže) ⁶⁰ můžeme říct, že zvolené podmínky byly pro naše vzorky výhodnější a přinesly reprodukovatelnější výsledky.

4.3.2 Porovnání antioxidační aktivity různými metodami

Cílem bylo stanovit antioxidační aktivitu u náhodně vybraných tablet Recovery s HydroFX a Recovery H2. Stanovení bylo provedeno postupem metody DPPH za laboratorní teploty u navážky 2 mg s přidavkem H_3PO_4 . Z naměřených hodnot vyplývá, že AAE tablet Recovery u obou šarží vykazují obdobné výsledky (tabulka 16), které byly očekávány kvůli stejnému složení vzorku obou šarží. Nižší výsledky oproti jiným (tabulka 17) mohou být zapříčiněny i tvorbou sraženiny mezi fosforečnanovými a hořečnatými ionty. Stanovení AAE bylo provedeno i s přidavkem HCl metodou DPPH. Z výsledků vyplývá, že AAE byla vyšší u nového Recovery H2. To může být příčinou jiného složení tablet Recovery H2, který je pravděpodobně účinnější než původní Recovery s HydroFX 1., 2. šarže.

Toto stanovení tablet bylo provedeno i metodou FRAP při teplotě 37 °C. Je patrné, že hodnota AAE se nám u Recovery H2 zvýšila a to několikrát (tabulka 17). Tyto výsledky

mohou být způsobeny oproti předchozí metodě jiným pracovním postupem ale i zvýšenou teplotou. Odlišné hodnoty jsou zapříčiněné nehomogenitou vzorku.

Tabulka 16: Porovnání AAE u různých tablet Recovery s přidavkem H₃PO₄ metodou DPPH na navážku 2 mg při laboratorní teplotě 24 °C

Recovery s HydroFX 1. šarže [mg.g ⁻¹]*			Recovery s HydroFX 2. šarže [mg.g ⁻¹]*	Recovery H2 [mg.g ⁻¹]*
tableta 1	tableta 2	tableta 3	tableta 4	tableta 5
26,7 ± 0,5	28,7 ± 0,5	28,7 ± 0,5	32,7 ± 0,5	37,3 ± 0,6

* Průměrné hodnoty AAE se směrodatnou odchylkou ze 3 opakování

Tabulka 17: Porovnání AAE u tablet Recovery za teploty 37 °C

Metoda	Recovery s HydroFX 1. šarže [mg.g ⁻¹]*	Recovery s HydroFX 2. šarže [mg.g ⁻¹]*	Recovery H2 [mg.g ⁻¹]*
DPPH s přidavkem HCl	46,7 ± 0,8	50,4 ± 0,7	82,8 ± 0,2
FRAP	72,3 ± 0,3	62,7 ± 0,2	219,1 ± 0,6

* Průměrné hodnoty AAE se směrodatnou odchylkou ze 3 opakování

Úkolem bylo porovnat antioxidační aktivitu tablet Recovery s jinými pevnými vzorky, abychom zjistili, zda jsou tablety Recovery účinným antioxidantem. Byly vybrány různé vzorky cereálií (tabulka 18), které byly stanovovány metodou DPPH. Jestliže porovnáme průměrné hodnoty AAE u Recovery a cereálií, je jednoznačné, že AAE u Recovery s HydroFX 1. a 2. šarže jsou 27 až 40× vyšší než v případě stanovení AAE u cereálií. U Recovery H2 byly hodnoty AAE až 80× vyšší než v případě stanovení AAE u cereálií.

Tabulka 18: Průměrné hodnoty AAE u cereálií⁶⁰

vzorek	AAE [mg.g ⁻¹]*
rýže natural	0,98 ± 0,4
rýže indická	0,93 ± 0,3
pšenice špalda	0,72 ± 0,5
kamut	0,69 ± 0,7
pšenice ozimá	0,67 ± 0,3
rýže parboiled indická	0,61 ± 0,4

* Průměrné hodnoty AAE se směrodatnou odchylkou z 5 opakování

Pomocí metody DPPH byla stanovena antioxidační aktivita u potravinové doplňku chlorella. Pro stanovení TAA byl použit standard askorbové kyseliny, podle které byla zjištěna průměrná koncentrace 6,91 mg.l⁻¹ antioxidantu, což odpovídalo TAA 0,0392 mmol.l⁻¹ 61. Ve srovnání se vzorkem Recovery byly hodnoty nejméně 1× vyšší a tento rozdíl narůstal s rostoucí navázkou tablety (tabulka 19).

Tabulka 19: Srovnání TAA Recovery s Hydro FX 1. šarže a Recovery H2

navážka [mg]	TAA [mmol.l ⁻¹]	
	Recovery s HydroFX	Recovery H2
1	0,05	0,06
2	0,12	0,15

Ke stanovení antioxidační aktivity byly vybrány tři druhy vína (červené, růžové a bílé), u kterých byla během výroby použita metoda FRAP. TAA byla vyjádřena pomocí ekvivalentního množství askorbové kyseliny [mmol.l⁻¹]. Jednotlivé vzorky vína byly centrifugovány a ředěny v jednotlivých poměrech (1:5, 1:10) 45. Nejvyšší hodnoty antioxidační aktivity byly naměřeny u červeného vína, a naopak nejnižší u vína bílého. Z vyhodnocených výsledků vyplívá, že TAA je 6 až 40× vyšší u vzorků vína (v závislosti na fázi výroby a druhu vína), než u tablet Recovery.

Další údaje v literatuře používají standard Trolox, proto srovnání s našimi údaji není možné. Z těchto výsledků vyplívá, že uvolněný molekulární vodík lze považovat za účinný ale přesto ne za nejlepší antioxidant.

4.4 Stanovení Ca a Mg pomocí AAS

Atomovou absorpční spektrometrií byla stanovena koncentrace vápníku a hořčíku v tabletách Recovery. Podle složení tablet z příbalového letáku byl teoreticky vypočítán obsah hořčíku (44,725 mg) a vápníku (76,65 mg) v jedné tabletě Recovery, která vážila asi 450 mg. V příbalové dokumentaci byly zaznamenány informace o obsahu hořčíku a vápníku ve 100 g (8889 mg Mg – 10 %), 10 222 mg Ca – 4,6 %). Podle vypočítaných obsahů hořčíku a vápníku byly výsledky pře počítány na procentuální zastoupení (40 % Mg, 37,4 % Ca). Z výsledků lze usoudit, že přídavek LaCl_3 měl veliký vliv na uvolnění vápenatých iontů do roztoku. Naopak u hořčíku tento vliv nebyl prokázán (tabulka 20). U Recovery H2 bylo stanovení koncentrací prováděno pouze s přídavkem uvolňovacího činidla (tabulka 21). Stanovení koncentrace hořčíku a vápníku bylo provedeno u více tablet z jednotlivých šarží (viz příloha tabulka 24).

Tabulka 20: Stanovení koncentrace hořčíku a vápníku

Recovery s HydroFX 1. šarže	koncentrace [mg.g ⁻¹]	ve 100 g [mg]	1 tableta [mg]
Hořčík bez LaCl_3	39,5	3950	17,8
Hořčík s LaCl_3	39,9	3990	17,9
Vápník bez LaCl_3	27,2	2720	12,2
Vápník s LaCl_3	63,6	6364	28,6

Tabulka 21: Stanovení koncentrace hořčíku a vápníku

Recovery H2	koncentrace [mg.g ⁻¹]	ve 100 g [mg]	1 tableta [mg]
Hořčík s LaCl_3	62,6	6263	25,1
Vápník s LaCl_3	0,9	96,3	0,4

Stanovené hodnoty hořčíku a vápníku v 1 tabletě Recovery ve srovnání s teoretickou vypočítanou hodnotou odpovídá pouze částečně. S přídavkem LaCl_3 bylo v 1 tabletě Recovery s HydroFX stanoveno pouze 40,1 % hořčíku a 37,4 % vápníku. Tento jev může být způsoben v důsledku použití jiného standardu hořčíku a vápníku. Z tohoto důvodu pro stanovení vápníku byl připraven zásobní roztok dihydrogenfosforečnanu vápenatého o c 1 g.l⁻¹ okyselený HNO_3 . Další postup byl obdobný jako u předchozího stanovení (tabulka 22). Byly získány v průměru 71 % zastoupení vápníku ve vzorku, tedy byly stanovené vyšší obsahy vápníku v tabletách Recovery s HydroFX 1. šarže než v předchozím stanovení. Toto stanovení bylo pro nás přínosné. U Recovery H2 může být přepočítáno pouze na 1 tabletu, protože na příbalovém letáku nebyly zaznamenány hmotnostní navážky jednotlivých látek. Z výsledků

vypovídá, že v tabletě Recovery H2 bude pravděpodobně více hořčíku a nepatrné množství vápníku oproti původnímu Recovery s HydroFX.

Tabulka 22: Stanovení Ca z fosforečnanu vápenatého

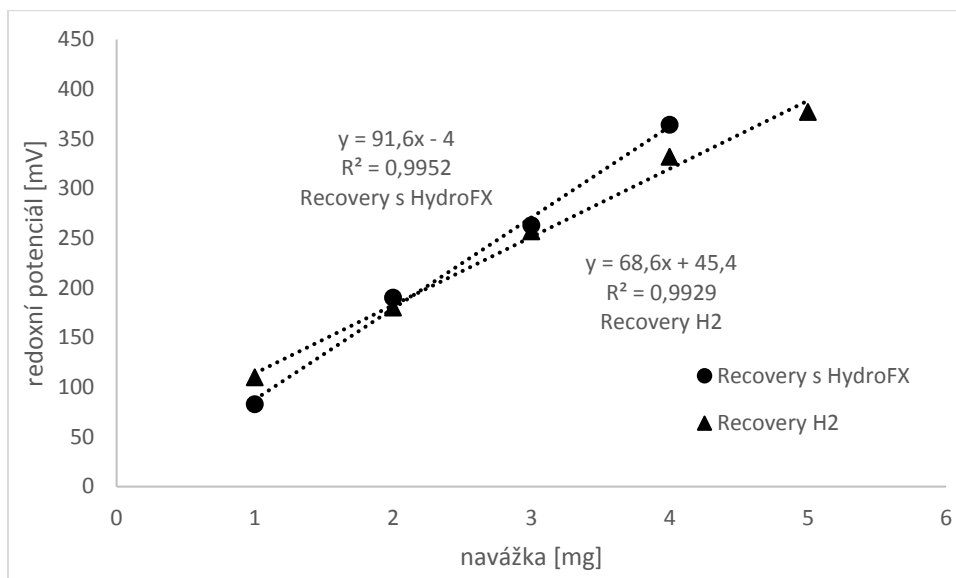
Recovery s HydroFX	koncentrace [mg.g⁻¹]	1 tableta [mg]
1 tableta 1. šarže	107,7	48,5
2 tableta 1. šarže	116,7	52,5
3 tableta 1. šarže	140,3	63,1
4 tableta 2. šarže	119,1	53,6

4.5 Potenciometrie

Pomocí potenciometrie bylo provedeno stanovení standardních redoxních potenciálů připravených vzorků Recovery. Cílem bylo stanovit, zda Recovery H2 vykazuje vyšší redoxní potenciály než Recovery s HydroFX 1.šarže, jak ve svých propagačních materiálech uvádí výrobce. Pro měření byla sestavena elektrochemická cela, která se skládala z měrné platinové a kalomelové referenční elektrody. Tyto elektrody byly umístěny v konstantní vzdálenosti. Clark-Lubsový tlumivý roztok byl po celou dobu stanovení probubláván dusíkem z důvodu odstranění přítomného kyslíku, který nám reagoval s uvolňovaným vodíkem. Značný problém byl ve stanovení redoxního potenciálu vzorku, kdy docházelo k pasivaci platinové elektrody. Tento fakt byl způsoben nerozpustnými částicemi přítomnými ve vzorku a nehomogenitou tablet přípravku. Z naměřených výsledků vyplívá, že s rostoucí navázkou klesá redoxní potenciál u obou typů vzorku (tabulka 23). Naměřené redoxní potenciály byly o něco nižší u vzorku Recovery s HydroXF 1. šarže, tedy opačně, než tvrdí výrobci (obrázek 12).

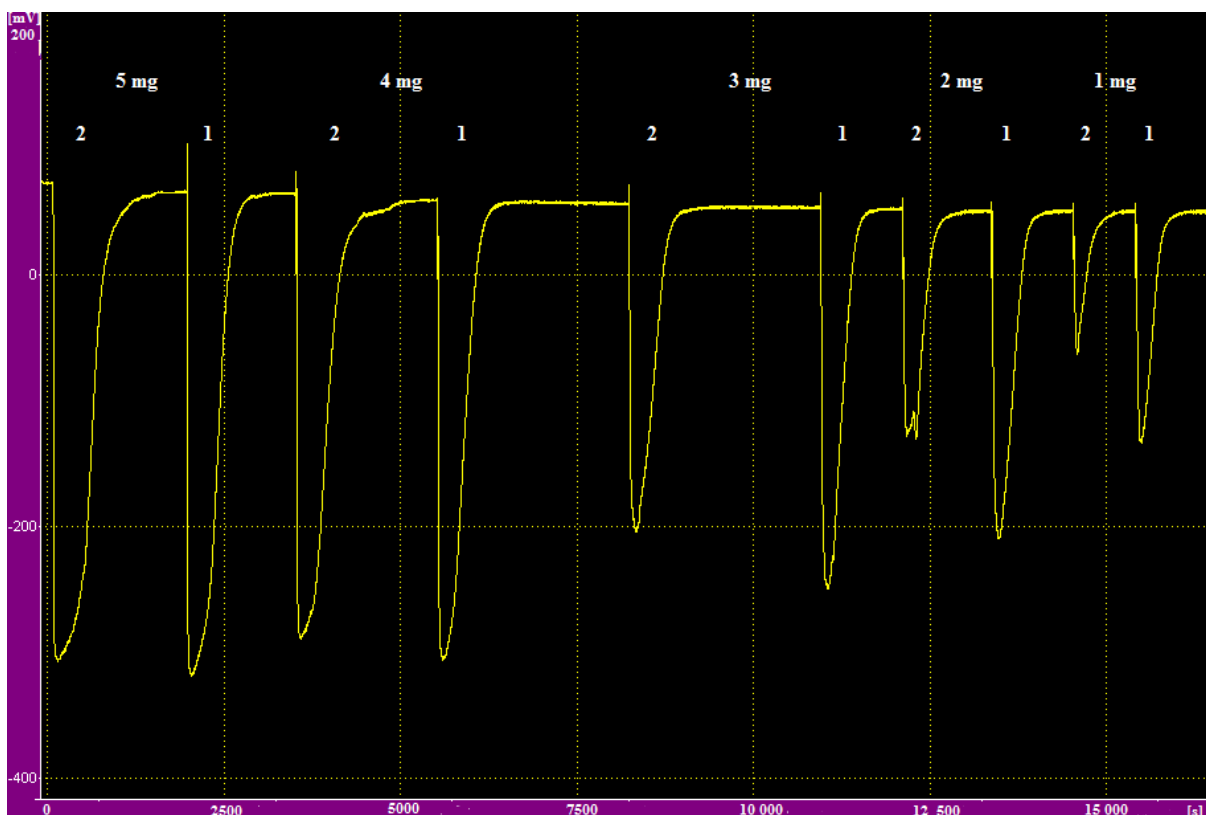
Tabulka 23: Stanovené redoxní potenciály u tablet Recovery

navážka [mg]	redoxní potenciál [mV]	
	Recovery s HydroFX 1. šarže	Recovery H2
1	83	110
2	190	180
3	263	257
4	364	332
5	-	377



Obrázek 12: Redoxní potenciály Recovery s HydroFX 1. šarže a Recovery H2

Pomocí programu ISES Professional bylo možno graficky naměřit závislost redoxních potenciálů [mV] na čase [s] u tablet Recovery s HydroFX 1. šarže (1) a Recovery H2 (2). Na obrázku 13 je možno pozorovat pokles redoxních potenciálů s rostoucí navázkou (1 – 5 mg) u jednotlivých vzorků Recovery.



Obrázek 13: Závislost redoxního potenciálu na čase

Hodnota elektrodového potenciálu elektrody určuje schopnost kovu přecházet do iontového stavu v elektrolytu. Na základě tohoto tvrzení se dá předpokládat chemická aktivita daného kovu v roztoku. Pokud je jedna z dvojice elektrod definovaná jako referentní, tedy v našem případě kalomelová elektroda, změřený potenciál se vztahuje na kalomelovu elektrodu, která má redoxní potenciál 0,241 V proti vodíkové elektrodě. Platinová elektroda nasycená vodíkem, která je ponořena do roztoku kyseliny s jednotkovou aktivitou H_3O^+ (rovnice 15), vykazuje standardní redoxní potenciál nula (z toho vychází Nernstova rovnice).



Stanovené redoxní potenciály uvolněného molekulárního vodíku do Clark-Labsoba tlumícího roztoku můžeme vidět jak v tabulce, tak i v grafickém zpracování (viz obrázek 13). Na zobrazených křivkách je pozoruhodné, že můžeme vedle sebe porovnat dva různé vzorky Recovery. U jednotlivých křivek s rostoucí navázkou klesá jejich redoxní potenciál. Tento vliv byl očekáván a došlo tedy k jeho potvrzení, i když ne úplně jak bylo tvrzeno výrobcí tablet Recovery.

5. Závěr

Tato diplomová práce byla zaměřena na sledování antioxidační aktivity tablet potravinového doplňku Recovery, který tvoří molekulární vodík. K vyhodnocení celkové antioxidační aktivity tablet Recovery byly vybrány dvě rozdílné spektrální metody, a to metoda DPPH a metoda FRAP. Metoda DPPH charakterizuje antioxidační aktivitu, která má schopnost antioxidantů přítomných v tabletách Recovery zhaset radikál DPPH. Metoda FRAP charakterizuje antioxidační aktivitu z pohledu redukčních schopností antioxidantů. U obou metod byly hodnoty AAE vyjádřeny v ekvivalentním množství askorbové kyseliny [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$]. Ze získaných výsledků u metody DPPH lze soudit, že s rostoucí navázkou Recovery a teplotou dochází k postupnému snížení antioxidační aktivity. Naopak u metody FRAP s rostoucí navázkou Recovery H2 dochází ke zvyšování antioxidační aktivity a to až $3\times$ více než u Recovery s HydroFX.

Pomocí atomové absorpční spektrometrie byla v tabletách Recovery stanovena koncentrace hořčíku a vápníku. Podle složení na příbalovém letáku byl vypočítán teoretický obsah hořčíku a vápníku. Ve srovnání s příbalovou dokumentací bylo v 1 tabletě Recovery s HydroFX s přídatkem LaCl_3 zjištěna pouze 40 % přítomnost hořčíku a 37 % přítomnost vápníku. V 1 tabletě Recovery H2 s přídatkem LaCl_3 byla zjištěna přítomnost 25 mg hořčíku a 0,39 mg vápníku.

Potenciometrií byl stanoven standardní redoxní potenciál tablet Recovery. Z výsledků vyplývá, že s rostoucí navázkou klesá redoxní potenciál u tablet Recovery. Naměřené redoxní potenciály byly nižší u tablet Recovery s HydroXF. Toto tvrzení je tedy opačné, než uvádějí ve svých materiálech výrobci.

Zajímavostí této studie bylo stanovení molekulárního vodíku ve formě plynu, který se uvolňoval do roztoku. Hodnoty TAA tablet Recovery byly srovnány se vzorky různých druhů cereálií, potravinového doplňku chlorella a třech druhů vín. Porovnáním hodnot TAA vyplynulo, že tablety Recovery uvolňující molekulární vodík lze považovat za účinný ale ne za nejlepší antioxidant.

6. Literatura

1. Štípek S.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. Grada Publishing, Praha, 2000, ISBN 80-7169-704-4.
2. Ortemberg A.: *Mládneme s antioxidanty*. Ivo Železný, Praha, 2002, ISBN 80-237-3742-2.
3. Passwater R. A.: *O antioxidantech*. PRAGMA, Praha, 2002, ISBN: 80-7205-897-5.
4. Trotman-Dickenson A. F.: *Volné radikály*. Státní nakladatelství technické literatury, London, 1963.
5. Dostupné: <<https://www.zdraviakrasa.cz/volne-radikaly-myty-pravdy-strasaku-moderni-doby-303>> (citováno: 15. 12. 2016).
6. Mandelker L.: *Oxidační stres: role mitochondrií, volných radikálů a antioxidantů*. Piepot, Praha, 2009, ISBN 978-80-7353-135-5.
7. Marounek M.: *Povaha a mechanismus účinku antioxidantů, význam ve výživě zvířat a lidí*, Vědecký ústav živočišné výroby. Praha, 2006.
8. Rychtáriková R., Kuncová G.: Imobilizované fotosenzitizátory singletového kyslíku a jejich účinek na mikroorganismy. *Chem. Listy* **103**, 800–813, (2009).
9. Rychterová L.: *Reaktivní sloučeniny kyslíku*. Bakalářská práce, Masarykova univerzita, Brno, (2008). Youngson R.: *Antioxidanty cesta ke zdraví, Jak odstranit vliv volných radikálů*. Jota, Brno, 1995, ISBN 80-85617-56-0.
10. Petrošová K.: *Snadná cesta ke zdraví ANTOXIDANTY*. Sun, Říčany, 2016, ISBN 978-80-7371-586-1.
11. Procházková D., Wilhelmová N.: Nitric oxide, reactive nitrogen species and associated enzymes during plant senescence. *Nitric Oxide* **24**, 61–65, (2012).
12. Hvízdová I., Luhová L., Petřivalský M.: Nitrace proteinů reaktivními formami dusíku. *Chem. Listy* **103**, 788–794, (2009).
13. Dostupné: <<http://www.nutram.cz/sites/default/files/obsah/stranky/novinky-trendy-v-krmivech/soubory/antioxidantyavolneradikaly.pdf>> (citováno: 30. 11. 2016).
14. Dostupné: <<http://www.archeaseen.cz/antioxidanty>> (citováno: 30. 11. 2016).
15. Youngson R.: *Antioxidanty cesta ke zdraví, Jak odstranit vliv volných radikálů*. Jota, Brno, 1995, ISBN 80-85617-56-0.
16. Racek J.: *Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění*. Galén, Praha, 2003, ISBN: 80-7262-231-5.

17. Dostupné: <<http://fbt.cz/skripta/ix-travici-soustava/7-vitaminy-a-vyziva>> (citováno: 11. 12. 2016).
18. Paulová H., Bochořáková H., Táborská E.: Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chem. Listy* **98**, 174–179 (2004).
19. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J.: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **39**, 44-84, (2007).
20. Sun X., Ohta S., Nakao A.: *Hydrogen Molecular Biology and Medicine*. Springer, China and Japan, 2015, ISBN 978-94-017-9690-3.
21. Ohsawa I., Ohta S., Ishikawa M., Takahashi K., Nishimaki K. a kol.: Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat. Med.* **13**, 688–694 (2007).
22. Fukuda K., Ohsawa I., Ohta S., Asoh S., Ishikawa M., Yamamoto Y.: Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **361**, 670–674 (2007).
23. Saitoh Y, Okayasu H, Xiao L, Harata Y, Miwa N. Neutral pH hydrogen-enriched electrolyzed water achieves tumor-preferential clonal growth inhibition over normal-cells and tumor invasion inhibition concurrently with intracellular oxidant repression. *Oncol Res.* **17**, 247–255 (2008).
24. Dostupné: <<http://www.vodikovetechnologie.cz/index.php>> (citováno: 15. 11. 2016).
25. Shigeo O.: Molecular hydrogen is a novel antioxidant to efficiently reduce oxidative stress with potential for the improvement of mitochondrial diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **1820**, 586–594 (2012).
26. Shigeo O.: Molecular hydrogen as a preventive and therapeutic medical gas: initiation, development and potential of hydrogen medicine. *Pharmacology & Therapeutics* **144**, 1–11, (2014).
27. Dostupné: <<http://www.molekularnivodik.cz/>> (citováno: 23. 11. 2016).
28. Ohta S., Nakashima-Kamimura N., Mori T., Ohsawa I., Asoh S.: Molecular hydrogen alleviates nephrotoxicity induced by an anti-cancer drug cisplatin without compromising anti-tumor activity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* **64**, 753–761 (2009).
29. Dostupné: <<http://www.sevenpoint2.cz>> (citováno 22. 11. 2016).
30. Saito Y., Okayasu H., Xiao L., Harata Y., Miwa N.: Neutral pH Hydrogen-Enriched Electrolyzed Water Achieves Tumor-Preferential Clonal Growth Inhibition Over

- Normal Cells and Tumor Invasion Inhibition Concurrently With Intracellular Oxidant Repression. *Oncology Research* **17**, 247–255 (2008).
31. Shirahata S., Kabayama S., Nakano M., Miura T., Kusumoto K., Gotoh M. a kol.: Electrolyzed–Reduced Water Scavenges Active Oxygen Species and Protects DNA from Oxidative Damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**, 269–274 (1997).
 32. Ohno K., Ito M., Ichihara M., Ito M.: Molecular Hydrogen as an Emerging Therapeutic Medical Gas for Neurodegenerative and Other Diseases. *Medical Gas Research* **24**, 1– 11 (2012).
 33. Shirahata S., Hamasaki T., Nakamura T., Abe M., Yan H. a kol.: Anti-diabetes effect of water containing hydrogen molecule and Pt nanoparticles. *BMC Proceedings* **5**, 1–3, (2011).
 34. Ondřejček P., Řehula M., Svačinová P., Stoniš J., Rabišková M.: Vliv nové kluzní látky syloidu na lisování tablet léčivých přípravků. *Chem. Listy* **108**, 687–693, (2014).
 35. Dostupné na: < <https://www.purative.com/active-h2-p.html>> (citováno: 1. 4. 2017).
 36. Song G., Li M., Sang H., Zhang L., Li X., Yao S., Yu Y., Zong CH., Xue Y., Qin S.: Hydrogen-rich water decreases serum LDL-cholesterol levels and improves HDL function in patients with potential metabolic syndrome. *J Lipid Res.* **54**, 1884–1893 (2013).
 37. Qiu X., Li H., Tang H., Jin Y., Li W., Sun Y., Feng P., Sun Y., Xia Z.: Hydrogen inhalation ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Int. Immunopharmacol.* **11**, 2130–2137, (2011).
 38. Xiao X., Cai J., Xu J., Wang R., Cai J., Liu Y., Xu W., Sun X., Li R.: Protective effects of hydrogen saline on diabetic retinopathy in a streptozotocin-induced diabetic rat model. *J Ocul Pharmacol Ther.* **28**, 76–82, (2012).
 39. Šulc M., Lachman J., Orsák M., Hamouz K., Dvořák P., Horáčková V.: Výběr a zhodnocení vhodných metod pro stanovení antioxidační aktivity fialových a červených odrůd brambor. *Chem. listy* **101**, 584–591, (2007).
 40. Réblová Z.: Vliv vnějších faktorů na aktivitu antioxidantů. *Chem. listy* **105**, 667–673, (2011).
 41. Prior R. L., Schain K., Wu X.: Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem* **53**, 4290–4302 (2005).
 42. Dostupné: <<https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/index.pl?cast=52974>> (citováno: 2. 1. 2017).

43. Teixeira J., Gaspar A., Garrido EM., Garrido J., Borges F.: Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. *Biomed Res Int* **30**, 1–11, (2013).
44. Mikyška A., Krofta K.: *Stanovení antioxidační aktivity chmele, chmelových výrobků a piva*. Výzkumný ústav pivovarství a sladařství a.s., Praha, 2012, ISBN 978-80-86576-51-0.
45. Kubišťová V.: Studium antioxidační aktivity vína. Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc (2012).
46. Dostupné:
<<http://web.vscht.cz/~dolezala/LRMCHP/%c3%9aloha%20%c4%8d.%206%20LabRM%20-%20DPPH.pdf>> (citováno 28. 11. 2016).
47. Benzi I. F. F., Strain J. J.: The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal. Biochemistry* **239**, 70–76 (1996).
48. Pellegrini N., Proteggente A.: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231–1237, (1999).
49. Miller N. J., Milner A., Rice-Evans C., Davies M. J., Gopinathan V.: A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* **84**, 407–412, (1993).
50. Lee Y., Yoon J, von Gunten U.: Spectrophotometric determination of ferrate (Fe(VI)) in water by ABTS. *Water research* **39**, 1946–1953, (2005).
51. Cao G., Alessio H. M., Cutler R. G.: Oxygen radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **14**, 303–311, (1993).
52. Ghiselli A., Serafini M, Ferro-Luzzi A.: New approaches for measuring plasma or serum antioxidant capacity: A methodological note. *Free Radic. Biol. Med.* **16**, 135–137, (1994).
53. Cao G., Sofic M., Prior R. L.: Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Food Chem* **44**, 3426–3431, (1996).
54. Apak R., Özyürek M., Güçlü K., Gorinstein S., Böhm V., Schaich K. M.: Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem* **85**, 957–998 (2013).
55. Apak R., Güçlü K, Ozyürek M, Karademir S. E.: 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. *Food Chem* **29**, 7970–7981, (2004).

56. Bener M. Ozyürek M, Güçlü K, Apak R.: Development of a low-cost optical sensor of cupric reducing antioxidant capacity measurement of food extracts. *Anal. Chem* **82**, 4252–4258, (2010).
57. Wayner D. D. M., Burton G. W., Ingold K. U., Locke S.: Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Lett.* **187**, 33–37, (1985).
58. Rapta P., Mišík V., Staško A., Vrabel I.: Redox intermediates of flavonoids and caffeic acid esters from propolis: an EPR spectroscopy and cyclic voltammetry study. *Free Radical Biol. Med.* **18**, 901–908, (1995).
59. Nakumura T., Nishi H., Kokusenya Y., Sato T.: Antioxidative Activity Estimation of Methanol Extracts of Crude Drugs by Electrochemical Detection-High Performance Liquid Chromatography (ECD-HPLC) and Correlation with 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging Activities. *Chem. Pharm. Bull.* **46**, 1388–1392, (1998).
60. Mrázová E.: Stanovení fenolických látek a antioxidační aktivity u cereálií. Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati, Zlín (2011).
61. Hvízdová B.: Antioxidační aktivita potravinového doplňku chlorela. Bakalářská práce, Univerzita Palackého, Olomouc (2016).

7. Seznam použitých zkratek

AAE	přepočítání na ekvivalentní množství askorbové kyseliny [mg AAE.g ⁻¹ vzorku]
AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropan)-dihydrochlorid
ABTS	2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazol-6-sulfonová kyselina)
ALI	akutní poškození plic
BHA	butyl-hydroxyanisol (E – 320)
BHT	butyl-hydroxytoluen (E – 321)
CNS	centrální nervový systém
CRM	certifikovaný referenční materiál
CUPRAC	redukce mědi antioxidantem (Cupric Reducing Antioxidant capacity)
DM	cukrovka (diabetes mellitus)
DNA	nukleová kyselina
DPPH	syntetický radikál 1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl
E _A	potenciál oxidačního píku
ESR	elektronová spinová rezonance
FRAP	hodnocení redukčních účinků antioxidantů pomocí železa (ferric reducing antioxidant potential)
GSH	glutathion
GSSG	okysličený glutathion
HDL-C	HDL-cholesterol („hodný“)
I _A	anodický proud
LDL-C	LDL-cholesterol („zlý“)
LPS	lipopolysacharid
MDA	maloaldehyd
NADPH	redukovaný nikotinamidadenindinukleotid
Nc	2,9-dimethyl-1,10-fenantrolin
NORP	oxidačně redukční potenciál
ORAC	generování kyslíkových radikálů (Oxygen Radical absorbance Capacity)
RNS	reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species)
RONS	reaktivní formy kyslíku a dusíku (reactive oxygen and nitrogen species)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
RSD	relativní směrodatná odchylka
S-ALT	alaninaminotransferáza (jaterní testy)

SOD	superoxiddizmutáza
TAA	celková antioxidační aktivita (Total Antioxidant Activity)
TBARS	metoda s thiobarbiturovou kyselinou (thiobarbituric acid reactive substance)
TEAC	přepočet na ekvivalentní množství Troloxu (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)
TG	triacylglycerol
TPTZ	2,4,6-tris-(2-pyridyl)-s-triazin
TRAP	detekce fluorescenční technikou (Total Radical Trapping Parameter)
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina
UV	ultrafialová část spektra
VIS	viditelná oblast spektra

8. Přílohy

Tabulka 24: Stanovení koncentrace hořčíku a vápníku u různých tablet Recovery

Recovery s HydroFX	vzorek	koncentrace [mg.g⁻¹]	ve 100 g [mg]	1 tableta [mg]
hořčík bez LaCl₃	tableta 1 ^a	36,75	3675	16,54
	tableta 2 ^a	37,13	3713	16,71
	tableta 3 ^b	30,00	3000	13,50
	tableta 4 ^b	29,00	2900	13,05
vápník bez LaCl₃	tableta 1 ^a	30,80	3080	13,86
	tableta 2 ^a	30,08	3008	13,53
	tableta 3 ^b	25,88	2588	11,64
	tableta 4 ^b	24,35	2435	10,96
vápník s LaCl₃	tableta 1 ^a	63,59	6359	28,61
	tableta 2 ^a	67,94	6794	30,57
	tableta 3 ^b	67,10	6710	30,20
	tableta 4 ^b	58,44	5844	26,30

a ... Recovery s HydroFX 1. šarže

b ... Recovery s HydroFX 2. šarže