UNIVERZITA PALACKÉHO

V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie

Chemiluminiscenční stanovení antioxidační kapacity – srovnání metod využívajících luminol-CTAB-BisTris a luminol-HRP

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vypracoval: Jan Rozsypal
Studijní obor: Aplikovaná chemie
Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Jan Hrbáč, Ph.D.

Olomouc, 2012

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

V Olomouci dne 9. 8. 2012 .....

Jan Rozsypal

Rád bych poděkoval svému vedoucímu,
panu doc. RNDr. Janu Hrbáčovi, Ph. D., za jeho velikou trpělivost, rady a pomoc při řešení potíží při vypracování zadané bakalářské práce.
Poděkování rovněž patří paní doc. RNDr. Taťjaně Nevěčné, CSc. za její vstřícný přístup a pomoc při řešení studijních problémů.

Obsah

Bibliografická identifikace **6**

Bibliographic identification **8**

1. ÚVOD **10**

2. TEORETICKÁ ČÁST **11**

2.1. Reaktivní formy kyslíku a dusíku **11**

2.1.1. Vlastnosti **11**

2.1.2. Vznik ROS/RNS v organismu **12**

2.1.3. Účinky ROS/RNS na organismus **15**

2.2. Antioxidanty **16**

2.2.1. Dělení antioxidantů **17**

2.2.2. Funkce antioxidantů **19**

2.3. Antioxidační kapacita **20**

2.3.1. Vyjadřování antioxidační kapacity **21**

2.3.2. Metody stanovení antioxidační kapacity **21**

Metoda ORAC **21**

Metoda FRAP **22**

Metoda TRAP **23**

Metoda odbarvení $ABTS^{+}$ **24**

Metoda odbarvení DPPH **24**

2.3.3. Chemiluminiscenční metody **24**

Metoda využívající křenovou peroxidasu a peroxid vodíku **27**

Metoda s využitím lucigeninu použitelná na lipofilní vzorky **27**

Metoda stanovení antioxidační kapacity jedlých oleju v mikroemulzi **28**

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST **29**

3.1. Použité chemikálie a studované reálné vzorky **30**

3.2. Přístrojové vybavení **30**
3.3. Použité metody **31**
3.3.1. Metoda s využitím systému CTAB-BisTris-$CoCl_2$ **31**
Příprava roztoků **31**
Postup měření **32**
3.3.2. Metoda založená na katalýze křenovou peroxidasou **33**
Příprava vzorků **33**
Postup měření **35**
3.3.3. Metoda s využitím křenové peroxidasy a CTAB **36**
Příprava vzorků **36**
Postup měření **36**
3.4. Výsledky a diskuse **37**
3.4.1. Zpracování výsledků **37**
Metoda CTAB-BisTris-$CoCl_2$ **38**
Peroxidasová metoda bez přídavku CTAB **44**
Peroxidasová metoda s přídavkem CTAB **46**
3.4.2. Diskuse **49**
4. Závěr **53**
5. Summary **53**

Literatura **55**

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Jan Rozsypal
Název práce:	Chemiluminiscenční stanovení antioxidační kapacity – srovnání metod využívajících luminol-CTAB-BisTris a luminol HRP
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	Doc. RNDr. Janu Hrbáč Ph. D.
Rok obhajoby práce:	2012
Abstrakt:	Antioxidanty zajišťují ochranu organismu před škodlivým vlivem volných radikálů, protože tělo získává velkou část antioxidantů z potravy, je vhodné mít metody schopné stanovit antioxidační kapacitu potravin. V této práci byly srovnány antioxidační kapacity červeného vína, pomerančového džusu a olivového oleje, naměřené třemi chemiluminiscenčními metodami.

Klíčová slova:	Chemiluminiscence, antioxidační kapacita, luminol, křenová peroxidasa, trolox, tokoferol, kyselina askorbová
Počet stran:	58
Jazyk:	Čeština

Bibliographical identification

Author´s first name and surname:	Jan Rozsypal
Title:	Chemiluminescence determination of antioxidant capacity – the comparison of luminol-CTAB-BisTris and luminol-HRP based methods.
Department:	Department of Physical Chemistry
Type of thesis:	Bachelor
Supervisor:	Doc. RNDr. Janu Hrbáč Ph. D.
Year of presentation:	2012
Abstract:	Antioxidants are compounds protecting organism against damaging effect of free radicals. Because one source of antioxidants is food, it is beneficial to have methods capable of determination of total antioxidant capacity (TAC) of foods. In this thesis were compared TAC values of red vine, orange juice and olive oil obtained by using chemiluminescence based methods.

Key words:	Chemiluminescence, antioxidant capacity, luminol, horseradish peroxidase, trolox, tocopherol, ascorbic acid
Number of pages:	58
Language:	Czech

1. Úvod

V organismu neustále vznikají činností metabolismu, i dalšími cestami, volné radikály. Tyto látky jsou velice reaktivní a mohou způsobovat poškození organismu, které se projevuje jako degenerativní onemocnění a stárnutí. Na ochranu před poškozením je organismus vybaven ochrannými látkami – antioxidanty. Tělo je schopno antioxidanty vytvářet, ale současně je musí přijímat v potravě. Z tohoto důvodu má význam stanovení antioxidační kapacity (total antioxidant capacity – TAC) různých potravin.

Pro stanovení antioxidační kapacity byla vyvinuta celá řada metod, ze kterých je nejpoužívanější metoda ORAC, založená na sledování vlivu antioxidantů na poškození fluoreskujícího proteinu β-fykoerythrinu. Mezi další metody patří metoda založená na redukci železitého komplexu – FRAP, nebo metody sledující odbarvování roztoků stabilních radikálů $ABTS^{+}$ a DPPH působením antioxidantů. Existuje i řada metod založených na inhibici chemiluminiscence (CL). Výhodou těchto metod je dostupnost automatických přístrojů schopných měřit v mikrotitračních destičkách.

Cílem této práce je

- porovnání metod stanovení antioxidační kapacity využívajích chemiluminiscenční reakci luminolu.
- Porovnávána je metoda založená na CL luminolu iniciované CTAB-BisTris-$CoCl_2$-H_2O_2 a
- enzymatická metoda využívající k iniciaci CL luminolu křenovou peroxidasu a H_2O_2.
- testování vlivu přídavku CTAB do reakční směsi luminol- křenová peroxidasa a H_2O_2.
- Ověření použitelnosti výše uvedených metod pro stanovení antioxidační kapacity vybraných reálných vzorků (červené víno, pomerančový džus, olivový olej)

2. Teoretická část

2.1. Reaktivní formy kyslíku a dusíku

Jako reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species-ROS) je označována skupina látek odvozených od molekulárního kyslíku. Kromě meziproduktů redukce kyslíku na vodu jsou zde řazeny i některé další látky. Skupina zahrnuje jak radikály, tak i látky neradikálové povahy.

Reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species-RNS) odvozujeme z oxidu dusnatého a opět je lze rozdělit na radikály a neradikálové látky. Tab. 1 ukazuje významné ROS/RNS.

	Látky neradikálové povahy	Radikály
ROS	Peroxid vodíku H_2O_2	Superoxidový $O_2^{\cdot -}$
	Kyselina chlorná HClO	Hydroperoxylový $HO_2^{\cdot}$
	Ozon O_3	Alkylperoxylový $ROO^{\cdot}$
	Singletový kyslík $^1O_2$	Hydroxylový $OH^{\cdot}$
		Alkoxylový $RO^{\cdot}$
RNS	Peroxynitrit ONOO	Oxid dusnatý NO
	Alkylperoxynitrit ROONO	
	Oxid dusitý N_2O_3	Oxid dusičitý NO_2
	Kyselina dusitá HNO_2	

Tabulka 1. Reaktivní formy kyslíku a dusíku.

2.1.1. Vlastnosti

Radikály jsou charakteristické přítomností nepárových elektronů, to je důvodem jejich vysoké reaktivity a snahy doplnit elektronový pár. Další elektron mohou získat vytržením vodíku z jiné molekuly. Některé radikály se stabilizují odevzdáním svého nadbytečného elektronu. Typický je řetězový průběh reakcí, to znamená, že se molekula po reakci s radikálem a ztrátě elektronu sama mění na radikál, původní radikál přitom zaniká. Reakce takto pokračuje, dokud nedojde k setkání dvou radikálů nebo vzniku

stabilního radikálu. Tímto způsobem může být pozměněno velké množství molekul, než dojde k zastavení reakce.

Reaktivita neradikálových látek může mít různý původ, například excitovaný stav elektronů kyslíku-singletový kyslík. Jiným příkladem jsou reakce některých ROS/RNS za vzniku radikálů, jako je rozklad peroxidu vodíku na hydroxylové radikály vlivem iontů přechodných kovů.

V tabulce 2. jsou zobrazeny střední doby života některých reaktivních látek při koncentracích, v jakých se mohou vyskytovat v organismu [1].

Hydroxylový radikál reaguje prakticky ihned na místě vzniku s molekulami v bezprostředním okolí, to znamená, že má velice krátkou dobu života. Tato vlastnost snižuje pravděpodobnost setkání hydroxylového radikálu s antioxidanty a proto je tento radikál velmi nebezpečný. Snad jediný praktický způsob ochrany před jeho účinky je předcházení jeho vzniku.

ROS/RNS	Střední doba života (s)
Hydroxylový radikál $OH^{\cdot}$	$1 \cdot 10^{-9}$
Alkoxylový radikál $RO^{\cdot}$	$1 \cdot 10^{-6}$
Peroxylový radikál $ROO^{\cdot}$	7s
Singletový kyslík $^1O_2$	$1 \cdot 10^{-6}$
Oxid dusnatý $NO^{\cdot}$	1-10
Peroxynitrit $ONOO^-$	0,05-1

Tabulka 2. Střední doba života některých ROS a RNS, střední doba života v tabulce neuvedených H_2O_2 a $O_2^{\cdot -}$ je závislá na činnosti enzymů glutathionperoxidasy, katalasy a superoxiddismutasy [1].

2.1.2. Vznik ROS/RNS v organismu

Nejvýznamnějším zdrojem ROS v organismu je aerobní metabolismus probíhající v mitochondriích, hlavně pak elektronový transportní řetězec [2], umístěný na vnitřní mitochondriální stěně. Tento řetězec reakcí je zodpovědný za reoxidaci NADH, vznikajícího činností citrátového cyklu, zpět na NAD^+. Elektrony jsou postupně přenášeny systémem enzymů označovaných jako komplex I–IV až na kyslík. Ten je čtyřmi elektrony redukován a následně protonován za vzniku dvou molekul vody.

Komplex I přenáší dva elektrony z NADH na semichinoidní formu ubichinonu $QH^{\cdot}$ za vzniku dvou molekul ubichinolu QH_2. V komplexu III je QH_2 opětovně oxidován proteinem cytochromem c, který se vyskytuje v mezimembránovém prostoru. Komplex IV přebírá elektrony z cytochromu c a předává je na kyslík, takto jsou získány dva elektrony. Další dva elektrony z celkových čtyř potřebných na redukci molekuly kyslíku na dvě molekuly vody zajišťuje komplex II, který je získává ze sukcinátu z citrátového cyklu a předává je komplexu III, ten pak cytochromu c a dále na komplex IV.

Současně s přenosem elektronů dochází v komplexech I a III k přečerpávání protonů z matrix mitochondrie do jejího mezimembránového prostoru. S rostoucím rozdílem koncentrací protonů se zvětšuje rozdíl elektrochemických potenciálů mezi matrix a mezimembránovým prostorem mitochondrie. Tento rozdíl potenciálů je hnací silou návratu protonů zpět do matrix. Protony při návratu procházejí vnitřní mitochondriální stěnou přes enzym ATP synthasu. Proud protonů tak dodává energii k tvorbě ATP. Celý tento proces je pak označován jako oxidativní fosforylace.

Přes vysokou účinnost elektronového transportního řetězce dochází k únikům elekronů přímo na kyslík místo toho, aby byly předány dalším částem řetězce. Toto nastává zejména v komplexu I a v menší míře v komplexu III [3] ve kterých probíhá jednoelektronová redukce semichinonové formy ubichinonu (koenzym Q10) na ubichinol a opětovná reoxidace.

Následkem předčasného úniku elektronu na kyslík vzniká superoxidový radikálanion $O_2^{\cdot -}$. V komplexech II a IV nedochází k významnější tvorbě $O_2^{\cdot -}$, pravděpodobně proto, že přítomné látky nemají dostatečně záporný redoxní potenciál a tedy potřebné redukční vlastnosti [2].

Vysvětlení proč vzniká právě $O_2^{\cdot -}$ lze nalézt v práci K. B. Beckmana a B. N. Amese [4]. Důvodem je skutečnost, že kyslík je v základním stavu tripletem, má tedy dva nepárové elektrony se stejným spinem. Aby mohl přijmout dva elektrony současně, musely by mít k jeho elektronům antiparalelní spin, to ovšem Pauliho princip u elektronového páru nedovoluje. Následkem toho dává kyslík přednost postupným jednoelektronovým výměnám a současné přijetí dvou nebo čtyř elektronů musí být zprostředkováno enzymy. Podle E. Cadenase a kol. [5] je jednoelektronová oxidace molekul kyslíku v komplexech I a III hlavní zdroj $O_2^{\cdot -}$ v organismu a odhaduje se, že 1–

2% celkové denní spotřeby kyslíku je přeměněno na $O_2^{\cdot -}$. To za předpokladu spotřeby 6,4 litrů kyslíku na kilogram tělesné hmotnosti odpovídá dennímu vzniku 160–320 mmol $O_2^{\cdot -}$ na ženu vážící 60 kilogramů a 215–430 mmol na muže o hmotnosti 80 kilogramů [5].

Superoxidový radikál-anion se může vyskytovat i v protonované formě $HO_2^{\cdot}$ zvané hydroperoxylový radikál, pK_a=4,69 [6], proto za podmínek, které jsou v cytosolu buněk jsou pouze asi 0,3% $O_2^{\cdot -}$ v protonované formě [7].

Další ROS mohou vznikat následnými reakcemi $O_2^{\cdot -}$. Disproporcionací $O_2^{\cdot -}$ vzniká peroxid vodíku. Tato reakce pomalu probíhá spontáně, v organismu je však katalyzována činností superoxiddismutasy (SOD). Dalším možným zdrojem peroxidu vodíku je oxidační deaminace biogeních aminů jako jsou tyramin, dopamin nebo serotonin monoaminoxidasami na vnější mitochondriální membráně [8]. Peroxid vodíku má oxidační účinky, ale jeho velmi nebezpečnou vlastností je schopnost homolytického rozkladu za tvorby vysoce reaktivních hydroxylových radikálů $OH^{\cdot}$. Tuto reakci katalyzují enzymy peroxidasy nebo ionty přechodných kovů, příkladem Fe^{2+} a Cu^{+} [9].

Kyselina chlorná má silné oxidační účinky a v organismu vzniká z peroxidu vodíku a chloridového aniontu činností myeloperoxidasy v bílých krvinkách neutrofilech [10] jako jedna z látek podílejích se na likvidaci pohlcených mikroorganismů.

Zdrojem oxidu dusnatého v organismu je enzym NO-synthasa, který jej vytváří z aminokyseliny L-argininu. Reakcí oxidu dusnatého se superoxidovým radikálaniontem vzniká peroxynitrit $ONOO^{-}$. Obě výchozí látky jsou ve zvýšené míře produkovány při zánětlivých reakcích a tak dochází k velkému nárůstu produkce $ONOO^{-}$. NO dokáže snadno pronikat buněčnou stěnou, není proto podmínkou vzniku $ONOO^{-}$ aby NO a $O_2^{\cdot -}$ vznikaly ve stejné buňce. Peroxynitrit se může za fyziologických podmínek vyskytovat i v protonované formě kyseliny peroxodusité HOONO s pK_a=6,6 [11].

2.1.3 Účinky ROS/RNS na organismus

Produkovány v přiměřeném množství slouží ROS/RNS jako signální molekuly, NO např. snižuje napětí hladkého svalstva. K signalizaci hypoxie slouží druh ROS produkovaný mitochondriemi. S klesající koncentrací kyslíku přechází mitochondrie

z produkce $O_2^{\cdot -}$ (stacionární koncentrace se pohybují v rozmezí 20–130 μmol/l O_2) a na $ONOO^-$ za hypoxie (2–20 μmol/l O_2). Pokud poklesne koncentrace kyslíku pod 20 μmol/l, nastávají anoxické podmínky a mitochondrie produkuje NO [12].

Při nadměrném výskytu reaktivních látek dochází ke vzniku nežádoucích procesů, které plynou z vysoké reaktivity a často řetězového průběhu reakcí.

Velice náchylné k napadení radikálem a odtržení vodíku jsou kvůli přítomnosti dvojných vazeb polynenasycené mastné kyseliny (PUFA), ať už volné nebo jako součást lipidů. Radikál mastné kyseliny pak podléhá reakci s kyslíkem za vzniku peroxylového radikálu, tento proces se nazývá peroxidace lipidů. Reakce dále pokračuje buď spojením dvou radikálů, nebo napadením dalších mastných kyselin a tím ke vzniku velkého množství poškozených molekul lipidů. Mimo výše popsaný mechanismus může peroxidaci lipidů docházet přímou reakcí mastných kyselin se singletovým kyslíkem [13]. Jelikož jsou buněčné membrány složeny z lipidů, může vlivem těchto reakcí dojít k jejich narušení.

Volné radikály jsou také původcem degradace proteinů. Reakcemi s bočními aminokyselinovými řetězci může dojít k zesíťování proteinů. Nejvíce náchylné k oxidaci jsou aminokyseliny obsahující sulfhydrylové skupiny, které se oxidují za vzniku disulfidových vazeb. Může docházet i k oxidaci páteřního řetězce, po které obvykle následuje rozštěpení proteinu [14]. Protože je většina enzymů složená z proteinů, mohou i enzymy být poškozeny působením radikálů. Funkce enzymů je závislá na jejich struktuře, jakákoliv její změna nebo nežádoucí oxidace aktivních míst může vést k narušení jejich činnosti.

Oxidativní poškození DNA se týká jak nukleových bazí, tak i ribosové páteře. Poškození DNA může vést k chybné expresi genu a tedy k produkci vadných proteinů a enzymů. Poškozené báze jsou obvykle opravovány jejich vystřižením a nahrazením, může však dojít k chybné náhradě vadné báze nebo jejímu vynechání a opět nesprávné expresi. Paradoxně mitochondriální DNA je z důvodu absence ochranných histonů a blízkosti zdroje ROS citlivá na poškození a množství oxidativně pozměněných bazí bývá 10–20 krát vyšší než u jaderné DNA [5].

Nežádoucí změny nemusí způsobovat jen samotné ROS/RNS, ale i produkty jejich reakcí s biologicky významnými molekulami. L. J. Marnett [15] uvádí jeden z možných

produktů lipidové peroxidace – malondialdehyd, schopný tvořit různé adukty s nukleovými bazemi DNA, tyto změny mohou způsobovat karcinogenitu a mutagenitu.

2.2. Antioxidanty

K napravení vzniklých škod a na předcházení dalšímu poškození existuje v organismu několik mechanismů. Poškozené nukleové báze DNA jsou obvykle enzymaticky odstraněny a nahrazeny novými. Lipidové hydroperoxidy mohou být opraveny glutathionperoxidasou.

Oxidativní změny proteinů lze napravit enzymatickou redukcí nežádoucích disulfidových vazeb, nebo obnovením oxidovaných bočních aminokyselinových řetězců. Pokud je poškození příliš rozsáhlé jsou proteiny odbourány lysosomálními proteasami, nebo peptidovými komplex zvanými proteasomy [16].

Škodám lze předcházet zabráněním vzniku reaktivních látek, příkladem může být přítomnost pigmentů v pokožce, chránících její buňky pohlcováním dopadajícího UV zářením, které má dostatečnou energii na tvorbu singletového, a tedy velmi reaktivního, stavu kyslíku.

Oxidativní poškození potlačují látky zvané antioxidanty. Halliwell [17] definuje antioxidant jako látku, která v přítomnosti oxidovatelných molekul výrazně zpomaluje nebo úplně zabraňuje jejich oxidaci, i když je přítomna v menším množství ve srovnání s množstvím oněch oxidovatelných molekul.

2.2.1. Dělení antioxidantů

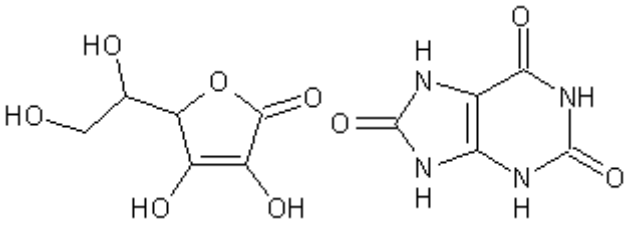
Antioxidanty můžeme, podle způsobu jejich působení, rozdělit do dvou skupin. První předchází nebo zpomaluje rozběh řetězové reakce (preventative antioxidants) a druhá pak ukončuje už běžící řetězové reakce (chain breaking antioxidants) [18].

Mezi preventivní antioxidanty patří enzymy katalyzující přeměny ROS na méně škodlivé látky (katalasa, superoxid dismutasa, peroxidasy), dále pak látky chelatující přechodné kovy, jejichž ionty mohou působit jako katalyzátory rozkladu peroxidu vodíku, sem patří ferritin, transferrin pro železo, ceruloplasmin pro měď a další.

Druhou skupinu tvoří látky označované jako nízkomolekulární antioxidanty (low molecular weight antioxidants LMWA), patří sem fenolické látky, thioly, heterocykly. Významnými zástupci jsou urát, askorbát, glutathion, α-tokoferol a β-karoten.

LMWA lze rozdělit podle charakteru prostředí ve kterém působí, tedy na hydrofilní vyskytující se především v krevní plasmě a cytosolu buněk a lipofilní, které lze nalézt v buněčných membránách a tukové tkáni, ale také v lipoproteinech krevní plasmy.

K důležitým hydrofilním antioxidantům patří kyselina askorbová a kyselina močová (Obr. 1). Kyselina askorbová je v organismu velice rozšířená, vyskytuje se jak v buňkách, tak i v mimobuněčných tekutinách. Je schopna jedno i dvouelektronové redukce. Kyselina močová vzniká rozpadem purinových bazí a je přítomna v krevní plasmě. Koncentrace těchto kyselin v krevní plasmě jsou 30–150 μmol/l kyseliny askorbové a 160–450 μmol/l kyseliny močové [1]. Obě kyseliny se za fyziologických podmínek vyskytují ve formě svých solí tedy askorbátu a urátu.

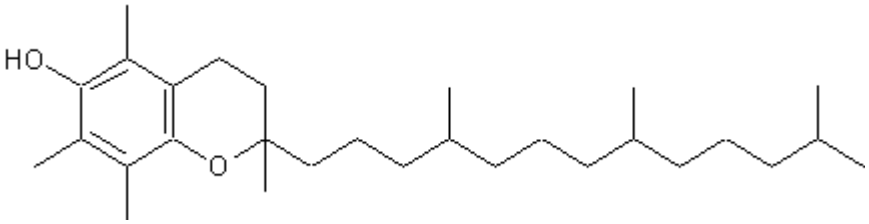


Obrázek 1. Kyselina askorbová a kyselina močová

Dále lze uvést bilirubin, který vzniká působením biliverdin reduktasy na biliverdin – produkt rozkladu hemu. Jako antioxidant slouží i tripeptid glutathion (GSH), který se skládá z glutamátu, cysteinu a glycinu. Thiolová skupina má redukční vlastnosti a proto může GSH sloužit jako antioxidant[19]. Kromě přímé antioxidační funkce slouží GSH jako kofaktor některých antioxidačních a detoxikačních enzymů kam patří glutathion S-transferasy a glutathionperoxidasy.

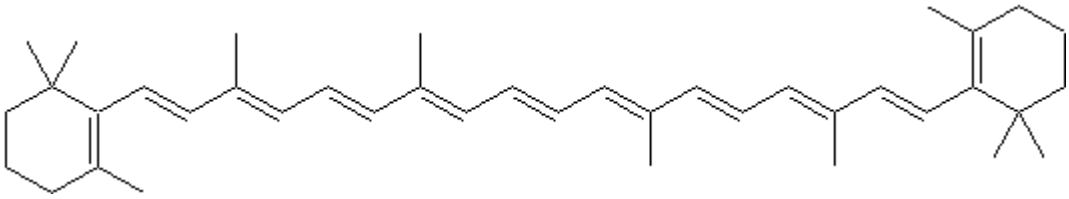
Snad nejvýznamnějším zástupcem lipofilních antioxidantů jsou tokoferoly, hlavně pak

α-tokoferol (Obr. 2). Existují čtyři izomerní formy α, β, γ a δ vzájemně se od sebe lišící polohou a počtem methylových skupin na chromenovém jádře. Příbuznou skupinou tokoferolů jsou tokotrienoly, které na rozdíl od tokoferolů mají nenasycený boční řetězec, stejně jako u tokoferolů se vyskytují ve čtyřech formách. Obě skupiny jsou pak označovány jako vitamin E.

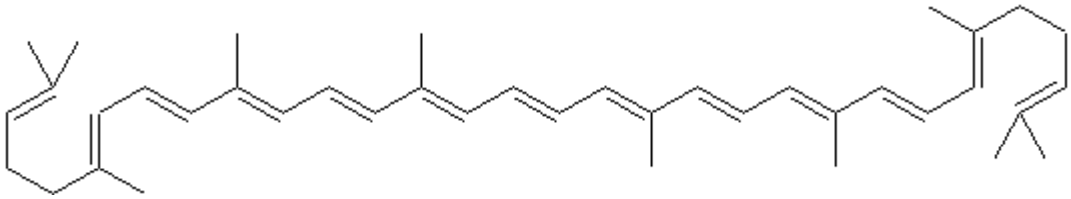


Obrázek 2. α-tokoferol

Další skupinu tvoří karotenoidy, ze kterých jsou nejvýznamnější β-karoten a lykopen (Obr. 3). Konjugované dvojné vazby jim dávají červené zbarvení a současně jsou podstatou jejich antioxidačních schopností.



β-karoten



Lykopen

Obrázek 3. β-karoten a lykopen

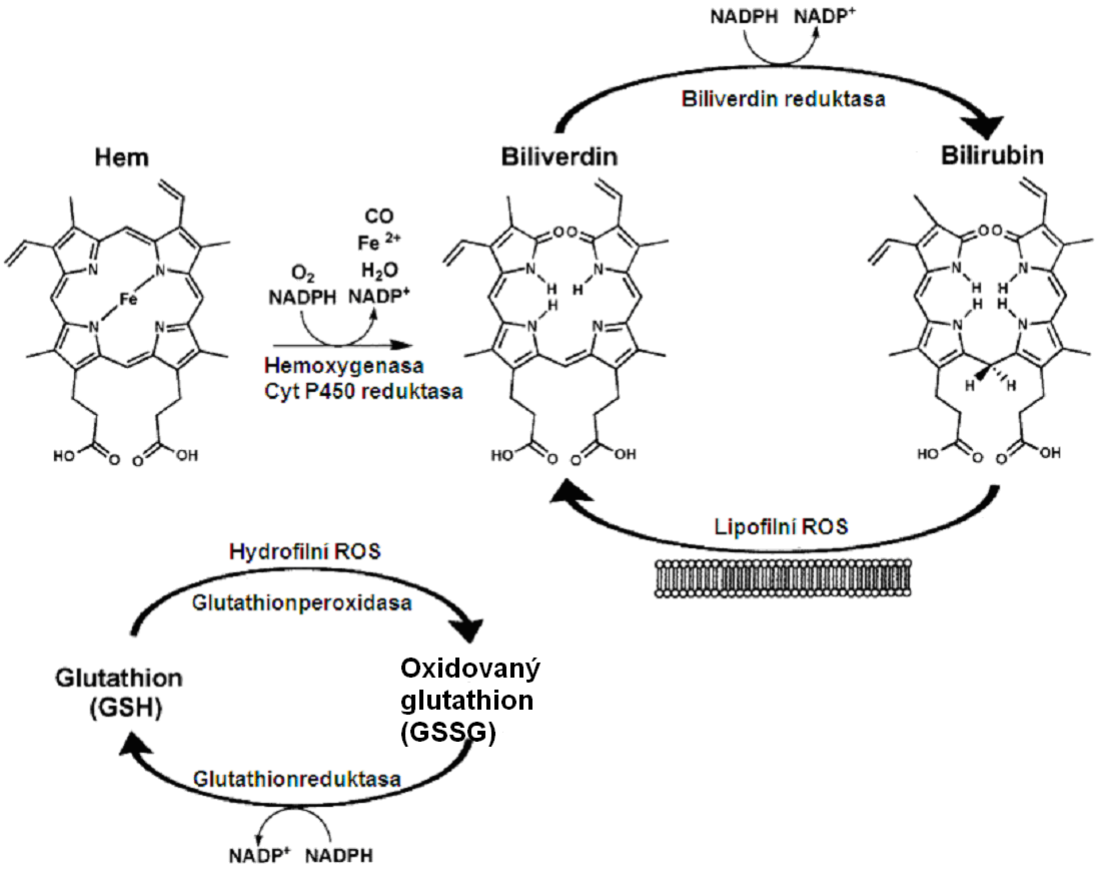
2.2.2. Funkce antioxidantů

Z tab. 1 jsou patrné rozdíly v dobách života jednotlivých ROS/RNS. Hydroxylový radikál je, jak již bylo uvedeno, typický svou velice krátkou dobou života. To znamená, že reaguje téměř okamžitě poté, co je vytvořen a ochrana před ním je možná pouze předcházením jeho vzniku, pokud se tak nestane jedinou možností je oprava napáchaných škod. Látky s delší dobou života se mohou vlivem difuze dostat dál od místa svého vzniku a způsobit tam škodu, ale současně je vyšší šance na jejich zachycení systémem antioxidantů [20].

Aby byly antioxidanty účinné, musí navzájem spolupracovat, jinak by došlo k jejich rychlému vyčerpání. Spolupráce je založena na vzájemné regeneraci. Oxidované formy antioxidantů jsou obvykle obnoveny enzymaticky. Celý řetězec reakcí

vypadá podle práce L. Packera a kol. [21] následovně: Lipofilní antioxidanty tokoferoly a tokotrienoly se oxidují na tokoferoxylový a tokotrienoxylový radikál, ty jsou na rozhraní lipidové a vodné fáze redukovány askorbátem, který přechází na semiaskorbylový radikál. Posledním antioxidantem v řetězci je glutation, který pracuje jako antioxidant s disulfidovou oxidovanou formou (GSSG). Po předání vodíku oxidované formě askorbátu je obnoven z GSSG formy pomocí glutathionreduktasy a NADPH [19].

Bilirubin je také schopný enzymové cyklické regenerace. Oxidovaná forma zvaná biliverdin se zpětně redukuje biliverdinreduktasou (BVR) za spotřeby NADPH na bilirubin a cyklus se může opakovat. Vysoká aktivita BVR umožňuje, aby byla hladina bilirubinu nízká, a přesto mohl fungovat jako antioxidant. Vysoké koncentrace bilirubinu však působí toxicky [22].



Obrázek 4. Cyklická enzymatická regenerace bilirubinu a glutathionu. Převzato z [22].

2.3. Antioxidační kapacita

Pokud dojde k nadměrnému výskytu ROS/RNS nebo poklesu množství či účinnosti antioxidantů, nastává poškození oxidovatelných látek a tím tkání a následně i organismu – oxidační stres. Schopnost tkání odolávat oxidačnímu stresu se označuje jako antioxidační kapacita. Biologické látky obsahují mnoho druhů antioxidantů, jejihž účinky se mnohdy vzájemně zesilují. Stanovení účinnosti každého zvlášť by bylo náročné, a proto se určuje takzvaná celková antioxidační kapacita (total antioxidant capacity – TAC) [23].

Často je antioxidační kapacita zjišťována na vzorcích potravin. Ukazuje se, že konzumace ovoce a zeleniny má vliv na snížení výskytu degenerativních onemocnění. Není přesně známo, které složky rostlinné stravy jsou za toto snížení zodpovědné, ale zdá se, že důvodem bude vysoký obsah antioxidantů. Určování přesné TAC je ztíženo tím, že existuje mnoho antioxidantů s různými mechanismy účinku. Vysoká hodnota TAC zjištěná některou z metod tedy nemusí znamenat odpovídající zlepšení odolnosti organismu proti oxidačnímu stresu.

2.3.1. Vyjadřovnání antioxidační kapacity

Antioxidační kapacitu je možné vyjádřit srovnáním účinku antioxidantů ve vzorku se známým množstvím standardu, která by způsobila stejnou odezvu. Jako standard slouží různé látky, obvykle se používá ve vodě rozpustný analog tokoferolu zvaný trolox, kyselina askorbová, kyselina gallová a tokoferol. Antioxidační kapacita se pak udává jako látkové množství příslušného standardu na určitý objem nebo hmotnost vzorku. Protože se trolox nevyskytuje v potravinách a současně pojem látková koncentrace nemusí být pro veřejnost srozumitelná, navrhuje D. Kim a kol. [24] používat jako standard vitamin C. Antioxidační kapacita by pak byla vyjádřena v miligramech vitaminu C na sto gramů nebo sto mililitrů daného vzorku potraviny.

2.3.2. Metody stanovení antioxidační kapacity

Metoda ORAC (oxygen-radical absorbing capacity)

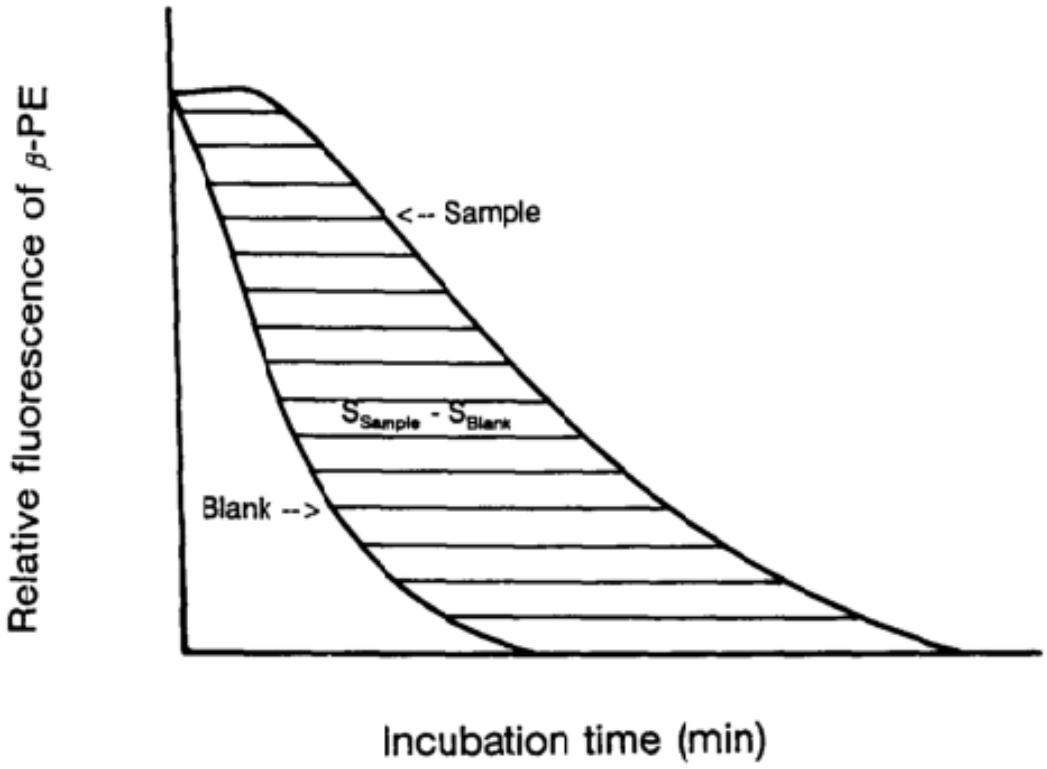
Metoda je dílem G. Cao a kol. [25]. Základem je indikátorový protein β-fykoerythrin (β-PE) a zdroj peroxylových radikálů 2,2´-azobis(2-amidinopropan)

dihydrochlorid (AAPH), lze ovšem možné použít i zdroje jiných radikálů. Jako standard je použit trolox.

β-PE je schopný fluorescence s emisí při 565 nm po excitaci zářením vlnové délky 540 nm. S poškozením vlivem radikálů ztrácí β-PE schopnost fluorescence.

Generování peroxylových radikálu se spustí zahřátím AAPH na 37 °C a pokles fluorescence je sledován každých 5 minut, až do úplného vyhasnutí. K vyhodnocení měření se používá časový průběh vyhasínání fluorescence (Obr. 5). Plocha mezi křivkami slepého vzorku a vzorku s obsahem antioxidantů odpovídá antioxidační kapacitě. Srovnávacím měřítkem je jednotka ORAC. Jedna ORAC jednotka odpovídá ploše mezi křivkami slepého vzorku a vzorku troloxu o koncentraci jednoho μmol/l. Hodnota ORAC stanovovaného vzorku je potom podílem velikosti plochy tohoto vzorku a plochy vytvořené srovnávacím vzorkem troloxu. Antioxidační kapacita se vyjádří jako počet jednotek na mililitr vzorku (units/ml).

Metoda má být schopná pracovat i s lipofilními vzorky po jejich rozpuštění v acetonu.



Obrázek 5. Křivky zhášení fluorescence β-PE, plocha mezi křivkami slouží k vyhodnocení antioxidační kapacity. Převzato z [25].

Metoda FRAP (ferric reducing ability of plasma)

Autory metody FRAP jsou I. F. F. Benzie a J. J. Strain [26]. V této metodě není použit žádný zdroj radikálů, ale vychází z předpokladu, že antioxidanty mají redukční vlastnosti. Jako indikátor zde slouží redukce tripyridyltriazin železitého komplexu (Fe^{III}-TPTZ) na železnatou formu. Přítomnost redukujících látek se projeví vznikem sytě modrého zbarvení železnaté formy komplexu s absorpčním maximem při 593 nm.

Vývoj zbarvení je sledován spektrofotometricky po dobu čtyř minut. Jako standard je v této metodě použita dvoumocná sůl železa, obvykle síran železnatý. Reakce železnatých iontů s TPTZ vede přímo ke vzniku komplexu Fe^{II}-TPTZ a vývoji modrého zbarvení. Koncentrace železnatých iontů, potřebná k dosažení stejné změny absorbance jakou poskytnou antioxidanty (redukující látky) ve vzorku, je tedy měřítkem antioxidační kapacity, a označuje se jako hodnota FRAP (FRAP value) a udává se v mikromol Fe^{2+} na litr vzorku.

Nevýhodou metody je, že redukce Fe^{III}-TPTZ probíhá za nízkého pH okolo 3,6. To může způsobit neaktivitu některých antioxidantů. Autoři FRAP metody toto ukázali na albuminu, který přestože nebyl z roztoku vysrážen, nevykazoval významnou antioxidační aktivitu, pravděpodobně kvůli vlivu pH na jeho sulfhydrylové skupiny [26].

Metoda TRAP (total radical-trapping antioxidant parameter)

Za metodou TRAP stojí D.D.R. Wayner a kol. [27]. Tato metoda využívá, podobně jako metoda ORAC, generátor peroxylových radikálů AAPH. Stanovení se provádí ve vzduchem nasyceném roztoku krevní plasmy a koncentrace kyslíku v roztoku je sledována kyslíkovou elektrodou. Přítomnost antioxidantů inhibuje pokles koncentrace kyslíku, který by jinak byl spotřebováván na peroxidaci oxidovatelných látek v krevní plasmě.

Doba, po kterou jsou antioxidanty schopny blokovat spotřebu kyslíku, se nazývá indukční doba (τ_{plasma}). K popisu antioxidační kapacity slouží hodnota TRAP, která je definována jako počet molů peroxylových radikálů zachycených litrem vzorku a vypočítá se z rovnice $TRAP=R_i\ \tau_{plasma.}$ Hodnota R_i se získá ze vzorce $R_i=n[trolox]/\tau_{trolox}$, kde n je počet peroxylových radikálu zachycených molekulou antioxidantu, v případě troloxu n=2. τ_{trolox} je druhá indukční doba vyvolaná přidáním známého množství troloxu do vzorku po spotřebování původních antioxidantů.

Novější verze této metody [28] využívá místo kyslíkové elektrody fluoreskující β-PE, v tomto se podobá metodě ORAC. Rozdíl mezi metodami spočívá ve způsobu určování antioxidační kapacity. Postup podle A. Ghiselli a kol. [28] spočívá ve sledování poklesu fluorescence β-PE. Po vyčerpání antioxidantů vzorku dojde k prudkému úbytku fluorescence. V tu dobu je do reakce přidán roztok standardu a zhášení fluorescence se opět zastaví, dokud není antioxidant standardu vyčerpán. Vyhodnocení je pak provedeno porovnáním doby, po kterou jsou antioxidanty vzorku a standardu schopny chránit β-PE před poškozením.

Metoda odbarvení $ABTS^{\cdot+}$

Podstatou metody navržené R. Re a kol. [29] je odbarvení radikálkationtu amonné soli 2,2´-azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny) ($ABTS^{\cdot+}$) generovaného reakcí ABTS s peroxodisíranem draselným. $ABTS^{\cdot+}$ se vyznačuje modrozeleným zbarvením s absorpčními maximy při 645 nm, 734 nm, 815 nm a 415 nm, tato poslední vlnová délka bývá nejčastěji použita při určování antioxidační kapacity.

Jsou možné dvě cesty stanovení antioxidační kapacity, jedna spočívá k přidání antioxidantů k roztoku $ABTS^{\cdot+}$ a sledování poklesu absorbance. Druhá v přítomnosti antioxidantu už při generaci $ABTS^{\cdot+}$, kdy po spotřebování antioxidantu dojde k nárůstu absorbance. V metodě podle R. Re a kol. [29] je použita první cesta.

Měření je vyhodnoceno jako procentuální pokles absorbance v závislosti na koncentraci vzorku. Jako standard je použit trolox. Metodu je možné použít ke stanovení antioxidační kapacity hydrofilních i lipofilních vzorků.

Metoda odbarvení DPPH

Difenylpikrylhydrazyl (DPPH) je radikál stabilizovaný delokalizací nepárového elektronu po celé molekule. Roztok této látky má tmavě fialovou barvu se silnou absorpcí při 520 nm. P. Molineau [30] doporučuje provádět měření v methanolickém nebo ethanolickém roztoku. Pokles absorbance v závislosti na koncentraci vzorku odpovídá antioxidační kapacitě. Jako standard je možné použít různé látky, jako je kyselina skorbová, trolox, tokoferol a antioxidační kapacita je pak vyjádřena jako látkové množství standardu na gram měřeného vzorku.

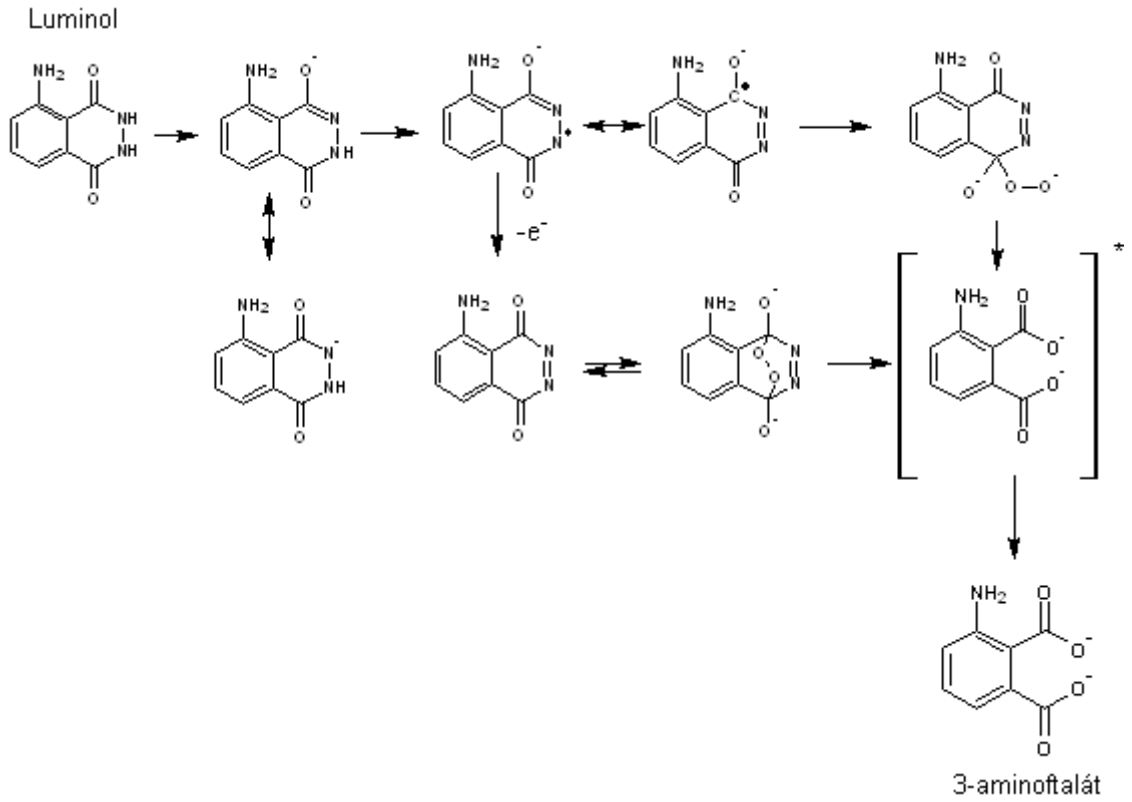
2.3.3. Chemiluminiscenční metody

Chemiluminiscence je jev, kdy je část energie vzniklé při chemické reakci uvolněna v podobě viditelného záření. Aby k tomu mohlo dojít, musí být látka schopná při přechodu z excitovaného do základního stavu naráz uvolnit energii v rozsahu 168-294 kJ/mol v závislosti na barvě vyzářeného světla. Tento rozsah odpovídá vlnovým délkám viditelného záření.

Kvantový výtěžek luminiscenční reakce se vyjadřuje jako podíl počtu vyzářených fotonu a počtu reagujících molekul. Rovnice výtěžku chemiluminiscence vypadá takto: $Ø_{CL}=Ø_R \cdot Ø_{ES} \cdot Ø_F$, kde $Ø_R$ je výtěžek produktu reakce, $Ø_{ES}$ je počet molekul vstupujících do excitovaného stavu, z nihž část deexcituje emisí světla, to popisuje $Ø_F$ – kvantový výtěžek fluorescence.

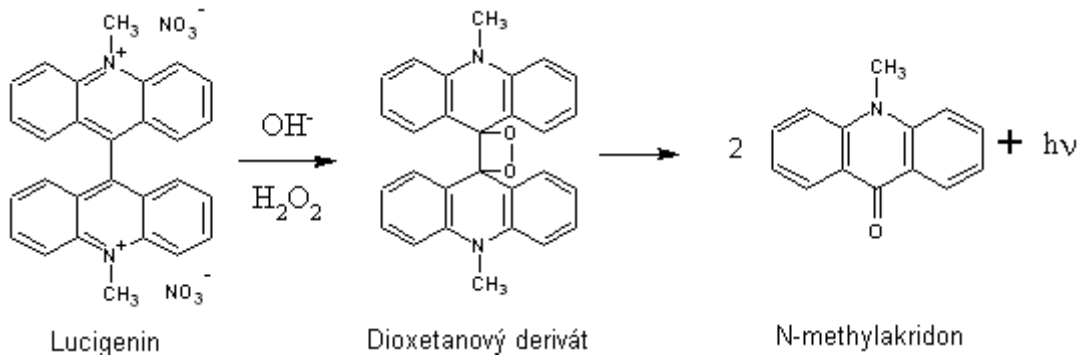
Může nastat situace, že přes vysoký kvantový výtěžek chemiluminiscence dochází k malé emisi světla. To se stane, pokud je $Ø_F$ dané látky velmi nízký, energie excitovaného stavu této látky však může být předána jiné molekule, která má vysoký $Ø_F$ a tak lze dosáhnout silné emise světla. Tomuto jevu se říká senzitizovaná chemiluminiscence [31]. Nejpouživanější chemiluminiscenční látkou při stanovení antioxidační kapacity je 3-aminoftalhydrazid, známý jako luminol.

Chemiluminiscence luminolu je usnadněna alkalických prostředím. Obr. 6 schématicky naznačuje průběh reakce. Meziprodukty reakce jsou diazachinonová forma luminolu, nebo luminolový radikálaniont. Oxidací těchto meziproduktů vznikají peroxidové formy luminolu, které se dále rozkládají za uvolnění dusíku na excitovanou formu 3-aminoftalátu. Ten následně relaxuje za vyzáření modrého světla.



Obrázek 6. Mechanismus chemiluminiscenční reakce dle [31].

Méně obvyklé je použití lucigeninu, látky ze skupiny derivátů akridinu, s modrozelenou chemiluminiscencí. Podobně jako u luminolu, i zde reakce (Obr. 7) probíhá v alkalickém prostředí. Meziprodukt reakce se rozkládá na N-methylakridon, který relaxuje za vyzáření světla. Samotný N-methylakridon má fluorescenci v modré barvě, nazelenalé zbarvení chemiluminiscence je způsobeno přenosem energie z excitované formy N-methylakridonu na lucigenin a vedlejší produkty reakce [31].



Obrázek 7. Mechanismus chemiluminiscence lucigeninu [31].

Metoda využívající peroxid vodíku a křenovou peroxidasu

Metoda je postavena na schopnosti enzymů peroxidas štěpit peroxidové vazby. V postupu vyvinutém S. Girottim a kol. [32] je použita křenová peroxidasa (horseradish peroxidase, HRP). Působením HRP na peroxid vodíku jsou produkovány komplexy HRP-H_2O_2, které jsou radikálové povahy. Luminol je těmito radikály oxidován a dochází k chemiluminiscenci v modré části spektra (425 nm).

Princip stanovení antioxidační kapacity spočívá v tom, že antioxidanty přítomné ve vzorku vznikající radikály pohlcují. Antioxidanty reagují jak přímo s radikálovými komplexy HRP-H_2O_2, tak i s radikálovými meziprodukty odvozenými od luminolu. To znamená, že dokud nejsou antioxidanty spotřebovány, nedojde k chemiluminiscenci.

Stanovení podle [32] probihá následovně. Je připravena směs peroxidu vodíku, luminolu a HRP a sleduje se vývoj chemiluminiscence. Jakmile chemiluminiscence dostoupí maxima a ustálí se zde, je do reakce přidán vzorek s obsahem antioxidantů. Přídavek způsobí vyhasnutí emise světla. Po určité době se chemiluminiscence opět obnoví. Doba od vyhasnutí záření po dosažení 30% původní intenzity je měřítkem obsahu antioxidantů ve vzorku. Vyjádření antioxidační kapacity je opět provedeno srovnáním se standardem (troloxem).

Metoda s využitím lucigeninu použitelná na lipofilní vzorky

D. Christodouleas a kol. [33] navrhují využití lucigeninu jako chemiluminiscenční látky. Jako rozpouštědlo byl zvolen 2-propanol, aby bylo možno pracovat s hydrofilními i lipofilními vzorky a současně je v něm rozpustný i lucigenin.

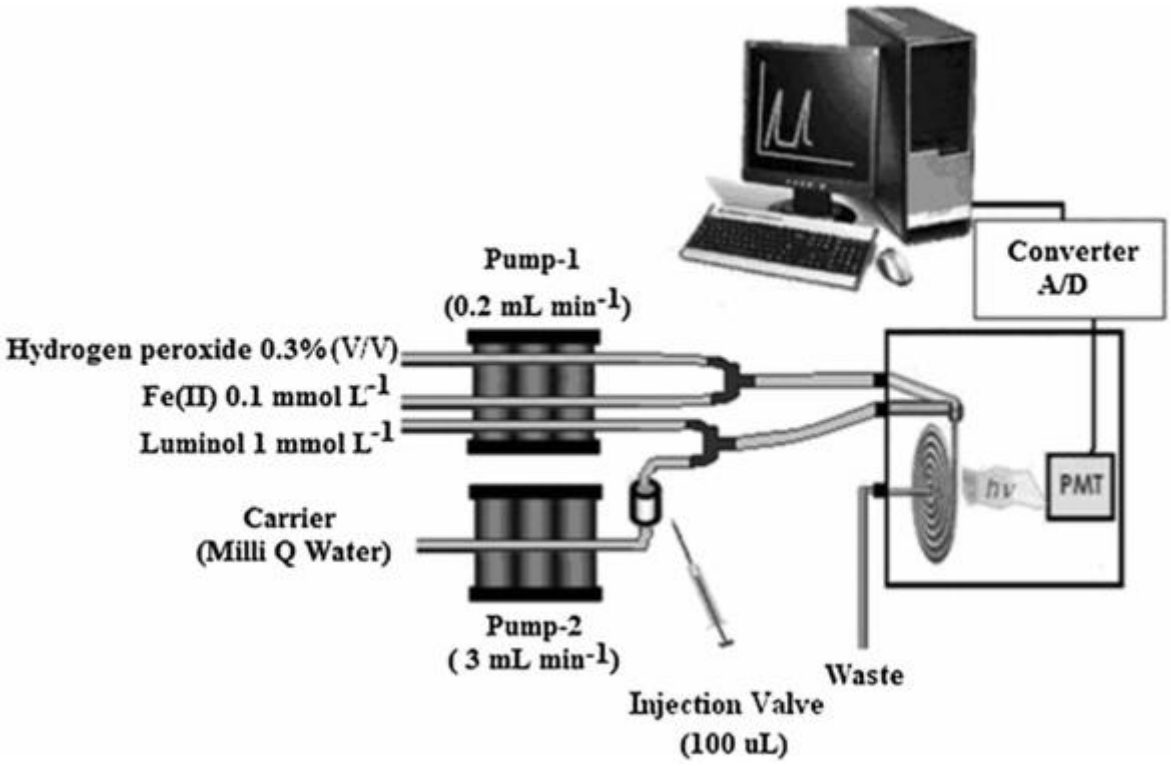
K měření se používá směs vzorku, peroxidu vodíku a lucigeninu. Chemiluminiscence je nastartována nástřikem hydroxidu sodného.

Antioxidační kapacita je vyhodnocena formou IC_{50}, to znamená koncentrace antioxidantu, která poskytne o 50% nižší intenzitu chemiluminiscence oproti slepému vzorku. Jako standard byla zvolena kyselina gallová a antioxidační kapacita vyjádřena formou ekvivalentu antioxidační kapacity gallové kyseliny (gallic equivalent antioxidant capacity GEAC). Tato veličina odpovídá rovnici

$$GEAC = \frac{IC_{50}(antioxidant)}{IC_{50}(gallová\ kyselina)}.$$

Metoda stanovení antioxidační kapacity jedlých olejů v mikroemulzi

J. A. M. Pulgarín a kol. [34] navrhuje postup metodou nástřikové průtokové analýzy (flow injection analysis FIA) s využitím n-hexanu jako rozpouštědla vzoku jedlého oleje. N-hexan je s vodou nemísitelný a tedy jeho přidáním do vody dojde ke vzniku mikroemulze. Zároveň přítomnost mikroemulze zesiluje intenzitu chemiluminiscence luminolu, oproti reakci v čistě vodném prostředí.



Obrázek 7. Schéma zařízení stanovení antioxidační kapacity metodou FIA. Převzato z [34].

Postup měření (Obr. 7) je následovný: Smísením peroxidu vodíku a železnatých iontů dojde k tvorbě hydroxylových radikálů. Další trubicí je veden roztok luminolu, ten se mísí s nosičem vzorku, v tomto případě vodou. Všechny čtyři látky se mísí v měřicí cele, kde je snímána intenzita chemiluminiscence. Nástřikem čistého n-hexanu (slepý vzorek) dojde k náhlému nárůstu intenzity světelného záření. Po poklesu intenzity záření na základní linii je nastříknut n-hexan s přítomností vzorku oleje. Opět dojde k nárůstu intenzity, ale oproti slepému vzorku je maximum nižší a odpovídá množství antioxidantů ve vzorku. Vyhodnocení se provádí způsobem IC_{50} a k porovnání antioxidační kapacity je použita kyselina gallová jako standard.

3. Experimentální část

Cílem této práce je ověření možnosti použít chemiluminiscenčních metod pro stanovení antioxidační kapacity jak hydrofilních, tak i lipofilních antioxidantů v reálných vzorcích. Snahou bylo vyhnout se nevodnému prostředí, proto bylo pro solubilizaci lipofilních antioxidantů využito povrchově aktivní látky cetyltrimethylamonium bromidu (CTAB). Testovány byly tři chemiluminiscenční metody, využívající luminol.

První metoda je založena na zjištění [35], že současná přítomnost kationtové povrchově aktivní látky CTAB a organického pufru bis-tris (Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan)-HCl výrazně zvyšuje intenzitu chemiluminiscence luminolu iniciovanou rozkladem peroxidu vodíku katalyzovaného chloridem kobaltnatým. Chemiluminiscence je u tohoto sytému pozorovatelná i při fyziologickém pH (7,4) – u běžných provedení CL reakce luminolu s anorganickými katalyzátory CL probíhá až při vyšších pH (>10). Přítomnost CTAB v reakční směsi umožňuje stanovení antioxidační kapacity jak hydrofilních, tak i lipofilních vzorků.

Druhá metoda využívá jako katalyzátor rozkladu peroxidu vodíku křenovou peroxidasu [32]. Tento systém není v původní podobě schopen pracovat s lipofilními vzorky. Proto byl testován vliv přídavku CTAB do reakční směsi. Přestože bylo předpokládáno, že křenová peroxidasa bude působením CTAB denaturována a stanovení bude znemožněno, zjistili jsme, že CTAB denaturaci nezpůsobuje ani v poměrně vysokých koncentracích.

3.1. Použité chemikálie a studované reálné vzorky

Látka	Výrobce	Čistota	M (g/mol)
Kys. chlorovodíková 35%	Penta	p.a.	36,45
Kys. askorbová	Fluka	99,5%	176,13
Trolox	Fluka	98%	250,32
α-tokoferol	Sigma	95%	430,72
Luminol (sodná sůl)	Sigma		199,15
Křenová peroxidasa 25 kU	Sigma		
Peroxid vodíku 3%	Fluka		34,02
CTAB	Fluka	99%	364,46
Hydroxid sodný	Lach-Ner	p.a.	40
Dihydrogenfosforečnan draselný	Lach-Ner	p.a.	136,09
Bis-Tris	Fluka	99%	209,24
Chlorid kobaltnatý hexahydrát	Lachema	p.a.	237,05
Methanol	Lachema	p.a.	32,04

Tabulka 1. Použité chemikálie.

Jako hydrofilní reálný vzorek byl použit 100% pomerančový džus (Toma) a červené víno Modrý Portugal (Maďarsko). Lipofilní vzorek byl olivový olej Monini Classico (Itálie).

3.2. Přístrojové vybavení

Chemiluminiscenční měření bylo prováděno na přístroji Fluoroskan Ascent FL (Thermo Scientific) s fotonásobičovým detektorem a dvěma čerpadly nástřiku. Vzorky byly měřeny v mikrotitračních destičkách s 96 jamkami. Přístroj je připojen k počítači a řízen programem Ascent. K měření pH byl použit bateriový pH metr ISFET Model IQ125 (miniLab).

3.3. Použité metody

3.3.1. Metoda s využitím systému CTAB-BisTris-$CoCl_2$

Tato metoda vychází z diplomové práce O. Tunky [35], kde bylo zjištěno, že přítomnost organického pufru Bis-Tris zvyšuje intenzitu chemiluminiscence luminolu iniciované rozkladem peroxidu vodíku za katalýzy chloridem kobaltnatým natolik, že je pozorovatelná i při pH = 7,4. Protože se mezi pH 7 a 8 intenzita chemiluminiscence výrazně roste, což snižuje reprodukovatelnost měření, byla stanovení antioxidační kapacity zvolena hodnota pH = 8. Kationický surfaktant CTAB umožňuje převedení lipofilních vzorků do roztoku. Druhou výhodou CTAB je, že dále zvyšuje intenzitu chemiluminiscence, pravděpodobně zakoncentrováním reakčních složek na povrchu micel.

Příprava roztoků

Zásobní roztok CTAB o koncentraci 0,1 mol/l je připraven navážením potřebného množství CTAB. Aby došlo k rozpuštění CTAB, je potřeba roztok zahřát na přibližně 30 °C (nad tzv. Krafftovu teplotu). Roztok Bis-Tris pufru o pH=8 a koncentraci 0,025 mol/l byl připraven navážením a rozpuštěním v malém množství vody. Po úpravě na pH = 8 pomocí 0,1 mol/l kys. chlorovodíkové je roztok doplněn vodou na požadovaný objem. Zásobní roztok $CoCl_2$ o koncentraci $2{,}5 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Zásobní roztok luminolu o koncentraci $3{,}85 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Zásobní roztok peroxidu vodíku 3% (0,882 mol/l). Zásobní roztoky jsou s výjimkou CTAB uchovávány v lednici.

Zásobní roztok troloxu o koncentraci 1 mmol/l je připraven rozpuštěním 6,3 mg troloxu v 1 ml methanolu a doplněním vodou do 25 ml. Zásobní roztok kyseliny askorbové o koncentraci 5 mmol/l je připraven rozpuštěním 22 mg kys. askorbové ve 25 ml vody. Zásobní roztok 1 mmol/l α-tokoferolu vznikne smísením 10,8 mg této látky v malém množství teplého zásobního roztoku CTAB. Solubilizaci α-tokoferolu je možné urychlit použitím ultrazvuku. Roztok doplníme roztokem CTAB do celkového objemu 25 ml.

Zásobní roztoky hydrofilních vzorků byly připraveny takto: Vzorek pomerančového džusu byl vodou naředěn na desetinásobný objem, vzorek červeného

vína na pětinásobný objem. Vzorek olivového oleje byl v poměru 1:1 rozpuštěn v teplém zásobním roztoku CTAB, solubilizaci oleje v CTAB lze urychlit pomocí ultrazvuku. Každé další ředění lipofilních vzorků bylo opět prováděno zásobním roztokem CTAB.

Chemiluminiscenční směs (CL směs) se připraví smísením 218 µl zásobního roztoku peroxidu vodíku a 500 µl zásobního roztoku luminolu a doplněním do 50 ml.

Pro měření jsou do mikrotitrační destičky napipetovány tyto objemy zásobních roztoků: 25 µl CTAB, 25 µl $CoCl_2$, 50 µl Bis-Tris a 20 µl vzorku. V případě lipofilních vzorků je zachován objem Bis-Tris a $CoCl_2$. Lipofilní vzorek je v požadovaném poměru naředěn roztokem CTAB. Z toho roztoku jsou odebírány různé objemy a po doplnění roztokem CTAB na objem 25 µl pipetovány do jamičky. Aby byl zachován celkový objem je 20 µl původně připadajících na vzorek nahrazeno 20 µl vody. Při zahájení měření je automatickým dávkovačem dodáno 130 µl CL směsi. Celkový objem reagencií v jamičce mikrotitrační destičky je tedy 250 µl. Tab. 2 shrnuje zásobní a výsledné koncentrace roztoků.

Látka	Zásobní koncentrace (mol/l)	Výsledná koncentrace v jamičce při měření (mol/l)
CTAB	0,1	0,01
Bis-Tris	0,025	0,005
$CoCl_2$	$2{,}5\cdot10^{-4}$	$2{,}5\cdot10^{-5}$
Luminol	$3{,}85\cdot10^{-4}$	$1\cdot10^{-6}$
H_2O_2	0,882	$1\cdot10^{-3}$

Tabulka 2. Zásobní a výsledné koncentrace roztoků.

Postup měření

Nástřikové čerpadlo měřicího zařízení je připraveno k použití propláchnutím 5 ml destilované vody a poté 2,7 ml chemiluminiscenční směsi. Před každým dalším měřením je vhodné propláchnout čerpadlo nejméně 1 ml CL směsi. Předchozí kroky jsou u všech metod stejné.

Nastavení přístroje: Směr měření po sloupcích (č. 5), objem nástřiku 130 µl CL směsi, doba třepání 10 s, doba integrace 500 ms.

V mikrotitrační destičce byla umístěna řada vzorků o koncentracích uvedených v tabulce 3. Měření bylo prováděno v triplikátech.

Výsledné koncentrace standardů (mol/l) při měření			Objemy vzorků (ul)		
Trolox	Tokoferol	K. askorbová	Pomerančový džus	Červené víno	Olivový olej
0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0	0	0
1,00E-05	1,00E-05	2,00E-05	0,04	0,08	0,375
2,00E-05	2,00E-05	3,00E-05	0,08	0,16	0,625
3,00E-05	3,00E-05	5,00E-05	0,1	0,2	0,75
4,00E-05	4,00E-05	7,00E-05	0,12	0,24	0,875
5,00E-05	5,00E-05	9,00E-05	0,16	0,32	1
7,00E-05	7,00E-05	1,00E-04	0,18	0,36	1,125
8,00E-05	8,00E-05	2,00E-04	0,2	0,4	1,25

Tabulka 3. Výsledné koncentrace standardů a objemy vzorků v mikrotitrační destičce.

3.3.2. Metoda založená na katalýze křenovou peroxidasou

Příprava roztoků

Zásobní roztok křenové peroxidasy o koncentraci 0,1 mg/ml je připraven rozpuštěním lyofilizovaného prášku 25000 jedn. (25 kU) ve fosfátovém pufru pH=7,6. Zásobní roztok peroxidasy je vhodné před měřením nechat týden odležet v chladu. Fosfátový pufr je připraven z 250 ml 0,1 mol/l dihydrogenfosforečnanu draselného a po úpravě pH pomocí 0,1 mol/l hydroxidu sodného je doplněn na celkový objem 500 ml. Zásobní roztok peroxidu vodíku má koncentraci 3% (0,882 mol/l), zásobní roztok luminolu $2 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Všechny roztoky jsou uchovávány v chladu.

Zásobní roztoky troloxu a kyseliny askorbové jsou připraveny stejně jako v předchozí metodě. Ředění na požadované koncentrace se provádí fosfátovým pufrem pH=7,4. Zásobní roztok pomerančového džusu byl připraven naředěním vodou na dvojnásobný objem. Víno bylo zředěno 10x. Další ředění na požadované koncentrace se provádí fosfátovým pufrem. Zásobní a výsledné koncentrace jsou uvedeny v tabulce 4.

Látka	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace při měření
Křenová peroxidasa	0,1 mg/ml	$5 \cdot 10^{-3}$ mg/ml
Luminol	$2 \cdot 10^{-3}$ mol/l	$3{,}2 \cdot 10^{-5}$ mol/l
Peroxid vodíku	0,882 mol/l	$7{,}07 \cdot 10^{-3}$ mol/l

Tabulka 4. Zásobní a výsledné koncentrace použitých látek.

Postup měření

K přípravě 50 ml CL směsi je potřeba 500 µl zásobního roztoku peroxidu vodíku a 1 ml zásobního roztoku luminolu, směs doplníme do 50 ml fosfátovým pufrem. Směs pro měření je připravena smísením 20 µl zásobního roztoku peroxidasy zředěného na koncentraci 0,05 mg/ml fosfátovým pufrem a 20 µl vzorku.

Nastavení přístroje: Parametry jsou shodné s předchozí metodou s výjimkou objemu nástřiku, ten je v tomto případě 160 µl a celkový objem reakční směsi je tedy 200 µl. Měření je provedeno pro koncentrace uvedené v tabulce 5, koncentrace jsou měřeny v triplikátech.

Výsledné koncentrace standardů (mol/l) při měření		Objemy vzorků (ul)	
Trolox	K. askorbová	Pomerančový džus	Červené víno
0,00E+00	0,00E+00	0	0
2,00E-06	1,00E-05	0,3	0,04
3,00E-06	1,50E-05	0,5	0,08
4,00E-06	2,00E-05	0,7	0,1
5,00E-06	2,50E-05	0,9	0,12
6,00E-06	3,00E-05	1	0,16
7,00E-06	4,00E-05	1,2	0,18
8,00E-06	5,00E-05	1,5	0,2

Tabulka 5. Výsledné koncentrace standardů a objemy vzorků v mikrotitrační destičce.

3.3.3. Metoda s využitím křenové peroxidasy a CTAB

Použitelnost peroxidasové metody pro stanovení antioxidační kapacity lipofilních vzorků byla otestována pro tokoferol a olivový olej. Uvedené lipofilní vzorky byly solubilizovány v CTAB. Přestože je známo, že povrchově aktivní látky negativně ovlivňují enzymy (mohou způsobit jejich denaturaci), domnívali jsme se, že je možné, že enzymová aktivita zůstane zachována.

Příprava roztoků

Koncentrace použitých látek jsou shrnuty v tabulce 6. Kromě CTAB jsou roztoky uchovávány v lednici. Zásobní roztoky kys. askorbové a tokoferolu jsou připraveny rozpuštěním navážky v zásobním roztoku CTAB, rozpuštění tokoferolu lze usnadnit ultrazvukem. Roztok troloxu je připraven rozpuštěním navážky v minimálním množství methanolu a poté doplněn zásobním roztokem CTAB na požadovaný objem. Další ředění je pak prováděno zásobním roztokem CTAB.

Roztoky vzorků jsou připraveny takto: Pomerančový džus je zředěn roztokem CTAB na dvojnásobný objem. Vzorek vína je připraven naředěním vína roztokem CTAB 20x. Vzorek oleje vznikl smísením s roztokem CTAB v poměru 1:1 a promíchán pomocí ultrazvuku. Všechna další ředění jsou prováděna roztokem CTAB.

Látka	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace při měření
Křenová peroxidasa	0,1 mg/ml	0,01 mg/ml
Luminol	$2 \cdot 10^{-3}$ mol/l	$3{,}2 \cdot 10^{-5}$ mol/l
Peroxid vodíku	0,882 mol/l	$7{,}07 \cdot 10^{-3}$ mol/l
CTAB	0,05 mol/l	0,005 mol/l

Tabulka 6. Zásobní a výsledné koncentrace použitých látek.

Postup měření

CL směs použitá v této metodě se shoduje se směsí původní peroxidasové metody. Směs pro měření se skládá z 20 μl neředěného zásobního roztoku peroxidasy (0,1 mg/ml) a 20 μl roztoku vzorku v CTAB.

Nastavení přístroje: Parametry měření se shodují s parametry použitými v původní peroxidasové metodě.

Měření je provedeno pro koncentrace uvedené v tabulce 7, koncentrace byly měřeny v triplikátech.

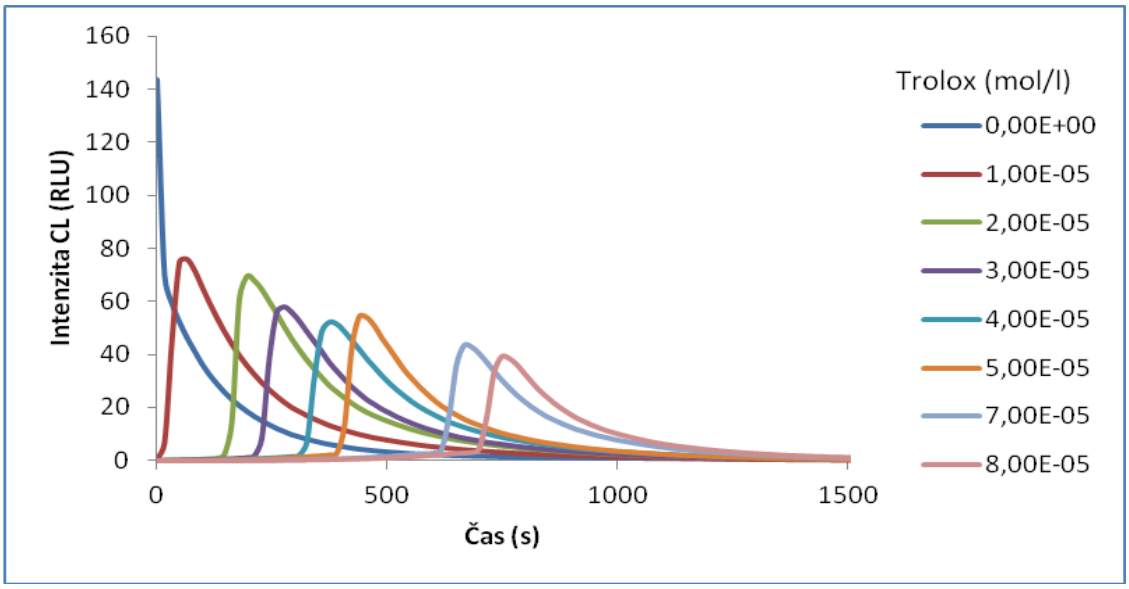
Výsledné koncentrace standardů (mol/l) při měření			Objemy vzorků (ul)		
Trolox	Tokoferol	K. askorbová	Pomerančový džus	Červené víno	Olivový olej
0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0	0	0
2,00E-06	2,00E-06	1,00E-05	0,3	0,02	0,2
3,00E-06	3,00E-06	1,50E-05	0,5	0,04	0,3
4,00E-06	4,00E-06	2,00E-05	0,7	0,05	0,4
5,00E-06	5,00E-06	2,50E-05	0,9	0,06	0,5
6,00E-06	6,00E-06	3,00E-05	1	0,08	0,6
7,00E-06	7,00E-06	4,00E-05	1,2	0,09	0,7
8,00E-06	8,00E-06	5,00E-05	1,5	0,1	0,8

Tabulka 7. Výsledné koncentrace standardů a objemy vzorků v mikrotitrační destičce.

3.4. Výsledky a diskuse

3.4.1. Zpracování výsledků

Výsledky měření jsou zpracovány v programech MS Excel a GraphPad Prism. Naměřené hodnoty intenzity chemiluminiscence (vyjádřená v tzv. relative light units, RLU) v závislosti na čase pro různé koncentrace troloxu v reakční směsi jsou uvedeny na obr. 1.



Obr. 1. Vývoj RLU v čase pro různé koncentrace troloxu. Výsledné koncentrace látek v reakční směsi (mol/l): CTAB 0,01, Bis-Tris 0,005, $CoCl_2$ $2{,}5 \cdot 10^{-5}$, luminol $1 \cdot 10^{-6}$, H_2O_2 $1 \cdot 10^{-3}$.

Z grafu jsou patrné prodlevy mezi smísením reakčních složek a nástupem chemiluminiscence. Přítomné antioxidanty reagují s radikály vznikajícími rozkladem peroxidu vodíku a zabraňují tak jejich reakci s luminolem. Po vyčerpání antioxidantů nastává chemiluminiscence (CL). Délka prodlev mezi smícháním složek reakční směsi a maximální intenzitě chemiluminiscence je úměrná obsahu antioxidantů v měřeném vzorku.

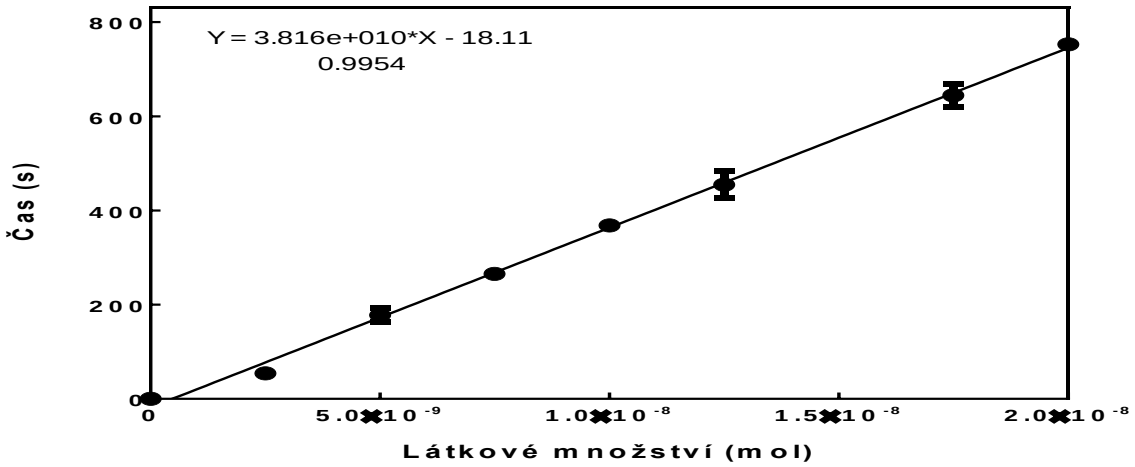
Metoda CTAB-BisTris-$CoCl_2$

Kalibrační závislost (obr. 2) pro trolox (analogicky je pak postupováno i u dalších standardů - tokoferolu, kys. askorbové) je sestavena vyhodnocením časových profilů chemiluminiscence uvedených na obr. 1. Na ose x je látkové množství stanovovaného antioxidantu v mikrotitrační destičce, na ose y jsou vyneseny časy, kdy nastane maximum CL.

Antioxidační kapacity reálných vzorků jsou stanoveny metodou kalibrační křivky. Na osách x jsou uvedeny vypočítané objemy vzorků (v litrech), které se nacházejí v jednotlivých jamičkách. Protože objemy reakčních směsí jsou stejné jak při měření standardů, tak i při měření reálných vzorků, je antioxidační kapacita získána jako podíl

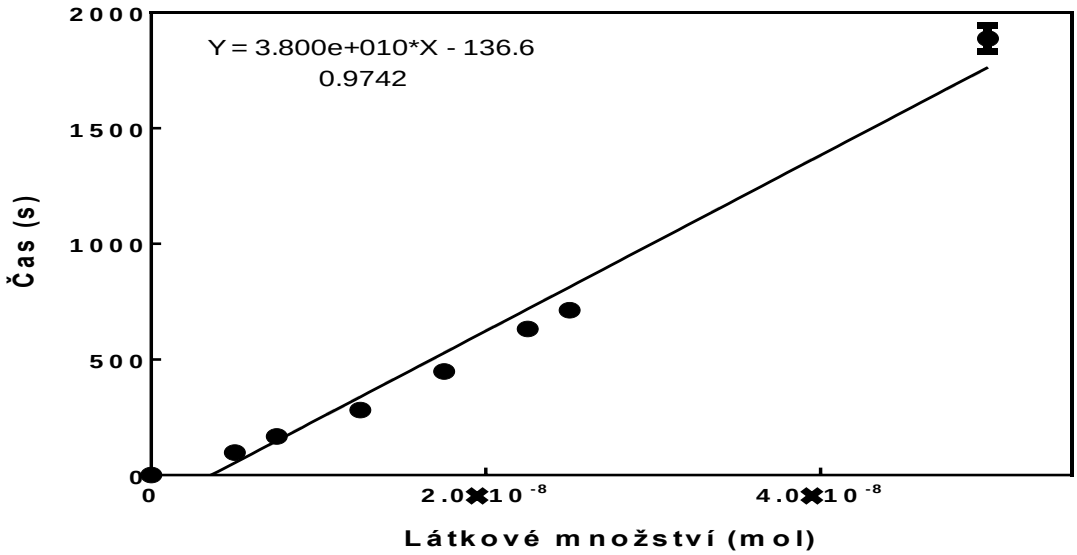
směrnice kalibrační křivky reálného vzorku a směrnice kalibrační křivky pro standard. Jednotkou je mol ekvivalentů použitého standardu na litr vzorku.

Trolox



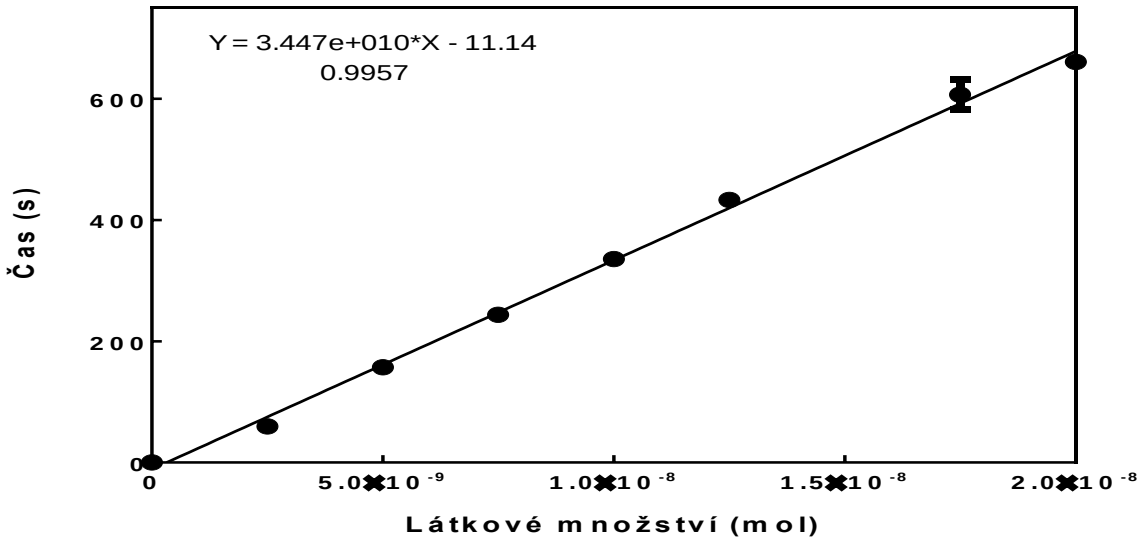
Obr. 2. Kalibrační závislost časové prodlevy mezi smícháním reaktantů a maximální intenzitou chemiluminiscence na látkovém množství troloxu v reakční směsi (tj. v jamičce mikrotitrační destičky). Látková množství standardů odpovídají, koncentracím uvedeným v tabulce 3. Výsledné koncentrace látek v reakční směsi (mol/l): CTAB 0,01, Bis-Tris 0,005, $CoCl_2$ $2{,}5 \cdot 10^{-5}$, luminol $1 \cdot 10^{-6}$, H_2O_2 $1 \cdot 10^{-3}$.

Kyselina askorbová



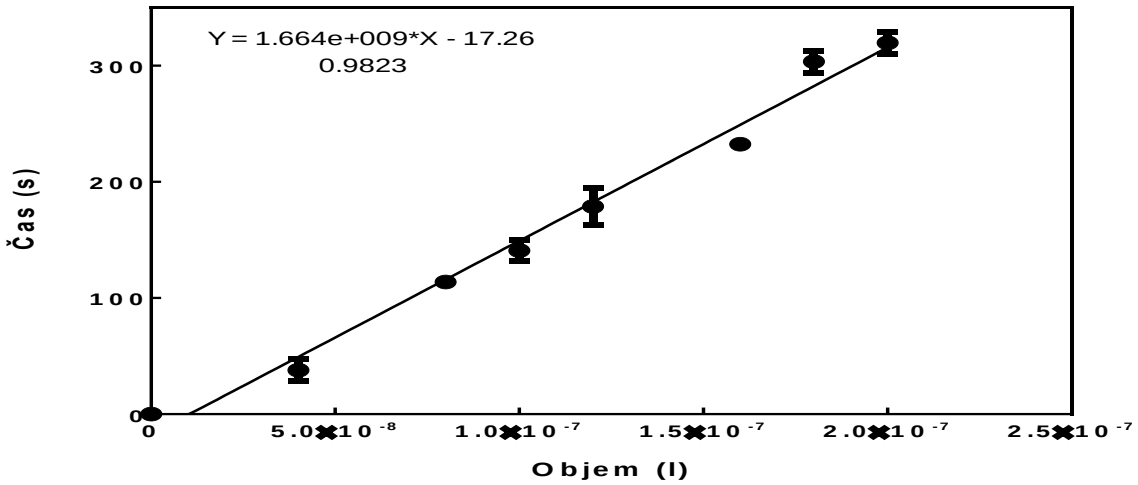
Obr. 3. Kalibrační závislost časových prodlev CL reakce na látkovém množství kys. askorbové v reakční směsi. Podmínky experimentu se shodují s podmínkami uvedenými v legendě obr. 2.

Tokoferol



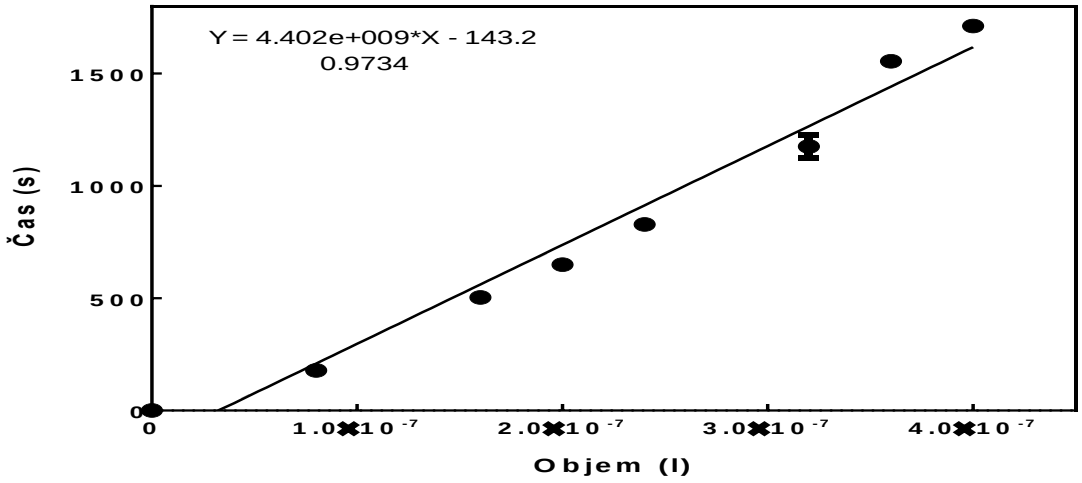
Obr. 4. Kalibrační závislost prodlev CL na látkovém množství tokoferolu v reakční směsi. Podmínky experimentu se shodují s podmínkami uvedenými u obr. 2.

Pomerančový džus



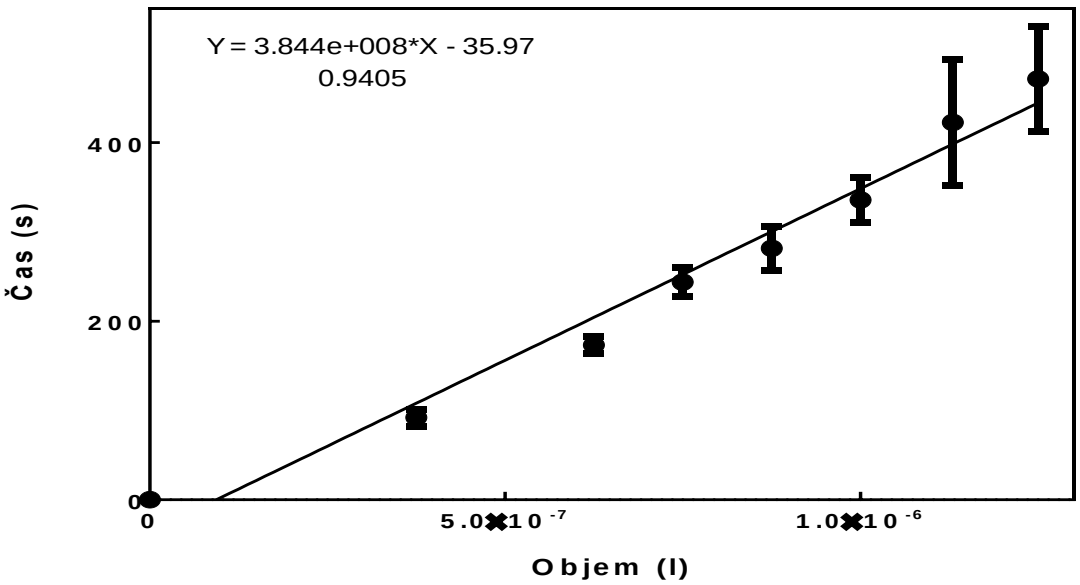
Obr. 5. Závislost prodlevy CL na objemu pomerančového džusu v reakční směsi. Podmínky experimentu jsou shodné s těmi uvedenými u obr. 2.

Červené víno



Obr. 6. Závislost zpoždění CL na objemu červeného vína v reakční směsi. Podmínky experimentu jsou shodné s těmi uvedenými u obr. 2.

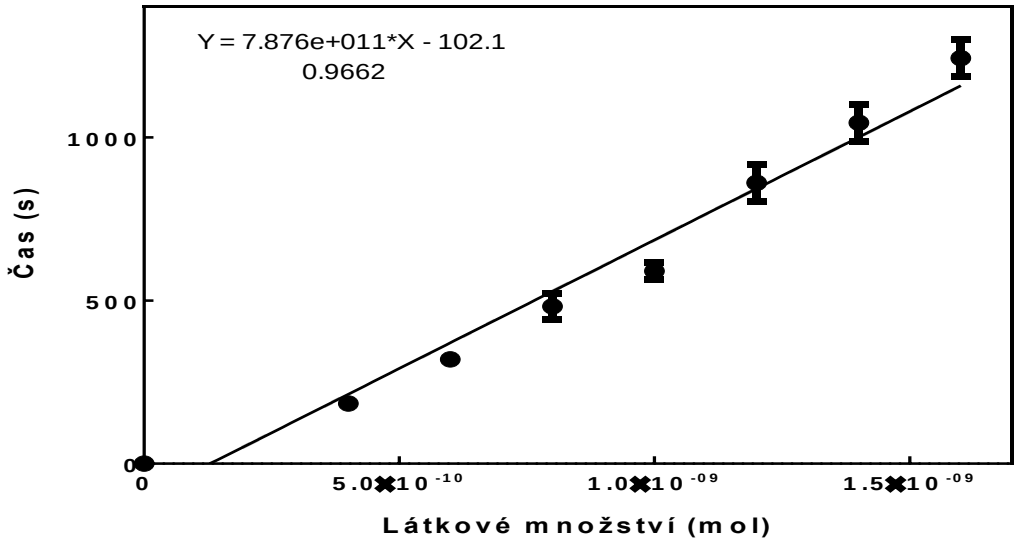
Olivový olej



Obr. 7. Závislost prodlevy CL na objemu olivového oleje v reakční směsi. Podmínky experimentu jsou shodné s podmínkami uvedenými u obr. 2.

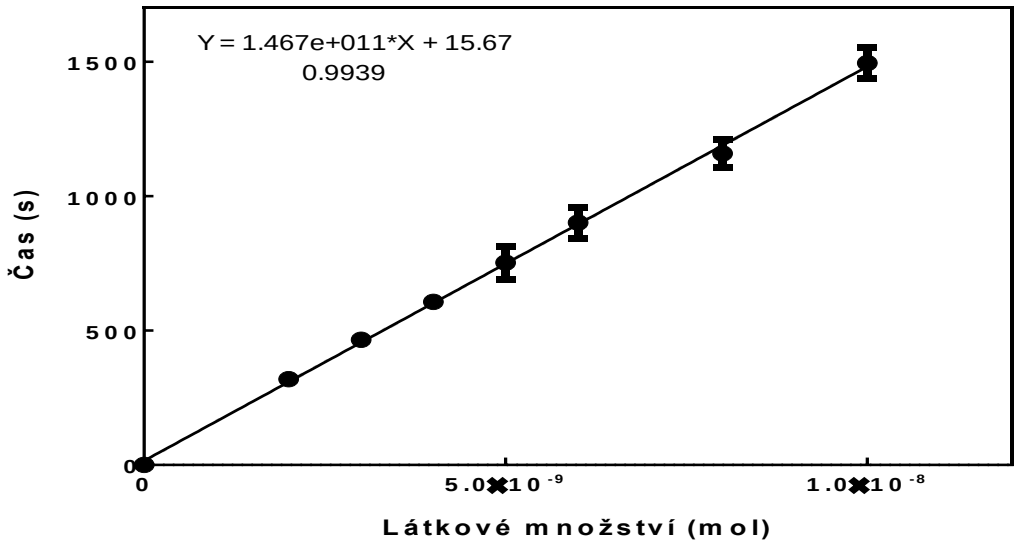
Peroxidasová metoda bez přídavku CTAB

Trolox



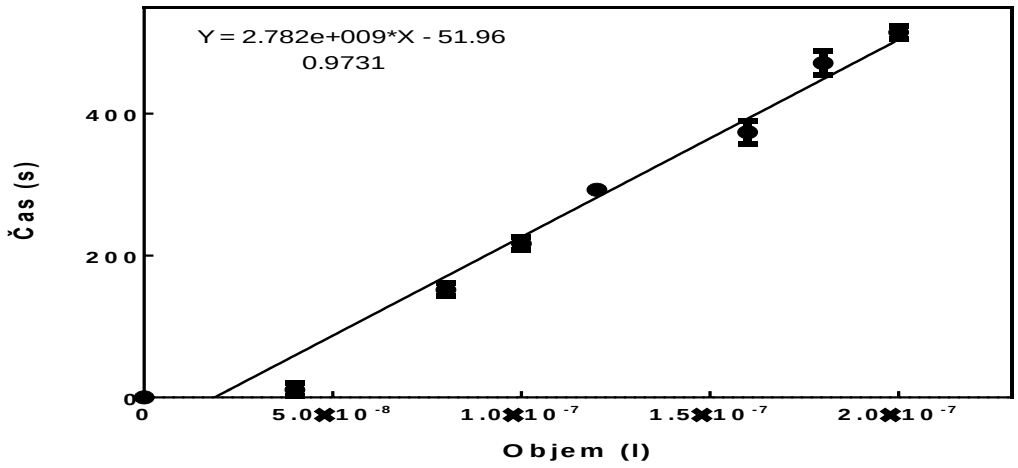
Obr. 8. Kalibrační závislost zpoždění CL na látkovém množství troloxu v reakční směsi. Látková množství standardů odpovídají, pro objem reakční směsi 200 µl, koncentracím uvedeným v tabulce 5. Koncentrace látek v reakční směsi: HRP 0,005 mg/ml, luminol $3{,}2 \cdot 10^{-5}$ mol/l, peroxid vodíku $7{,}07 \cdot 10^{-3}$ mol/l.

Kyselina askorbová



Obr. 9. Kalibrační závislost zpoždění CL na látkovém množství kys. askorbové v reakční směsi. Podmínky experimentu odpovídají podmínkám uvedeným u obr. 8.

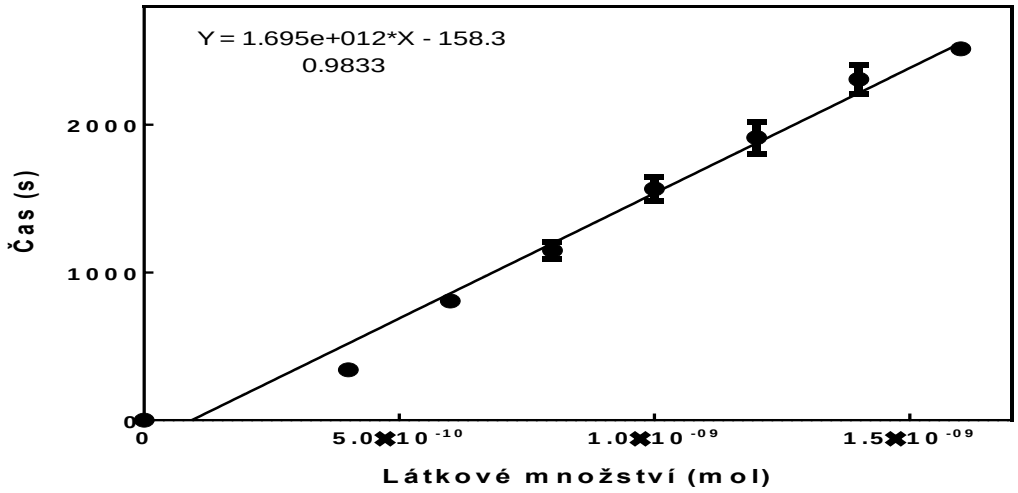
Červené víno



Obr. 10. Závislost prodlevy CL na objemu červeného vína v reakční směsi. Podmínky experimentu odpovídají podmínkám uvedeným u obr. 8.

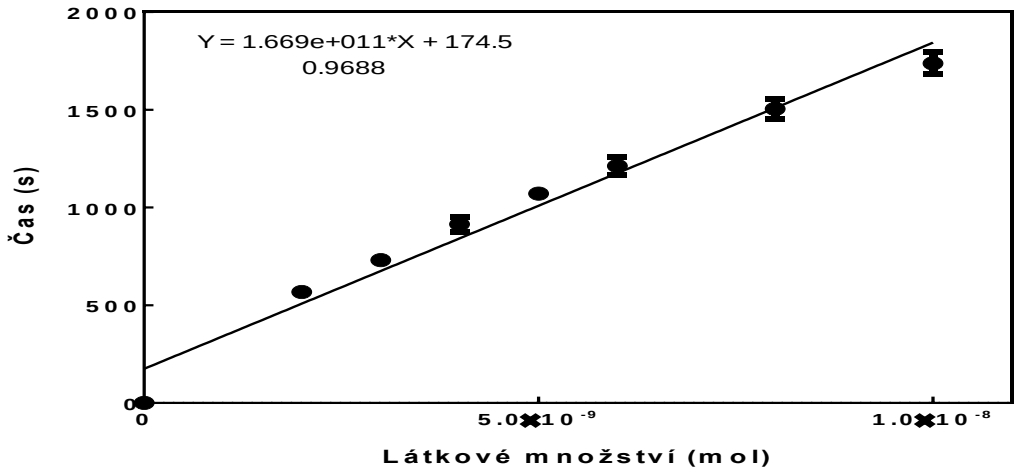
Peroxidasová metoda s přídavkem CTAB

Trolox



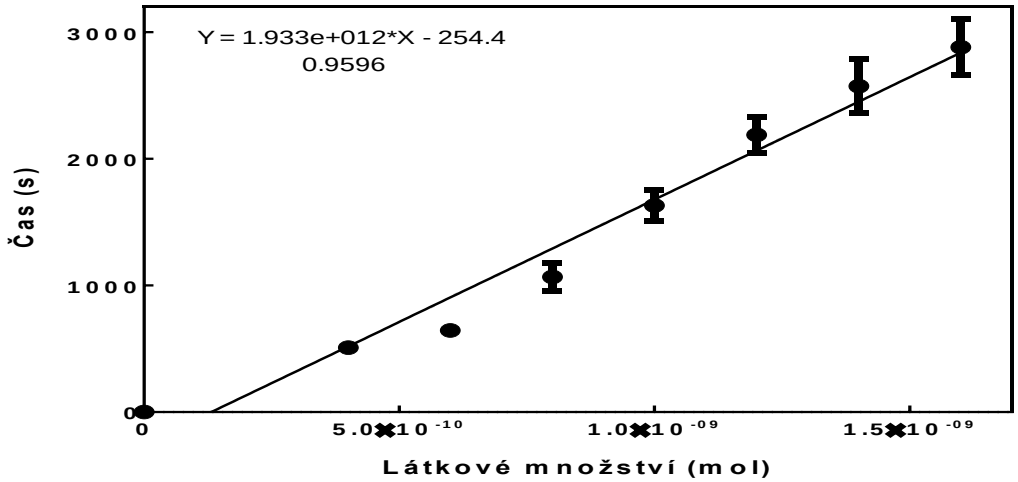
Obr. 11. Kalibrační závislost prodlevy CL na látkovém množství troloxu v reakční směsi. Látková množství standardů, pro objem reakční směsi 200 µl, odpovídají koncentracím uvedeným v tabulce 7. Koncentrace látek v reakční směsi: HRP 0,01 mg/ml, luminol $3{,}2 \cdot 10^{-5}$ mol/l, peroxid vodíku $7{,}07 \cdot 10^{-3}$ mol/l, CTAB 0,005 mol/l.

Kyselina askorbová



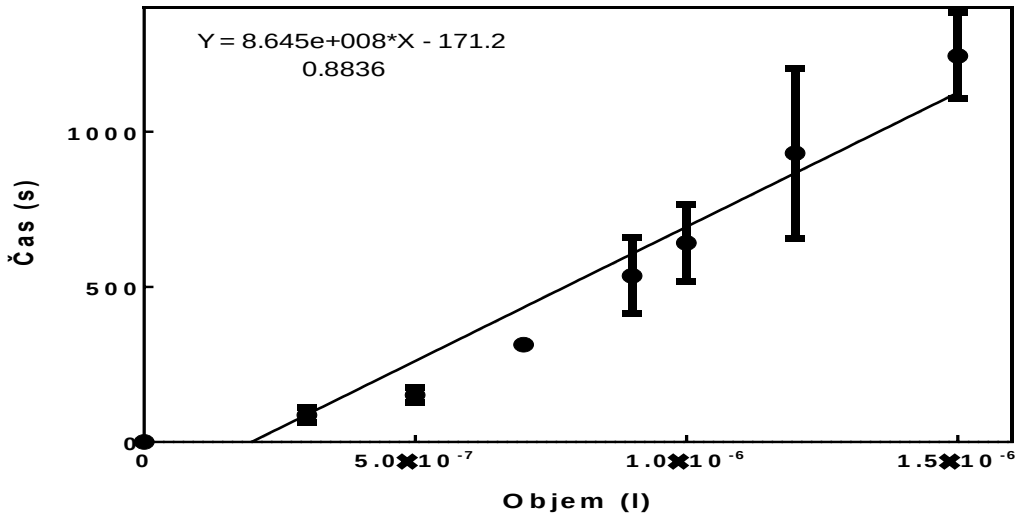
Obr. 12. Kalibrační závislost prodlevy CL na látkovém množství kys. askorbové v reakční směsi. Podmínky experimentu odpovídají podmínkám uvedeným u obr. 11.

Tokoferol



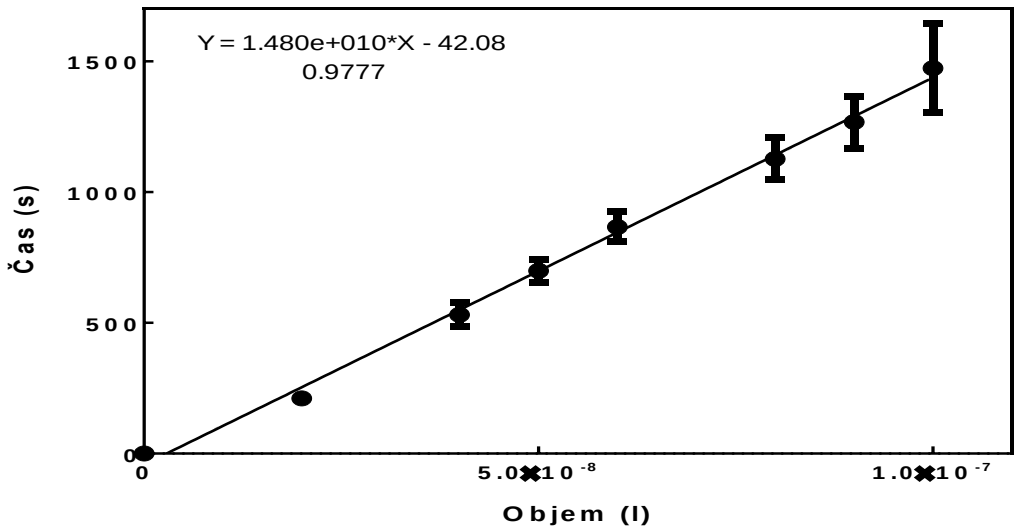
Obr. 13. Kalibrační závislost prodlevy CL na látkovém množství tokoferolu v reakční směsi. Podmínky experimentu odpovídají podmínkám uvedeným u obr. 11.

Pomerančový džus

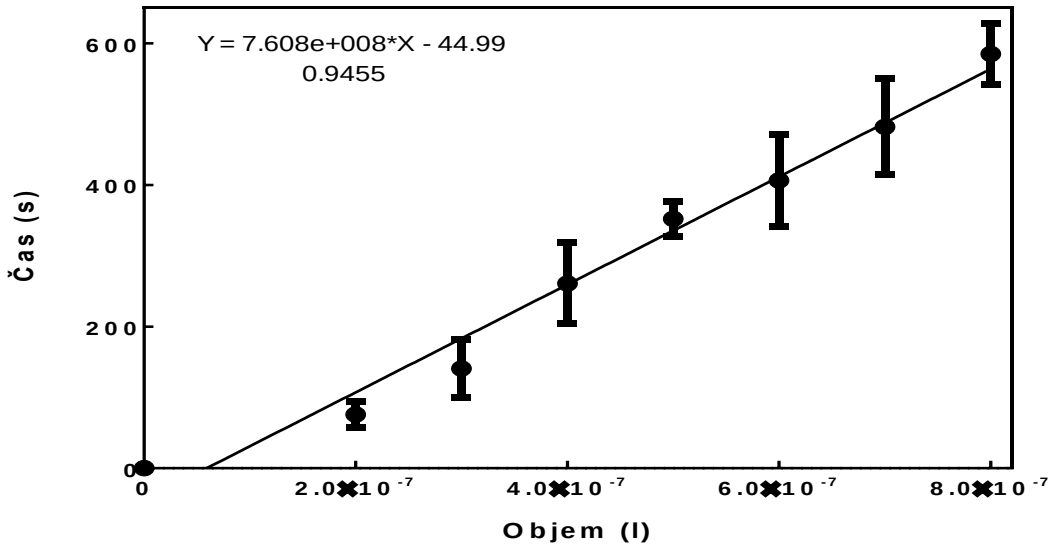


Obr. 14. Kalibrační závislost prodlevy CL na objemu pomerančového džusu v reakční směsi. Podmínky experimentu odpovídají podmínkám uvedeným u obr. 11.

Červené víno



Obr. 15. Kalibrační závislost prodlevy CL na objemu červeného vína v reakční směsi. Podmínky experimentu odpovídají podmínkám uvedeným u obr. 11.



Obr. 16. Kalibrační závislost prodlevy CL na objemu olivového oleje v reakční směsi. Podmínky experimentu odpovídají podmínkám uvedeným u obr. 11.

3.4.2 Diskuse

Antioxidační kapacity jednotlivých reálných vzorků jsou vypočteny metodou kalibrační křivky a vyjádřeny v molech daného standardu na jeden litr vzorku. Pro výpočet byly použity směrnice regresních přímek jednotlivých standardů a reálných vzorků, uvedených na obr. 2-16. Výsledné antioxidační kapacityjsou shrnuty v následujících tabulkách:

Metoda CTAB-BisTRIS-$CoCl_2$			
Standard	Trolox	Kys. askorbová	Tokoferol
Směrnice kalibrační přímky (sec/mol)	3,8E+10	3,8E+10	3,4E+10
Vzorek	Pomerančový džus	Červené víno	Olivový olej
Směnice přímky (sec/l)	1,7E+09	4,4E+09	3,8E+08
Antioxidační kapacita			
Ekvivalent troloxu (mol TE/l vzorku)	4,4E-02	1,2E-01	1,0E-02
Ekvivalent kys. askorbové (mol AE/l vzorku)	4,4E-02	1,2E-01	1,0E-02
Ekvivalent tokoferolu (mol ToE/l vzorku)	4,8E-02	1,3E-01	1,1E-02

Tabulka 8. Vyhodnocení výsledků měření získaných metodou CTAB-BisTris-$CoCl_2$.

Metoda využívající HRP bez přídavku CTAB		
Standard	Trolox	Kys. askorbová
Směrnice kalibrační přímky (sec/mol)	7,9E+11	1,5E+11
Vzorek	Červené víno	
Směnice přímky (sec/l)	2,8E+09	
Antioxidační kapacita		
Ekvivalent troloxu (mol TE/l vzorku)	3,5E-03	
Ekvivalent kys. askorbové (mol AE/l vzorku)	1,9 E-02	

Tabulka 9. Vyhodnocení výsledků měření získaných metodou využívající HRP bez přídavku CTAB.

Metoda využívající HRP a CTAB			
Standard	Trolox	Kys. askorbová	Tokoferol
Směrnice kalibrační přímky (sec/mol)	1,7E+12	1,7E+11	1,9E+12
Vzorek	Pomerančový džus	Červené víno	Olivový olej
Směnice přímky (sec/l)	8,6E+08	1,5E+10	7,6E+08
Antioxidační kapacita			
Ekvivalent troloxu (mol TE/l vzorku)	5,1E-04	8,7E-03	4,5E-04
Ekvivalent kys. askorbové (mol AE/l vzorku)	5,2E-03	8,9E-02	4,6E-03
Ekvivalent tokoferolu (mol ToE/l vzorku)	4,5E-04	7,7E-03	3,9E-04

Tabulka 10. Vyhodnocení výsledků měření získaných metodou využívající HRP s přídavkem CTAB.

Z výsledků uvedených v tabulce 8 pro metodu využívající CL luminolu iniciovanou směsí CTAB-BisTris-$CoCl_2$-H_2O_2 vyplývá, že metoda poskytuje prakticky shodné výsledky pro trolox, tokoferol a askorbát, což je patrné z dobré shody hodnot směrnic kalibračních křivek všech tří standardů. Naproti tomu u metod využívajících HRP se směrnice kalibračních křivek pro standardy výrazně liší. Trolox se jeví jako antioxidant 5,4x účinnější než askorbát při použití metody využívající CL luminolu iniciovanou směsí HRP-H_2O_2. Přídavek CTAB do směsi luminol- HRP-H_2O_2 vede k ještě výraznějšímu (desetinásobnému) rozdílu mezi směrnicemi kalibračních křivek pro trolox a askorbát. Směrnice závislostí pro trolox a tokoferol však vykazují poměrně dobrou shodu. Z důvodu vyloučení případně experimentální chyby bylo měření kalibračních závislostí peroxidasovými metodami dvakrát opakováno, ale měření vedlo ke shodným výsledkům. Metody byly aplikovány pro stanovení antioxidační kapacity reálných vzorků, kterými byly červené víno, pomerančový džus a olivový olej. Výsledky získané metodou CTAB-BisTris-$CoCl_2$-H_2O_2 indikují, že nejvyšší antioxidační kapacitu má vzorek červeného vína, následovaný pomerančovým džusem (cca poloviční hodnota antioxidační kapacity) a nejnižší antiox. kapacitu má olivový olej, cca 10x nižší ve srovnání s červeným vínem. Metody založené na použití HRP

poskytují velmi odlišné výsledky. Antioxidační kapacita pomerančového džusu je téměř shodná s antioxidační kapacitou olivového oleje a přibližně 20x nižší než antioxidační kapacita vzorku vína. Zajímavým zjištěním bylo, že pomerančový džus při měření metodou využívající peroxidasu bez přídavku CTAB nevyvolal žádné prodlevy v nástupu chemiluminiscence. Přídavek CTAB však umožňuje stanovení antioxidačních vlastností i u pomerančového džusu.. Metoda využívající HRP a H_2O_2 Přítomnost CTAB v peroxidasové metodě umožnila měření antioxidační kapacity lipofilních vzorku, toto bylo úspěšně vyzkoušeno na tokoferolu a olivovém oleji.

4. Závěr

1. Byla testována možnost využít CTAB pro solubilizaci lipofilních vzorků za účelem stanovení jejich antioxidační kapacity
2. Byly testovány tři chemiluminiscenční metody. Metoda CTAB-BisTris-$CoCl_2$, schopná pracovat s lipofilními i hydrofilními vzorky. Metoda využívající HRP, která i okolo pH = 7,4 poskytuje intenzivní chemiluminiscenci luminolu. Metoda HRP s přídavkem CTAB, umožňující provádět měření antioxidační kapacity i u lipofilních vzorků.
3. Ukázalo se, že je možné, za podmínek experimentu, použít CTAB v kombinaci s HRP bez toho, že by došlo k denaturaci tohoto enzymu.
4. Z výsledků měření vyplývají značné rozdíly v naměřených antioxidačních kapacitách při použití různých metod.
5. HRP metody ukazují jiné výsledky pro kyselinu askorbovou, ve srovnání s tokoferolem a troloxem. Podle očekávání by měla mít kys. askorbová podobné antioxidační vlastnosti jako tokoferol a trolox.
6. Důvodem toho jevu může být inhibice HRP působením kyseliny askorbové.

5. Summary

1. Potential use of CTAB to solubilize the lipophilic antioxidant(s) containing samples with the aim at determination of antioxidant capacity of these samples was tested.
2. Three chemiluminescence based methods were tested. The method utilising CTAB-BisTris-$CoCl_2$-H_2O_2 system to induce chemiluminescence of luminol is capable to determine the antioxidant capacity of both hydrophilic and lipophilic samples. The second tested method is based on HRP catalysis of luminol oxidation by H_2O_2. Both methods method provide strong chemiluminescence even at pH = 7.4-8.0.
3. The addition of CTAB into the reaction mixture was tested in order to measure lipophilic samples. It was shown that the use of CTAB with HRP is possible without causing the enzyme denaturation.
4. Measurement results show significant differences in antioxidant capacity values obtained by using different methods. HRP based methods show unexpected results for ascorbic acid, which is underscored in comparison with tocopherol and trolox.

According to our expectation the ascorbic acid should have similar antioxidant properties as tocopherol and trolox.

5. The reason of this effect can be explained by inhibition of HRP caused by ascorbic acid but more research is necessary to deeper examine this experimental finding.

Literatura

1. H. Sies, W. Stahl, Vitamins E and C, β-carotene, and other carotenoid as antioxidants, Am. J. Clin. Nutr. 62 (1995) 1315-1321.
2. F. Muller, The nature and mechanism of superoxide production by the electron transport chain: Its relevance to aging, J. Amer. Assoc. 23 (2000) 227-253.
3. M. P. Murphy, How mitochondria produce reactive oxygen species, Biochem. J. 417 (2009) 1-13.
4. K. B. Beckman, B. N. Ames, The free radical theory of aging matures, Physiol. Rev.78 (1998) 547-581.
5. E. Cadenas, K. J. A. Davies, Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging, Free Radic. Biol. Med. 29 (2000) 222-230.
6. D. T. Sawyer, J. S. Valentine, How super is superoxide?, Acc. Chem. Res. 14 (1981) 393-400.
7. A. D. N. J. de Grey, $HO_2^{\cdot}$: The forgotten radical, DNA Cell. Biol. 21 (2002) 251-257.
8. N. Hauptmann, J. Grimsby, J. C. Shih, E. Cadenas, The metabolism of tyramine by monoamine oxidase A/B causes oxidative damage to mitochondrial DNA, Arch. Biochem. Biophys 335 (1996) 295-304.
9. S. J. Stohs, D. Bagchi, Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions, Free Radic. Biol. Med. 18 (1995) 321-336.
10. S. J. Klebanoff, Myeloperoxidase: Friend and foe, J. Leukoc. Biol. 77 (2005) 598-625.
11. E. M. Conner, M. B. Grisham, Inflammation, free radicals and antioxidants, Nutrition 12 (1996) 274-277.
12. R. O. Poyton, K. A. Ball, P. R. Castello, Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling, Trends Endocrin. Met. 20 (2009) 332-340.
13. B. Halliwell, S. Chirico, Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance, Am. J. Clin. Nutr. 57 (1993) 715-724.
14. B. S. Berlett, E. R. Stadtman, Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress, J. Biol. Chem. 272 (1997) 20313-20316.

15. L. J. Marnett, Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde, Mutat. Res. 424 (1999) 93-95.
16. T. Grune, T. Reinheckel, K. J. A. Davies, Degradation of oxidised proteins in mammalian cells, FASEB J. 11 (1997) 526-534.
17. B. Halliwell, How to characterise a biological antioxidant, Free Radical Res. Commun. 9 (1990) 1-32.
18. K. U. Ingold, Inhibition of autooxidation. In Oxidation of organic compounds, F. R. Mayo. American chemical society, Vol. 75 (1968) 296-305.
19. A. Pompella, A. Viskivis, A. Paolicchi, V. D. Tata, A. F. Casini, The changing faces of glutathione, a cellular protagonist, Biochem. Pharmacol. 66 (2003) 1499-1503.
20. H. Sies, Strategies of antioxidant defense, Eur. J. Biochem. 215 (1993) 213-219.
21. L. Packer, S. U. Weber, G. Rimbach, Molecular aspects of α-tocotrienol antioxidant action and cell signalling, J. Nutr. 131 (2001) 369-373.
22. T. W. Sedlak, S. H. Snyder, Bilirubin benefits: Cellular protection by a biliverdin reductase antioxidant cycle, Pediatrics 113 (2004) 1776-1782.
23. N. Pellegrini, M. Serafini, B. Colombi, D. Del Rio, S. Salvatore, M. Bianchi, F. Brighenti, Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays, J. Nutr. 133 (2003) 2812-2819.
24. D. Kim, K. W. Lee, H. J. Lee, C. Y. Lee, Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 3713-3717.
25. G. Cao, H. M. Alessio, R. G. Cutler, Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants, Free Radic. Biol. Med. 14 (1993) 303-311.
26. I. F. F. Benzie, J. J. Strain, The ferric reducing ability of plasma(FRAP) as a measure of „antioxidant power“: The FRAP assay, Anal. Biochem. 239 (1996) 70-76.
27. D. D. R. Wayner, G. W. Burton, K. U. Ingold, S. Locke, Quantitative measurement of the total, peroxyl radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled proxidation, FEBS Lett. 187 (1985) 33-37.
28. A. Ghiselli, M. Serafini, G. Maiani, E. Azzini, A. Ferro-Luzzi, A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability, Free Radic. Biol. Med. 18 (1995) 29-36.

29. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A, Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant aktivity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, Free Radic. Biol. 26 (1999) 1231-1237.

30. P. Molyneux, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant aktivity, J. Sci. Technol. 26 (2004) 211-219.

31. K. D. Gundermann, F. McCapra, Chemiluminescence in organic chemistry. Springer-Verlag, Berlin Heidenberg (1987).

32. S. Girotti. E. N. Ferri, L. Bolelli, G. Arfelli, A. Bendini. L. Cerratini, Luminescence-based assays to evaluate the total antioxidant capacity of foods, OUAC 21 (2010) 129-138.

33. D. Christodouleas, C. Fotakis, K. Papadopoulos, E. Yannakopoulou, A. C. Calokerinos, Development and validation of a chemiluminogenic method for evaluation of antioxidant activity of hydrophilic and hydrophobic antioxidants, Anal. Chim. Acta 652 (2009) 295-302.

34. J. A. M. Pulgarín, L. F. G. Bermejo, A. C. Durán, Evaluation of the antioxidant activity of vegetable oils based on luminol chemiluminescence in a microemulsion, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 112 (2010) 1294-1301.

35. O. Tunka, Vliv vybraných biologických pufrů na chemiluminiscenční reakce luminolu. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci 2006.