

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální chemie

RESVERATROL VS. KATECHOLY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce:
Studijní obor:

Patrycja Anna Chodorowska
Management v chemii

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Martina Banciřová, Dr.

Olomouc 2011

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Martiny Banciřové, Dr.. Veškerá literatura, která byla použita, je uvedena v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne

.....
Patrycja Chodorowska

Poděkování:

Děkuji své odborné vedoucí Mgr. Martině Bancířové, Dr. za trpělivost, cenné rady a věnovaný čas během vypracování této bakalářské práce.

OBSAH

Bibliografická identifikace	6
Bibliographical identification	7
1 ÚVOD	8
2 TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Reaktivní formy kyslíku	11
2.1.1 Vznik a vlastnosti radikálů	11
2.1.2 Kyslíkaté volné radikály. Superoxid	12
2.1.3 Ostatní ROS	12
2.2 Antioxidanty	13
2.2.1 Endogenní a exogenní antioxidanty	13
2.2.2 Antioxidanty rostlinného původu	14
2.2.3 Oxidační stres	16
2.2.4 Antioxidační kapacita	17
2.3 Metody stanovení TAC	18
2.3.1 TEAC	18
2.3.2 TRAP	18
2.3.3 FRAP	18
2.3.4 Metoda používající DPPH	19
2.3.5 FIA-CL	19
2.4 Chemiluminiscence	20
2.5 Resveratrol	21
2.5.1 Chemické vlastnosti, struktura	21
2.5.2 Výskyt, funkce v rostlině, účinky na lidský organizmus	22
2.5.3 Francouzský paradox	22
2.5 Katecholy	23
2.5.1 Výskyt a použití katecholů	23
2.5.2 Chemické vlastnosti katecholů	23
2.5.3 Kyselina kávová	24
2.5.4 (+)-Catechin	25
2.5.5 Hydrochinon	25
2.5.6 Hnědnutí potravin	26

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1 Chemikálie	29
3.2 Přístrojové vybavení	33
3.3 Metoda stanovení TAC	34
3.4 Postup stanovení	34
3.5 Vyhodnocení experimentálních dat	35
3.6 Výsledky a diskuze	35
3.6.1 Vyhodnocení standardů	35
3.6.2 Antioxidační kapacita resveratrolu-vliv teploty pH	38
3.6.3 Antioxidační kapacita resveratrolu a katechin hydrátu-vliv pH	40
3.6.4 Antioxidační kapacita katecholů	42
3.6.5 TAC vína	47
3.6.6 TAC reálných vzorků	48
3.6.7 Porovnání TAC resveratrolu s katecholů	51
4 ZÁVĚR	57
5 SUMMARY	60
6 LITERATURA	63

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Patrycja Anna Chodorowska
Název práce: Resveratrol vs. katecholy – antioxidační účinky
Typ práce: Bakalářská
Pracoviště: Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce: Mgr. Martina Bancířová, Dr.
Rok obhajoby práce: 2011

Abstrakt:

Antioxidanty jsou látky, které chrání živý organismus před působením volných radikálů. Antioxidanty, které si živý organismus není schopen syntetizovat sám, nazýváme exogenními antioxidanty. Porovnávala byla antioxidační kapacita resveratrolu a vybraných katecholů. Bylo použito 8 katecholů, resveratrol a 12 reálných vzorků. Pro stanovení antioxidační kapacity byla použita metoda chemiluminiscenční TEAC.

Klíčová slova: Antioxidační kapacita, resveratrol, katechol, víno, chemiluminiscence, TEAC

Počet stran: 65

Počet příloh: 0

Jazyk: čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname:	Patrycja Anna Chodorowska
Title:	Resveratrol vs. catechols – antioxidant properties
Department:	Department of Physical Chemistry
Type of thesis:	Bachelor
Supervisor:	Mgr. Martina Bancířová, Dr.
The year of presentation:	2011
Abstract:	Antioxidants are compounds, which protect a living organism against free radicals. Antioxidants are divided into two groups: exogenous antioxidants and endogenous antioxidants. There was determined and compared the antioxidant capacity of resveratrol and catechols. For this study were used 8 catechols, resveratrol and 12 beverages. For the determination of total antioxidant capacity there it was used the method called Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC).
Keywords:	Antioxidant capacity, reveratrol, catechol, wine, chemiluminescence, TEAC
Number of pages:	65
Number of appendices:	0
Language:	Czech

1 ÚVOD

Antioxidanty jsou látky, které chrání živý organismus před působením volných radikálů. Volné radikály způsobují oxidaci buněk. Obecně je tento jev označován jako stárnutí buněk. V lidském organismu jsou volné radikály produkovány v důsledku stresu a při nadměrné konzumaci tučných a alkoholických výrobků. Poškozují buňky bílkovin, lipidů a DNA. Výsledkem jsou vážná nádorová onemocnění a obezita. Antioxidanty se vyskytují volně v přírodě. Neutralizují volné radikály, a tím chrání živý organismus před jejich toxickými účinky. Antioxidanty, které si živý organismus produkuje sám, označujeme jako endogenní antioxidanty. K endogenním antioxidantům zařazujeme: enzymy, bílkoviny a koenzymy. Antioxidanty, které si živý organismus není schopen syntetizovat sám, nazýváme exogenními antioxidanty. Exogenní (rostlinné) antioxidanty můžeme rozdělit dle jejich struktury na: polyfenoly, karotenoidy a na kyselinu askorbovou a tokoferoly. Vyskytují se v ovoci, zelenině a rostlinách. Velké množství antioxidantů v podobě katecholů je obsaženo v čaji, zejména v zeleném a bílém. Doporučena je také konzumace kvalitního červeného vína, který obsahuje antioxidanty, jako je resveratrol a jiné polyfenoly. Existují i antioxidanty, které ve větších koncentracích mají prooxidační účinky. Mezi ně patří hlavně syntetické antioxidanty ale, i některé rostlinné antioxidanty (např. 1,2-dihydroxybenzen).

Cílem této bakalářské práce bylo porovnání antioxidační kapacity resveratrolu a vybraných katecholů. A to jak v čisté podobě, tak i v reálných vzorcích jako je víno, čaj, káva a ovocná šťáva. Porovnávala byla také závislost antioxidační kapacity na změně pH roztoku resveratrolu a katechin hydrátu. Pro stanovení antioxidační kapacity byla použita metoda chemiluminiscenční TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Reaktivní formy kyslíku

2.1.1 Vznik a vlastnosti volných radikálů

Reaktivními formami kyslíku (ROS - reactive oxygen species) nazýváme volné radikály a látky, které se účastní reakcí jejich vzniku. Volným radikálem je atom nebo molekula, která má nepárový elektron. Radikály mohou být neutrální částice nebo ionty kladně či záporně nabitě.

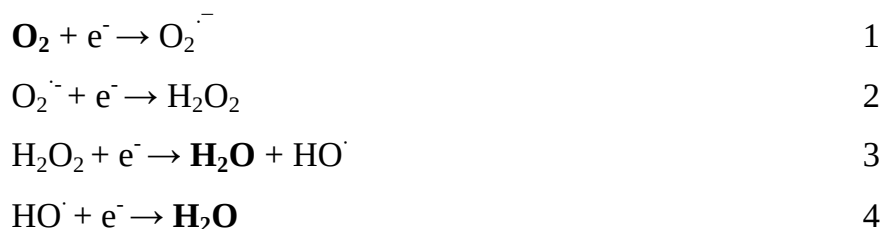
Volné radikály z molekul vzniknou díky redukci (přidáním elektronu), oxidaci (ztrátou elektronu) nebo homolytickým štěpením kovalentních vazeb, které je způsobeno UV, rentgenovým nebo ionizačním zářením nebo přidáním velkého množství energie či teploty.

Jako radikály obecně se označují vysoce reaktivní částice, které se snaží co nejrychleji doplnit nepárový elektron nebo jej předat jiné molekule, která se poté stane volným radikálem a tímto způsobem dojde k iniciaci řetězce dalších reakcí. [1]

2.1.2 Volné radikály. Superoxidový radikál anion.

Mezi kyslíkové radikály zařazujeme superoxid $\text{O}_2^{\cdot-}$, hydroxylový radikál $\text{HO}^{\cdot}$, peroxy $\text{ROO}^{\cdot}$, alkoxy $\text{RO}^{\cdot}$ a hydroperoxy $\text{HO}_2^{\cdot}$.

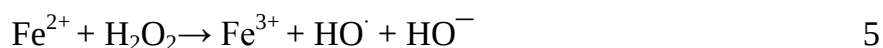
Superoxid se zároveň redukuje i oxiduje pomocí enzymu superoxid dismutáza. Této reakci říkáme dizmutace, při níž vznikne v organismu méně škodlivý peroxid vodíku, který je enzymem kataláza dále rozložen na vodu a kyslík. Nezbytnou reakcí pro aerobní způsob života je redukce atmosférického kyslíku na 2 molekuly vody (rovnice 1-4).



Probíhá v dýchacím řetězci mitochondrií, v aktivním centru enzymu cytochromoxidáza. Tam dochází k transformaci energie chemických vazeb živin na ATP. V průběhu této reakce vznikají toxické radikály jako superoxid a hydroxylový radikál. Ve spojení s enzymem se zneutralizují, a proto pro živý organismus škodlivé nejsou. [1, 2]

2.1.3 Ostatní reaktivní formy kyslíku

K ROS také patří peroxid vodíku, který především reaguje s tranzitními kovy. Ve Fentonově reakci, kde reaguje zmiňovaný peroxid vodíku s železem Fe^{2+} , vzniká vysoce toxický hydroxylový radikál, který okamžitě reaguje s okolními biomolekulami (rovnice 5).



Dále k ROS patří látky: kyselina chlorná HOCl , ozon O_3 a singletový kyslík $^1\text{O}_2$. [1,2]

2.2 Antioxidanty

2.2.1 Endogenní a exogenní antioxidanty

Antioxidanty jsou látky, které mají schopnost neutralizovat volné radikály. Díky tomu je živý organismus chráněn před vznikem nádorů a je stimulován imunitní systém. Podle místa výskytu antioxidanty dělíme na exogenní a endogenní (Tab. 1). Nejdůležitějšími endogenními antioxidanty jsou: enzymy, různé bílkoviny a koenzymy. Exogenní antioxidanty jsou obsažené v potravinách nebo v doplňcích stravy. [3]

Endogenní antioxidanty	Exogenní antioxidanty
Superoxid dismutáza	Vitamín A
Kataláza	Vitamín E
Glutathion reduktáza	Vitamín C
Transferáza	Karotenoidy
Polyaminy	Xantofyly
Melatonin	Exogenní koenzym Q ₁₀
Estrogen	Polyfenoly
Laktoferin	
Kyselina močová	
Kyselina lipanová	
Ceruplazmin	
Albumin	
Glutathion	
Endogenní koenzym Q ₁₀	

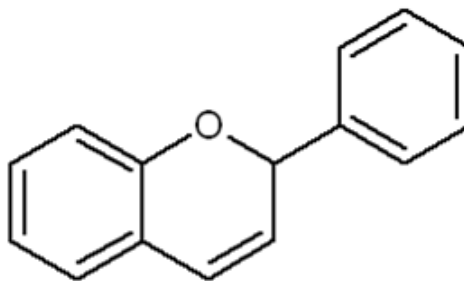
Tabulka 1: Rozdělení antioxidantů na exogenní a endogenní.

2.2.2 Antioxidanty rostlinného původu

Antioxidanty rostlinného původu můžeme rozdělit dle jejich struktury do tří skupin:

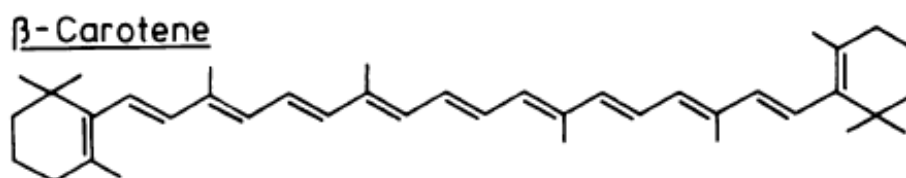
- Polyfenoly, které tvoří dvě hlavní skupiny sloučenin: fenolové kyseliny a flavonoidy
- Karotenoidy
- Kyselina askorbová a tokoferoly

Flavonoidy jsou nejrozšířenějšími fenolickými sloučeninami. Jsou obsaženy v zelenině, ovoci a v nápojích, jako je víno nebo čaj. Základem jejich struktury je $C_6-C_3-C_6$ flavonový skeleton (Obr. 1), ve kterém jsou jednotlivé fenolické skupiny obvykle propojeny kyslíkem. Různé druhy flavonoidů můžeme rozlišit od sebe pomocí stupně nenasycenosti a stupně oxidace tří-uhlíkatého segmentu. Dále pak jsou rozlišovány podle počtu a druhu substituentů připojených k fenolickému jádru. [4,5]



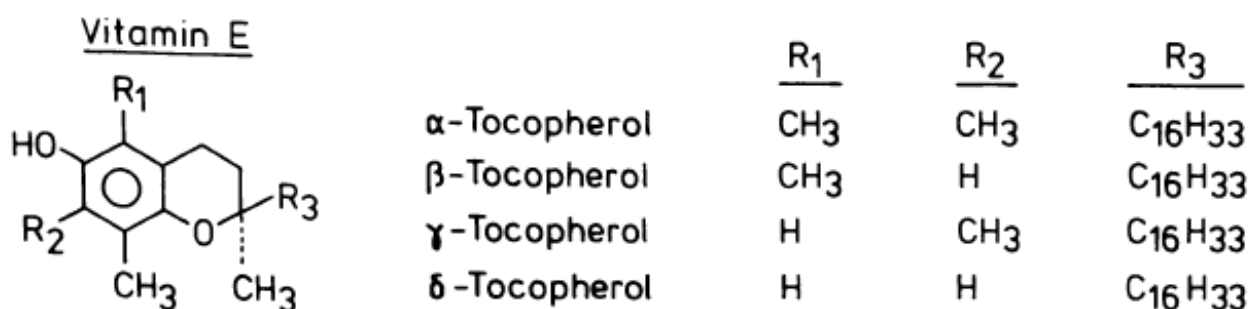
Obr. 1: Flavan

Karotenoidy jsou důležitými rostlinnými barvivy, která jsou zodpovědná za žlutý, oranžový, červený nebo fialový odstín různého druhu ovoce, zeleniny a rostlin. U rostlin jsou často odstíny karotenoidů překryty zeleným chlorofylem a jejich pravý odstín je možné spatřit teprve na podzim, kdy je pigment chlorofylu rozložen. Existuje zhruba 600 druhů karotenoidů, známých hlavně jako α - nebo β -karoten (obr. 2). Obecně jsou označovány jako zdroj vitamínu A, potravinářské barvivo nebo jako doplněk stravy. Odstín a antioxidační kapacita karotenoidů je dána jejich specifickou strukturou, konjugovanými dvojnými vazbami. [6]



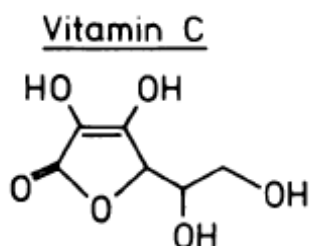
Obr. 2: β -karoten

Tokoferoly a tokotrienoly a kyselina askorbová reagují se singletovým kyslíkem a s volnými radikály, zejména s peroxyem. Tokoferoly působí hlavně v lipidových membránách a LDL (low-density lipoprotein). Kyselina askorbová je hlavním akceptorem radikálů v tělesných tekutinách (např. v cytosolu nebo plasmě) a dokáže také zredukovat tokoperoxyl radikál. Vitamínem E jsou obecně pojmenovány všechny homology tokoferolu (obr. 3) a tokotrienoly.



Obr. 3: Vitamin E

Vitamin C neboli kys. L-askorbová (obr. 4) je rozpustná ve vodě a stálá za různých fyziologických podmínek. Je považován za nejdůležitější antioxidant v mimobuněčných tekutinách a v přírodě. Efektivně vychytává superoxid, peroxid vodíku, chlornany, hydroxylové a peroxylové radikály a singletový kyslík. [7]



Obr. 4: Vitamin C

2.2.3 Oxidační stres

Při neutralizaci radikálů antioxidanty dochází k rovnováze. Tato rovnováha může být narušena vnějším faktorem, a to např. znečištěným prostředím, požíváním velkého množství alkoholu, kouřením tabákových výrobků nebo stresem. Oxidační stres nastane v důsledku nahromadění volných radikálů. Volné radikály poškozují buňky RNA, DNA, bílkovin a lipidů. Následkem jsou vážná nádorová onemocnění, cukrovka, Parkinsonova či Alzheimerova choroba. [8]

2.2.4 Antioxidační kapacita

Antioxidační kapacita TAC (Total Antioxidant Capacity), což je schopnost potravin nebo doplňků výživy vázat volné radikály, poskytuje informaci o délce trvání antioxidačního účinku. Výše antioxidační kapacity v rostlinách, ovoci a zelenině závisí na různých faktorech: skladování, vnější podmínky, způsobu pěstování a způsobu zpracování. [9]

Přehled celkové antioxidační kapacity nápojů naměřené různými metodami je v tabulce 2. [10]

Antioxidant Source	Antioxidant activity (estimated by three different methods)		
	FRAP (mmol Fe^{2+} /L)	TRAP (mmol Trolox/L)	TEAC(mmol Trolox/L)
Beer (lager)	2.78	--	1.04
Chamomile	0.65	1.26	0.61
Coffee (espresso)	129.38	66.00	36.54
Coffee (espresso, decaffeinated)	93.01	45.82	26.96
Coffee (extracted)	96.40	59.57	30.29
Coffee (soluble)	108.56	52.37	32.48
Cognac	2.25	1.46	1.29
Grappa	ND	ND	0.18
Rum	ND	ND	0.04
Tea (black)	10.09	4.87	3.60
Tea (green)	18.00	7.63	6.01
Vinegar (red)	9.50	4.80	3.12
Whiskey	3.45	2.31	1.68
Wine (Aglianico, red)	30.53	16.09	12.14
Wine (Chianti, red)	31.53	14.84	11.43
Wine (Sauvignon, red)	23.90	11.73	8.95
Wine (Villa Torre, rosé)	8.33	2.24	2.42
Wine (Tamerici, rosé)	7.22	3.20	2.18
Wine (Bardolino, rosé)	4.66	1.98	1.52
Wine (Vernaccia, white)	5.04	2.32	1.94
Wine (Pinot, white)	3.72	2.10	1.68
Wine (Greco di Tufo, white)	3.83	1.86	1.61

Tabulka 2: Přehled TAC nápojů. [10]

2.3 Metody stanovení TAC

2.3.1 TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) s využitím ABTS

Metoda je založena na schopnosti antioxidantů odbarvit poměrně stálý radikál $\text{ABTS}^\bullet + (2,2'\text{-azinobis(3-ethylbenzothiazolin)-6-sulfonát})$, modrozelený chromofor s charakteristickou absorbancí v 734nm, který je srovnáván s Troloxem, ve vodě rozpustným analogem vitamínu E. Přidáním antioxidantů k látce, která je ve formě radikálu, dochází k redukci a tedy i k odbarvení této látky. Rychlost a míra odbarvení jsou úměrné antioxidační aktivitě vzorku.[11, 12]

2.3.2 TRAP (Total Radical-trapping Antioxidant Parameter)

TRAP je metoda založená na antioxidační protekci před fluorescenčním rozkladem R-fytoeritrinu v průběhu peroxidačních reakcí. Výsledky jsou vyjádřeny v ekvivalentních jednotkách Troloxu. [11, 12]

2.3.3 FRAP (Ferric Reducing-Antioxidant Power)

Benzie a Strain metoda využívající Hewlett-Packardův 8543 spektrofotometr s diodovým polem. Metoda je založena na redukci železitých komplexů TPTZ (2,4,6-tripyridyl-S-triazin) do formy železnatnatých komplexů TPTZ. Absorbance se měří při 593nm. [11]

2.3.4 Metoda používající DPPH

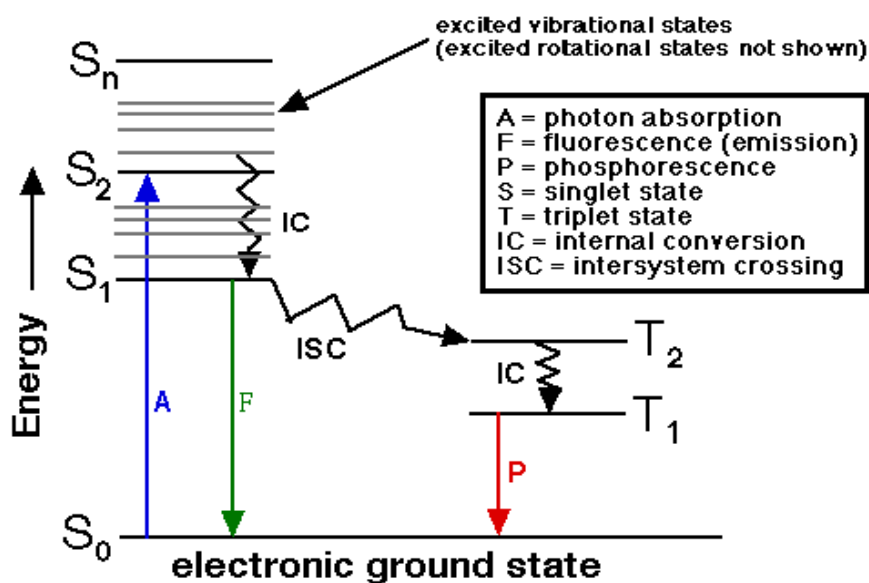
U této metody dochází k reakci analyzované látky s DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl) za vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazin). Reakce je obvykle měřena spektrofotometricky při vlnové délce 517nm. Analýzu lze provést i na mikrotitračních destičkách nebo metodou ESR (Electron Spin Resonance) nebo HPLC. [13]

2.3.5 FIA-CL (Flow Injection with Chemiluminescence Detection)

Metoda je založena na chemiluminiscenčních reakcích mezi luminolem a hydroxylovými radikály vytvořenými peroxidem vodíku v přítomnosti iontů Co^{2+} ve spojení s EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) podle Fentonovy reakce. Přístroj pro stanovení metodou FIA-CL se skládá ze tří kanálků, kterými jsou přiváděny příslušné kapaliny: nosná kapalina, boritan sodný o $\text{pH}=9$, do kterého je vzorek aplikován, dále tok H_2O_2 a tok obsahující chemiluminiscenční činidlo.[14]

2.4 Chemiluminiscence

Chemické reakce obvykle doprovází výměna energie mezi reakčním systémem a okolím. Tyto reakce mohou být exotermické – energie se uvolňuje ze systému, nebo reakce endotermické, kde je energie pohlcována. Uvolněná energie může být rozptýlená do okolí, nebo zůstává v reagujících molekulách, čímž dochází k excitaci molekuly. Excitované částice v molekule pomalu ztrácí svou energii v podobě tepla nebo emise záření. V případě emise záření doprovázejícího chemické reakce mluvíme o chemiluminiscenci. Jablonského diagram (obr. 5) představuje zářivé (F-fluorescence, P-fosforescence) a nezářivé (IC – vnitřní konverze, ISC - mezi-systémové křížení) pochody. Aby látka mohla emitovat světlo, musí světlo absorbovat (A – absorpce fotonu = excitace částice). Při přechodu z hladiny S_1 do S_0 dochází k emisi fotonu – fluorescenci (doba života 1-100ns). Při přechodu z hladiny T_1 do S_0 dochází k emisi fotonu – fosforescenci (doba života 1ms-dny). Jelikož přechody Triplet-Singlet jsou spinově zakázány, doba života fosforescence je mnohem delší. Při chemiluminiscenci se částice excitují absorpcí energie, která se uvolní při chemické reakci. [15, 16]

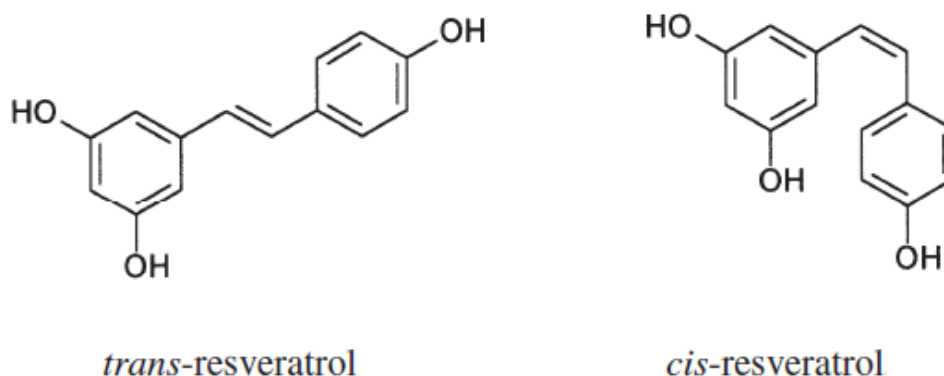


Obr. 5: Jablonského diagram. F je emise záření – chemiluminiscence.

2.5 Resveratrol

2.5.1 Chemické vlastnosti, struktura

Resveratrol systematickým názvem 3,4,5-trihydroxystilben existuje ve dvou geometrických isomerech, cis a trans (obr. 6). V rostlinách se vyskytují oba tyto isomery, kde trans – isomer převažuje.[17,18] Resveratrol snižuje rychlost oxidace "cytochromu c" hydroxylovými radikály, které vznikly z peroxidu vodíku UV zářením. Resveratrol je také efektivním akceptorem hydroxylových radikálů v ethanolických roztocích β-karotenu. Resveratrol má silné tlumící účinky na superoxidový anion a H₂O₂. Rozpustnost resveratrolu ve vodných roztocích je velmi slabá. Rozpustnost polyphenolů ve vodě je méně než 0,05 mg/ml, nicméně v přítomnosti ethanolu se rozpustnost resveratrolu zvyšuje na 50 mg/ml. [19,20]



Obr. 6: Struktura trans- a cis- resveratrolu.

2.5.2 Výskyt, funkce v rostlině, účinky na lidský organizmus

Resveratrol je antioxidant obsažený ve více než 72 druzích rostlin. Nejznámějším zdrojem resveratrolu jsou hrozny vinné révy. Obsah resveratrolu v červeném víně je cca 2-6mg/l, ve víně bílém 0,2-0,8 mg/l. Resveratrol je také obsažen v zelenině např. v čínském zelí, brokolici, česneku, červené řepě atd., a v ořechách, např. v arašídech. [17,18]

Resveratrol patří mezi fytoalexiny. Jeho produkce se zvyšuje vlivem vnějšího prostředí: UV záření, mechanické poškození rostliny, vliv ozonu apod. nebo po napadení rostliny viry, houbami nebo bakteriemi. Při napadení hroznů révy vinné *Botrytis cinerea* plísní je možno pozorovat vznik resveratrolové bariéry okolo napadeného místa. V místě napadení je koncentrace resveratrolu nízká.[17,18]

Resveratrol jakožto antioxidant pohlcuje volné radikály, a tím brání vzniku nádorů, srdečních onemocnění a obezity. Trans-resveratrol je preventivním faktorem několika vážných onemocnění, jako je: neurodegenerativní proces, cévní onemocnění, virové infekce a rakovina.[20]

2.5.3 Francouzský paradox

Je zajímavým jevem, že paradoxně Francouzi trpí podstatně méně kardiovaskulárními nemocemi oproti ostatním obyvatelům západní Evropy, přestože konzumují více sýrů, tučných výrobků nebo mají horší životosprávu. Tímto zázrakem je právě resveratrol společně s dalšími polyfenoly obsaženými v červeném víně, které Francouzi konzumují v daleko větší míře než obyvatelé ostatních zemí. [17,18]

2.5 Katecholy

2.5.1 Výskyt a použití katecholů

Katecholy (1,2-dihydroxybenzen) jsou významnými sloučeninami v různých oborech. Jsou používány jako činidla ve fotografickém odvětví, v produkci plastů a gumy a ve farmaceutickém průmyslu. Chlorované a methylové katecholy jsou vedlejším produktem zpracování dužin a oleje. Katecholy jsou také meziproduktem při rozkladu aromatických sloučenin a buničiny mikroorganismy. Navíc se mohou objevit v kouři tabákových výrobků (semichinony, polymerizovaný katechol) nebo jako složky potravin (kyselina kávová, katechin obsažen v čaji, dopamin). [21]

2.5.2 Chemické vlastnosti katecholů

Katecholy zařazujeme mezi fenolické látky. Zvýšením jejich konzumace snižujeme riziko vzniku kardiovaskulárních nemocí, a jistých druhů rakoviny. Jsou účinnými akceptory hydroxylových a peroxylových radikálů. [22]

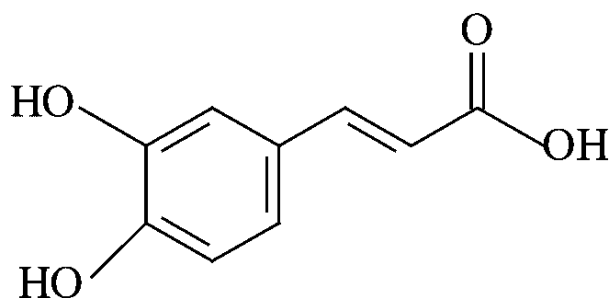
Katecholy mají antioxidační vlastnosti, ale mohou mít také vlastnosti pro-oxidační, které poškozují makromolekuly jako je DNA a proteiny.

1,2- dihydroxybenzen je metabolitem benzenu a má cytotoxické, hematotoxické a genotoxické účinky. Je to těkavá látka, která se využívá v průmyslu k syntéze jiných chemikálií. [21]

Katecholy tvoří stabilní komplexy s dvoj- a trojmocnými kovy. Komplexy s trojmocnými kovy jsou stabilnější. Komplexy s Fe (II) upřednostňují kyselé pH a komplexy Fe (III) naopak se vyskytují v zásaditém prostředí. [21]

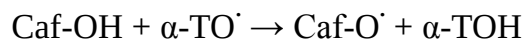
2.5.3 Kyselina kávová

Kyselina kávová (3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenová kyselina) (obr. 7) se vyskytuje v mnoha druzích potravin a rostlin. Hlavně v zelenině, ovoci, čaji, kávě a ve víně. Fenolické kyseliny, jako je kyselina kávová, mají antimutagenní, antikarcinogení, protizánětlivé a antialergení účinky. [23]



Obr. 7: Struktura kyseliny kávové.

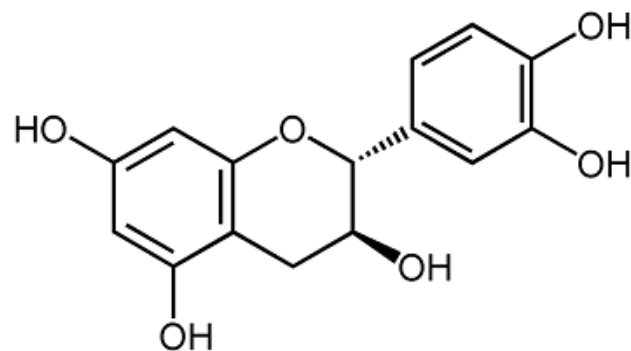
Kyselina kávová má schopnost reaktivace α -tokoferolu na povrchu LDL (low-density lipoprotein, cholesterol, který se váže na bílkoviny a je transportován v krvi, má negativní účinky na organismus). Rovnice 6: reakce kyseliny kávové (Caf-OH) a α -tokoferolu (α -TOH). Redukce α -tokoperoxy radikálu (α -TO $\cdot$) Caf-OH na povrchu LDL za vzniku kyseliny kávové o-semichinon (Caf-O $\cdot$). [24]



6

2.5.4 (+)-Catechin

(+)-Catechin (5,7,3',4'-tetrahydroxyflavan-3-ol) (Obr. 8) se vyskytuje v ovoci, zelenině, zeleném a černém čaji, ve víně a v kakaových plodech. Je to exogenní antioxidant, který má význam chránit nás před vznikem nádorů a rakoviny. Tvoří komplexy s tranzitními kovy, zejména s železem a mědí. [25]



(+)-Catechin

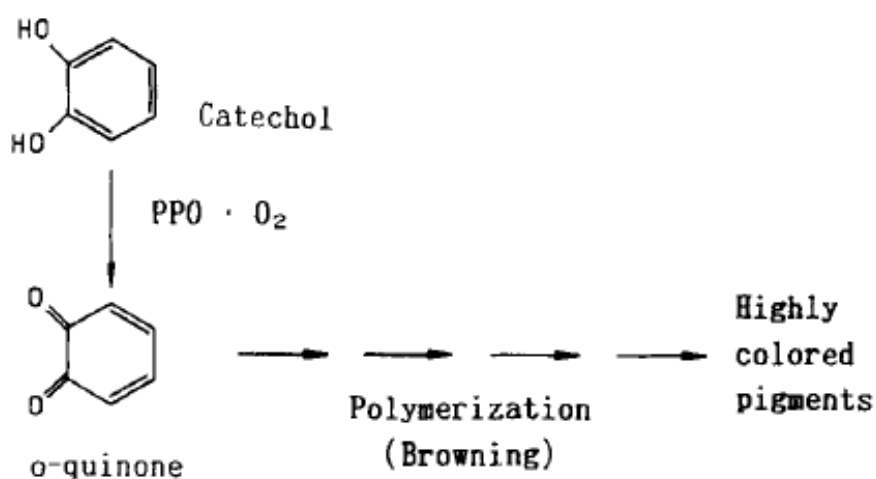
Obr. 8: Struktura (+)-catechinu.

2.5.5 Hydrochinon

Hydrochinon (benzen-1,4-diol) je fenolickou sloučeninou mající za úkol brzdit enzymatickou oxidaci tyrozinu a PPO (polyphenol oxidase, enzym účastnící se procesu hnědnutí potravin). Hydrochinon je velmi toxický, neboť má silné oxidační účinky. Rychle reaguje s oxidy, vedlejšími produkty jsou: p-benzochinon a hydroxybenzochinon, které mohou způsobit depigmentaci. Je obsažen v zesvětľujících krémech, z důvodů toxicity je prodej těchto přípravků v Evropě zakázán. Alternativou je mechinol (4-methoxyfenol). [26]

2.5.6 Hnědnutí rostlin

Hnědnutí je změna kvality potravin, týká se to hlavně čerstvých nápojů a zpracovaných rostlinných potravin. Catechin, kyselina chlorogenová nebo epicatechin, jsou látky spojené s hnědnutím potravin. Katecholy, které jsou zoxidovány, mění svůj odstín na hnědou barvu. PPO (polyphenol oxidase) je nejběžnějším enzymem účastnícím se procesu hnědnutí (obr. 9). V potravinářském průmyslu se proces hnědnutí zpomaluje pomocí látek jako je NaCl nebo Na₂SO₃, které jsou běžnými přísadami potravin. [27]



Obr. 9: Mechanismus hnědnutí katecholu. Katechol je oxidován PPO na o-chinon. O-chinon je dále polymerizován na hnědou látku. [27]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cíl práce

- Stanovení antioxidační kapacity resveratrolu – vliv teploty.
- Stanovení antioxidační kapacity resveratrolu a katechin hydrátu – vliv pH.
- Stanovení antioxidační kapacity katecholů.
- Stanovení celkové antioxidační kapacity bílého a červeného vína.
- Stanovení celkové antioxidační kapacity kávy, čaje a ovocné šťávy.
- Porovnání antioxidační kapacity resveratrolu a katecholů.

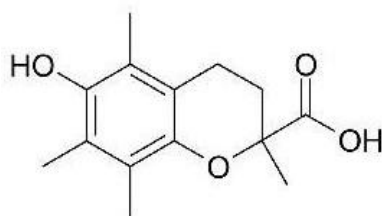
3.1. Chemikálie.

Zásobní roztoky:

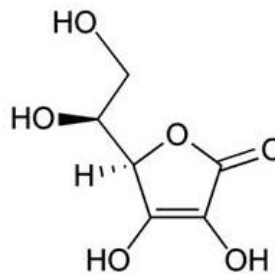
- Fosfátový pufr: pH 7,4 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0,007 M roztok v destilované vodě) a KH_2PO_4 (0,067 M roztok v destilované vodě) v poměru 5:1)
- Trolox: koncentrace 10^{-3} M roztok ve fosfátovém pufru. (98%, Fluka Chemika)
- Kyselina askorbová: koncentrace $1,4 \cdot 10^{-3}$ M roztok ve fosfátovém pufru. (99,5%, Fluka Biochemika)
- HRP: křenová peroxidáza, koncentrace $0,0227 \cdot 10^{-3}$ M roztok ve fosfátovém pufru. (181purpurogallin U/mg pevné l., Sigma-Aldrich)

Chemiluminiscenční směs:

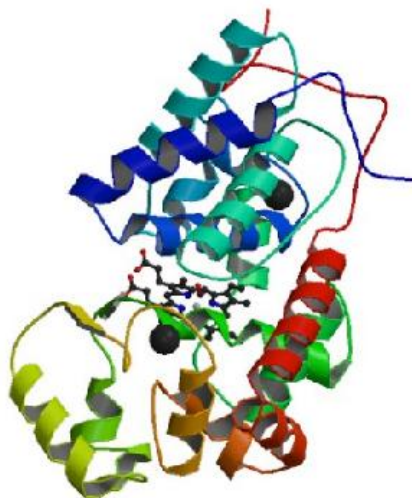
- Luminol: $2 \cdot 10^{-3}$ M roztok luminolu sodné soli ve fosfátovém pufru. (98%, Sigma-Aldrich)
- Peroxid vodíku: 3% roztok. (3%, Fluka Analytical)



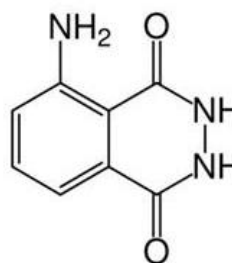
Trolox



Kys. askorbová



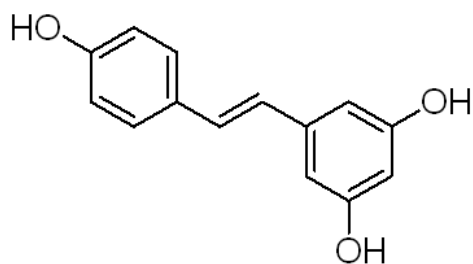
HRP



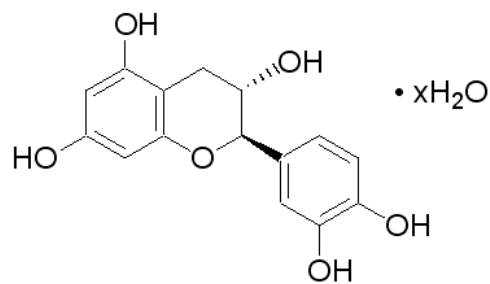
Luminol

Analyzované látky:

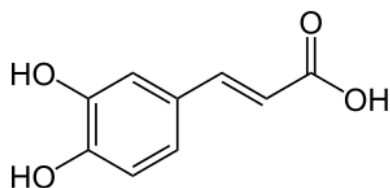
- Resveratrol: koncentrace $4,38 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ roztok v ethanolu. (98%, TCI Europe)
- Katechin hydrát: koncentrace $3,45 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ roztok v destilované vodě. (98% , Sigma)
- Benzochinon: koncentrace $0,0925 \cdot 10 \text{ M}$ roztok v destilované vodě. (Lachema)
- Kyselina kávová: koncentrace $5,55 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ roztok v destilované vodě. (99%, Sigma)
- Kyselina 4,5-dihydroxybenzen sulfonová disodná sůl monohydrát: koncentrace $15 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ roztok v destilované vodě. (98%, Sigma-Aldrich)
- Hydrochinon: koncentrace $0,0908 \text{ M}$ roztok v destilované vodě. (99%, Sigma-Aldrich)
- 1,2-naptochinon-4-sulfonová kyselina sodná sůl: koncentrace $0,0151 \text{ M}$ roztok v destilované vodě. (97% , Aldrich)
- Anthrachinon-1,5-disulfonová kyselina: koncentrace $0,0151 \text{ M}$ roztok v destilované vodě. (95%, Sigma-Aldrich)
- Anthrachinon- β -sulfonan sodný: koncentrace $0,0322 \text{ M}$ roztok v destilované vodě. (Lachema)



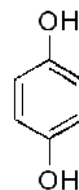
Resveratrol



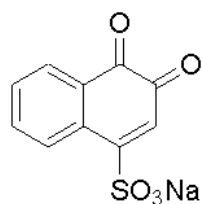
Katechin hydrát



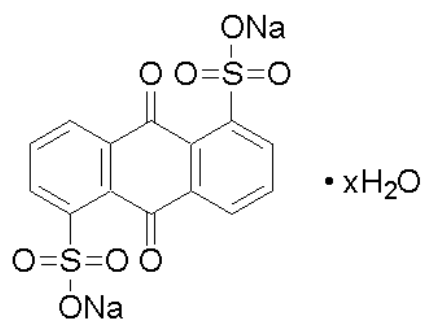
Kyselina kávová



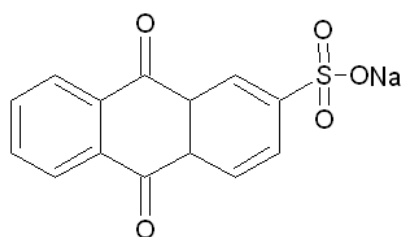
Hydrochinon



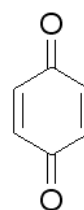
**1,2-naptochinon-4-sulfonová
kyselina sodná sůl**



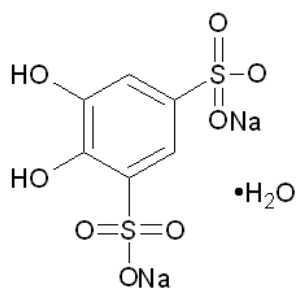
Anthrachinon-1,5-disulfonová kyselina



Anthrachinon-β-sulfonan sodný



Benzochinon



**Kyselina 4,5-dihydroxybenzen sulfonová
disodná sůl monohydrát**

Reálné vzorky:

- Červené víno č.1: Cabernet, červené víno polosladké, 2009, Moldavsko
- Červené víno č.2 : Cabernet Sauvignon, červené víno suché, 2007, Moldavsko
- Bílé víno č.1 : Muscat, bílé víno polosladké, 2007, Moldavsko
- Bílé víno č.2 : Chardonnay, bílé víno suché, 2009, Moldavsko
- Bílý čaj: Bílý čaj s květy růže. (BioActive, původem z Číny).

1g v 100ml horké vody (cca 80°C), louhování po dobu 5 minut.

- Ovocný čaj: Tropická směs.(Bastek Coffee & Tea).

1g v 100ml horké vody (cca 80°C), louhování po dobu 5 minut.

- Červený čaj: Rooibos červený. (Tesco stores, původem z Jihoafrické republiky)

1g v 100ml horké vody (cca 80°C), louhování po dobu 5 minut.

- Bylinný čaj: Einstein Tea. (Dr. Popov)

1g v 100ml horké vody (cca 80°C), louhování po dobu 5 minut.

- Ledový čaj zelený: Nestea Vitao Green Tea.

Složení: voda, cukr, regulátory kyselosti: kyselina citronová a citronan sodný, extrakt ze zeleného čaje (0,17%), aroma, antioxidant kyselina askorbová. Obsah antioxidantů (polyfenoly): 70 mg/100 ml. (Coca-Cola, čaj původem z Indie)

- Ledový čaj bílý: Nestea Vitao White Tea.

Složení: voda, cukr, regulátory kyselosti: kyselina citronová a citronan sodný, extrakt z bílého čaje (0,2%), meruňková šťáva (0,1%) z koncentrátu, aroma, antioxidant kyselina askorbová. Obsah antioxidantů (polyfenoly): 70mg/100ml. (Coca-Cola, čaj původem z Číny)

- Káva: Tchibo Family classic. 3g v 50ml horké vody (cca 80°C). (Tchibo)
- Čerstvá šťáva z pomeranče: hmotnost pomeranče: 432g, objem šťávy: cca 185ml. (Pomeranče původem ze Španělska)
- Čerstvá šťáva z citronu: hmotnost citronu: 104g objem šťávy: cca 65ml. (Původem z Turecka)
- Pomerančový džus: Pfanner 100% arancia. 100% pomerančový, pasterizovaný džus bez konzervačních látek. (Hermann Pfanner)

3.2 Přístrojové vybavení:

Fluoroskan Ascent FL značky Thermo Scientific, má funkci fluorescenčního i luminiscenčního měření v mikrotitračních destičkách s počtem jamek od 1 do 384. Součástí zařízení je i třepačka s regulací rychlosti a amplitudy a inkubátor s rozsahem teplot od +3°C od teploty okolí do 45°C. Luminiscenční detekce v oblasti spektra 270-670nm. Detektorem je fotonásobič (PMT – photonmultiplier tube). Přístroj je řízen jednoduše ovladatelným programem Ascent, který umožňuje i kompatibilitu s robotem.



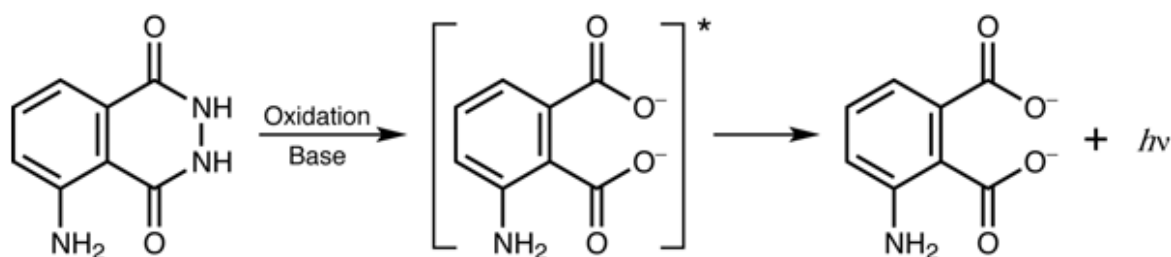
Fluoroskan Ascent FL

3.3 Metoda stanovení TAC

Pro stanovení celkové antioxidační kapacity byla zvolena metoda TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Metoda TEAC je definována jako milimolární koncentrace Troloxu odpovídající 1mM stanovené látky. Trolox je ve vodě rozpustný analog vitamínu E. [28]

Princip stanovení:

Chemiluminiscenční směs obsahuje peroxid vodíku, který je rozložen křenovou peroxidásou za vzniku reaktivních forem kyslíku (ROS) a následné chemiluminiscence luminolu (obr. 10). Antioxidanty obsažené ve vzorku vychytávají tyto ROS a tímto způsobem opožďují chemiluminiscenci. Měřena je časová prodleva. Jako standard byl použit Trolox a kyselinu askorbovou.



Obr. 10: Oxidací luminolu peroxidem vodíku dochází k excitaci molekuly a následné chemiluminiscenci. Reakce je urychlována katalyzátorem (HRP).

3.4 Postup stanovení

K 20μl standardu (Trolox, kyselina askorbová) nebo vzorku bylo přidáno 20μl katalyzátoru- křenové peroxidázy (HRP). Po vložení mikrotitrační destičky do přístroje Fluroscan Ascent FL došlo k nástřiku 160μl chemiluminiscenční směsi (100μl H₂O₂ se 200μl roztoku luminolu doplněno fosfátovým pufrům na objem 10ml).

Nastavení přístroje: teplota= 25°C, třepání 10s, integrační doba: 20ms.

3.5 Vyhodnocení experimentálních dat

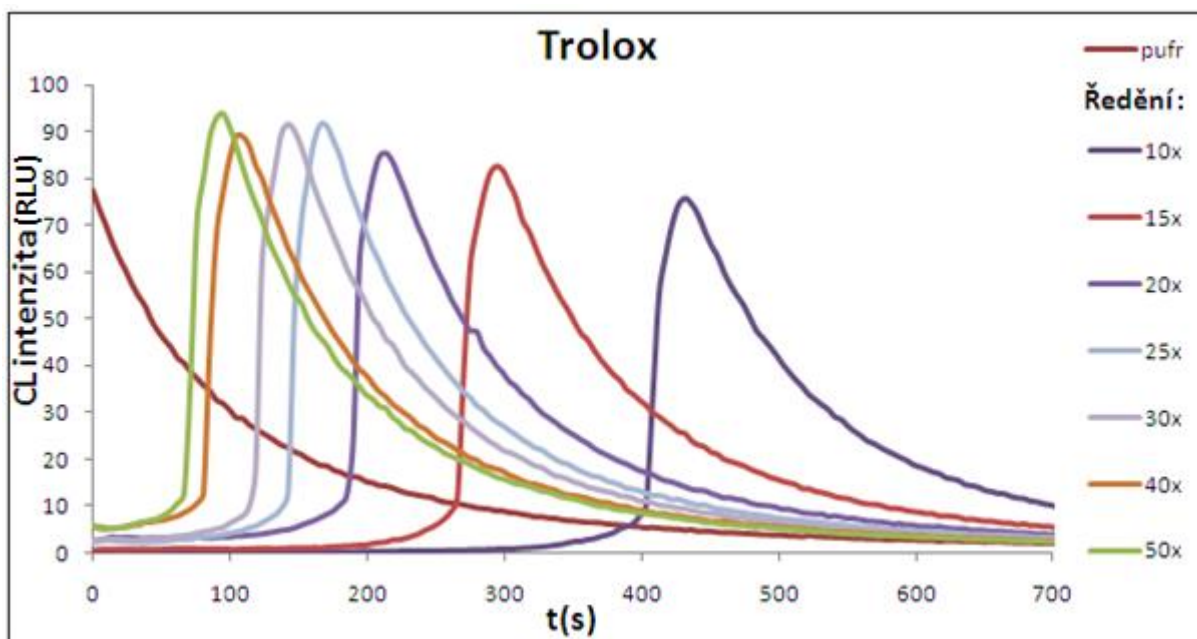
Z naměřených hodnot byl sestrojen graf intenzity chemiluminiscence v závislosti na čase (graf 1). Dále pak kalibrační křivka závislosti časové prodlevy chemiluminiscence na koncentraci Troloxu (graf 2). Z výsledné rovnice regrese byla vypočtena antioxidační kapacita vzorku. Stejný postup vyhodnocení byl použit pro kyselinu askorbovou (graf 3 a 4). Vše jsem zpracovala v programu Microsoft Excel.

3.6 Výsledky a diskuze

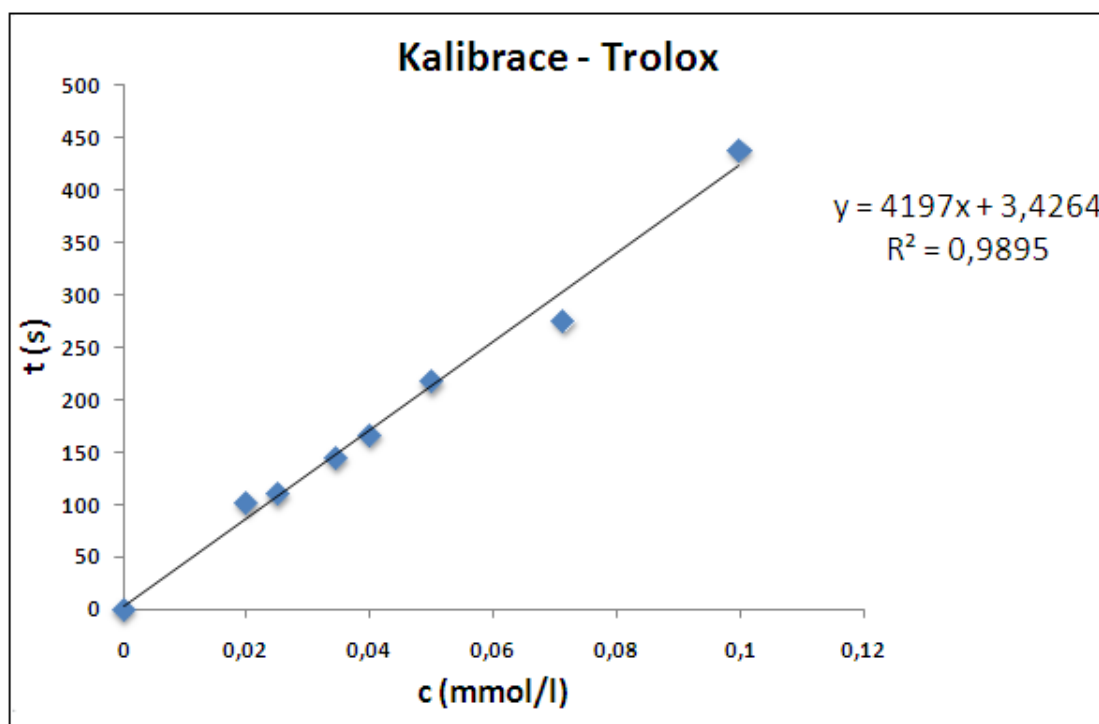
3.6.1 Vyhodnocení standardů

V grafu 1 je zobrazena závislost intenzity CL na čase pro různá ředění Troloxu.

V grafu 2 je zobrazena závislost časové prodlevy na koncentraci Troloxu. Jednotlivé hodnoty časové prodlevy byly odečteny z grafu 1. Nejvyšší bod na ose y pro určitou koncentraci Troloxu (kyseliny askorbové), odpovídal hodnotě na ose x. Odečtena hodnota na ose x se rovná časové prodlevě Troloxu (kyseliny askorbové) pro určitou koncentraci.

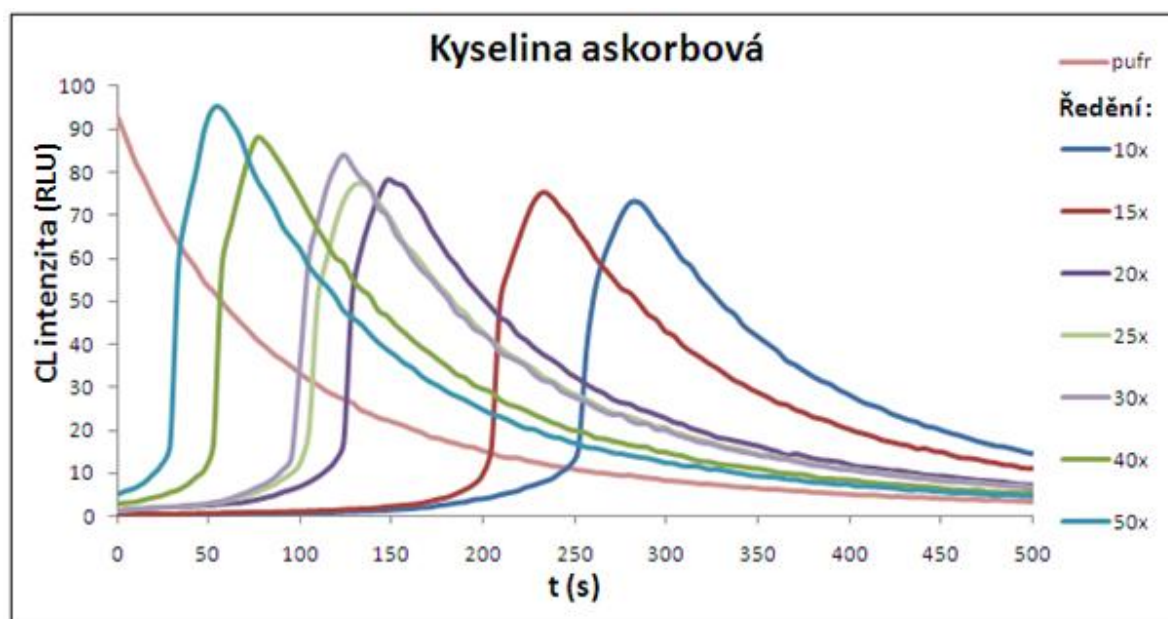


Graf 1: Závislost intenzity CL na čase pro různá ředění Troloxu (koncentrace 10^{-3} M roztok ve fosfátovém pufru, CL směs: 100 μ l H_2O_2 s 200 μ l roztoku luminolu doplněno fosfátovým pufrům na objem 10ml), $t = 25^\circ C$, $pH = 7,4$.

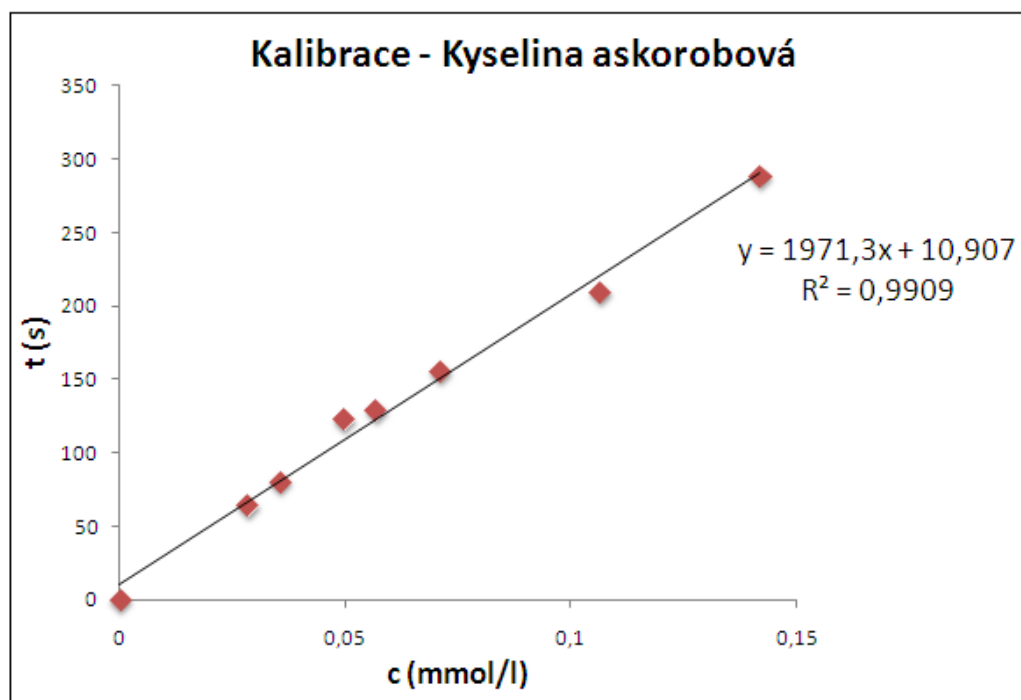


Graf 2: Kalibrační křivka pro Trolox.

V grafu 3 je zobrazena závislost intenzity CL na čase pro různá ředění kyseliny askorbové. V grafu 4 je zobrazena závislost časové prodlevy na koncentraci kyseliny askorbové.



Graf 3: Závislost intenzity CL na čase pro různá ředění kyseliny askorbové (koncentrace $1,4 \cdot 10^{-3}$ M roztok ve fosfátovém pufru, CL směs: 100 μ l H_2O_2 s 200 μ l roztoku luminolu doplněno fosfátovým pufrem na objem 10ml), $t = 25^\circ C$, $pH = 7,4$.



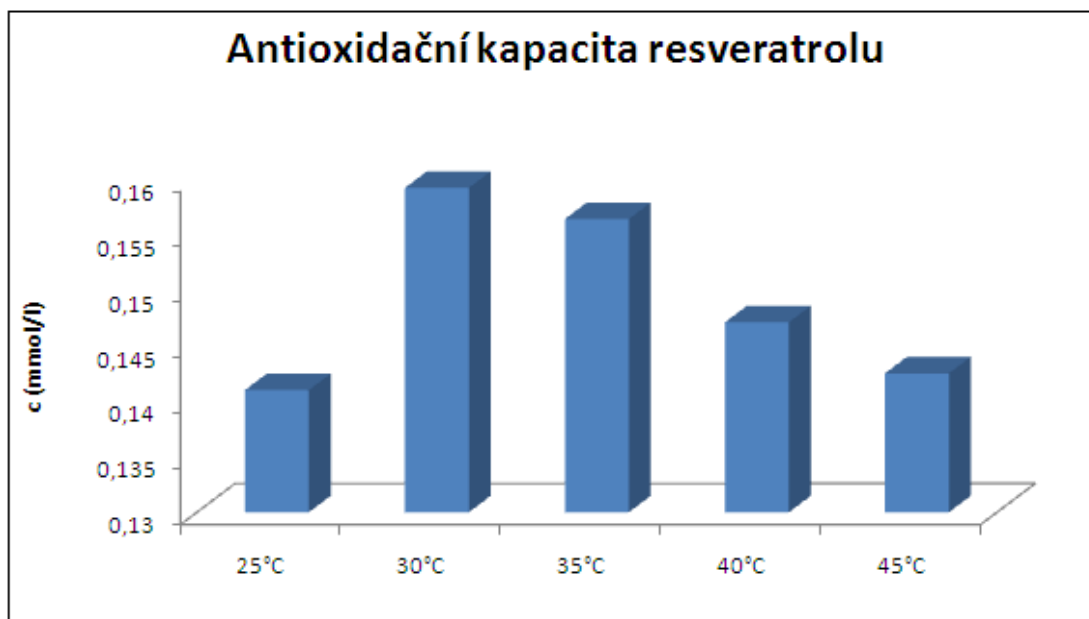
Graf 4: Kalibrační křivka pro kyselinu askorbovou.

3.6.2 Antioxidační kapacita resveratrolu – vliv teploty

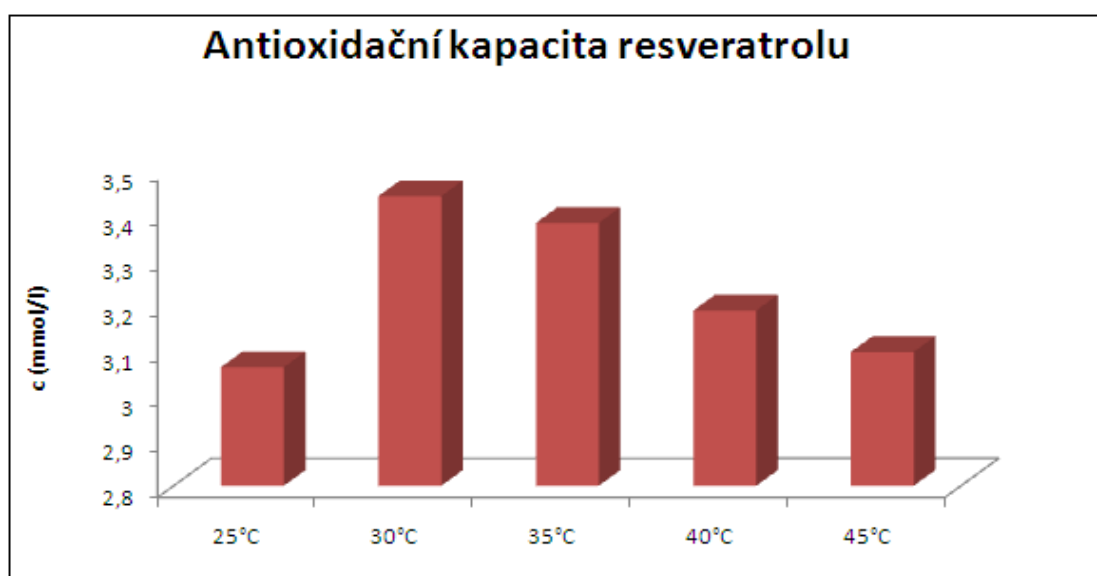
Antioxidační kapacita resveratrolu je uvedena v tabulce 2 a zobrazena v grafech 5 a 6.

Teplota °C	Trolox mmol/l	Kys. askorbová mmol/l
25	0,1410	3,0621
30	0,1592	3,4406
35	0,1564	3,3813
40	0,1471	3,1876
45	0,1425	3,0958

Tabulka 2: Antioxidační kapacita resveratrolu v závislosti na teplotě.



Graf 5: Vliv teploty na antioxidační kapacitu resveratrolu, standardem je Trolox, pH= 7,4.



Graf 6: Vliv teploty na antioxidační kapacitu resveratrolu, standardem je kyselina askorbová, pH= 7,4.

V grafech 5 a 6 lze pozorovat změnu antioxidační kapacity ovlivněnou zvýšením teploty. Při 25°C antioxidační kapacita resveratrolu je nejnižší, s rostoucí teplotou antioxidační kapacita roste. Při teplotách vyšších 30°C antioxidační kapacita resveratrolu klesá.

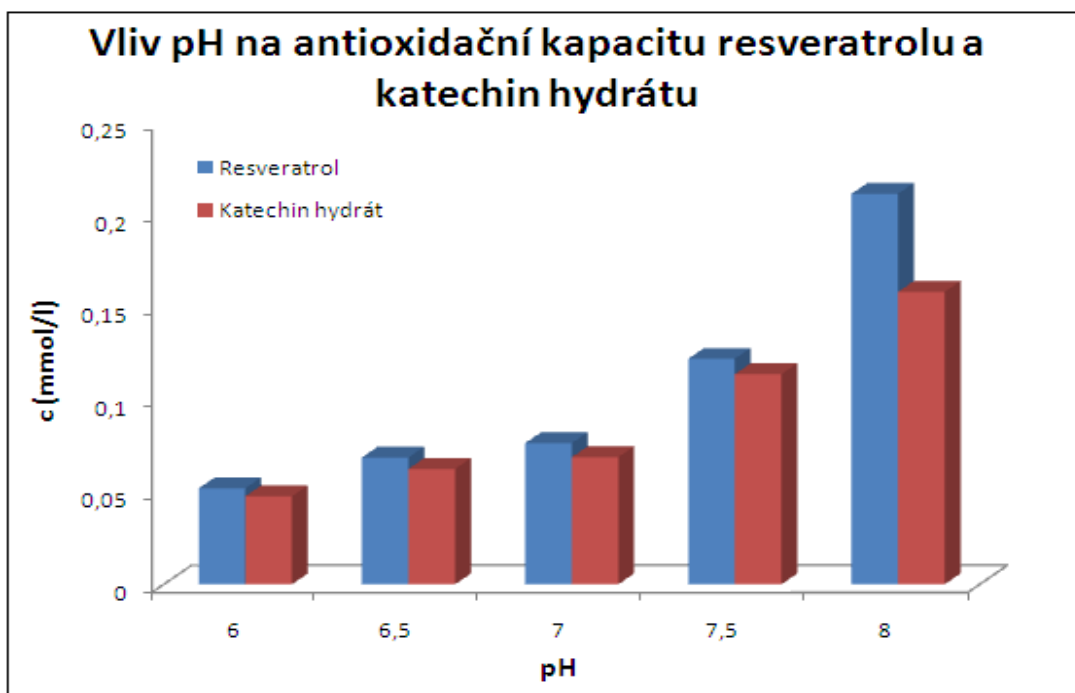
3.6.4 Antioxidační kapacita resveratrolu a katechin hydrátu – vliv pH

Porovnání antioxidační kapacity resveratrolu, který je obsažen hlavně ve víně a katechin hydrátu, který je složkou ovoce a čaje v odlišném pH. pH 6-8 bylo zvoleno podle rozsahu pH tekutin v lidském organismu.

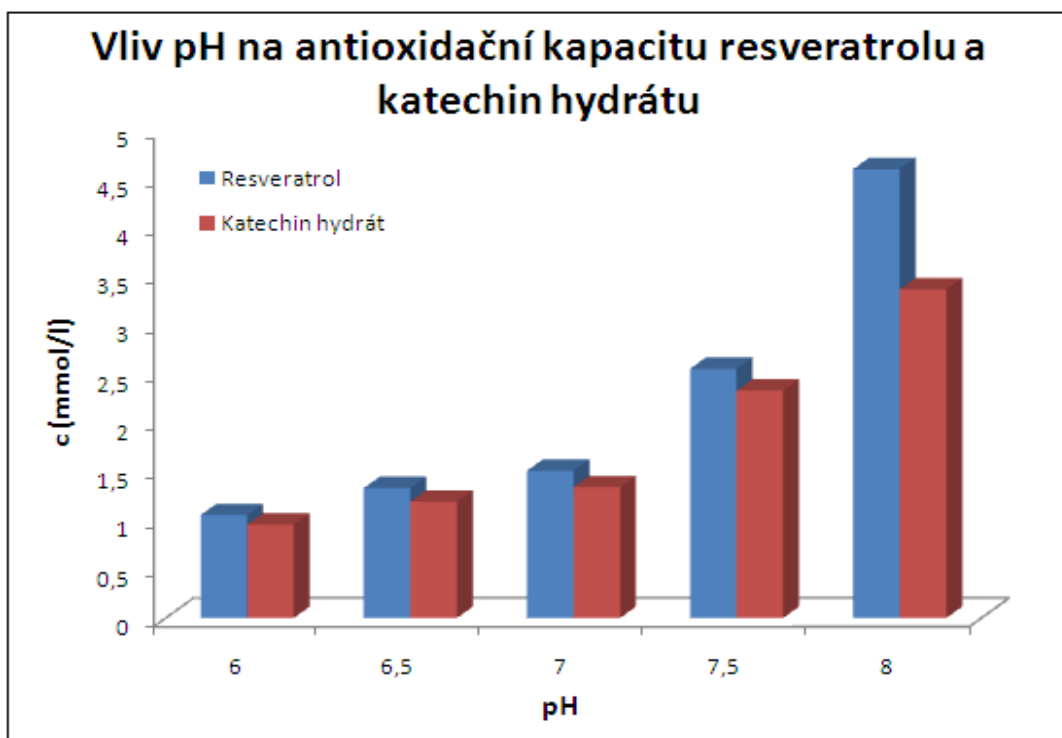
Výsledná antioxidační kapacita resveratrolu a katechin hydrátu při odlišném pH je shrnuta v tabulce 3 a zobrazena v grafu 7 a 8.

pH	Resveratrol		Katechin hydrát	
	Trolox mmol/l	Kys. askorbová mmol/l	Trolox mmol/l	Kys. askorbová mmol/l
6	0,0519	1,0542	0,0476	0,9568
6,5	0,0686	1,3313	0,0624	1,1918
7	0,0763	1,5082	0,0687	1,3397
7,5	0,1219	2,5530	0,1136	2,3288
8	0,2111	4,5993	0,1581	3,3654

Tabulka 3: TAC resveratrolu a katechin hydrátu v odlišném pH.



Graf 7: Vliv pH na antioxidační kapacitu resveratrolu a katechin hydrátu, standardem je Trolox, $t=25^{\circ}\text{C}$.



Graf 8: Vliv pH na antioxidační kapacitu resveratrolu a katechin hydrátu, standardem je kyselina askorbová, $t=25^{\circ}\text{C}$.

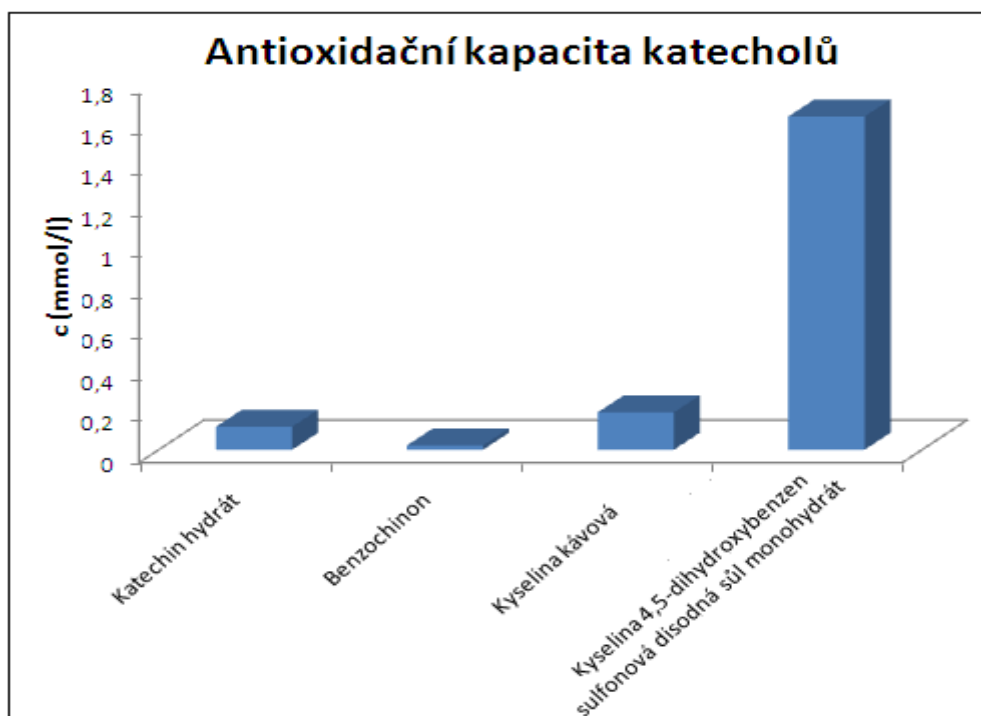
Antioxidační kapacita obou antioxidantů se zvětšuje s rostoucím pH. Narůst antioxidační kapacity resveratrolu je intenzivnější než u katechin hydrátu. Hodnoty antioxidační kapacity látek jsou vztaženy k původním koncentracím roztoku (viz. kapitola 3.1 chemikálie).

3.6.3 Antioxidační kapacita katecholů.

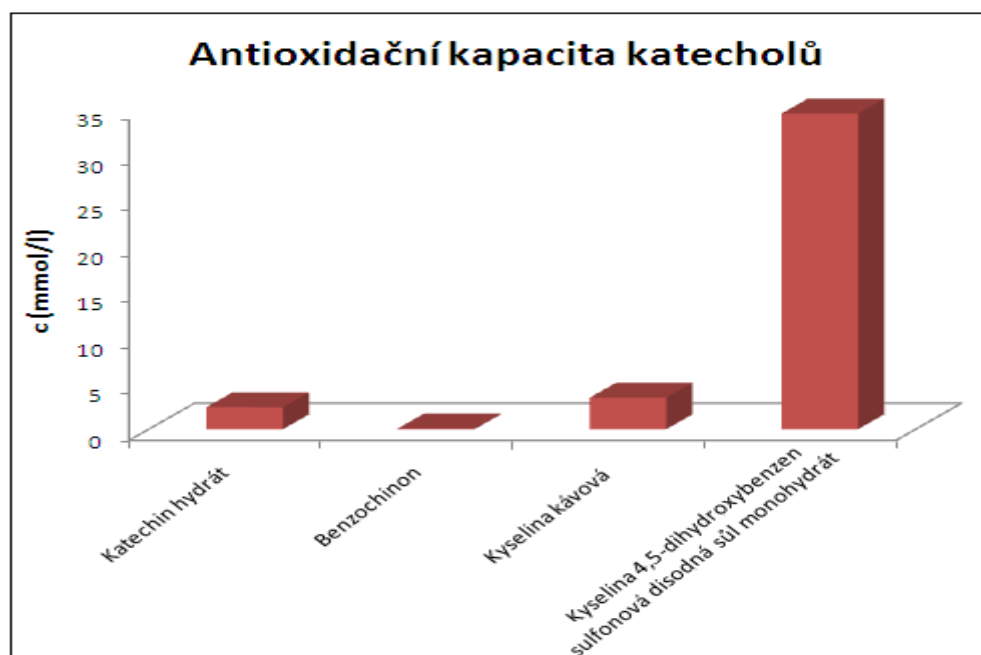
Antioxidační kapacita byla měřena u všech 8 katecholů, dostupných v laboratoři. Antioxidační kapacita katecholů je uvedena v tabulce 4 a zobrazena v grafu 9 a 10. Katecholy, které nebylo možné stanovit z důvodů velmi malé nebo žádné časové prodlevy jsou zobrazeny v grafech 11, 12, 13 a 14.

Katechol	Trolox mmol/l	Kys. askorbová mmol/l
Katechin hydrát	0,1124	2,3910
Benzochinon	0,0205	0,0873
Kyselina kávová	0,1820	3,4432
Kyselina 4,5-dihydroxybenzen sulfonová disodná sůl monohydrát	1,6293	34,4761

Tabulka 4: Antioxidační kapacita katecholů.

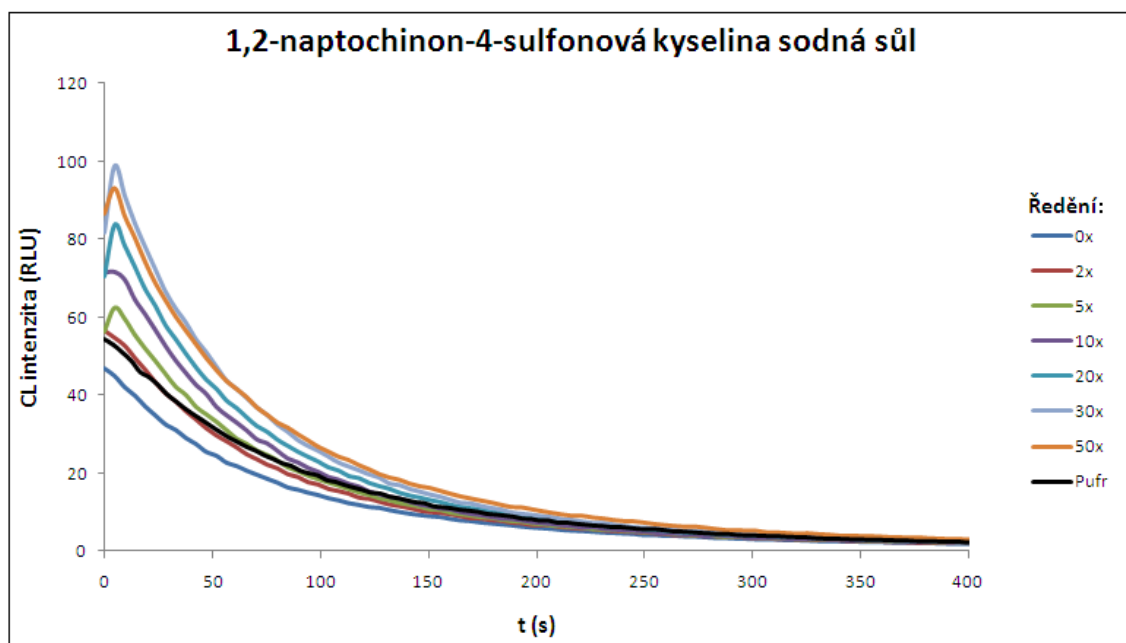


Graf 9: Antioxidační kapacita katecholů. Standardem je Trolox, $t = 25^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7,4$.

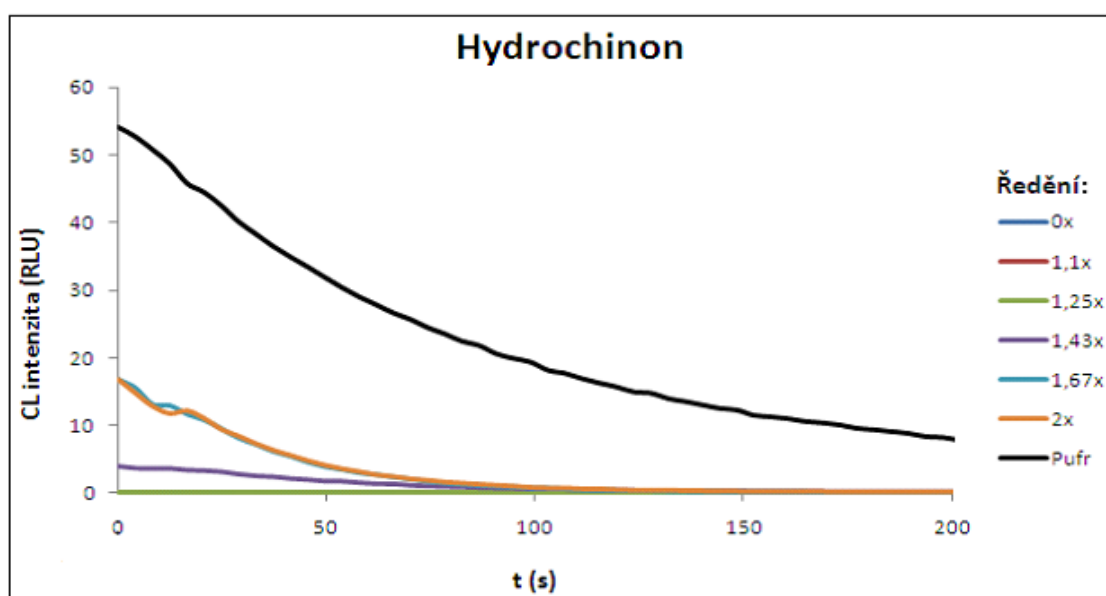


Graf 10: Antioxidační kapacita katecholů. Standardem je kyselina askorbová, $t = 25^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7,4$.

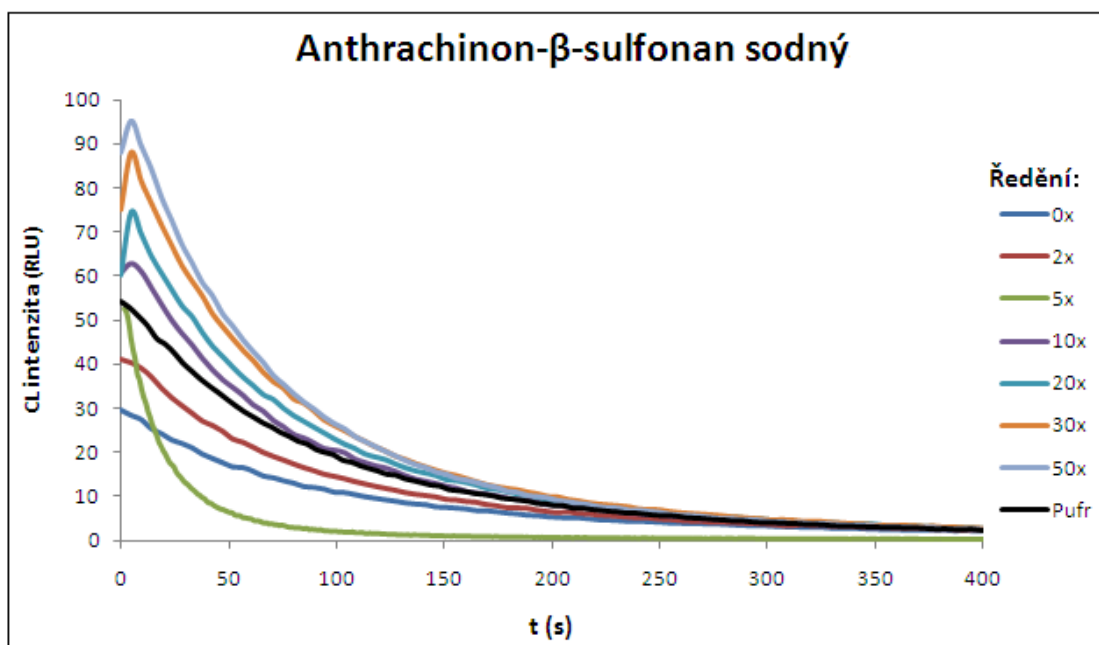
V tabulce 4 a v grafu 7 jsou zobrazeny hodnoty antioxidační kapacity katecholů, které jsou vztaženy k původním koncentracím roztoku (viz. kapitola 3.1 chemikálie).



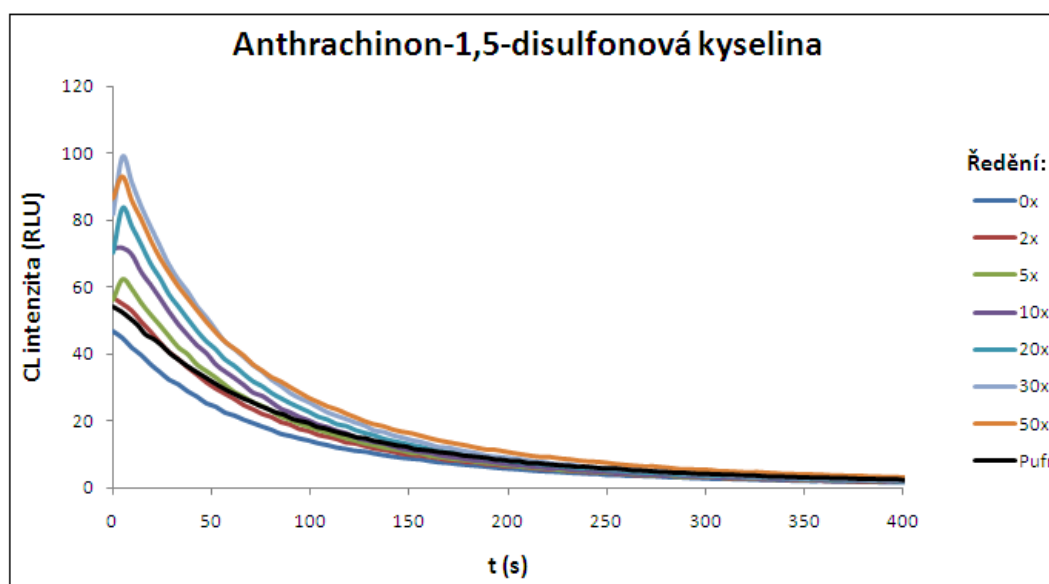
Graf 11: Závislost intenzity CL na čase pro různá ředění 1,2-naptochinon-4-sulfonové kyseliny sodné soli (koncentrace 0,0151M roztok v destilované vodě, CL směs: 100 μ l H₂O₂ s 200 μ l roztoku luminolu doplněno fosfátovým pufrém na objem 10ml), t= 25°C, pH= 7,4.



Graf 12 Závislost intenzity CL na čase pro různá ředění hydrochinonu (koncentrace 0,0908M roztok v destilované vodě, CL směs: 100 μ l H₂O₂ s 200 μ l roztoku luminolu doplněno fosfátovým pufrém na objem 10ml), t= 25°C, pH= 7,4



Graf 13: Závislost intenzity CL na čase pro různá ředění antrachinon-β-sulfonanu sodného (koncentrace 0,0322 M roztok v destilované vodě, CL směs: 100μl H₂O₂ s 200μl roztoku luminolu doplněno fosfátovým pufrém na objem 10ml), t= 25°C, pH= 7,4.



Graf 14 Závislost intenzity CL na čase pro různá ředění antrachinon-1,5-disulfonové kyseliny (koncentrace 0,0151M roztok v destilované vodě, CL směs: 100μl H₂O₂ s 200μl roztoku luminolu doplněno fosfátovým pufrém na objem 10ml), t= 25°C, pH= 7,4.

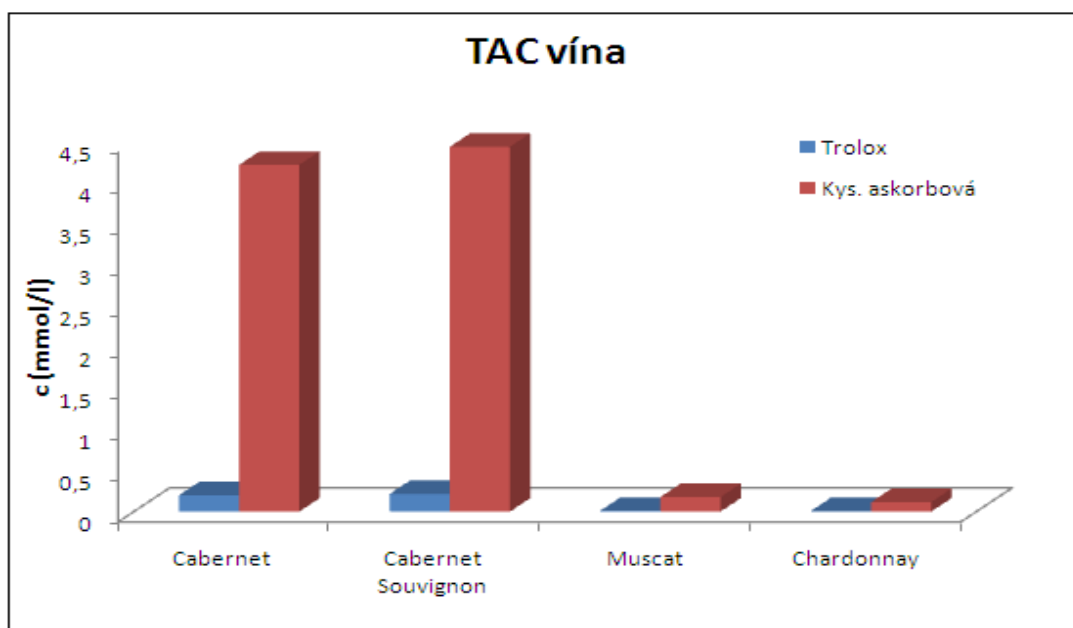
V grafech 11, 12, 13, 14 byly představeny katecholy, které se mi nepodařilo stanovit z důvodu velmi malé nebo žádné časové prodlevy. U nezředěných a málo zředěných vzorků se projevují silné antioxidační vlastnosti katecholů. Katecholy potlačují vznik reaktivních forem kyslíků, intenzita CL je tedy nižší než v samotném pufru. U vzorků s větší intenzitou CL než má pufr, pravděpodobně došlo k rychlému vyčerpání antioxidantů a postupného zhasínání volných radikálů.

3.6.4 TAC vína

TAC vína je uvedena v tabulce 5 a zobrazena v grafu 15.

Název	Trolox mmol/l	Kyselina askorbová mmol/l
Cabernet	0,1990	4,2227
Cabernet Sauvignon	0,2141	4,4426
Muscat	0,0097	0,1769
Chardonnay	0,0070	0,1150

Tabulka 5: Celková antioxidační kapacita červeného a bílého vína.



Graf 15: TAC červeného a bílého vína.

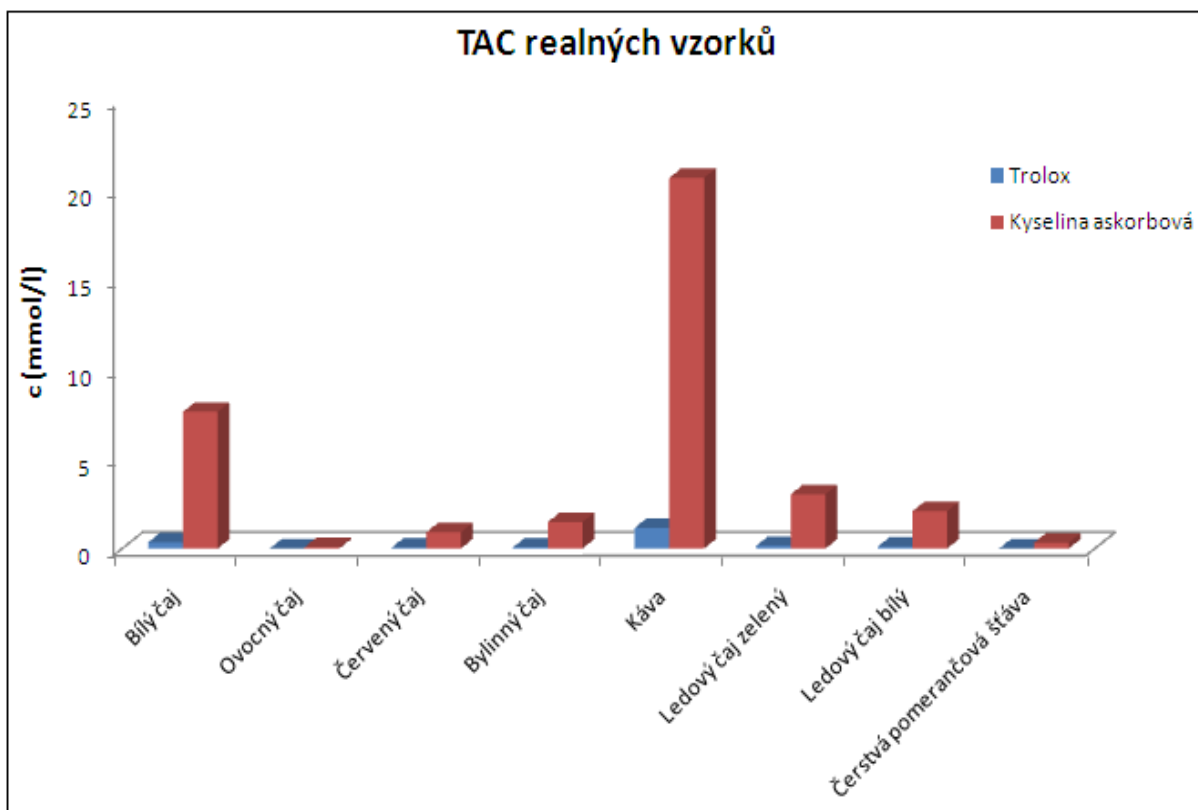
Z tabulky 5 a grafu 15 je zřejmé, že antioxidační kapacita červeného vína (Cabernet a Cabernet Sauvignon) je mnohem větší, než v případě vína bílého (Muscat a Chardonnay). Rozdíl v obsahu resveratrolu mezi červeným a bílým vínem je spojen s jeho způsobem úpravy. Na výrobu červeného vína jsou použity celá hrozna i se slupkami, kde je koncentrace resveratrolu největší. [17]

3.6.5 TAC reálných vzorků vztažena ke standardům: Trolox a kyselina askorbová

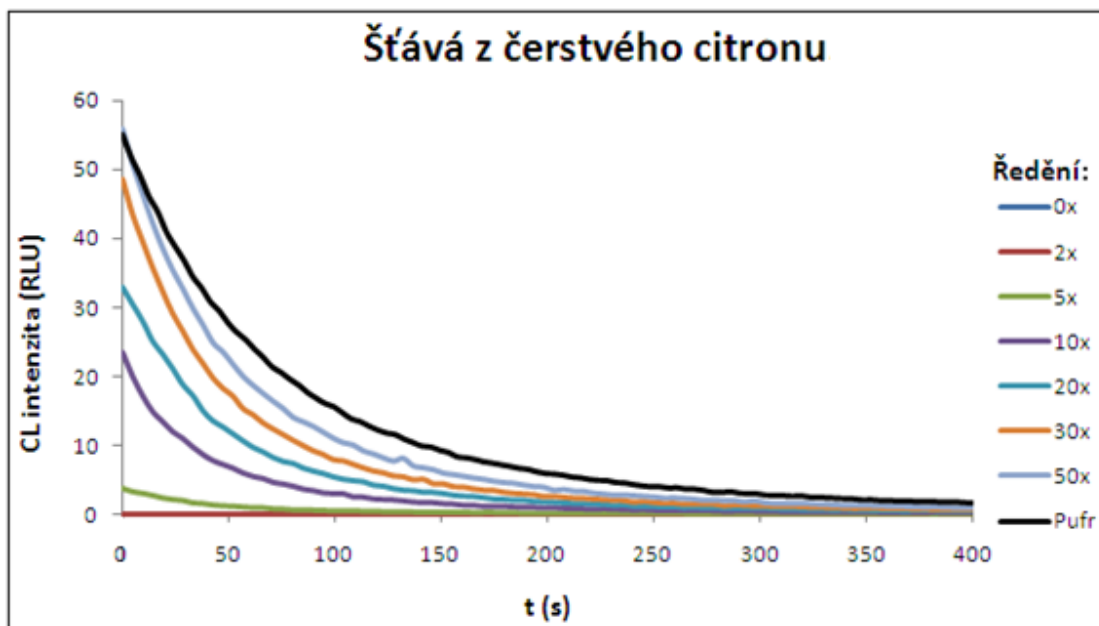
Celková antioxidační kapacita vzorků je uvedena v tabulce 6 a zobrazena v grafu 16. Čerstvá šťáva z citronu a pomerančový džus, které nebylo možné stanovit z důvodu žádné nebo velmi malé časové prodlevy, jsou zobrazeny v grafech 17 a 18.

Vzorek	Trolox mmol/l	Kys. askorbová mmol/l
Bílý čaj	0,3528	7,6244
Ovocný čaj	0,0046	0,0808
Červený čaj	0,0481	0,9038
Bylinný čaj	0,0671	1,4693
Ledový čaj zelený	0,1490	3,0256
Ledový čaj bílý	0,1080	2,0793
Káva	1,150	20,6691
Čerstvá pomerančová šťáva	0,0072	0,3243

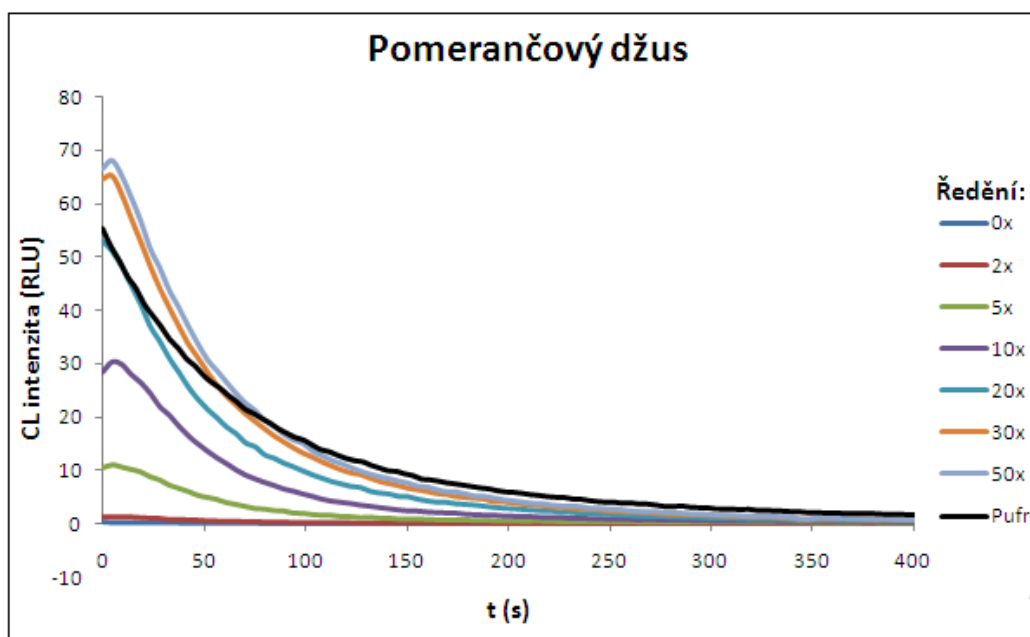
Tabulka 6.: TAC reálných vzorků.



Graf 16: TAC reálných vzorků, $t = 25^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7,4$. Bílý čaj: bílý čaj s květy růže, ovocný čaj: tropická směs, červený čaj: rooibos červený, bylinný čaj: Einstein Tea, ledový čaj zelený: Nestea Vitao Green Tea, ledový čaj bílý: Nestea Vitao White Tea, káva: Tchibo Family classic, čerstvá šťáva z pomeranče původem ze Španělska.



Graf 17: Závislost intenzity CL na čase pro různá ředění čerstvé citronové šťávy (hmotnost citronu: 104g objem šťávy: cca 65ml, CL směs: 100 μ l H₂O₂ s 200 μ l roztoku luminolu doplněno fosfátovým pufrem na objem 10ml), t= 25°C, pH= 7,4.



Graf 18: Závislost intenzity CL na čase pro různá ředění pomerančového džusu (100% pasterizovaný džus, CL směs: 100 μ l H₂O₂ s 200 μ l roztoku luminolu doplněno fosfátovým pufrem na objem 10ml), t= 25°C, pH= 7,4.

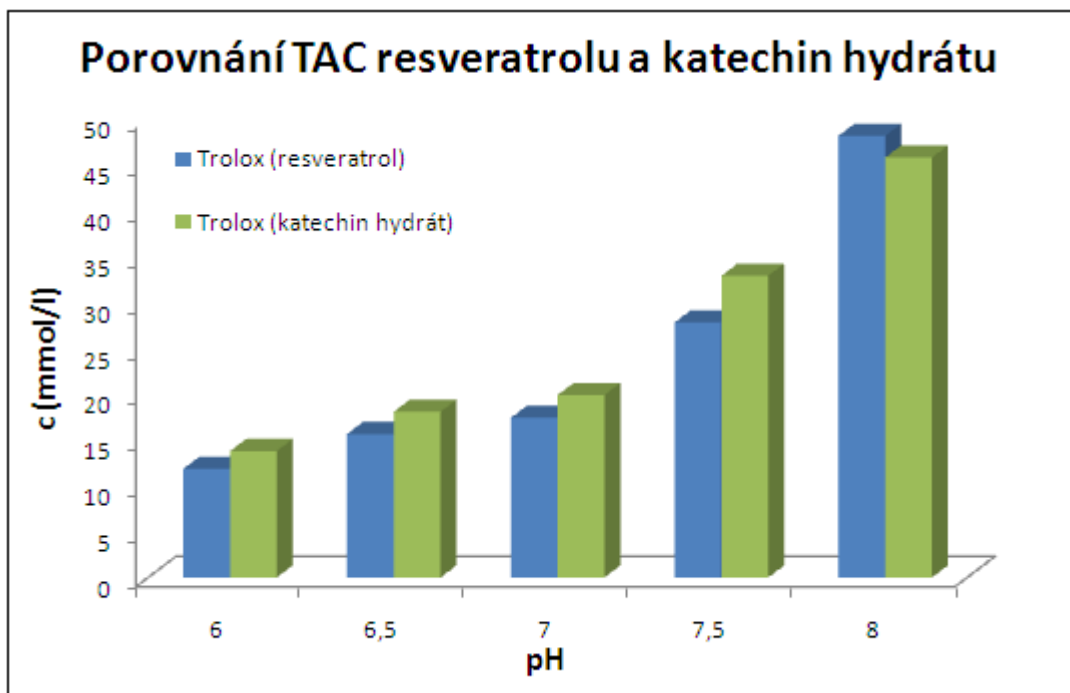
V tabulce 6 a grafu 16 je zobrazena TAC reálných vzorků. Největší TAC měl vzorek kávy, za ním bílé a zelené čaje. Ostatní čaje a čerstvá šťáva z pomeranče již tak velkou antioxidační kapacitu neměly. V grafech 17 a 18 jsou zobrazeny: čerstvá šťáva z citronu a pomerančový džus. Jejich TAC nebylo možné stanovit z důvodů malé nebo žádné časové prodlevy.

3.5.5 Porovnání antioxidační kapacity resveratrolu a katecholů.

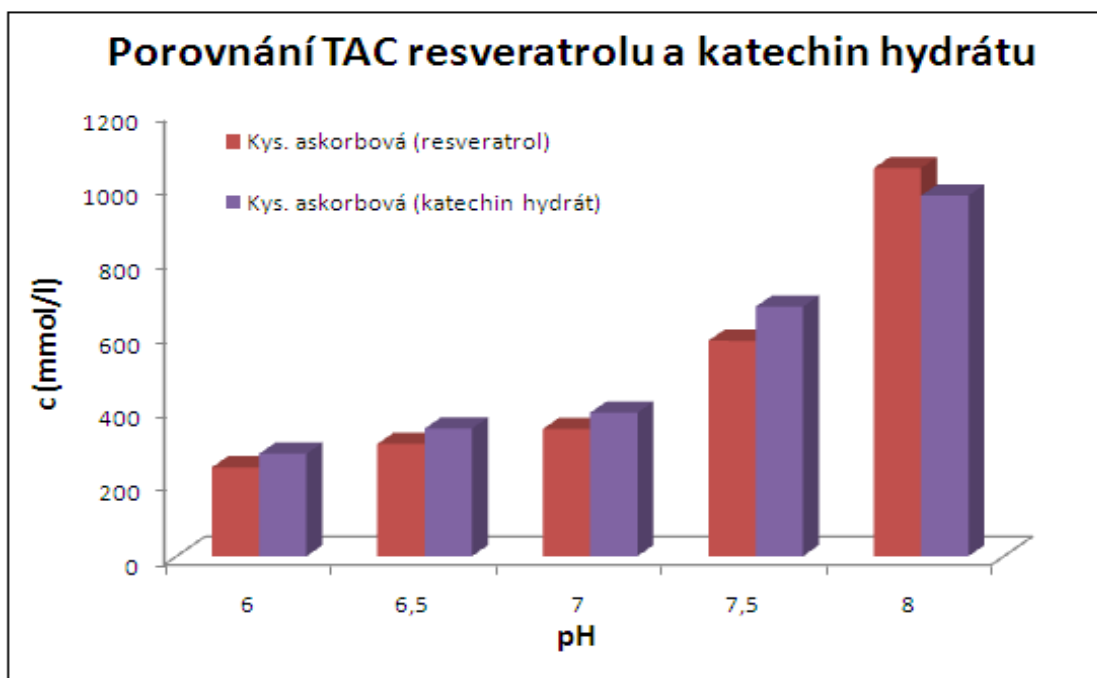
V tabulce 7 a grafu č. 19 a č. 20 je zobrazena antioxidační kapacita resveratrolu a katechin hydrátu při odlišném pH. Koncentrace resveratrolu a katechin hydrátu 1mol/l.

pH	Resveratrol c= 1mol/l		Katechin hydrát c= 1mol/l	
	Trolox mmol/l	Kys. askorbová mmol/l	Trolox mmol/l	Kys. Askorbová mmol/l
6	11,8493	240,6849	13,7971	277,3333
6,5	15,6621	303,9498	18,0870	345,4493
7	17,4201	344,3379	19,9130	388,3188
7,5	27,8311	582,8767	32,9275	675,0145
8	48,1964	1050,068	45,8261	975,4783

Tabulka 7: TAC resveratrolu a katechin hydrátu při odlišném pH.



Tabulka 19: Porovnání TAC resveratrolu a katechin hydrátu při odlišném pH, standardem je Trolox, $t = 25^{\circ}\text{C}$



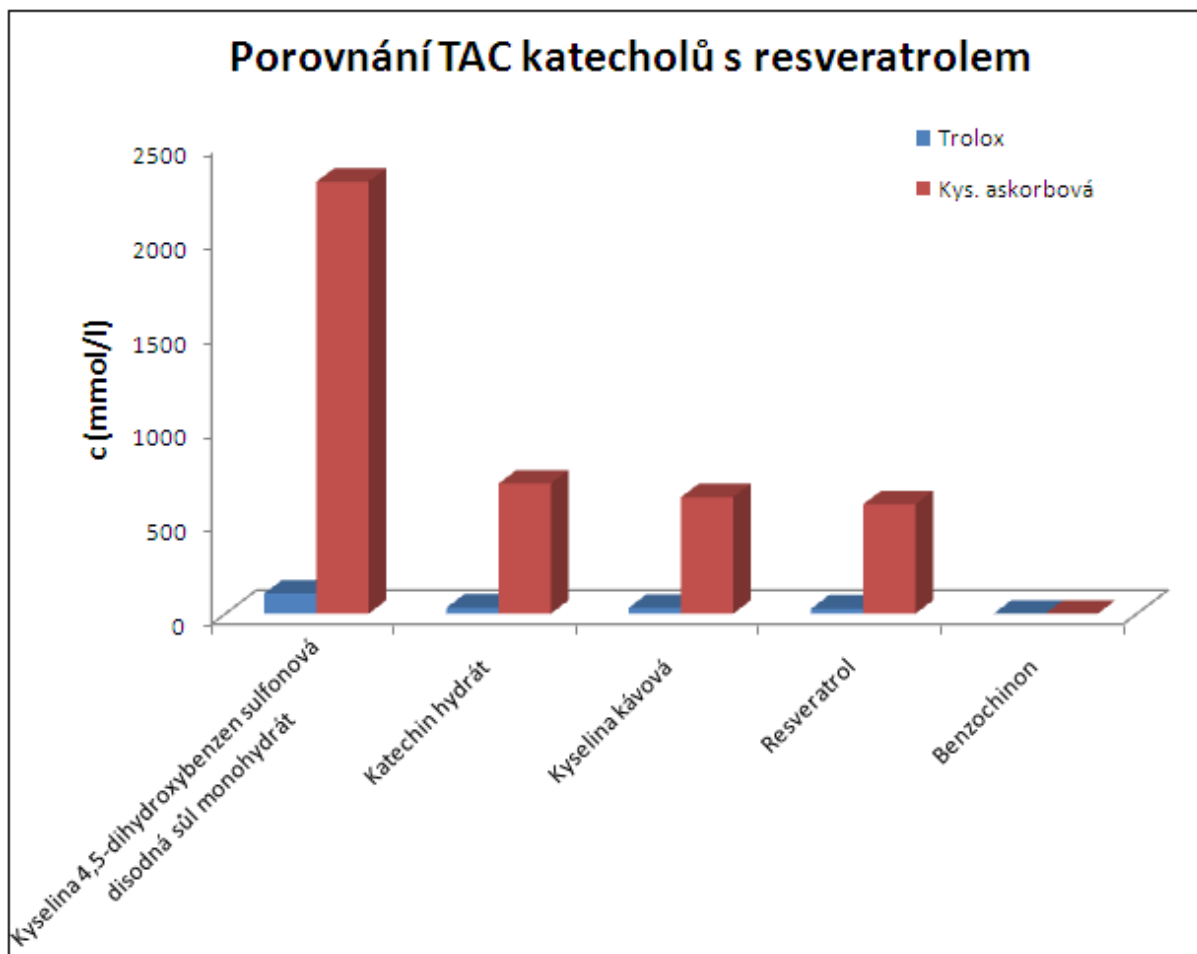
Graf 20: Porovnání TAC resveratrolu a katechin hydrátu při odlišném pH, standardem je kyselina askorbová, $t = 25^{\circ}\text{C}$.

Z tabulky 7 a grafů 19 a 20 vyplývá, že katechin hydrát i resveratrol jsou nestabilní při změně pH. Antioxidační kapacita resveratrolu je mírně nižší než u katechin hydrátu, naopak u pH 8 antioxidační kapacita resveratrolu výrazně vzrůstá.

V tabulce 8 a v grafu 21 je porovnávána antioxidační kapacita katecholů a resveratrolu. Koncentrace katecholů a resveratrolu je přepočtena na 1mol/l.

Látka o konc. 1mol/l	Trolox mmol/l	Kys. askorbová mmol/l
Kyselina 4,5-dihydroxybenzen sulfonová disodná sůl monohydrát	108,6	2298,4
Katechin hydrát	33,2	693,1
Kyselina kávová	32,8	620,4
Resveratrol	27,8	582,9
Benzochinon	0,22	0,94

Tabulka 8: Porovnání antioxidační kapacity katecholů s resveratrole.



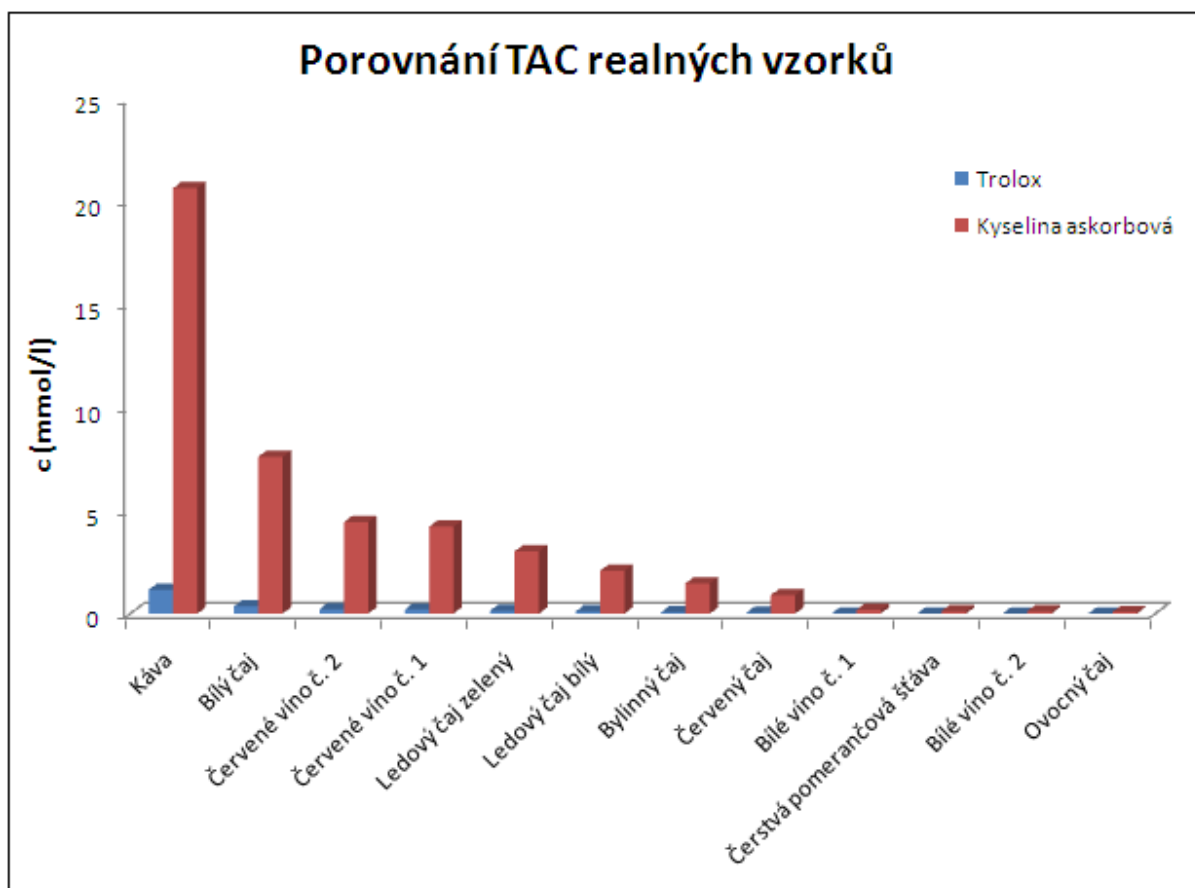
Graf 21: Porovnání TAC katecholů s resveratrolem, $t = 25^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7,4$.

Z grafu 21 je možno usuzovat, že kyselina 4,5-dihydroxybenzen sulfonová disodná sůl monohydrát má velmi vysokou antioxidační kapacitu oproti ostatním látkám. Antioxidační kapacita resveratrolu je porovnatelná s antioxidační kapacitou katechin hydrátu a kyseliny kávové.

V tabulce 9 a v grafu 22 je porovnávána TAC vína s TAC ostatních reálných vzorků.

Reálný vzorek	Trolox mmol/l	Kys. askorbová mmol/l
Káva	1,150	20,6691
Bílý čaj	0,3528	7,6244
Červené víno č. 2	0,2141	4,4426
Červené víno č. 1	0,1990	4,2227
Ledový čaj zelený	0,1490	3,0256
Ledový čaj bílý	0,1080	2,0793
Bylinný čaj	0,0671	1,4693
Červený čaj	0,0481	0,9038
Bílé víno č. 1	0,0097	0,1769
Čerstvá pomerančová šťáva	0,0072	0,1243
Bílé víno č. 2	0,0070	0,1150
Ovocný čaj	0,0046	0,0808

Tabulka 9: Porovnání TAC čaje, kávy a ovocné šťávy s TAC vína.



Graf 22: Porovnání TAC čaje, kávy a ovocné šťávy s TAC vína, $t = 25^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7,4$.

Tabulka 9 a graf 22 porovnává TAC reálných vzorků. Největší TAC má káva a bílý čaj. Obě červená vína mají vysokou antioxidační kapacitu v porovnání k ostatním vzorkům, nicméně bílé vína mají TAC nízkou. Ve srovnání s tabulkou 2 (kapitola 2.2.4 antioxidační kapacita), pořadí přibližně odpovídá mým naměřeným hodnotám.

4 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo stanovení a porovnání antioxidační kapacity resveratrolu a katecholů. Ke studii byly použity následující látky: resveratrol, katechin hydrát, benzochinon, kyselina kávová, kyselina 4,5-dihydroxybenzen sulfonová disodná sůl monohydrát, hydrochinon, 1,2-naptochinon-4-sulfonová kyselina sodná sůl, anthrachinon-1,5-disulfonová kyselina a anthrachinon- β -sulfonan sodný. Dále byla stanovena a porovnávána antioxidační kapacita reálných vzorků bílého a červeného vína, bílého, červeného, bylinného a ovocného čaje, rozpustné kávy, pomerančového džusu, čerstvé šťávy z citronu a pomeranče a zeleného a bílého ledového čaje.

Pro stanovení antioxidační kapacity byla zvolena metoda TEAC. Celková antioxidační kapacita stanovená touto metodou je definována jako milimolární koncentrace Troloxu odpovídající 1mM stanovené látky.

Antioxidační kapacita resveratrolu a katechin hydrátu stoupala v závislosti na změně pH. Antioxidační kapacita resveratrolu o koncentraci 1mol/l v kyselém pH byla nízká 11,8 mmol Trolox/l, 240,7 mmol Ask/l, naopak v zásaditém pH byla vysoká 48,2 mmol Trolox/l, 1050,1 mmol Ask/l. Změna antioxidační kapacity v závislosti na pH byla pozorovatelná i u katechin hydrátu. U pH=6 začínala na 13, 8 mmol Trolox/l, 277,3 mmol Ask/l, u pH=8 dosáhla hodnoty 45,8 mmol Trolox/l, 975,5 mmol Ask/l.

Při porovnání testovaných látek, největší antioxidační kapacitu měla kyselina 4,5-dihydroxybenzen sulfonová disodná sůl monohydrát 108,5 mmol Trolox/l, 2298,4 mmol Ask/l, dále: katechin hydrát 33,2 mmol Trolox/l, 693,1 mmol Ask/l, kyselina kávová 32,8 mmol Trolox/l, 620,4 mmol Ask/l, resveratrol 27,8 mmol Trolox/l, 582,9 mmol Ask/l a nejmenší antioxidační kapacitu měl benzochinon 0,22 mmol Trolox/l, 0,94mmol Ask/l.

Při srovnání reálných vzorků, největší antioxidační kapacitu měla káva 1,150 mmol Trolox/l, 20,6691 mmol Ask/l a bílý čaj 0,3528 mmol Trolox/l, 7,6244mmol Ask/l. Červená vína, která jsou především zdrojem resveratrolu měly také vysokou TAC 0,1990-0,2141 mmol Trolox/l, 4,2227-4,4426 mmol Ask/l. Ovocné šťávy měly TAC velmi nízkou nebo je nebylo možné stanovit. Důvodem může být příliš kyselé pH vzorku, tudíž pro jejich stanovení metoda TEAC nebyla vhodně zvolená. Pro

stanovení TAC ovocných šťáv se jeví vhodnými metody FRAP a DPPH. [29]

Při zvyšování teploty vzorku, antioxidační kapacita resveratrolu se výrazně neměnila.

Cílem bylo porovnání účinnosti resveratrolu s katecholy. Resveratrol se jeví v souladu s literárními údaji jako látka, která se může projevovat jako, významné antioxidační činidlo a může tedy mít i význam jako antioxidační protektivum živých organismů.

5 SUMMARY

Antioxidants are compounds, which protect a living organism against free radicals. Free radicals cause an oxidation of cells and can damage them. Antioxidants are divided into two groups: exogenous antioxidants and endogenous antioxidants. Endogenous antioxidants like enzymes, proteins and coenzymes are produced in living organism. Exogenous antioxidants are contained in plants, fruits, and vegetables. A great number of antioxidants as catechols, are contained in teas, especially in green or white teas. Consumption of red wines is highly recommended. They contain resveratrol and other polyphenols.

The aim of the work was to determine and compare the antioxidant capacity of resveratrol and catechols. Single compounds were compared: resveratrol, catechine hydrate, benzoquinone, caffeic acid, 4,5-dihydroxy-1,3-benzenedisulfonic acid disodium salt monohydrate, hydroquinone, 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid sodium salt, anthraquinone-1,5-disulfonic acid and anthraquinone- β -sulfonic acid sodium salt. The total antioxidant capacity (TAC) was determined and compared of samples of white and red wines, teas: white tea, rooibos, herbal tea and fruit tea, soluble coffee, orange juice, fresh lemon and orange squash and green and white iced tea.

For the determination of total antioxidant capacity there it was used the method called Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC). It is based on the relation between the total antioxidant capacity and equivalent concentration of Trolox solution. Trolox is a water-soluble vitamin E equivalent.

Antioxidant capacities of resveratrol and catechin hydrate were increased in dependence on variation of pH. Antioxidant capacity of resveratrol with solution concentration of 1mol/l in acidic pH=6 was low 11,8 mmol Trolox/l, 240,7 mmol Ask/l, whereas in alkaline pH=8 was high 48,2 mmol Trolox/l, 1050,1 mmol Ask/l. The antioxidant capacity of catechin hydrate with solution pH=6 started on 13, 8 mmol Trolox/l, 277,3 mmol Ask/l, at pH=8 reached a value of 45,8 mmol Trolox/l, 975,5 mmol Ask/l.

In case of the comparison, antioxidant capacity of single compounds, the highest value of the antioxidant capacity had 4,5-dihydroxy-1,3-benzenedisulfonic

acid disodium salt monohydrate 108,5 mmol Trolox/l, 2298,4 mmol Ask/l, than: catechin hydrate 33,2 mmol Trolox/l, 693,1mmol Ask/l, caffeic acid 32,8 mmol Trolox/l, 620,4 mmol Ask/l, resveratrol 27,8 mmol Trolox/l, 582,9 mmol Ask/l and the lowest antioxidant capacity had benzoquinone 0,22 mmol Trolox/l, 0,94mmol Ask/l.

In case of the comparison samples of beverages, the highest total antioxidant capacity had soluble coffee 1,150 mmol Trolox/l, 20,6691 mmol Ask/l and white tea 0,3528 mmol Trolox/l, 7,6244mmol Ask/l. Red wines, that are the main source of resveratrol, had a high TAC too, 1990-0,2141 mmol Trolox/l, 4,2227-4,4426 mmol Ask/l. Fresh orange and lemon squash and orange juice had very low TAC or it wasn't possible to determine it. A reason can be very acidic pH of sample, so the method TEAC wasn't suitably chosen. For the determination TAC of fruit juices, the method FRAP and DPPH there was suggested. [29]

The antioxidant capacity of resveratrol wasn't significantly changed by increasing the temperature of sample.

The aim of this study was to find out the relation among the antioxidant capacities of resveratrol and catechols. Resveratrol seems to be an important antioxidative agent and can be understood as protective substance of living organisms. This fact is confirmed by citation of many literature's sources.

LITERATURA

- [1] Štípek, S.: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci, *Grada Publishing* 2000, str. 21-27
- [2] Youngson, R.: Antioxidanty, cesta ke zdraví: Jak odstranit vliv volných radikálů, *Jota*, 1995, str. 13-19
- [3] J. Dabrowski: Barwy Twojego Zdrowia - Tajemnice suplementacji, *Pro Vita*, 2004
- [4] Robard K.; Prenzler P. D.; Tucker G.; Swatsitang P.; Glover W.: Phenolic compounds and their role in oxidative process in fruits, *Food Chemistry* 66, 1999, str. 401
- [5] Hertog M. G. L.; Feskens E. J. M.; Hallman P. C. H.; Katan M. B.; Kromhout D.: Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Eldrely Study, *The Lancet*, 1993, str. 1007
- [6] Stahl W.; Siesl W.: Perspectives in biochemistry and biophysics, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1996, str. 1
- [7] Sies H.; Stahl W.; Vitamins E and C, β -carotene and other carotenoids as antioxidants, *The American Journal of Clinical Nutrition*, str. 1315-1319
- [8] L. Czerwiecki: *Manager Apteki nr 1*, 2009
- [9] Šulc M.; Lachamn J.; Hamouz K.; Orsák M.; Dvořák P.; Horáčková V.: Výber a zhodnocení vhodných metod pro stanovení antioxidační aktivity fialových a červených odrůd brambor, *Chemické listy* 101, 2007, str.584
- [10] www.dietaryfiberfood.com
- [11] Pellegrini N.; Serafini M.; Colombi M.; Del Rio D.; Salvatore S.; Bianchi M.; Brighenti F.: Total antioxidant capacity of plant, foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays, *The Journal of Nutrition*, 2003, str. 2812-2819

- [12] Zloch Z.; Čelakovský J.; Aujezdská A.: Stanovení obsahu polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu, 2004
- [13] Paulová H.; Bochořáková H.; Táborská E.: Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro, *Chemické Listy* 98, 2004, str. 175
- [14] Popa C. V. ; Danet A.F.; Jipa S.; Zaharescu T.: Determination of total antioxidant activity of wines using a flow injection method with chemiluminescence detection, *Rivista de Chimie*, 2010, str. 11-13
- [15] Słowiański J.: Metody badania słabych emisji fotonowych z układów biologicznych, *PWN Warszawa*, 1989, str. 5-6
- [16] www.chemicool.com
- [17] Fremont L.: Biological effects of resveratrol, *Life Sciences*, 1999, str. 664
- [18] Šmidrkal J.; Filip, V.; Melzoch K.; Hanzlíková I.; Buckiová D.; Křísa B.: *Chemické Listy* 95, str. 602-609
- [19] Bradamante S.; Berenghi L.; Villa A.: Cardiovascular protective effects of resveratrol, *Neva Press*, 2004, str. 171
- [20] Delmas D.; Aires V.; Limagne E.; Dutartre P.; Mazue F.; Ghirighelli F.; Latruffe N.: Transport, stability and biological activity of resveratrol, *Annals of The New York Academy of Sciences*, 2011, str. 48-50
- [21] Sweighert N.; Zehnder A. J. B.; Eggen R. I. L.: Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from organisms to mammals, *Environmental Microbiology*, 2001, str. 81-86
- [22] Lee. J; Koo N.; Min D. B.; Reactive oxygen species, aging and antioxidative nutraceuticals, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2004, str. 30
- [23] Pereira P.; Oliveira P. A.; Anderghy P.; Rotta L.; Heriques J. A. P.; Picada J. N.: Neuropharmacological analysis of caffeic acid in rats, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2006, str. 374-375

- [24] Laranjinha J.; Cadenas E.; Redox cycles of caffeic acid, α -tocopherol and ascorbate: Implication for protection of low-density-lipoproteins against oxidation, *Life*, 1999, str. 57-59
- [25] Torreggiani A.; Jurasekova Z.; Sanchez-Cortes S.; Tamba M.: Spectroscopic and pulse radiolysis studies of the antioxidant properties of (+)catechin: metal chelation and oxidizing radical scavenging, *Journal of Raman Spectroscopy*, 2008, str. 265-266
- [26] Draelos Z. D.; Skin lightening preparations and the hydroquinone controversy, *Dermatologic Therapy*, 2007, str. 308-310
- [27] Ohnishi M.; Matsubara T.: Complex formation between sugarligands and catechols: Studies of the fluorescence titration with TNS and its effect on the polyphenol oxidase-catalysed browning reaction, *Starch*, 1996, str. 233
- [28] Giotto R. C. T.; Lavarda L. C.; Ferreira F. J. B.; Antioxidant Activity of Flavonols, *International Journal of Quantum Chemistry*, 2002, str. 950
- [29] Ryan L.; Prescott S. L.; Stability of the antioxidant capacity of twenty-five commercially available fruit juices subjected to an in vitro digestion, *International Journal of Science Food & Technology*, 2010, str. 1193