UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra fyzikální chemie

CHEMILUMINISCENČÍ STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITY LIPOFILNÍCH LÁTEK

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce: **Andrea Šmídová**

Studijní obor: **Management v chemii**

Vedoucí práce: **doc. RNDr. Jan Hrbáč, Ph.D.**

Olomouc 2013

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Jana Hrbáče, Ph. D. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne.....

……..

podpis

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu, panu doc. RNDr. Janu Hrbáčovi, Ph. D., za jeho velikou trpělivost a pomoc při řešení potíží při vypracování zadané bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat panu Davidovi Jirovskému Ph. D. za poskytnuté materiály o lupině.
Poděkování rovněž patří paní doc. RNDr. Taťjaně Nevěčné, CSc. za její vstřícný přístup a pomoc při řešení studijních problémů.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Andrea Šmídová
Název práce:	Chemiluminiscenční stanovení antioxidační kapacity lipofilních látek
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Jan Hrbáč
Rok obhajoby práce:	2013
Abstrakt:	Cílem této práce je ověření chemiluminiscenční metody využívající CTAB pro stanovení antioxidační aktivity lipofilních antioxidantů v reálných vzorcích. Pro solubilizaci metody bylo využito katioaktivního tenzidu cetyltrimethylamoniumbromidu CTAB a organického pufru Bis-tris (Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan)-HCl. Tyto látky zvyšují intenzitu chemiluminiscence luminolu, která je vyvolaná rozkladem peroxidu vodíku katalyzovaného chloridem kobaltnatým. V této práci byly srovnány antioxidační kapacity extra panenského olivového oleje Franz Josef, extra panenského olivového oleje Monini, lupinového oleje, slunečnicového oleje Heliol, slunečnicového oleje Budget, řepkového oleje Varoma a olivového oleje pokrutinového Penny.

Klíčová slova: Antioxidanty, rostlinné oleje, Lupinový olej

Počet stran: 48

Počet příloh: 0

Jazyk: čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname:	Andrea Šmídová
Title:	Chemiluminescence determination of antioxidant capacity of lipophilic compounds
Type of thesis:	Bachelor
Supervisor:	doc. RNDr. Jan Hrbáč
The year of presentation:	2013
Abstract:	The thesis aims to verify the chemiluminiscence method, which utilises CTAB for the determination of antioxidant activity of lipophilic antioxidants in real specimen. Cationic tenzide cetyltrimethylamoniumbromide CTAB is capable to solubize lipophilic antioxidants and in the presence of organic buffer Bis-tris (Bis(2-hydroxyethyl)ammine-tris(hydroxymethyl)methan)-HCl the intensity of chemiluminiscence of induced by the decomposition of hydrogen peroxide catalysed by cobalt (II) chloride is markedly incereased. The thesis compares the antioxidant strength of Franz Josef olive oil, Monini extra virgin olive oil, lupine oil, Heliol sunflower oil, Budget sunflower oil, Varoma rapeseed oil and Penny oilseed cake olive oil.

Keywords: antioxidants, vegetable oils, lupine

Number of pages: 48

Number of appendices: 0

Language: Czech

Obsah

1 ÚVOD 9
2 TEORETICKÁ ČÁST 11
2.1 Reaktivní formy kyslíku a dusíku 12
2.1.1 Vznik reaktivních forem kyslíku 13
2.1.2 Volné radikály 13
2.1.3 Negativní vliv ROS 14
2.2 Antioxidanty 14
2.2.1 Antioxidanty rozpustné v hydrofilním prostředí 15
2.2.2 Antioxidanty rozpustné v hydrofilním i lipofilním prostředí 16
2.2.3 Antioxidanty rozpustné v lipofilním prostředí 17
2.3 Celková antioxidační kapacita 19
2.3.1 Metody stanovení antioxidační kapacity 19
2.3.2 Metody stanovení antioxidační kapacity lipofilních vzorků 23
2.4 Rostlinné oleje a lupina 26
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 27
3.1 Použité chemikálie, přístrojové vybavení 28
3.2 Příprava zásobních roztoků 29
3.3 Popis průběhu experimentů při měření antioxidační aktivity 30
3.4 Výsledky a zpracování 31
4 ZÁVĚR 40
5 SUMMARY 42
6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 44

1 ÚVOD

Antioxidanty jsou skupinou látek, které jsou schopné zpomalit či úplně zabránit oxidační destrukci látek, které mají za úkol chránit. Antioxidanty působí proti tzv. volným radikálům, a to i v relativně nízkých koncentracích I přesto, že volné radikály v nízkých koncentracích v organismu zaujímají různé důležité funkce, vysoká hladina volných radikálů, je pro buňku velmi nebezpečná a vede k tzv. oxidačnímu stresu a může vést až ke smrti buňky. Oxidační stres je stav, kdy volné radikály v organismu mnohonásobně převažují nad antioxidanty a organismus již není schopen volné radikály zneškodnit.

Existuje celá řada metod, kterými lze stanovit antioxidační kapacitu. Mezi nejzákladnější patří metoda FRAP, ORAC nebo TEAC. Dále existuje i řada metod založených na inhibici chemiluminiscence (CL). Uvedenými metodami se analyzují převážně vzorky obsahující antioxidanty rozpustné ve vodě. Po stanovení lipofilních vzorků se metody musejí modifikovat.

Cílem této práce je ověření chemiluminiscenční metody využívající CTAB pro stanovení antioxidační aktivity lipofilních antioxidantů v reálných vzorcích. Pro solubilizaci lipofilních antioxidantů bylo využito kationaktivního tenzidu cetyltrimethylamoniumbromidu (CTAB) v přítomnosti organického pufru Bis-tris (Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan)-HCl. Zvyšuje intenzitu chemiluminiscence luminolu, která je vyvolaná rozkladem peroxidu vodíku katalyzovaného chloridem kobaltnatým. Jako reálné vzorky byly v této metodě použity různé druhy rostlinných olejů. Zvláštní pozornost byla věnována lupinovému oleji.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Reaktivní formy kyslíku a dusíku

Reaktivní formy kyslíku označovány také jako ROS (reactive oxygen species) jsou částice odvozené od molekulárního kyslíku. Ve srovnání s molekulárním kyslíkem jsou ale tyto částečně redukované či aktivované deriváty kyslíku velmi reaktivní či dokonce toxické. Zahrnují tzv. volné radikály a látky neradikálové povahy. ROS jsou produkty fyziologických procesů uvnitř buněk a tkání. Reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species) jsou částice odvozené z oxidu dusnatého. Dělí se také na radikály a látky neradikálové povahy. Přehled nejdůležitějších ROS a RSN je dále shrnut v (Tab.1) [1].

Reaktivní formy kyslíku			
Volné radikály		**Látky neradikálové povahy**	
Superoxidový radikál	$O_2^{\bullet -}$	Singletový kyslík	$^1O_2$
Hydroxylový radikál	$OH^{\bullet}$	Ozón	O_3
Hydroperoxylový radikál	$HO_2^{\bullet}$	Kyselina chlorná	$HClO$
Peroxylový radikál	$ROO^{\bullet}$	Peroxid vodíku	H_2O_2
Alkoxylový radikál	$RO^{\bullet}$		
Reaktivní formy dusíku			
Volné radikály		**Látky neradikálové povahy**	
Oxid dusnatý	$NO^{\bullet}$	Kyselina dusitá	HNO_2
Oxid dusičitý	$NO_2^{\bullet}$	Oxid dusitý	N_2O_3
		Peroxynitrit	$ONOO^-$
		Alkylperoxynitrit	$ROONO^-$
		Chlorid nitrilu	NO_2Cl

Tab. 1 reaktivní formy kyslíku a dusíku

2.1.1 Vznik reaktivních forem kyslíku

Molekulární kyslík je poměrně málo reaktivní vzhledem k jeho elektronové konfiguraci. Aktivace kyslíku probíhá absorpcí dostatečné energie konkrétně 22 kJ mol^{-1}, která je potřebná k tomu, aby se obrátil spin na jednom z nepárových elektronů. Energie je získána přenosem excitační energie světelných kvant pigmenty fotosyntetického reakčního centra. Následně vznikne singletní kyslík, který je v porovnání s molekulovým kyslíkem velmi reaktivní [2]. Singletní kyslík přenáší svoji energii buď na jiné biologické molekuly, nebo s nimi reaguje za vzniku hydroperoxidů [3]. Dále reaktivní formy kyslíku vznikají jednoelektronovou redukcí kyslíku ve čtyřech základních fázích. Reakce probíhají exotermicky. Následující fáze jsou shrnuty do jedné reakce

$$H_2O_2 + O_2^{\bullet -} \rightarrow OH^- + OH^\bullet + O_2 \qquad (1)$$

V první fázi vzniknou superoxidové radikály okolo buňky. Ve vodném prostředí jsou tyto radikály v rovnováze s hydroperoxylovým radikálem ($O_2^{\bullet -} + H_2O \rightarrow HO_2^\bullet + OH^-$). Oba radikály jsou velmi reaktivní a způsobují peroxidaci lipidů buněk, dokonce způsobují zeslabení či poškození buněčné membrány. Radikály jsou velmi nestabilní a rychle se mění na peroxid vodíku. Peroxid vodíku je relativně stabilní látka, která je schopná difundovat do větší vzdálenosti od místa vzniku [4].

2.1.2 Volné radikály

Jako volné radikály jsou označovány molekuly případně molekulové fragmenty, obsahující ve svém atomu či molekulovém obale jeden či více nepárových elektronů. Kvůli tomu jsou radikály nestálé, extrémně reaktivní. Volné radikály mohou vznikat homolytickým štěpením kovalentní vazby, kdy každý fragment získá jeden elektron. Dále volné radikály vznikají jednoelektronovou redukcí, kdy molekula přijímá elektron či oxidací kdy molekula ztrácí elektron [2]. Typický je pro radikály také řetězový průběh reakcí, kdy radikál napadá jinou molekulu. Molekula se ztrátou elektronu mění na radikál, původní radikál zaniká. K zastavení reakce dojde při setkání dvou radikálů nebo vzniku dvou radikálů. Tímto procesem může být pozměněno velké množství molekul. Jedná se o reakci, která zahrnuje celou řadu kroků, z nichž každý tvoří volný radikál, který spouští další krok. Existují tři fáze řetězové reakce: iniciace, propagace a terminace [1]. Iniciační fáze zahrnuje tvorbu volných

radikálů. Propagační fáze zahrnuje reakci radikálu s molekulou a její změnu na radikál. Terminační fáze jsou ty reakce, které mají za následek snížení počtu radikálů. Nejčastěji se jedná o reakci dvou radikálů za vzniku molekuly [6].

2.1.3 Negativní vliv ROS

Na rozdíl od molekulárního kyslíku jsou redukované nebo aktivované deriváty kyslíku velmi reaktivní a toxické. Hlavní příčinou toxicity reaktivních forem kyslíku je jejich schopnost zahájit řetězovou reakci, která vede k produkci hydroxylového radikálu a dalších destruktivních druhů. Ty mohou způsobit poškození DNA, bílkovin, lipidovou peroxidaci či mohou vést až k poškození buněčných struktur. Z toho důvodu vyvinuly aerobní organismy obranný antioxidační systém. Obecně platí, že na zvýšenou tvorbu reaktivních forem reaguje organismus zvýšenou tvorbou antioxidantů. Jestliže je ale porušena rovnováha mezi tvorbou ROS či RNS a obranným antioxidačním systémem, vzniká tzv. oxidační stres. Jedná se o stav, kdy reaktivní částice v organismu mnohonásobně převažují nad antioxidanty, což způsobí, že organismus není schopen reaktivní formy zneškodnit a eliminovat [4].

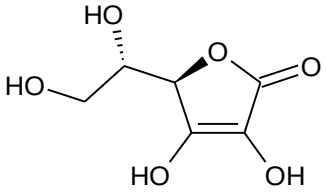
2.2 Antioxidanty

Antioxidanty reagují s vysoce reaktivními formami kyslíku či dusíku. Jsou obecně definovány jako látky, které jsou schopné zpomalit či úplně zabránit oxidační destrukci látek, které mají za úkol chránit. A to i v nízkých koncentracích v porovnání s reaktivními druhy [6]. Antioxidanty se mohou vyskytovat na různých místech v rámci buňky, v membráně, nebo extracelulárním prostoru [7]. Antioxidační ochrana je velmi důležitá, protože způsobuje přímé odstranění ROS. Antioxidanty se dělí na enzymatické či neenzymatické. Enzymatické antioxidanty se dále dělí na enzymy, které regenerují redukované formy antioxidantů a enzymy, které interagují s reaktivními formami kyslíku, kde patří superoxidismutáza, kataláza či glutathion peroxidáza. Každá eukaryotická buňka v organismu obsahuje silný enzymatický antioxidant. Mezi neenzymatické antioxidanty zahrnujeme kyselinu askorbovou, tokoferoly, karotenoidy, thioly (glutathion, thioredoxin a kyselina lipoová), flavonoidy, melatonin a další

sloučeniny. Některé antioxidanty se rozpouští v hydrofilním prostředí (kyselina askorbová, kyselina močová a výše zmíněné thioly) a některé v lipofilním prostředí (karotenoidy, tokoferoly) [8]. Zvláštní skupinou jsou fenolické sloučeniny, které mohou v rostlinných tkáních sloužit jako potencionální antioxidanty [9].

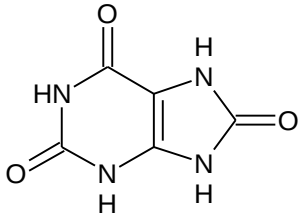
2.2.1 Antioxidanty rozpustné v hydrofilním prostředí

Kyselina askorbová (2,3-endiol-laktonu kyseliny 2-oxo-L-gulonové). Je to nestálá látka, která se velmi snadno oxiduje na kyselinu dehydroaskorbovou (DHA) (Obr.1). Tvoří bezbarvé, ve vodě rozpustné krystaly. Kyselina askorbová se nachází ve vysokých koncentracích v mnoha rostlinných buňkách především v chloroplastech. Hodně rozšířená je i v organismu, kde se nachází například v buňkách, tkáních. Kyselina askorbová je jeden z nejsilnějších antioxidantů. Za antioxidační vlastnosti je primárně zodpovědný vodík v hydroxylové skupině kyseliny askorbové. Má schopnost předávat elektron během řady enzymatických a neenzymatických reakcí, je to hlavní lapač ROS ve vodní fázi. [10].



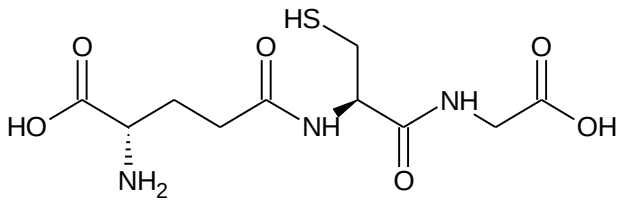
Obr. 1 kyselina askorbová

Kyselina močová (2,4,6-trioxypurin) (Obr. 2) je bezbarvá krystalická látka. Je odvozena od purinových bází adeninu a guaninu. Dlouhou dobu byla považována pouze za odpadní látku. Později se zjistilo, že kyselina močová je výborným antioxidantem lidské plazmy [11].



Obr. 2 kyselina močová

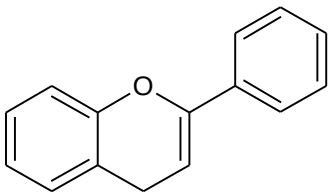
Glutathion je tripeptid složený ze tří druhů aminokyselin (kyseliny glutamové, cysteinu a glycinu). Aminokyseliny dohromady tvoří tripeptid s chemickým názvem glutamyl-cysteil-glycin. Jeho hlavní řetězec tvoří thiol. Glutathion (Obr. 3) se nachází v rostlinných tkáních a buněčných organelách jako například v endoplazmatickém retikulu, vakuole a mitochondrii. Jeho hlavním úkolem je ochrana bílkovin obsahujících SH skupiny, které jsou pro jejich funkci nezbytné. Volný glutathion se vyskytuje v redukované formě jako GSH, která se přemění během oxidačního stresu na oxidovatelnou formu GSSG [12].



Obr. 3 glutathion

2.2.2 Antioxidanty rozpustné v hydrofilním i lipofilním prostředí

Flavonoidy jsou nízkomolekulární polyfenolické sloučeniny. Flavonové jádro se skládá ze dvou benzenových jader propojených O-heterocyklem (2H-pyranem). Flavonové jádro je tedy složeno dohromady z 15 atomů uhlíku. Heterocyklické kruhy bývají substituovány hydroxyskupinami či methoxyskupinami. Jednotlivé deriváty se od sebe liší stupněm substituce a oxidace. Některé flavonoidy jsou rozpustné v hydrofilním a některé v lipofilním prostředí [29]. Flavonoidy mají schopnost jak přímo zhášet ROS, tak i inhibovat enzymy zapojené v různých oxidačních procesech jako je xanthinoxidasa či NADPHoxidasa [14] nebo naopak zvyšovat aktivitu antioxidačních enzymů jako katalasa, superoxiddismutasa, glutathionperoxidasa či glutathionreduktasa [15].



Obr.4 základní struktura flavonoidů

Flavonoidy dělíme na flavanoly, flavony, isoflavony, flavoly, antokyany, flavanony, katechiny, chalkony a aurony. Mezi flavanoly patří katechin, epikatechin,

Katechin patří do skupiny flavanolů (flavon-3-ol). Nachází se ve vysokých koncentracích v listech čajovníku, ale také v červeném víně. Katechin je hydrofilní povahy [16].

Kvercetin (pentahydroxyflavon) patří do skupiny flavonolů. Nachází se ve vysokých koncentracích v rostlinách. Vyskytuje se především vázaný s glykosidickou jednotkou na třetí pozici nenasyceného heterocyklického kruhu jako hyperon, isokvercetin či rutin. Kvercetin je výborný hydroantioxidant. Za antioxidační vlastnosti zodpovídá struktura kvercetinu. V rámci flavonoidů, se kvercetin považuje za nejúčinnější čistič ROS. Kvercetin dokáže snižovat sekreci protizánětlivých cytokinů a tím zabraňuje buněčné smrti apoptóze [17].

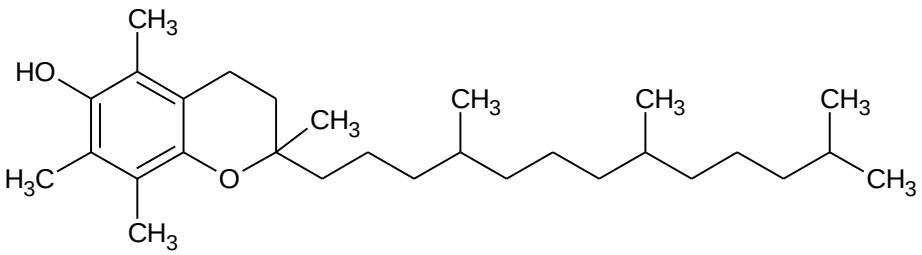
Rutin (kvercetin-3-rhamnoglukosid) je přírodní flavonový derivát, který je obsažen v rostlinách, především v pohance seté. Je to glykosid odvozený od kvercetinu, známý také jako vitamín P. Jedná se o významný antioxidant, velmi důležitý pro organismus. V organismu působí protizánětlivě, antihypertenzně, zvyšuje pružnost cévních stěn, reguluje srážlivost krve a také množství cholesterolu v krvi. Kromě toho také zvyšuje imunitní systém [18].

Kyselina gallová (3,4,5-trihydroxybenzoová kyselina) se získává kyselou hydrolýzou taninů. Kyselina gallová je substituovaná různými atomy uhlíku na postranním řetězci za vzniku esterů kyseliny gallové, které mají odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti. Liší se zejména svojí rozpustností v lipofilní fázi. Estery kyseliny gallové, zejména alkylové estery, jsou pro organismus prospěšnější než samotná kyselina gallová. Například syntetický ester složený z osmi či více atomů uhlíku v postranním řetězci je efektivnější, zabraňuje vzniku virů a plísní [19].

2.2.3 Antioxidanty rozpustné v lipofilním prostředí

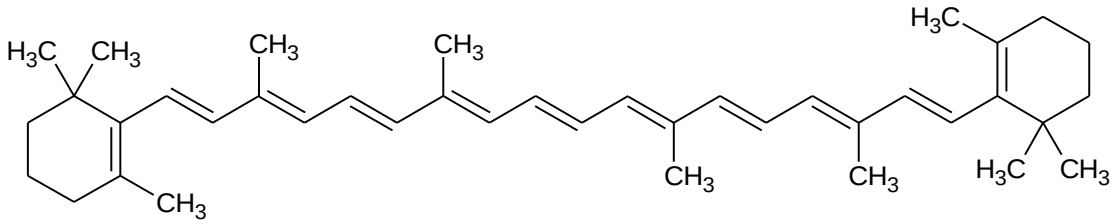
Tokoferoly jsou za normálních podmínek bezbarvé nebo slabě žluté viskózní oleje. Nachází se ve všech částech rostlinné buňky. V tylakoidní membráně chloroplastů mají enzymatickou i neenzymatickou funkci. Mimo jiné zabraňují destruktivnímu neenzymovému působení molekulárního kyslíku na dvojné vazby nenasycených mastných kyselin vázaných

v tkáňových lipidech [20]. Struktura tokoferolů (Obr. 4) je tvořena z hlavního chromanového kruhu a postranního hydrofóbního fytylového řetězce, který zapříčiňuje nerozpustnost ve vodě. Existují čtyři tokoferolové isomery (α-, β-, γ-, δ-). α-tokoferol vykazuje nejvyšší antioxidační aktivitu v důsledku přítomnosti tří methylových skupin, které jsou navázány na chromanový kruh. Relativní antioxidační aktivita tokoferolových izomerů in vivo je v důsledku počtu methylových skupin připojených na fenolový kruh následující: α > β > γ > δ [21]. α -tokoferol neboli 5´,7‘8´-trimethyltokol.



Obr. 5 α-tokoferol

Karotenoidy jsou pigmenty rostlin, hub, řas, mikroorganismů a živočichů. Poskytují intenzivní žlutou, oranžovou či červenou barvu. Jejich barva a také antioxidační vlastnosti jsou způsobené přítomností konjugované dvojné vazby systému v molekulách. Karotenoidy jsou z chemického hlediska polyenové uhlovodíky syntetizovány z osmi izoprenových jednotek, které odpovídají řetězci o 40 atomech, uhlíku. Hlavní řetězec některých karotenoidů obsahuje na obou koncích cyklickou skupinu. Tyto cyklické skupiny mohou být nahrazeny funkčními skupinami obsahující kyslík. Na základě jejich složení jsou karotenoidy rozděleny do dvou tříd, na karotenoidy obsahující pouze uhlíkové a vodíkové atomy (např. α-karoten, β-karoten (Obr. 5), lykopen) a tzv. oxokarotenoidy nebo-li xantofyly, které mají ve své struktuře alespoň jeden atom kyslíku [22]. Xantofyly dále dělíme na hydroxykarotenoidy (lutein, zeaxantin) nebo ketokarotenoidy (např. asthaxanthin, kanthaxanthin) v závislosti na tom, zda obsahující kyslíkový substituent je hydroxyl či keton [23].



Obr. 6 β-karoten

2.3 Celková antioxidační kapacita

Celková antioxidační kapacita měří schopnost vzorku biologického materiálu eliminovat radikály. Metody, které jsou stanoveny pro měření celkové antioxidační kapacity biologických vzorků, jsou označovány jako takzvané inhibiční metody týkající se reaktivních druhů kyslíků a dusíku. Celková antioxidační kapacita je tedy míra, jakou jsou antioxidanty schopné eliminovat volné radikály, nebo také schopnost antioxidantů odolávat oxidačnímu stresu. Celková antioxidační kapacita byla zavedena pro vzájemné porovnávání antioxidačních účinků různých směsí látek. Antioxidační kapacita se obvykle vyjadřuje srovnáním účinku antioxidantů s předem daným množstvím standardu. Antioxidační kapacita se dále udává jako látkové množství příslušného standardu, kterým může být například trolox nebo kyselina askorbová, na určitou hmotnost či objem vzorku. V oblasti chemické analýzy a biologického hodnocení jakosti rostlinných produktů byly v posledních letech vypracovány četné metody, které umožňují stanovit tzv. celkovou antioxidační aktivitu vzorku (TAC tj. total antioxidant capacity). Metody TAC jsou principiálně navzájem značně odlišné, postupně se vyvíjejí jejich různé modifikace [26]. V praxi jsou nejčastěji používanými metodami TEAC (ABTS), ORAC, FRAP, DPPH, TRAP.

2.3.1 Metody stanovení antioxidační kapacity

Metoda TEAC

Metoda TEAC patří mezi základní metody pro stanovení celkové antioxidační kapacity. TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) byla vyvinuta Millerem a kol. [24]. Později byla upravena Re a kol. [25]. Jedná se o metodu, která je založená na principu zhášení uměle připraveného stabilního radikálového kationtu (2,2.-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát) ($ABTS^{\bullet+}$). Z toho důvodu je též někdy označována jako metoda ABTS. V reakční směsi se kation-radikál $ABTS^{\bullet+}$ vytváří oxidací ABTS (Obr.6). Antioxidanty vystupují jako donory vodíku.

Původní metoda $ABTS^{\bullet+}$, která byla vyvinuta v Randox laboratoři v San Francisku, je tvořena vzájemným působením ABTS s ferrylmyoglobinem, který je generován reakcí peroxidázou (metmyoglobinu) s H_2O_2. Při vlastním experimentálním měření se používají dva

postupy. Nejpoužívanější způsob je metoda, při které se antioxidant přidává k již vygenerovanému radikálu $ABTS^{\bullet+}$. V druhém případě se přidává antioxidační činidlo do reakční směsi, která slouží ke generaci radikálu. Dále je zjišťováno, jak moc je zpomalována generace. Zhášení radikálu s látkou, která má antioxidační účinky je sledováno spektrofotometricky na základě změn absorčního spektra $ABTS^{\bullet+}$ při vlnové délce 660, 734 a 820 nm. Metoda se nazývá TEAC z toho důvodu, že výsledná aktivita vzorku je srovnávána s antioxidační aktivitou syntetické látky standardu Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), Trolox je rozpustný analog vitamínu E. Dále je znázorněn mechanismus reakce [26].

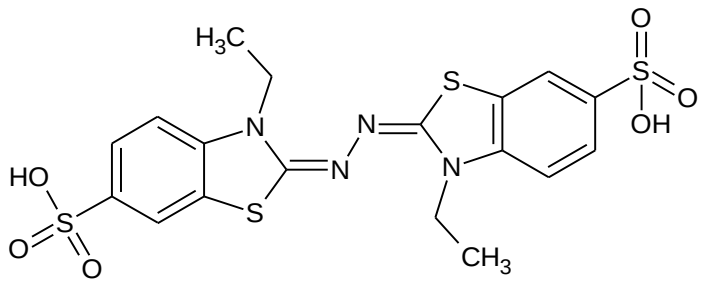
Mechanismus reakce:

$$HX\text{-}Fe^{3+} + H_2O_2 \rightarrow X\text{-}\ [FE^{4+}= O] + H_2O \qquad (2)$$

$$ABTS\bullet + X - [Fe^{4+}=O] \rightarrow ABTS^{+}\bullet + HX - Fe^{3} \qquad (3)$$

$HX\text{-}Fe^{3+}$ …metmyoglobin

$X - [Fe^{4+}=O]$ …ferrylmyoglobin



Obr. 7 ABTS

Metoda ORAC

Metodu ORAC (oxygen radical absorbance capacity) vyvinul Cao a kol. v roce 1993 [26]. Principem metody ORAC je zhášení antioxidační kapacity, která je vyvolaná peroxylovým radikálem 2,2´-azobis(2-amidinopropan)dihydrochloridem (AAPH) při teplotě 37 °C. Při měření celkové antioxidační kapacity je sledován úbytek fluorescence na základě

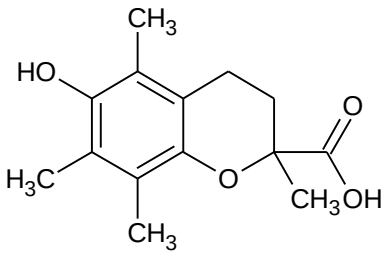
vhodného fluorescenčního indikátoru jako je například β-fykoeritrin. β-fykoeritrin je protein získaný z ruduchy porphyridium cruentum. Reakce s peroxylovým radikálem AAPH způsobuje ztrátu fluorescence. Antioxidační kapacita se měří stanovením plochy fluorescenční křivky rozpadu vzorku v porovnání se slepým vzorkem, kde není přítomen žádný antioxidant. V systému se generují kyslíkové radikály a hodnotí se schopnost zpomalit či úplně zastavit radikálovou reakci. V roce 2001 Ou a kol. [30] představil fluorescein (3‘,6‘-dihydroxyspiro[isobenzofuran-1[3*H*],9‘[9*H*]-xanthen]-3-on) jako spolehlivější indikátor metody ORAC. Z toho důvodu se upustilo od používání β-fykoerytrinu. Výsledky jsou standardizovány pomocí srovnávání s troloxem, což je hydrofilní derivát vitamínu E.

$$R{-}N{=}N{-}R + O_2 \rightarrow N_2 + 2ROO^{\bullet} \quad (4)$$

$$ROO^{\bullet} + \text{fluorescein} \rightarrow ROOH + \text{ztráta fluorescence} \quad (5)$$

$$ROO^{\bullet} + AH \rightarrow ROOH + A^{\bullet} \quad (6)$$

$$ROO^{\bullet} + A^{\bullet} \rightarrow ROOA \quad (7)$$

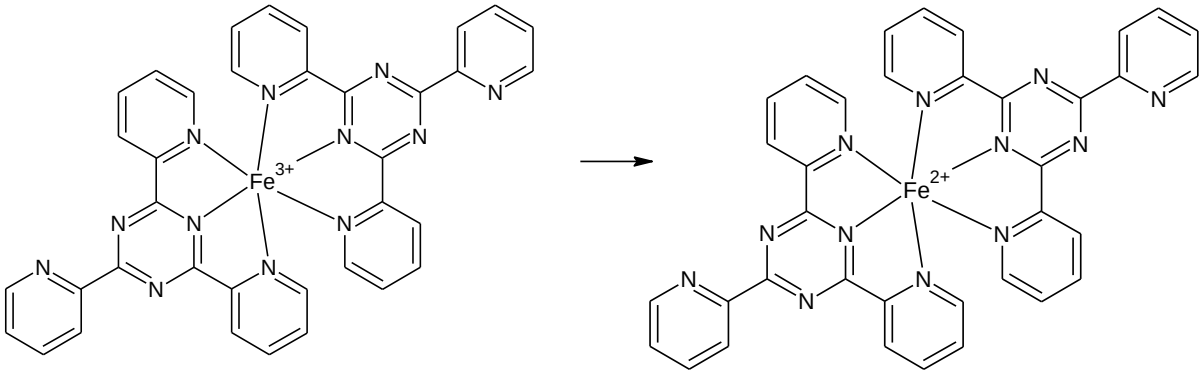


Obr. 8 Trolox

Metoda FRAP

Metoda FRAP (ferric reducting antioxidant potential), kterou vytvořil Benzie a Strain [29], je založena na principu redoxní reakce, tj. na redukci železitých komplexů. Konkrétně se jedná o reakci, kdy z komplexu tripyridyltriazinželezitého (Fe^{3+}-TPTZ) (Obr.5), který je téměř bezbarvý, vzniká komplex tripyridyltriazinželeznatý (Fe^{2+}-TPTZ) vytvářející barevné produkty, které jsou zbarveny do modré barvy s absorpčním maximem 593 nm. K tomu, aby bylo možné přesně změřit redukční sílu, musí být splněny následující podmínky. Všechny

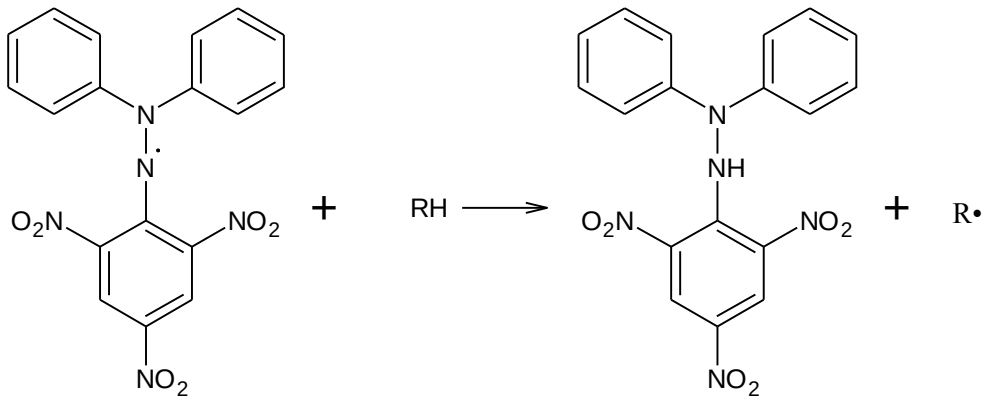
antioxidanty musí být schopné redukovat Fe^{3+}-TPTZ, dále reakční rychlost musí probíhat dostatečně rychle v krátkém časovém úseku, oxidující antioxidant a vedlejší produkty reakce by neměly mít absorpci větší než Fe^{2+}-TPTZ.



Obr. 9 Redukce bezbarvého komplexu Fe(III)-TPTZ na modrý Fe(II)-TPTZ

Metoda DPPH

Metoda DPPH (difenyl pikrylhydrazyl) byla poprvé popsána Bloisem v roce 1958 [31]. V roce 1995 Brand-Williams, Cuvelier a Berset [32]. poupravili původní metodu a $DPPH^{\bullet}$ se stala velmi oblíbenou metodou pro měření celkové antioxidační kapacity. Metoda DPPH je založena na reakci testované látky se stabilním syntetickým volným dusíkovým radikálem $DPPH^{\bullet}$ (1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl), který je kvůli své struktuře akceptorem atomu vodíku. Z toho důvodu během reakce dochází k redukci radikálu a vzniká tak DPPH-H (difenylpikrylhydrazin). Metoda DPPH je sledována pomocí UV/VIS spektrometru při vlnové délce 517 nm, kde se sleduje úbytek absorbance, přičemž dochází k odbarvování tmavě fialového roztoku DPPH radikálu vlivem antioxidačních látek obsažených ve vzorku. Tmavě fialová barva je způsobena přítomností nepárového elektronu na dusíku hydrazilu. Metodu lze měřit také pomocí ESR (elektronová spinová rezonance), neboť právě tato metoda je schopná přímo určit koncentraci volných radikálů.



Obr. 10 Struktura DPPH a jeho redukce antioxidantem RH

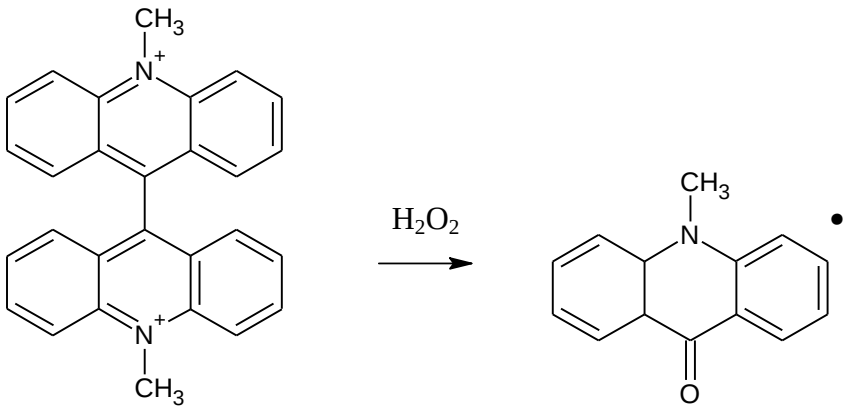
Metoda TRAP

Metoda TRAP (Total Radical-trapping Antioxidant Parameter), kterou vyvinul Wayner a kol. [27], je nejrozšířenější metodou pro měření antioxidační kapacity v plazmě. Je to luminometrická (chemiluminiscenční) metoda. Měří přímo antioxidační kapacitu proti peroxylovému radikálu. Metoda je založena na termální dekompozici ABAP (2,2-azobis-(2-aminodinopropan)hydrochlorid), který produkuje peroxylové radikály při konstantní rychlosti.

2.3.2 Metody stanovení antioxidační kapacity lipofilních vzorků

Metoda využívající chemiluminiscenci

Triantis a kol. [33] navrhli metodu, která popisuje citlivý a jednoduchý postup pro měření celkové antioxidační kapacity v olivovém a slunečnicovém oleji ve vodném methanolickém extraktu. Tato metoda využívá chemiluminiscenci. K měření se používá chemiluminiscenční látka lucigenin, alkalický peroxid vodíku a olejový extrakt. Když chemiluminiscence dosáhne maxima, přidá se vzorek s antioxidanty, což způsobí snížení emise světla. Olivový olej vykazuje větší antioxidační aktivitu než slunečnicový olej. Vyjádření antioxidační kapacity se provádí na základě srovnání s předem připraveným standardem kyseliny kávové [33].



Obr. 11 Cl reakce lucigeninu

Metoda ABTS/HPR odbarvení roztoku

Metodu ABTS [24] navrhnul Cano a kol. [35]. Pro stanovení antioxidační kapacity u lipofilních vzorků se použila reakční směs ABTS, H_2O_2 a HRP (křenová peroxidáza) v čistém ethanolu. Metoda zahrnuje generaci $ABTS^{\bullet+}$ peroxidázou, přidání antioxidantu a získání konečné hodnoty absorbance. Měření je vyhodnoceno jako rozdíl hodnot absorbance na začátku měření, kdy A= 730 nm a na konci měření (po uplynutí doby 5 minut). Jako standard je použit trolox.

Metoda ORAC použitelná pro lipofilní vzorky

Prior a kol. [26] poupravili metodu ORAC, aby byla použitelná jak pro lipofilní, tak i hydrofilní vzorky. Extrakce vzorku se pro lipofilní část provádí přidáním hexanu do vzorku. Následně se směs odstředí v centrifuze. Vzniklý lipofilní extrakt je vysušen pomocí tekutého dusíku a znovu rozpuštěn ve směsi voda/acetát, obsahující 7% β–cyclodextrin. Standard trolox se přidá do již připraveného roztoku voda/acetát. Do každého vzorku se přidá určité množství v předem daném rozmezí. Tím se vytvoří kalibrační standardy. Titrační destička se vzorky se vloží do fluorimetru a inkubuje se při konstantní teplotě 37 °C, po dobu 120 minut. Současně je inkubován i fosfátový pufr. Po uplynutí stanovené doby je do fosfátového pufru přidán AAPH, titrační destička je také vyndána a co nejrychleji je do jamek napipetován roztok AAPH. Fluorescence se měří při excitační vlnové délce A= 485 nm a emisní vlnové délce A= 510 nm. K vyhodnocení měření se používá časový průběh vyhasínání

fluorescence. Plocha mezi křivkami slepého vzorku a vzorku s obsahem antioxidantů odpovídá antioxidační kapacitě [36].

Chemiluminiscenční metoda s využitím Luminolu

Outila a kol. [37] navrhli mechanismus chemiluminiscenční metody, která je vyvolaná přidáním luminolu (hydrazid kyseliny 3-aminoftalové) do reakční směsi. Reakční směs obsahuje zdroj volných radikálů, luminol ve fosfátovém pufru či glycinu. Reakční směs se inkubuje při teplotě 21 °C. Luminol detekuje peroxilové radikály, které vznikají termickým rozkladem (2,2-azobis-(2-aminodinopropan)hydrochlorid) při konstantní rychlosti. Dále se pomocí luminometru změří signál. Poté, co se do vzorku přidají antioxidanty, dojde k následnému vychytávání peroxidových radikálů a ke snížení chemiluminiscenčního signálu. Po vyčerpání antioxidantů z reakce se signál opět zvýší. Celková antioxidační kapacita je doba, po kterou je vzorek schopný vychytávat radikály [38].

Metoda FRAP pro lipofilní vzorky

Dragland a kol. [39] poupravili původní metodu FRAP, aby byla co nejvíce použitelná pro hydrofilní a lipofilní antioxidanty. Vzorky jsou homogenizovány. Dále se provádí extrakce vzorků přidáním roztoků voda/metanol, voda/2-propanol a 2-propanol do vzorků. Celkový obsah antioxidantů se měří v každém rozpouštědle zvlášť. Pro měření se použije přístroj Technicon RA 1000. Měření se provádí při vlnové délce 600 nm. Inkubuje se při konstantní teplotě 37 °C po dobu 4 minut. Jako standard se použije vodný roztok heptahydrát síranu železnatého. Výsledky měření čistých sloučenin se uvádí jako množství redukovaných sloučenin Fe^{3+}-TPTZ, konkrétně μmol Fe^{2+}-TPTZ/μmol sloučenin [40].

Metoda DPPH pro lipofilní vzorky

V této metodě byly použité synteticky připravené antioxidanty BTA, BTH, dále karotenoidy a α-tokoferol. Před samotným měřením se látky rozpustí v roztoku ethanol/ n-hexan. Měření se provádí v triplikátech ve čtyřech odlišných koncentracích. Následně se spektrofotometricky stanoví celková antioxidační kapacita testované látky se stabilním

syntetickým volným dusíkovým radikálem DPPH$^{\bullet}$. Metoda DPPH [32] je zvláštní tím, že nedokáže přímo detekovat antioxidační aktivitu žádného karotenoidu. Vykazuje pouze antioxidační aktivitu synteticky připravených látek BHA, BHT a α-tokoferolu. Mendez-Robles a kol. zjistili nízkou antioxidační aktivitu u apokarotenoidů ditaxinu a heteranthinu ve srovnání s β-karoten a lykopenem. Aby se látky daly změřit, musí být namíchány ve vysokých koncentracích s methanolem (až 1500 μM) [41].

2.4 Rostlinné oleje a lupina

Rostlinné oleje jsou tvořeny triacylglyceroly. Získávají se z olejových semen (slunečnice, řepka olejná), z ořechů, některých druhů ovoce (olivy či avokádo), ale také z luštěnin (sója). Rostlinné oleje jsou lisovány z olejnatých semen a dužin plodů a dále průmyslově zpracovávány různými technologickými procesy. V závislosti na technologii výroby olejů se určuje konečná kvalita olejů.

Olivový olej obsahuje zdraví prospěšné nenasycené mastné kyseliny a také přírodní antioxidanty jako tokoferoly, karotenoidy, steroly a fenolové sloučeniny (oleuropein, hydroxytyrosol, tyrosol). Všechny tyto látky vykazují významné antioxidační účinky. Tyto antioxidační účinky jsou v závislosti na způsobu zpracování zachovány či zničeny. Mezi nejkvalitnější olivové oleje patří extra panenské olivové oleje, které jsou lisovány za studena. Tyto olivové oleje se vyrábí z prvního lisování a neprochází žádnou chemickou úpravou [42].

Slunečnicový olej se získává ze slunečnicových semen. Obsahuje kyselinu linolovou a nepatrné množství kyseliny α-linolenové. Je bohatý na nenasycené mastné kyseliny.

Řepkový olej se získává z řepky olejné. Je významným zdrojem kyseliny α-linolenové.

Zvláštním typem olejů je nepochybně lupinový olej, který je doposud málo prozkoumaný. Lupinový olej se získává z lupinových semen. V lupinových semenech se vyskytují látky, které mají antioxidační vlastnosti. Mezi tyto látky patří především polyfenoly (taniny), flavonoidy a karotenoidy. Lupina je dobrým zdrojem bílkovin, cukrů, lipidů, minerálů a vitamínů. Lupinová semena obsahují mimo jiné i α-galaktosidy. Tyto látky mají negativní dopad na fyziologické funkce [43].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem mé práce je ověření chemiluminiscenční metody využívající systém CTAB-BisTris-$CoCl_2$ [42] pro stanovení antioxidační aktivity lipofilních antioxidantů v reálných vzorcích. Pro solubilizaci lipofilních antioxidantů bylo využito již zmíněného kationaktivního tenzidu cetyltrimethylamoniumbromidu (CTAB). CTAB v přítomnosti organického pufru Bis-tris (Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan)-HCl zvyšuje intenzitu chemiluminiscence luminolu, která je vyvolaná rozkladem peroxidu vodíku katalyzovaného chloridem kobaltnatým.

3.1 Použité chemikálie, přístrojové vybavení

Látka	**Výrobce**	**M (g/mol)**	**Čistota**
Trolox	Fluka	250,32	98%
α-tokoferol	Sigma	430,72	95%
Roztok peroxidu vodíku (3%)	Fluka	34,02	
Luminol (sodná sůl)	Sigma	199,15	
Hexahydrát chloridu kobaltnatého	Lachema	237,05	p.a.
Kys. chlorovodíková	Penta	36,45	p.a.
Bis-Tris	Fluka	209,24	99%
CTAB	Fluka	364,46	99%
Methanol	Lachema	32,04	p.a.

Tab. 1. Chemikálie

Jako lipofilní reálné vzorky byly použity následující jedlé oleje- extra panenský olivový olej Franz Josef (Španělsko), extra panenský olivový olej Monini Classico (Itálie),

lupinový olej, slunečnicový stolní olej Heliol Palma (Slovensko) a slunečnicový stolní olej Budget (Polsko), řepkový olej Varoma (Česká republika), olivový olej pokrutinový Penny (Polsko).

Použité přístroje a vybavení

Měření chemiluminiscence bylo prováděno na přístroji Fluoroskan Ascent Fl (Thermo Labsystems), který umožňuje měření luminiscence a fluorescence v mikrotitračních destičkách s 96 jamkami. Nástřik reakční složky je v rozsahu 5-1000 µl. Přístroj je připojený k počítači a řízený programem Ascent. Pro rozpuštění lipofilních vzorků byl použit ultrazvuk Ultrasonic Compact Cleaner (Powersonic). Pro měření pH pufru Bis-Tris byl využitý pH metr ISFET IQ125 (miniLab).

3.2 Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztok pufru Bis-Tris byl připraven v deionizované vodě. Na přípravu 0,025 M roztoku o pH 8 je třeba 1,0462 g pevného Bis-Trisu, který se následně rozpustí v minimálním množství vody a pomocí HCL byl roztok upraven na požadované pH. Po úpravě pH byl roztok doplněn deionizovanou vodou na 200 ml.

1 M zásobní roztok CTAB byl připraven navážením 1,8273 g látky a rozpuštěním v deionizované vodě. CTAB je za normální pokojové teploty ve vodě špatně rozpustný, proto zásobní roztok musel být zahříván na teplotu minimálně 30 °C, což je tzv. Krafftova teplota. Při dosažení teploty 30 °C dochází ke snadnému rozpuštění molekul CTAB a vznikají micely.

Dále byl namíchán zásobní roztok chloridu kobaltnatého o koncentraci $2{,}5 \cdot 10^{-4}$ mol/l navážením 0,0059 g a doplněním deionizovanou vodou do 100 ml.

Zásobní roztok troloxu o koncentraci 1 mmol/l byl připravený navážením $6{,}3 \cdot 10^{-3}$ g troloxu, který byl následně rozpuštěný v 1 ml methanolu a doplněný do 25 ml deionizovanou vodou. Zásobní roztok o koncentraci 1 mmol/l α-tokoferolu byl připraven navážením $10{,}8 \cdot 10^{-3}$g a rozpuštěn v minimálním množství zásobního roztoku CTAB. Pro snadnější rozpuštění α-tokoferolu byl roztok CTAB zahřátý na 30 °C a vložený do ultrazvukové lázně. Po rozpuštění byl doplněn roztokem CTAB do 25 ml a neustále zahříván na Krafftovu teplotu. Vzorky olejů byly zředěny v poměru 1:1 se zahřátým roztokem CTAB a následně rozpuštěny v ultrazvukové lázni.

Zásobní roztok luminolu o koncentraci $3{,}85 \cdot 10^{-4}$ mol/l byl připraven navážením $7 \cdot 10^{-4}$ g luminolu a doplněním do 10 ml deionizovanou vodou.

Zásobní roztok chemiluminiscenční směsi byl připraven každý den čerstvý a to smícháním 500 µl 3% zásobního roztoku peroxidu vodíku s 218 µl roztoku luminolu o koncentraci $3{,}85 \cdot 10^{-4}$ mol/l . Směs se doplnila do 50 ml deionizovanou vodou.

Látka	**Zásobní koncentrace (mol/l)**	**Výsledná koncentrace v jedné jamičce při experimentu (mol/l)**
Bis-Tris	0,025	0,005
CTAB	0,1	0,01
Chlorid kobaltnatý	2,50E-04	2,50E-05
Luminol	3,85E-04	1,00E-05
Peroxid vodíku	0,882	1,00E-05

Tab. 2. Výsledné koncentrace složek chemiluminiscenční směsi

3.3 Popis průběhu experimentů při měření antioxidační aktivity

Při samotném měření se do jamky mikrotitrační destičky napipetuje z předem připravených zásobních roztoků reakční směs, která obsahuje 50 µl pufru Bis-Tris, 25 µl CTAB, 25 µl $CoCl_2$ a 20 µl vzorku. V případě hydrofilní látky troloxu se zásobní roztok dále naředí do každé jamky deionizovanou vodou tak, aby bylo dosaženo odlišných koncentrací. V případě lipofilních vzorků je postup složitější. Do každé jamky se přidá odlišné množství látky CTAB a vzorku tak, aby bylo zachováno původní množství CTAB 25 µl a zároveň aby byla u každého vzorku odlišná koncentrace. Pro zachování stejného celkového objemu jak u hydrofilního vzorku, tak i u lipofilních vzorků se do lipofilních vzorků přidává 20 µl deionizované vody. V přístroji dojde k nástřiku chemiluminiscenční směsi 130 µl do každé jamky. Celkový objem směsi, připadající na každou jamku, činí 250 µl.

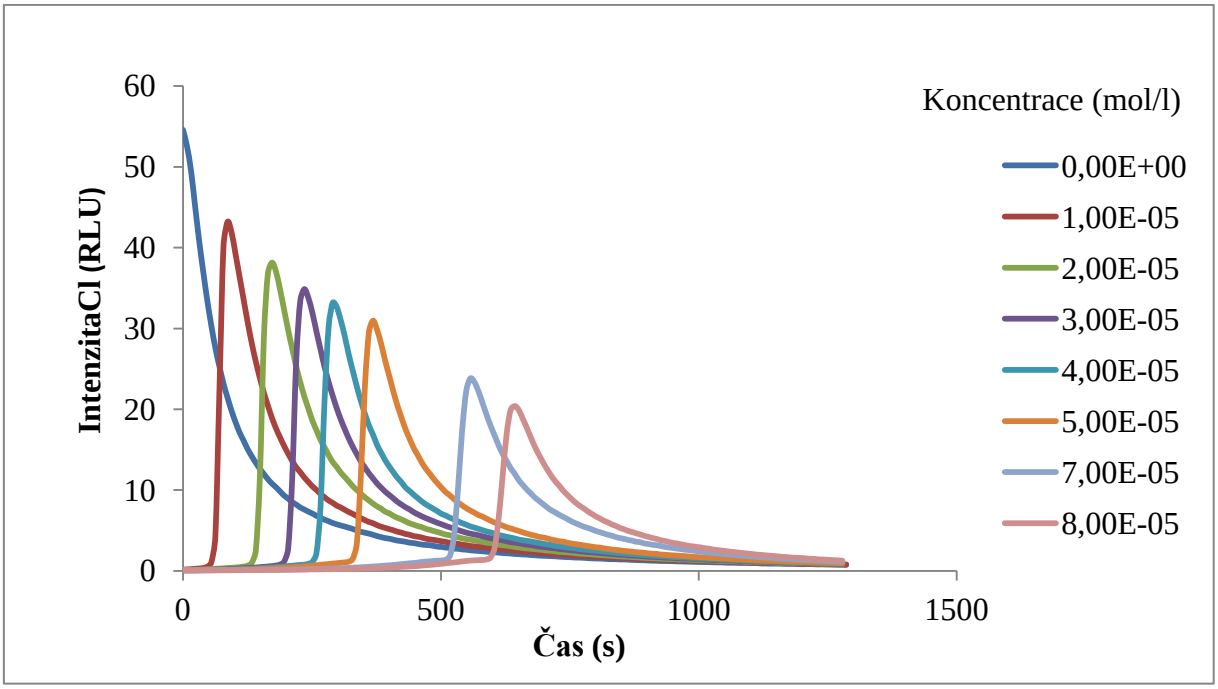
Parametry a podmínky měření byly nastaveny prostřednictvím PC software Ascent. Přístroj je vybaven dvěma dávkovači pro nástřik reagentů. Teplota byla nastavena na 25 °C. Nástřikové čerpadlo měřícího zařízení je připraveno k použití po propláchnutí 5 ml destilované vody a poté 5 ml chemiluminiscenční směsi. Před každým dalším měřením je nutné propláchnout čerpadlo nejméně 1 ml chemiluminiscenční směsi. Měření je prováděno po řádcích. Objem nástřiku chemiluminiscenční směsi činí 130 µl směsi, doba třepání je 10 s, doba integrace 500 ms. V následující tabulce (Tab. 3.) jsou uvedeny hodnoty výsledných objemů standardů a lipofilních reálných vzorků v jedné mikrotitrační destičce.

Koncentrace standardů při měření	**Objem reálných vzorků v µl**
Trolox + α-tokoferol	
0,00E+00	0
1,00E-05	0,64
2,00E-05	1,25
3,00E-05	1,5
4,00E-05	1,75
5,00E-05	2,0
7,00E-05	2,25
8,00E-05	25

Tab. 3. objemy standardů v mikrotitrační destičce při měření

3.4 Výsledky a zpracování

Vycházela jsem z diplomové práce Ondřeje Tunky [42], kde bylo zjištěno, že v micelární fázi CTAB nastává intenzivní chemiluminiscence luminolu při iniciaci směsí kobaltnaté soli a peroxidu vodíku, pokud je v reakční směsi použitý pufr BIS-TRIS. Kationaktivní tenzid CTAB je mimo jiné také schopný solubilizovat i ve vodě nerozpustné antioxidanty. Výsledky jsou zpracovány v programu MS-EXCEL. Z následujícího grafu (graf 1.) je zřejmé, že přítomnost antioxidantů ve vzorku způsobuje časové zpoždění nástupu chemiluminiscence.



Graf 1. Závislost intenzity chemiluminiscence v čase pro reakční směs luminol-H_2O_2-$CoCL_2$-Bis-tris v přítomnosti různých koncentrací Troloxu.

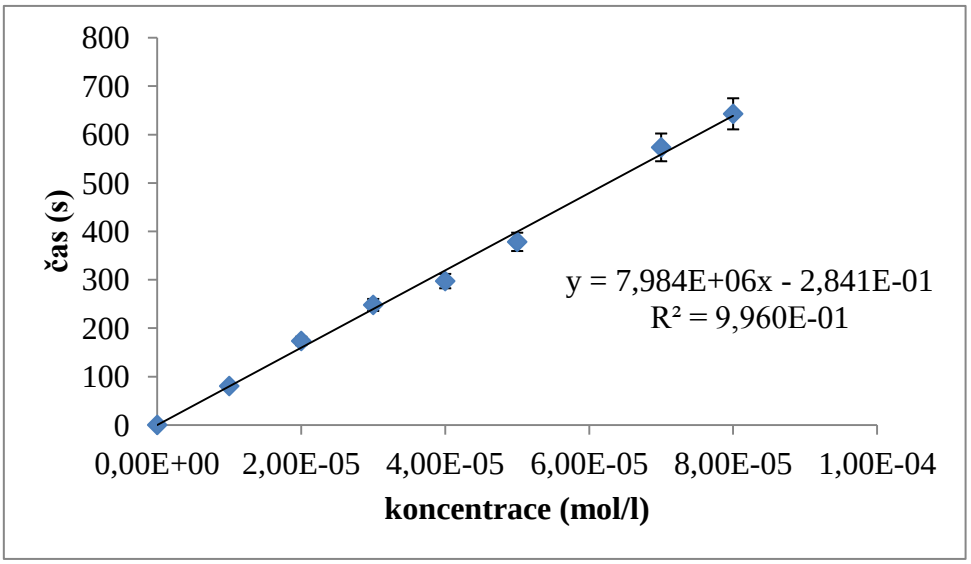
Chemiluminiscenční reakce mohou mít různý průběh i kinetiku. Tyto dva faktory jsou ovlivněny přítomností různých antioxidantů v reakční složce. Křivka 0,00E+00 znázorňuje kinetiku CL reakce, kde není přítomný žádný antioxidant. V ostatních křivkách je znázorněn průběh chemiluminiscenční reakce v přítomnosti různě koncentrovaných antioxidantů. Čím větší koncentrace antioxidantů v reakční směsi, tím větší doba zpoždění nástupu chemiluminiscence.

Při měření zpoždění chemiluminiscence může dojít k hrubé chybě, která může výrazně ovlivnit antioxidační kapacitu. Z toho důvodu je třeba takovou chybu odhalit a z měřených hodnot vyloučit, k čemuž slouží tzv. Grubbsův test. Pomocí tohoto testu byly dále vyloučeny nežádoucí hodnoty, které jsou v následujících tabulkách vyznačeny červeně. Tyto hodnoty nebyly zahrnuty do celkového hodnocení.

Trolox

Koncentrace (mol/l)	Zpoždění nástupu CL (s)								Aritmetický průměr	Směrodatná Odchylka
0,00E+00	0	0	0	0	0	0	0	0		
1,00E-05	78,4	78,39	78	78,4	78,4	78,39	78	78,9	78,36	0,2639
2,00E-05	172,42	172,42	172,8	172,43	172,42	172,42	172,8	172,44	172,52	0,1625
3,00E-05	250,85	250,8	250,8	250,83	250,81	250,81	250,84	250,9	250,83	0,0316
4,00E-05	297,8	300	297,85	297,82	297,8	297,81	297,85	300	298,37	0,9434
5,00E-05	376,18	376,18	376,2	376,19	376,18	376,18	376,2	376,17	376,19	0,01
7,00E-05	580,0	580,5	572,48	580,01	580	580	572,48	572,49	577,25	3,6917
8,00E-05	642,73	642,3	642,7	642,75	642,73	642,73	642,7	643,19	642,73	0,2232

Tab. 4 Zpoždění chemiluminiscence při stanovení antioxidační kapacity troloxu

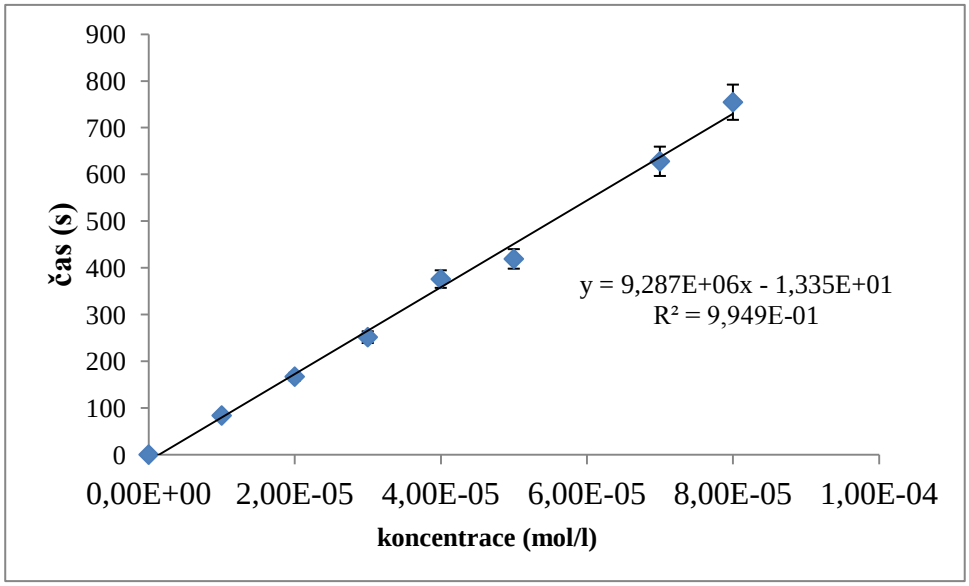


Graf 2. Vliv různých koncentrací troloxu na zpoždění chemiluminiscence

α-tokoferol

Koncentrace (mol/l)	Zpoždění nástupu CL (s)								Aritmetický průměr	Směrodatná Odchylka
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,00E-05	83,65	83,66	83,65	83,67	83,67	83,68	83,69	83,68	83,67	0,0136
2,00E-05	167,33	165,51	165,52	167,33	167,32	167,33	167,33	167,34	166,88	0,7859
3,00E-05	251,02	251,01	251,01	251,01	252,85	251,01	251,02	252,85	251,47	0,7953
4,00E-05	376,54	374,84	374,7	376,55	376,54	376,55	374,37	376,56	375,83	0,9331
5,00E-05	418,37	418,7	418,04	420,21	420,61	418,9	418,89	418,38	419,01	0,8566
7,00E-05	627,65	627,67	627,62	627,62	627,35	**630,5**	627,51	627,49	627,56	0,1062
8,00E-05	753,49	**760,37**	755,34	753,24	753,3	753,27	753,28	753,3	753,60	0,7131

Tab. 5 Zpoždění chemiluminiscence při stanovení antioxidační kapacity α-tokoferolu

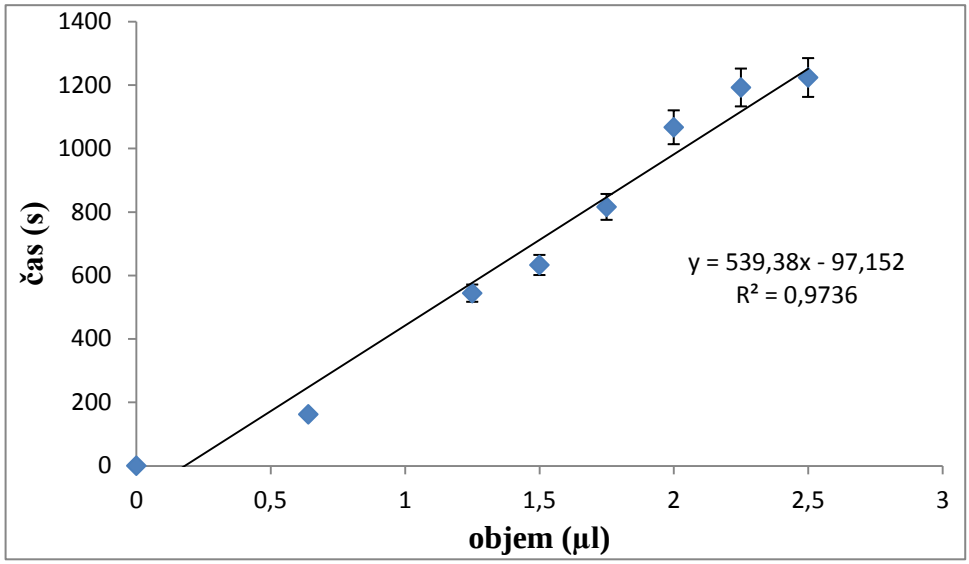


Graf 3. Vliv různých koncentrací α-tokoferolu na zpoždění chemiluminiscence. Metoda by měla být prakticky stejně citlivá pro trolox a tokoferol a to z důvodu toho, že trolox je hydrofilní analog α-tokoferolu. Podle výsledných směrnic u tokoferolu a troloxu, je zřejmé, že při měření došlo k drobné chybě v důsledku špatného měření či rozpuštění troloxu.

Extra panenský olivový olej značky Monini

Objem vzorku (µl)	Zpoždění nástupu CL (s)								Aritmetický průměr	Směrodatná Odchylka
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,64	**178,17**	188,81	188,82	188,8	188,1	188,2	188,7	188,83	188,60	0,2939
1,25	533,31	533,67	533,32	545,67	533,32	533,32	545,67	533,67	536,49	5,2998
1,5	628,79	627,43	628,8	628,78	627,05	628,76	628,78	627,43	628,23	0,7242
1,75	815,64	815,64	815,65	815,63	815,64	815,64	815,65	815,64	815,64	0,0059
2	1066,56	1066,57	1066,57	1066,56	1066,56	1066,56	1066,56	1066,57	1066,56	0,0048
2,25	1192,01	1192,01	1192	1191,99	1191,99	1192	1191,98	1192,01	1192,00	0,0105
2,5	1223,37	1223,38	1223,37	1223,38	1223,38	1223,38	1223,38	1223,4	1223,38	0,0086

Tab. 6 Zpoždění chemiluminiscence při stanovení antioxidační kapacity extra panenského olivového oleje Monini

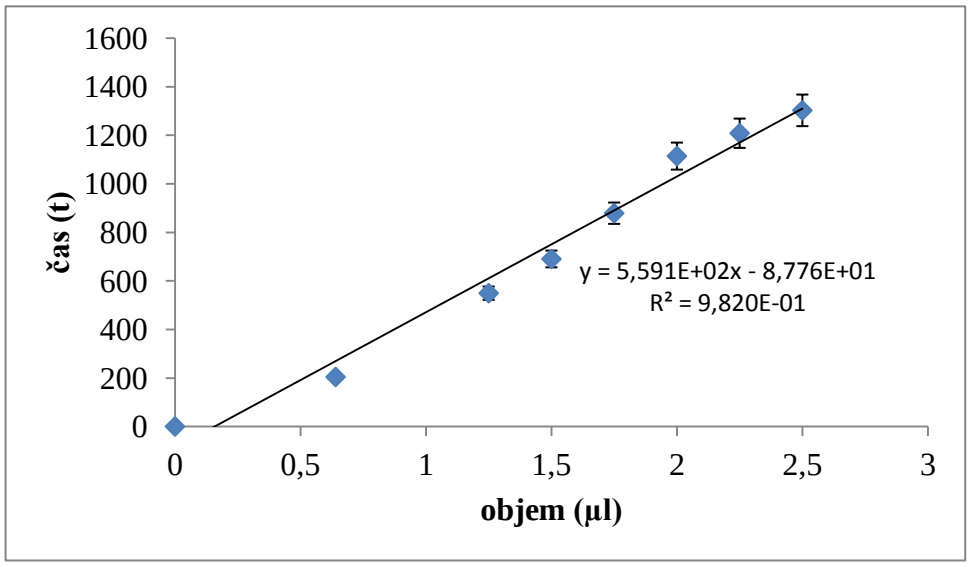


Graf 4. Vliv různých objemů extra panenského olivového oleje značky Monini na zpoždění chemiluminiscence.

Extra panenský olivový olej Franz Josef

Objem vzorku (µl)	Zpoždění nástupu CL (s)								Aritmetický průměr	Směrodatná Odchylka
0	0	0	0	0	0	0	0	0		
0,64	203,92	203,92	203,91	203	208,25	203,91	203,9	203,9	188,60	0,2939
1,25	549	549,01	549,02	549,01	549	549,02	549,02	549,02	536,49	5,2998
1,5	690,17	690,16	690,17	690,16	690,17	690,16	690,16	690,17	628,23	0,7242
1,75	878,55	878,53	878,53	878,53	878,5	878,53	878,53	878,54	815,64	0,0059
2	1113,8	1113,8	1113,8	1113,8	1113,8	1113,81	1113,8	1113,8	1066,56	0,0048
2,25	1207,95	1207,98	1207,97	1207,98	1207,98	1207,98	1207,98	1207,98	1192,00	0,0105
2,5	1302,16	1302,16	1302,16	1302,15	1302,16	1302,16	1302	1303	1223,38	0,0086

Tab. 7 Zpoždění chemiluminiscence při stanovení antioxidační kapacity extra panenského olivového oleje Franz Josef

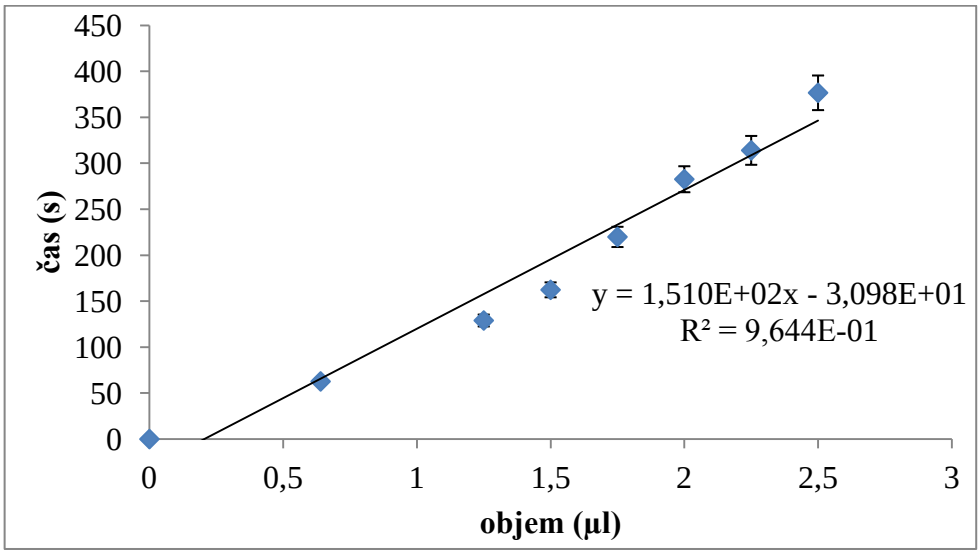


Graf 5. Vliv různých objemů extra panenského olivového oleje značky Franz Josef na zpoždění chemiluminiscence.

Lupinový olej

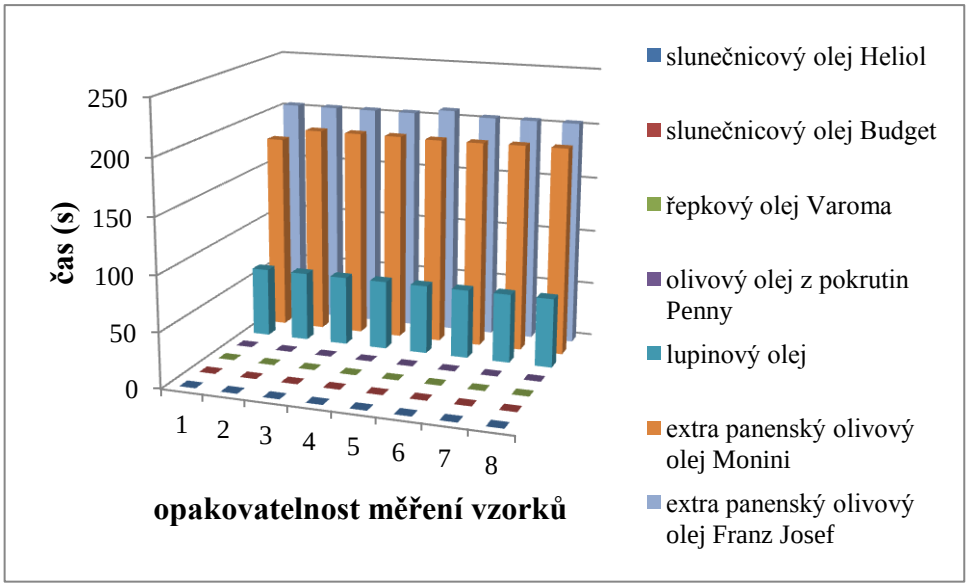
Objem vzorku (µl)	Zpoždění nástupu CL (s)								Aritmetický průměr	Směrodatná Odchylka
0	0	0	0	0	0	0	0	0		
0,64	62,81	62,81	62,81	62,22	63,22	62	63,13	62,81	204,34	1,50804
1,25	**157,02**	125,64	125,63	125,63	124,63	127,02	137,63	137,02	549,01	0,00829
1,5	168,44	157,02	157,02	168,43	170,44	166,44	157,02	154,4	690,17	0,00500
1,75	219,83	219,86	219,86	219,83	219,83	220,8	**230,8**	219,83	878,53	0,01323
2	282,72	282,72	282,75	282,75	282,75	282,76	282,76	282,72	1113,80	0,00331
2,25	314,15	314,15	314,15	**314,17**	314,15	314,15	314,15	314,15	1207,98	0,01000
2,5	376,97	376,36	376,98	376,98	376,38	**388,38**	376,99	376,97	1302,24	0,29051

Tab. 8 Zpoždění chemiluminiscence při stanovení antioxidační kapacity lupinového oleje



Graf 6. Vliv různých objemů lupinového oleje na zpoždění chemiluminiscence.

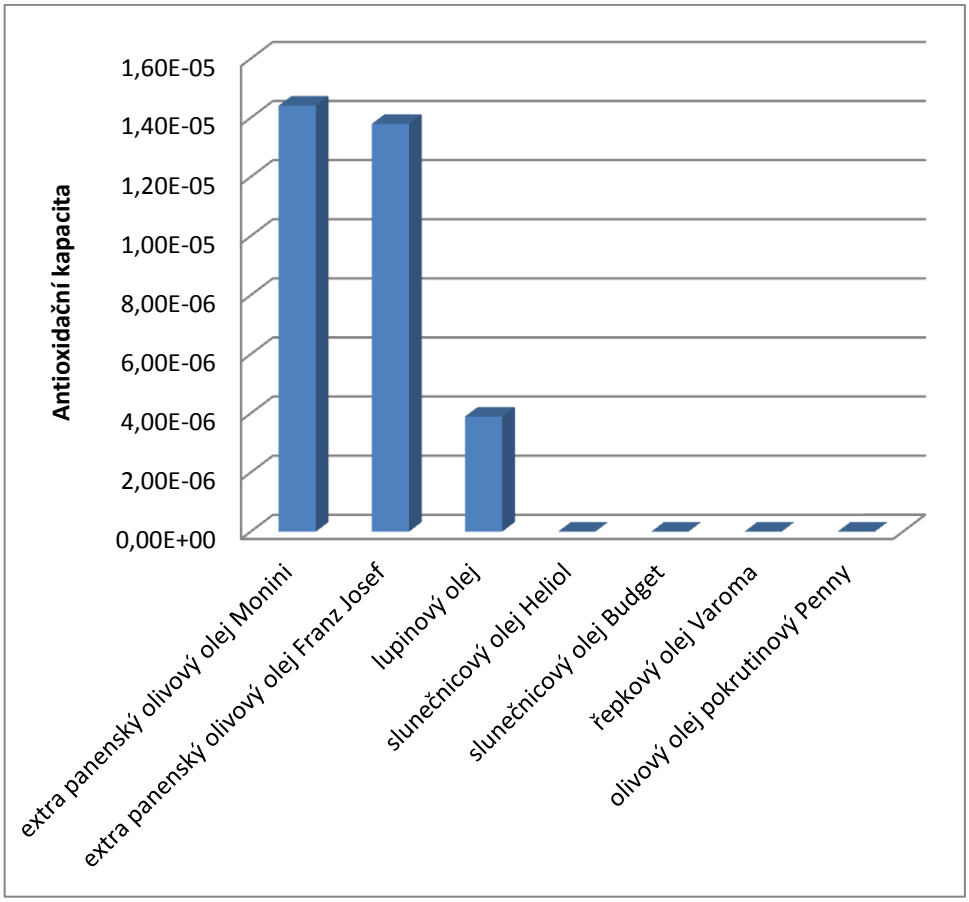
Byla také měřena antioxidační aktivita u reálných vzorků slunečnicového oleje Heliol, slunečnicového oleje Budget, řepkového oleje Varoma a olivového oleje pokrutinového Penny. U žádného ze vzorků nebyla prodleva pozorována.



Graf. 7 Srovnání chemiluminiscenčního zpoždění reálných vzorků olejů o objemu 0,64µl vzorku v reakční směsi.

antioxidační kapacita	
extra panenský olivový olej Monini	1,44E-05
extra panenský olivový olej Franz Josef	1,38E-05
lupinový olej	3,89E-06
slunečnicový olej Heliol	0,00E+00
slunečnicový olej Budget	0,00E+00
řepkový olej Varoma	0,00E+00
olivový olej pokrutinový Penny	0,00E+00

Tab. 9 Antioxidační kapacita



Graf. 7 Srovnání antioxidační kapacity reálných vzorků jedlých olejů.

4 ZÁVĚR

Chemiluminiscenční metoda založená na CL luminolu s využitím systému H_2O_2-CTAB-BisTris-$CoCl_2$ byla aplikována pro měření antioxidační kapacity vybraných jedlých olejů. Metoda byla nejdříve ověřena několika měřeními na standardech troloxu a α-tokoferolu. Jelikož tokoferol je lipofilní analog troloxu, měly by oba standardy vykazovat stejnou antioxidační aktivitu. Podle výsledných směrnic u tokoferolu a troloxu, je zřejmé, že při měření došlo k drobné chybě v důsledku špatného měření či rozpuštění troloxu. Dále byla testována antioxidační aktivita olejů, jako jsou extra panenský olivový olej Franz Josef (Španělsko), extra panenský olivový olej Monini Classico (Itálie), lupinový olej, slunečnicový stolní olej Heliol Palma (Slovensko) a slunečnicový stolní olej Budget (Polsko), řepkový olej Varoma (Česká republika), olivový olej pokrutinový Penny (Polsko). Nejlepší, téměř stejnou antioxidační kapacitu vykazovaly extra panenský olivový olej Franz Josef a olivový olej Monini Classico. Tyto oleje jsou lisované za studena, vyrábí se z prvního lisování a neprochází žádnou chemickou úpravou. Obsah antioxidantů v těchto olejích proto zůstává zachován. Lupinový olej vykazoval nižší antioxidační aktivitu ve srovnání s extra panenskými olivovými oleji. Slunečnicové stolní oleje nevykazovaly žádnou antioxidační aktivitu. K porovnání byl záměrně vybrán slunečnicový stolní olej Heliol, který je v potravinářském trhu preferován jako kvalitnější stolní olej, a méně kvalitní stolní olej Budget. Žádnou antioxidační aktivitu nevykazoval ani řepkový olej Varoma a ani olivový olej pokrutinový Penny, který je zbaven antioxidantů zřejmě v důsledku způsobu zpracování oleje.

5 SUMMARY

The validity of chemiluminiscence method based on luminol CL initiated by the CTAB-BisTris-$CoCl_2$-hydrogen peroxide system was first verified by several measurements of trolox and α-tocopherol. Since trolox is hydrophilic analog of tocopherol both tests should have indicate equal or at least similar antioxidant activity. The resulting data for tocopherol and trolox are sililar, although a small mistake due to incorrect measurements or dissolution trolox might have occured.Subsequently, the antioxidant activities of several edible oils were determined, namely Franz Josef olive oil (Spain), Monini Classico extra virgin olive oil (Italy), lupine oil, Heliol Palma sunflower oil (Slovakia), Budget sunflower oil (Poland), Varoma rapeseed oil (Czech republic), and Penny oilseed cake olive oil (Poland). Franz Josef olive oil Monini Classico olive oil demonstraded by far the strongest antioxidant capacities. Both are cold pressed, produced from the first squeeze, and are not subject to any chemical modifications. The net effect is that the whole content of antioxidants in these oils is conserved. Compared to extra virgin olive oils, lupine oil showed somewhat lower antioxidant activity. Sunflower oils did not generate any antioxidant activity at all. Deliberately selected were two distinct brands of these; Heliol, supposedly superior of the two, that enjoy a good reputation within the food industry; and Budget, allegedly the lesser oil of the duo. Varoma rapeseed oil exhibited no antioxidant activity whatsoever and nor did Penny oilseed cake olive oil, with the latter being deprived of antioxidants presumably as a result of its processing technique.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] Chaves M. M.; Rocha-Vieira E.; Pereira dos Reis A. Increase of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species generated by phagocyting granulocytes related to age. *Mech. Ageing Dev.*, 2000, 119, 1-8.

[2] Scandalios J.G.; Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. *Plant Pfysiol.*, 1993, 101, 7.

[3] Vranová E.; Inzé D.; Van Breusegem F. Signal transduction during oxidative stress. *J.Exp. Bot.*, 2002, 53, 1227-1236.

[4] Liu H.; Xiang B.; Qu. L.; Liu H.; Xiang B.; Qu. L. Structure analysis of ascorbic acid using near-infrared spectroscopy and generalized two-dimensional correlation spectroscopy. *J. Mol. Biol.*, 2006, 794, 12-17.

[5] Breusegem F.V.; Vranová E.; Dat J.F.; Inzé D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci.*, 2001, 161, 405-414.

[6] Chew B.P. Importance of antioxidant vitamins in immunity and health in animals. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 1996, 59, 103-114.

[7] Lönnrot K.; Metsä-Ketelä T.; Molnár G.; Ahonen J-P.; Latvala M.; Peltola J.;Pietilä T.; Alho H. The effect of ascorbate and ubiquinone supplementation on plasma and CSF total antioxidant capacity. *Free Radical Bio. Med.*, 1996, 21, 211-217.

[8] Sies H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.*, 1997, 82, 291-295.

[9] Blokhina O.; Virolainen E.; Fagerstedt K.V. Antioxidants, Oxidative damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals Bot-London*, 2003, 91, 179-194.

[10] Liu H.; Xiang B.; Qu. L.; Liu H.; Xiang B.; Qu. L. Structure analysis of ascorbic acid using near-infrared spectroscopy and generalized two-dimensional correlation spectroscopy. *J. Mol. Biol.* , 2006, 794, 12-17.

[11] Yao J. K.; Reddy R. , van Kammen D. P. Reduced level of plasma antioxidant uric acid in schizophrenia. *Psychiat. Res.*, 1998, 80, 29-39.

[12] Gill S.S.; Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Bioch.* 2010, 48, 909-930.

[13] Pietta P-G; Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.*, 2000, 63, 1035-1042.

[14] Lin J-K.; Chen P-C.; Ho C-T.; Lin-Shiau S-Y. Inhibition of Xanthine Oxidase and Suppression of Intracellular Reactive Oxygen Species in HL-60 Cells by Theaflavin-3,3′-digallate,(-)-Epigallocatechin-3-gallate, and Propyl Gallate. *Food Chem.*, 2000, 48, 2736−2743.

[15] Rajendran P.; Ekambaram G.; Sakthisekaran D. Cytoprotective Effect of Mangiferin on Benzo(a)pyrene-Induced Lung Carcinogenesis in Swiss Albino Mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 2008, 103, 137-142.

[16] Madhan B.; Krishnamoorthy G.; Raghava Rao J.; Nair B.U. Role of green tea polyphenols in the inhibition of collagenolytic activity by collagenase. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2007, 41, 16-22.

[17] Boots A.W.; Haenen G.R.M.M.; Bast A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *Eur J. Pharmacol*., 2008, 585, 325-337.

[18] Kurisawa M.; Chung J. E.; Uyama H.; Kobayashi S. Enzymatic Synthesis and Antioxidant Properties of Poly(rutin). *Biomacromolekules*, 2003, 4, 1394-1399.

[19] Locatelli C.; Filippin-Monteiro F. B.; Creczynski-Pasa T.B. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: A review. *Eur. J. Med. Chem*., 2013, 60, 233-239.

[20] Brigelius-Flohé R.; Traber M. G. Vitamin E: function and metabolism. *Faseb J.*, 1999, 13, 1145-1155.

[21] Yoshida Y.; Niki E.; Noguchi N. Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. *Chem. Phys. Lipids*, 2003, 123, 63-75.

[22] Stahl W. Sies H. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol. Aspects Med.*, 2003, 24, 345-351.

[23] Rodrı´guez L.P. Carotenoids in evolutionary ecology: re-evaluating the antioxidant role. *BioEssays*, 2009, 31, 1116-1126.

[24] Miller N. J.; Rice-Evans C.; Davies M. J.; Gopinathan V.; Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci*. 1993, 84, 407–412.

[25] Re R.; Pellegrini N.; Proteggente A.; Pannala A.; Yang M.;Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med*. 1999, 26, 1231–1237.

[26] Prior R.L.; Cao G. In vivo total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods. *Free Radical Bio. Med.*, 29, 1173-1181.

[27] Wayner D. D. M.; Burton G. W.; Ingold K. U. Locke S.Quantitative measurement of the total, peroxyl radical-trappingantioxidant capacity of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Lett*., 1985, 187, 33–37.

[28] Prior R.L.; Wu X.; Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Food Chem.*, 2005, 53, 4290-4302.

[29] Benzie I. F. F.; Strain J. J. Ferric reducing antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol. 1999, 299, 15-27,

[30] Ou B.; Huang D.; Hampsch-Woodill M.; Flanagan J.A. Deemer E.K. Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *Food Chem.*, 2002, 50, 3122-3128.

[31] Blois, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 1958, 181, 1199−1200.

[32] Brand-Williams W.; Cuvelier M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol*, 28, 25−30.

[33] Papadopoulos K.; Triantis T.; Yannakopoulos E.; Nikokavoura A.; Dimotikali D. Comparative studies on the antioxidant activity of aqueous extracts of olive oils and seed oils using chemiluminiscence., *J Amer Oil Chem Soc,* 2003, 494, 41–47.

[34] Navas M. J. Chemiluminescent method in Olive Oil Analysis. *J. Amer. Oil Chem Soc.* 2007, 84, 405-411.

[35] Arnao M. B.; Cano A.; Acosta M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem.*, 73, 239-244.

[36] Rautenbach F.; Venter I.; Hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity of commonly consumed South African fruits, vegetables, grains, legumes, fats/oils and beverages. *J. Food Compl.Anal.*, 2010, 23, 753-761.

[37] Uotila J.T.; Kirkkola A. L.; Rorarius M.; Tuimala R. J.; Metsä-Ketelä T.: The total peroxyl radical-trapping ability of plasma and cerebrospinal fluid in normal and preeclamptic parturients., *Free Radical Bio. Med.*, 1994, 16, 581-590.

[38] Lissi E.; Salim-Hanna M.; Pascual C.; Castillo M. D.; Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements., *Free Radical Bio. Med*, 1995, 18, 153-158.

[39] Dragland S.; Senoo H.; Wake K.; Holte K.; Blomhoff R. Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. *Journal of Nutrition*, 2003, 133, 1286–1290.

[40] Halvorsen B. T.; Blomhoff R. Validation of a quantitative assay for the total content of lipophilic and hydrophilic antioxidants in foods. *Food Chem.*,2011, 127, 761-768.

[41] Müller L.; Fröhlich K.; Böhm V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (TEAC), DPPH assay and peroxyl radical scavenging assay. *Food Chem.*, 2011, 129, 139-148.

[42] Kachouri F.; Hamdi M.; Enhancement of polyphenols in olive oil by contact with fermented olive mill wastewater by Lactobacillus plantarum. *Process Biochem*., 2004, 39, 841-845.

[43] Bojková K.; Studium fenolických kyselin a proteinového složení mouky z lupiny bílé (Lupinus albus L.), Univerzita Palackého v Olomouci 2010.

[44] Tunka O.; Vliv vybraných biologických pufrů na chemiluminiscenční reakce luminolu. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci 2006.