

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY DOPLŇKŮ STRAVY IN VITRO

IN VITRO STUDY OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FOOD SUPPLEMENTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

DOMINIKA VOPELKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

prof. Ing. LADISLAV OMELKA, DrSc.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0914/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Dominika Vopelková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901R021)	
Vedoucí práce	prof. Ing. Ladislav Omelka, DrSc.	
Konzultanti:	doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.	

Název bakalářské práce:

Studium antioxidační aktivity doplňků stravy in vitro

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracujte literární přehled k dané problematice
2. Popište použité metody hodnocení
3. Zpracujte naměřené výsledky z experimentů
4. Zhodnoťte získané výsledky formou diskuse

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Dominika Vopelková
Student(ka)

prof. Ing. Ladislav Omelka, DrSc.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá stanovením antioxidačních vlastností doplňků stravy in vitro. Teoretická část pojednává o legislativních požadavcích na doplňky stravy, o jejich charakteristice a rozdělení. Dále je pozornost věnována antioxidantům, jejich vlastnostem, účinkům, významu a využití. V samostatné kapitole jsou poté popsány byliny, které jsou základní složkou zkoumaných doplňků stravy, jejich účinky a vlastnosti. Pro experimentální část bylo vybráno několik suplementů v různých formách (kapsle, čaj, šťáva, sušené plody), u kterých byl stanoven celkový obsah polyfenolických látek pomocí UV-VIS spektroskopie. Dále byla kvantifikována celková antioxidační aktivita metodou DPPH za pomoci EPR spektroskopie u dvou vybraných doplňků stravy.

ABSTRACT

Bachelor thesis deals with the determination of antioxidant activity of food supplements in vitro. The theoretical part focuses on legislative requirements of food supplements, their characteristic and classification. Further, the attention is also devoted to antioxidants, their properties, effects, importance and utilization. Separate chapter describes herbs, which are an essential component of researched supplements, their effects and properties. For experimental part several food supplements in various forms (capsule, tea, juice, dried fruits) were chosen and total content of polyphenols was determined using the UV-VIS spectroscopy. Further, the total antioxidant activity is characterized by electron paramagnetic resonance involving DPPH method.

KLÍČOVÁ SLOVA

Doplňky stravy, antioxidační aktivita, polyfenoly, UV-VIS, EPR

KEY WORDS

Food supplements, antioxidant activity, polyphenols, UV-VIS, EPR

VOPELKOVÁ, D. *Studium antioxidační aktivity doplňků stravy in vitro*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 39 s. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Ladislav Omelka, DrSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

Podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu bakalářské práce prof. Ing. Ladislavu Omelkovi, DrSc. a doc. Ing. Jiřině Omelkové, CSc. za odborné vedení, ochotu, čas a cenné rady během zpracování bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Lence Butorové za čas, pomoc a cenné rady při zpracování experimentální části bakalářské práce.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Doplňky stravy	8
2.1.1	Požadavky na doplňky stravy.....	8
2.1.1.1	Požadavky na složení doplňků stravy	8
2.1.1.2	Označování doplňků stravy.....	8
2.1.2	Kategorie doplňků stravy	9
2.2	Antioxidanty	10
2.2.1	Klasifikace antioxidantů.....	10
2.2.1.1	Fenolové kyseliny a jejich deriváty	11
2.2.1.2	Flavonoidy	12
2.3	Byliny zastoupené v testovaných doplncích stravy	12
2.3.1	Maqui (<i>Arisotelia chilensis</i>).....	12
2.3.2	Graviola (<i>Annona muricata</i>)	13
2.3.3	Cordyceps (<i>Cordyceps sinensis</i>)	14
2.3.4	Goji (<i>Lycium chinense</i>)	15
2.3.5	Brusinky (<i>Vaccinium vitis idaea</i>).....	15
2.3.6	Lapacho (<i>Tabebuia serratifolia</i>)	16
2.4	Analytické metody využité pro studium antioxidační aktivity.....	17
2.4.1	UV-VIS spektroskopie	17
2.4.1.1	Teoretický základ.....	17
2.4.1.2	Experimentální uspořádání	18
2.4.1.3	Stanovení celkových polyfenolických látek	18
2.4.2	Elektronová paramagnetická rezonance	19
2.4.2.1	Teoretický základ.....	19
2.4.2.2	Spin-spinové interakce	21
2.4.2.3	Experimentální uspořádání	21
2.4.2.4	Metoda využívající DPPH	21
3	Experimentální část.....	23
3.1	Laboratorní vybavení.....	23
3.1.1	Chemikálie	23
3.1.2	Pomůcky.....	23

3.1.3	Přístroje	23
3.2	Analyzované vzorky	23
3.3	UV-VIS experimenty.....	24
3.3.1	Příprava vzorků	24
3.3.2	Stanovení obsahu celkových polyfenolů.....	24
3.3.2.1	Kalibrační křivka	24
3.3.2.2	Vlastní stanovení.....	24
3.4	EPR experimenty	25
3.4.1	Příprava extraktů pro EPR experimenty.....	25
3.4.2	Stanovení radikál-zhášející aktivity s využitím radikálu DPPH	25
3.4.2.1	Parametry EPR analýzy	25
4	Výsledky a diskuze.....	27
4.1	Stanovení celkových polyfenolů (TPC)	27
4.1.1	Bylinný čaj Lapacho.....	27
4.1.2	CRANVITA šťáva z brusinek a petržele	27
4.1.3	Sušené plody Goji	27
4.1.4	Kapsle Maqui, Cordyceps, Graviola	28
4.1.4.1	Kapsle Graviola	28
4.1.4.2	Kapsle Cordyceps	29
4.1.4.3	Kapsle Maqui	30
4.2	Stanovení DPPH radikál-zhášející aktivity vybraných doplňků stravy.....	31
5	Závěr.....	34
6	Seznam použité literatury	35
7	Seznam použitých zkratk.....	39

1 ÚVOD

Dnešní dobu lze charakterizovat jako dobu stresu, spěchu, civilizačních nemocí, špatných stravovacích návyků a diet, které je mají řešit. Na druhou stranu i jako dobu technologického, technického a vědeckého pokroku. Tato skutečnost přímo nahrává farmaceutickému průmyslu, který v posledních letech ve velkém nabízí opravdu širokou škálu produktů, nazývaných doplňky stravy. Při dnešní pestré nabídce potravin v obchodních řetězcích by se mohlo zdát, že naše strava už nepotřebuje doplnit z řad farmaceutických výrobků. Zajištění komplexní stravy však není jednoduché při ohledu na roční období, počasí, psychické či fyzické zátěže. Dietních suplementů je nabízeno velké množství od vitaminů a minerálních látek přes sacharidové, proteinové doplňky, doplňky s obsahem esenciálních mastných kyselin, esenciální mastné kyseliny, vlákninu, rostlinné extrakty atd.[1]

Významnou skupinou doplňků stravy jsou produkty s obsahem antioxidantů. Antioxidanty jsou chemické sloučeniny, kterým je v posledních letech věnována pozornost vzhledem k jejich schopnosti zbavovat organismus volných radikálů. Tyto, převážně kyslíkové radikály způsobují v organismu oxidační poškození biologických molekul. Je známo, že oxidační stres hraje roli při vzniku a rozvoji zánětlivých a degenerativních onemocnění a je také projevem fyziologického stárnutí organismu. Aktivními složkami antioxidantů jsou především polyfenolické látky. Studium a stanovení těchto látek je často zkoumaným tématem.[1, 2]

Předložená práce popisuje některé skutečnosti o potravinových doplncích stravy se zaměřením na legislativní požadavky, označování, třídění doplňků stravy, dále kapitoly o antioxidantech obecně a také o bylinách používaných ve vybraných doplncích stravy. Experimentální část práce se zaměřuje na stanovení obsahu celkových polyfenolických látek s využitím UV-VIS (Ultraviolet Visible Spectroscopy) spektroskopie ve vybraných doplncích, které byly ve formě kapslí, čaje, sirupu a sušených plodů. Dále je pozornost věnována sledování antioxidačních, radikál-zhášejících vlastností vybraných doplňků stravy s využitím testu založeného na zhášení syntetického radikálu DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) za pomoci elektronové paramagnetické rezonance.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Doplnky stravy

Doplňkem stravy se dle zákona č.110/1997 Sb.,[3] o potravinách a tabákových výrobcích v platném znění rozumí potraviny, které mají za účel doplňovat běžnou stravu, jsou koncentrovaným zdrojem minerálních látek, vitaminů nebo dalších látek s nutričním či fyziologickým účinkem obsažených v potravine samostatně nebo v kombinaci. Jsou určeny k přímé spotřebě v malém odměřeném množství.

Vedle národního zákona jsou potravinové doplňky definovány směrnicí Evropského parlamentu a rady 2002/46/ES[4] jako potraviny, jejichž účelem je doplňovat běžnou stravu, jsou koncentrovaným zdrojem živin nebo jiných látek s výživovým nebo fyziologickým účinkem, samostatně nebo v kombinaci. Tyto potraviny jsou uváděny na trh ve formě dávek, a to ve formě tobolek, pastilek, tablet a pilulek, dále ve formě sypké, jako kapalina v ampulích, v lahvičkách s kapátkem a v jiných kapalných formách nebo sypkých výrobků určených k příjmu v malých odměřených množstvích. Živinami se rozumí hlavně vitaminy a minerální látky.

2.1.1 Požadavky na doplňky stravy

Tyto požadavky udává vyhláška MZd č.225/2008 Sb.,[5] kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a obohacování potravin. Zapracovává příslušné předpisy Evropského společenství a v návaznosti na ně upravuje

- a) požadavky na složení doplňků stravy, jejich označování a způsob jejich použití,
- b) podmínky přidávání dalších látek do potravin s výjimkou doplňků stravy.

2.1.1.1 Požadavky na složení doplňků stravy

Vyhláška stanovuje vitaminy a minerální látky, které lze použít pro výrobu doplňků stravy (příloha č.1 k této vyhlášce), dále formu, ve které mohou být tyto vitaminy a minerální látky použity (příloha č.2 k této vyhlášce). V příloze č.3 k této vyhlášce jsou uvedeny další látky, které lze použít pro výrobu doplňků stravy, a podmínky, za kterých je lze použít. Do doplňků stravy není možné přidat jednotlivě nebo ve směsi omamné a psychotropní látky, dále látky, u kterých byl prokázán toxický, genotoxický, teratogenní, halucinogenní, omamný či jiný nepříznivý účinek na lidský organismus. Příloha č.4 této vyhlášky uvádí látky, které nelze použít k výrobě doplňků stravy[5].

2.1.1.2 Označování doplňků stravy

Dle výše uvedené vyhlášky je nezbytné na obalu pro spotřebitele uvést:

- a) v názvu potraviny slovo „doplňk stravy“,
- b) název vitaminů, minerálních látek nebo dalších látek charakterizující vzorek,
- c) číselný údaj o množství vitaminů, minerálních látek nebo dalších látek vztažený na doporučenou denní dávku,
- d) údaje o obsahu vitaminů a minerálních látek i v procentech doporučené denní dávky uvedené v příloze č.5 k této vyhlášce, tento údaj lze uvést i v grafické podobě,
- e) doporučené denní dávkování a popřípadě další podmínky použití,

- f) varování před překročením doporučeného denního dávkování,
- g) upozornění, aby výrobky byly uloženy mimo dosah dětí,
- h) upozornění, že doplňky stravy nejsou náhradou pestré stravy,
- i) upozornění „Nevhodné pro těhotné ženy“ u doplňků stravy obsahujících více než 800 µg (RE) vitamínu A v denní dávce.

Označování doplňků stravy nesmí doplňkům stravy přisuzovat vlastnosti týkající se prevence, léčby nebo vyléčení lidských onemocnění nebo na tyto vlastnosti odkazovat, a dále nesmí obsahovat žádné tvrzení, které by uvádělo či naznačovalo, že vyvážená pestrá strava obecně nemůže poskytnout dostatečné množství vitaminů anebo minerálních látek [5].

2.1.2 Kategorie doplňků stravy

Jen těžko lze v dnešní době docílit, aby naše strava byla trvale komplexní. Může v ní něco chybět absolutně, když zdroj není stále nebo občas komplexní, například v závislosti na ročním období (např. jablka nebo brambory po zimním skladování), nebo je strava nekomplexní relativně, to když se zvýší potřeba určité složky v závislosti na věku, zdravotních potížích, rekonvalescenci, fyzickém nebo duševním zdraví. Právě proto spotřebitel často sáhne pro pomoc mezi doplňky stravy.

Právě v návaznosti na to, jaký problém by měl doplněk stravy vyřešit, nebo mu předejít, je důležité správně vybrat ve velké skupině produktů. Jako první ostře ohraničenou skupinu suplementů můžeme jmenovat vitaminy a minerální látky, zvané též někdy mikroživiny, a jejich podskupiny multivitaminy a multiminerály. Jako vitaminy obvykle označujeme skupinu životně důležitých látek, které obsahují aminovou skupinu. Je nutné je tělu dodávat, protože se v něm samy netvoří. Na minerální látky lze z širšího hlediska pohlížet jako na prvky a jejich sloučeniny, nacházející se volně (nerosty) nebo vázaně (horniny) v přírodě. Z hlediska doplňků stravy však za tyto látky označujeme jednu prvky (např. jód, selen), jindy sloučeniny těchto prvků. Tyto mikroživiny chápeme jako látky, při jejichž nedostatku hrozí porucha zdraví. Antioxidanty jsou chemické sloučeniny, do kterých řadíme minerální látky, vitaminy a dalších látky, potlačující oxidační stres, při němž dochází k hromadění volných radikálů. Právě tyto látky jsou schopny dostat množství hromadících se volných radikálů pod kontrolu. Od rostlinných extraktů můžeme očekávat podobné účinky jako od léčivých bylin. Nalezneme je v nejrůznějších formách od tablet, tinktur po čaje a nálevy. Velkou skupinu tvoří produkty podporující hubnutí, nebo tzv. spalovače tuků. Tyto doplňky však nebývají příliš úspěšné bez podpory ze strany změny stravování a životního stylu. Pro celkovou vitalitu, duševní, fyzickou ale i sexuální výkonnost či vzrušivost můžeme na trhu narazit na doplňky na povzbuzení. Jako nejdynamičtější se rozvíjející skupinu přípravků můžeme sledovat doplňky stravy na problémy s klouby, přičemž mezi jejich aktivními látkami najdeme minerály, vitaminy, antioxidanty a další. Doplňky stravy s (nenasycenými) mastnými kyselinami mohou pomoci při hubnutí, snižování hladiny cholesterolu, potlačení tvorby prostaglandinů a leukotrienů, čímž snižují vývoj zánětlivých procesů či nepříjemné pocity při menstruaci. Probiotika tvoří moderní skupinu doplňků, které oživují mikrobiální střevní kultury v těle, čímž může docházet ke zvýšení imunity a odstranění škodlivin ze střevního obsahu. Dále mezi účinné látky doplňků stravy můžeme zařadit enzymy a hormony, některé jsou volně prodejné, registrované jako doplňky stravy, jiné

lze získat pouze na předpis. Na doplňky sportovní výživy nahlížíme jako na samostatnou skupinu doplňků, které si zaslouží vlastní členění. Často bývají zaměňovány s dopingem, látkami výslovně uvedenými na Seznamu zakázaných látek Antidopingové komise Českého olympijského výboru. Tyto sportovní suplementy lze dělit do mnoha podskupin, z nichž nejvýznamnější jsou sacharido-proteinové přípravky, proteinové přípravky a aminokyseliny, podporující růst svalové hmoty, spalovače tuků, kloubní výživu a sportovní nápoje [1].

2.2 Antioxidanty

Jako antioxidanty můžeme označit takové látky, které mohou ochránit cílovou buňku před poškozením, oddálit ho nebo dokonce odstranit. Je nutné, aby v organismu byla udržována rovnováha mezi oxidanty a antioxidanty, která minimalizuje poškození buněk a tkání. Termínem oxidativní stres označujeme nerovnováhu vzniklou působením oxidantů. Je způsobován volnými radikály, které vznikají *in vivo* a mají řadu fyziologických funkcí, jako je účast při protizánětlivých reakcích či v procesu fagocytózy. Negativnímu působení těchto látek na organismus je v posledních letech věnována velká pozornost. Úroveň poznatků a znalostí se zvyšuje. Tyto volné radikály (především kyslíkové a dusíkové) působí v organismu na biologicky významné sloučeniny, jako jsou bílkoviny, lipidy, sacharidy či nukleové kyseliny, mění jejich strukturu, čímž dochází k modifikaci jejich funkce. Kaskáda reakcí způsobená radikály vede ke změnám struktury buněk, následně celých tkání a orgánů. Působením antioxidantů lze těmto nežádoucím účinkům zabránit [6,7].

Mezi antioxidanty můžeme nalézt endogenní nízkomolekulární látky, jako je glutathion, kyselina močová, koenzym Q a další. Větší pozornost však v poslední době zaujímají látky přírodního původu, které se do organismu dostávají společně s potravou, a které kromě své nutriční a energetické hodnoty přispívají jako zdroj antioxidantů. K přírodním látkám s antioxidační aktivitou jsou tradičně řazeny vitaminy C, E a karotenoidy. Větší význam však začíná být připisován dalším přírodním látkám, především polyfenolickým sloučeninám, mezi které patří například flavonoidy, katechiny, fenolické kyseliny. Zdrojem těchto látek je ovoce, zelenina, čaje, vína, aromatické a léčivé rostliny [6,7].

2.2.1 Klasifikace antioxidantů

Klasifikace antioxidantů může být velmi rozmanitá podle mnoha kritérií. Pro naši problematiku antioxidantů v doplňcích stravy se zaměříme na rozdělení [8]:

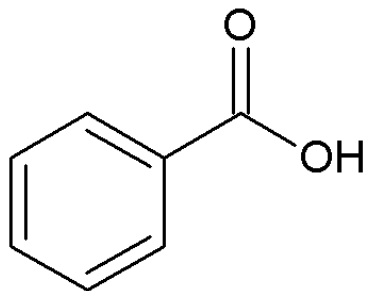
- 1) Podle původu:
 - a) přírodní,
 - b) syntetické.
- 2) Podle struktury:
 - a) fenolové,
 - b) endioly.

V přírodních materiálech, rostlinách se vyskytuje řada látek, které vykazují antioxidační vlastnosti a tvoří běžnou součást lidské stravy. Mezi takto působící účinné látky patří dlouho známé sloučeniny jako vitamin C, β -karoten, vitamin E. Patří sem také velká skupina látek souhrnně označovaných jako polyfenoly. Skupina fenolických látek v rostlinném materiálu je strukturně velmi rozmanitá. V současné době roste zájem o studium těchto látek, protože

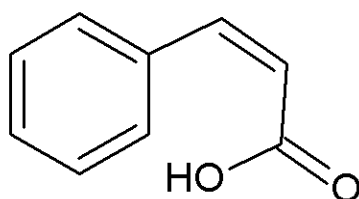
bývají dávány do souvislosti se snížením výskytu chorob jako jsou rakovina či kardiovaskulární onemocnění. Fenolické látky přijímané člověkem v potravě lze rozdělit na fenolové kyseliny, flavonoidy a méně častou skupinu stilbenů a lignanů[2,8,9].

2.2.1.1 Fenolové kyseliny a jejich deriváty

Fenolové kyseliny spolu se svými deriváty vykazují účinky primárních antioxidantů. V potravě jsou běžně přijímány kyselina benzoová, skořicová a jejich deriváty [2].

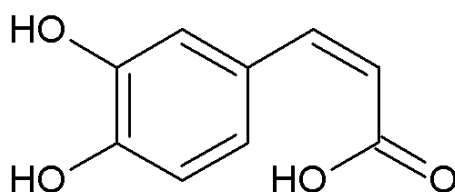


Obr.1: Kyselina benzoová

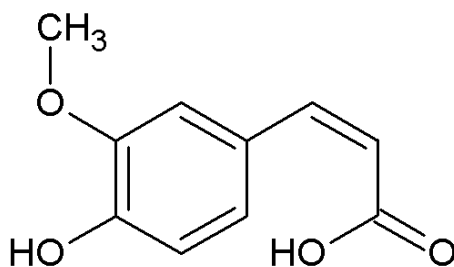


Obr.2: Kyselina skořicová

Významnými deriváty skořicové kyseliny jsou kyselina kávová, její ester chlorogenová kyselina, nacházející se v zelenině, ovoci a kávě. Dále pak kyselina ferulová, ta je asociována s potravinovou vlákninou, významným zdrojem jsou pšeničné otruby [2].



Obr.3: Kyselina kávová



Obr.4: Kyselina ferulová

2.2.1.2 Flavonoidy

Flavonoidy tvoří nejčastěji se vyskytující skupinu polyfenolických látek v lidské potravě. Působí jako primární antioxidanty. Pro antioxidační aktivitu je důležitý počet a poloha hydroxylových skupin v molekule. Mezi hlavní skupiny patří flavanoly, flavanony, flavony, flavonoly, proantokyanidiny, kyanidiny a isoflavonoidy.

Mezi významné flavonoly patří kvercetin, dominantní flavonoid ve výživě člověka. Ten se nachází ve vysokých koncentracích v běžných potravinách jako je cibule, jablka, kapusta, červené víno, zelený a černý čaj. Nachází se buď volný, nebo ve vázané formě s cukernými jednotkami. Hlavními flavanoly jsou katechiny, např. katechin, epikatechin, epigallokatechin a jejich estery s kyselinou gallovou. Přítomné jsou hlavně v čaji, dále v červeném víně a čokoládě. Další skupina, proantokyanidiny, jsou látky vyskytující se v rostlinách jako komplexní směsi polymerů, nebo také esterově vázané s kyselinou gallovou či ve formě dimerů. Jejich struktura je velmi složitá. Běžným zdrojem je ovoce jako jsou jablka, hrušky, hrozny, dále červené víno, čaj, čokoláda a kakao. Antokyanidiny jsou červená barviva obsažená např. v třešních, švestkách nebo rybízu. Flavanony jsou látky typicky se vyskytující v pomerančích a grapefruitech, proto jsou také nazývány „citrusové“ flavonoidy. K hlavním patří naringenin, hesperetin a jejich glykosidy. K zvláštní skupině isoflavonoidů patří především isoflavony daidzein a genistein, které se nachází v luštěninách, vydatně v soje a produktech z ní [2,8, 9].

2.3 Byliny zastoupené v testovaných doplňcích stravy

Pro experimentální část práce bylo vybráno několik doplňků stravy, prezentujících antioxidační účinky. V následující kapitole jsou představeny byliny zastoupené v těchto produktech.

2.3.1 Maqui (*Aristotelia chilensis*)

Maqui je celoročně zelený keř z čeledi *Elaeocarpaceae*, jehož původ můžeme najít v jihoamerickém státě Chile. Roste ve střední a jižní oblasti země a produkuje červenofialové bobule s průměrem okolo šesti milimetrů, které dosahují zralosti mezi prosincem a březnem. Plody jsou nejčastěji konzumovány čerstvé, nebo jsou využity k přípravě šťáv či džemů. Intenzivně červené zbarvení vodného extraktu plodů je způsobeno přítomností antokyaninových pigmentů, kterých je využíváno jako přírodních barviv. V tradiční medicíně byly infuze z plodů a listů maqui používány k léčení bolesti v krku, bolesti ledvin, zažívacích onemocnění, horečky, ošetření jizev. V současné době vědecké výzkumy ukazují, že tyto plody mají silnou *in vitro* antioxidační, anti-aterogenní a kardioprotektivní aktivitu, dále

vykazují inhibiční efekt na záněty a adipogenezi. Léčebné vlastnosti maqui jsou spojovány s jejich vysokým obsahem polyfenolů, konkrétně antokyanů[10-12].



Obr.5: Maqui berry[13]

2.3.2 Graviola (*Annona muricata*)

Annona muricata nazývána běžně graviola patří do čeledi *Annonaceae*. Původem a velmi rozšířena je v Subsaharské Africe. Anona je stále zelený tropický strom dosahující výšky 5 až 6 metrů. Produkuje velké plody, těm však není věnována přílišná pozornost, narozdíl od listů, kořenů a stonků. Ty již byly předmětem fytochemických studií. Její listy, konkrétně odvar z nich, je tradičně používán k léčbě rakoviny v mnoha zemích. Účinné látky izolované z této rostliny jsou acetogeniny. Jsou to látky rozmanité struktury odvozené od kyseliny octové, které mohou být alifatické (mastné kyseliny), nebo aromatické (antrachinony). Už dřívější studie demonstrovaly antihyperglykemické, antiparazitické, antibakteriální, antivirální, a především antirakovinné vlastnosti[14-17].



Obr.6: *Annona muricata* [18]

2.3.3 *Cordyceps* (*Cordyceps sinensis*)

Cordyceps sinensis, neboli housenice čínská, je houba z čeledi *Ophiocordycipitaceae*. Je vzácnou potravinou v tradiční čínské medicíně, kde je už stovky let používána pro léčbu lidských onemocnění, například hypertenze, arytmie, hyperglykemie, a také v boji proti stárnutí. Polysacharidům extrahovaným z této houby jsou připisovány imunomodulační, antitumorální, antiproliferační a antioxidační účinky. Bylo zjištěno, že kyselá polysacharidová frakce extrahovaná z mycelia housenice má silný vliv na funkci makrofágů *in vitro*. Jako aktivní látka je v tomto případě sledována sloučenina cordycepin (3'-deoxyadenosin), u níž byly prokázány antitumorální účinky [19-21].



Obr.7: *Housenice čínská*[22]

2.3.4 Goji (*Lycium chinense*)

Goji je název pro bobulovité plody rostliny známé pod názvem kustovnice čínská (*Lycium chinense*), která náleží do čeledi *Solanaceae*. Původ můžeme najít na jihovýchodě Evropy a v Asii, kde byla rostlina velmi známá a populární v tradiční čínské medicíně, dále jako kulinářská ingredience i jako funkční potravina. Vliv účinných látek byl pozorován v boji proti stárnutí, zlepšení zraku či funkcí jater a ledvin. V posledních letech zájem o plody goji dramaticky vzrostl díky potenciálně vysoké nutriční hodnotě, především pro vysoký obsah antioxidantů. V severní Americe a Evropě je považována za „superpotravinu“ a často bývá využívána jako potravinový doplněk. Plody jsou sklizeny od srpna do října, nejčastěji jsou konzumovány sušené, mohou být ale také používány čerstvé listy jako hodnotná zelenina, dále ve formě džusů, vína či čaje. Můžeme se setkat s využitím pro výrobu tinktur, prášku či tablet. Plody jsou asi 2 cm velké, zbarvení přechází od oranžové po tmavě červenou, chuť může přecházet od hořké po sladkou[23,24].



Obr.8: Goji[25]

2.3.5 Brusinky (*Vaccinium vitis idaea*)

Brusinka je stále zelený poléhavý keřík, který dorůstá výšky 10 až 20 cm. Patří do čeledi *Ericaceae*. Jeho plody jsou kulovité, lesklé, červené bobule. Historii těchto plodů můžeme najít v době, kdy Evropané dorazili do Severní Ameriky, kde díky indiánům poznali tamní brusinky. Indiáni tyto plody využívali k léčení poranění jedovatými šípy, při žaludečních a jaterních problémech a poruchách krevního oběhu. Brusinky nalezneme kromě Severní Ameriky také v severní části Asie a téměř po celé Evropě. Hojně se brusinka vyskytuje v sušších lesích, můžeme ji nalézt až v oblastech horského pásma. Obecným názvem brusinka označujeme tuzemskou brusnici brusinku (*Vaccinium vitis idaea*) i tzv. americké brusinky (*Vaccinium macrocarpon*). Bobule jsou bohaté na vitamin C, organické kyseliny, minerály

a fenolické sloučeniny. Brusinky a produkty z nich jsou po mnoho desetiletí využívány k léčbě infekcí močových cest. Extrakty z brusinkové šťávy také vykazují protirakovinné účinky a inhibici oxidace lipoproteinů s nízkou hustotou. Mohou být potenciální prevencí rozvoje srdečních onemocnění. Mimořádný protizánětlivý účinek má prášek z usušených plodů. Brusinky obsahují flavonoidy jako jsou proantokyanidy, antokyany, flavonoly, které chrání kosti před resorpcí[26-28].



Obr.9: Brusinka[29]

2.3.6 Lapacho (*Tabebuia serratifolia*)

Tabebuia je druhový název pro rostliny zvané lapacho. Jsou to stromy pocházející z Jižní Ameriky, převážně z Amazonského deštného pralesa. Léčivé účinky jsou připisovány kůře těchto stromů, která je používána k přípravě čaje. Lapacho bývá nazýváno také jako čaj Inků. V oblasti And byla tato kůra používána indiány už před mnoha lety. Jako na zázračný lék začalo být na lapacho pohlíženo v šedesátých letech v Brazílii a Argentině. Dnes je kůra těchto stromů ve formě odvaru využívána tradiční fytomedicínou k léčbě bakteriálních a plísňových infekcí, horečky, malárie, ale také při poruchách funkce žaludku a močového měchýře. V šedesátých letech se studiem této rostliny začal zabývat National cancer institute ve Spojených státech, poté, co se začaly objevovat případy zázračného uzdravení nádorů a rakoviny spojené s užíváním odvaru z lapacha. Aktivními látkami, které byly z rostlin *Tabebuia* izolovány jsou lapachol a β -lapachon. β -lapachon je potenciální chemoterapeutikum, vykazující celou řadu farmakologických účinků, jako je antivirální, antiparazitní, antirakovinná a protizánětlivá aktivita. Pro-apoptotické účinky byly pozorovány *in vitro*[30-32].



Obr.10: Yellow Lapacho [33]

2.4 Analytické metody využité pro studium antioxidační aktivity

Pro stanovení antioxidační aktivity lze v literatuře najít mnoho metod, což dokazuje, že antioxidanty jsou nízkomolekulární látky, které mohou působit různými mechanismy. Často jde o přímou reakci s radikály (vychytávání, zhášení), která se dá vyhodnocovat mnoha způsoby, například pomocí UV-VIS spektroskopie, EPR (Electron Paramagnetic Resonance) spektroskopie či vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC-High Performance Liquid Chromatography). V následující práci je antioxidační aktivita sledována pomocí analytické metody EPR spektroskopie. Antioxidační chování je také posuzováno dle obsahu látek, u kterých jsou známy antioxidační vlastnosti, a těmi jsou polyfenoly. K jejich stanovení bylo využito metody UV-VIS spektroskopie [6].

2.4.1 UV-VIS spektroskopie

2.4.1.1 Teoretický základ

Podstatou UV-VIS spektroskopie je absorpce elektromagnetického záření molekulami či ionty v roztoku, měření probíhá při charakteristické vlnové délce 200-780 nm a určuje se změna intenzity světla při průchodu vzorkem. V této oblasti spektra je absorpce vyvolána přechodem elektronů mezi dvěma či více energetickými hladinami v molekule. Dochází k vytvoření elektronového spektra. Když excitovaná molekula přechází do základního stavu, vyzařuje energii v podobě tepelné energie, čímž se mění kinetická energie molekuly. Absorpční spektrum v UV-VIS oblasti je závislostí absorpance na vlnové délce a je charakteristické pro stanovovanou látku. Absorpční spektrum je pásové, jednotlivé pásy charakterizují přechody elektronů v molekule do excitovaných stavů. K vlastní analýze vzorku je tedy možné využít charakteristické maximum tohoto spektra. Látky absorbující světlo záření v ultrafialové oblasti (vlnová délka menší než 380 nm) se oku jeví jako

bezbarvé, naopak látky absorbující záření o vlnových délkách vyšších než 380 nm vidí oko jako barevné.

Mezi základní vztahy popisující absorpční děje patří poměr intenzit prošlého a dopadajícího záření, které se označuje jako transmitance:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (1)$$

kde I je intenzita prošlého monochromatického světelného toku, I_0 je intenzita dopadajícího monochromatického toku. Dekadickým logaritmem převrácené hodnoty transmitance je absorbance:

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I} \quad (2)$$

Vztah popisující souvislost mezi absorbancí a koncentrací látky je Lambert-Beerův zákon, popisující změnu intenzity záření při průchodu vzorkem, přičemž měřenou veličinou je absorbance

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot b \quad (3)$$

kde b je tloušťka měřené vrstvy v centimetrech, c je koncentrace látky v roztoku v mol/l a ε je molární absorpční koeficient [34-36].

2.4.1.2 Experimentální uspořádání

Jako zdroj primárního spojitého záření se v molekulové absorpční spektroskopii v ultrafialové oblasti používá vodíková, častěji deuteriová výbojka s vyšší intenzitou. Pro oblast viditelného záření se používají wolframové nebo halogenové žárovky. K potřebné disperzi záření slouží mřížky ve spojení se vstupní a výstupní štěrbinou. Šířka štěrbin má být zásadně alespoň pětkrát menší než je pološířka měřeného absorpčního pásu. Tato část se nazývá monochromátor. Absorbující prostředí je realizováno pomocí kyvet, kdy v jedné kyvetě je umístěn roztok sledované látky, v druhé kyvetě se nachází čisté rozpouštědlo nebo slepý vzorek. Pro běžná měření se nejčastěji užívá 1 cm kyvet. Základní podmínkou je, aby materiál, z něhož jsou kyvety vyrobeny, sám neabsorboval záření v konkrétním rozsahu záření. Pro ultrafialovou oblast se používají kyvety křemenné, pro viditelnou oblast kyvety skleněné. Pro hodnocení velikosti absorpce se ve spektrofotometrii využívá několik typů fotoelektrických detektorů. Často používaný detektor bývá fotonásobič, často se také využívá uspořádání spektrofotometru s diodovým polem, kde je univerzální detektor nahrazen řadou citlivých fotodiod. Při tomto uspořádání je monochromátor umístěn až za kyvety [36].

2.4.1.3 Stanovení celkových polyfenolických látek

Jednou z nejpoužívanějších metod pro stanovení obsahu celkových polyfenolických látek je reakce Folin-Ciocalteuovým činidlem (směs wolframu a molybdenu v zásaditém prostředí).

Reakcí polyfenolických látek s tímto redukčním činidlem dochází k tvorbě modrého komplexu, který je poté kvantifikován pomocí UV-VIS spektrofotometru. Měření absorpance vzniklého komplexu se provádí při vlnové délce 760 nm. Celkové polyfenoly zjištěné touto metodou bývají vyjádřovány jako ekvivalenty kyseliny gallové GAE (Gallic Acid Equivalent) [37-38].

2.4.2 Elektronová paramagnetická rezonance

2.4.2.1 Teoretický základ

Metoda elektronová paramagnetická rezonance (EPR) je založena na interakci nepárových elektronů s magnetickým polem. Při EPR po absorpci energie dochází k přechodu mezi energetickými hladinami, které odpovídají různým orientacím spinu nepárových elektronů v atomech a molekulách ve vnějším magnetickém poli.

Každý elektron má vnitřní moment hybnosti, spin $\vec{S}$. Průmět vektoru do směru magnetického pole může nabývat pouze dvou hodnot $\frac{1}{2}$ a $-\frac{1}{2}$. Se spinem je spojen vznik magnetického momentu $\vec{\mu}_s$, jeho hodnota je dána výrazem

$$\vec{\mu}_s = \gamma_e \frac{h}{2\pi} \vec{S} \quad (4)$$

kde γ_e je gyromagnetický poměr elektronu, jeho hodnota $\gamma_e < 0$, proto spinový moment hybnosti a magnetický moment mají opačnou orientaci. Elektron má dále, na rozdíl od protonu a neutronu, ještě orbitální magnetický moment, ten je dán vztahem

$$\vec{\mu}_L = \gamma_e \frac{h}{2\pi} \vec{L} \quad (5)$$

kde $\vec{L}$ je orbitální moment hybnosti.

Spinový a orbitální moment lze vektorově sečíst, výsledkem je moment hybnosti $\vec{J}$:

$$\vec{J} = \vec{L} + \vec{S} \quad (6)$$

Průmět toho vektoru do směru magnetického pole může nabývat $2J+1$ hodnot.

Celkový magnetický moment elektronu je vyjádřen výrazem

$$\vec{\mu}_e = \gamma_e \frac{h}{2\pi} \vec{J} \quad (7)$$

Gyromagnetický poměr elektronu je dán výrazem

$$\gamma_e = g_e \frac{e}{2m_e} \quad (8)$$

kde g_e je tzv. faktor spin-orbitální interakce elektronu, e je elementární náboj a m_e je hmotnost elektronu.

Magnetický moment elektronu můžeme pak vyjádřit jako

$$\vec{\mu}_e = g_e \frac{e}{2m_e} \frac{h}{2\pi} \vec{J} \quad (9)$$

Hodnota $\frac{e}{2m_e} \frac{h}{2\pi} = \mu_B$, někdy označována jako β , se nazývá Bohrov magneton a je jednotkou magnetického momentu elektronu. Jeho hodnota je $9,273 \cdot 10^{-24} \text{ Am}^2$. Celkový magnetický moment je pak

$$\vec{\mu}_e = g_e \mu_B \vec{J} \quad (10)$$

Metoda EPR spektroskopie je použitelná pouze pro systémy s nenulovým spinem, tedy systémy obsahující alespoň jeden nepárový elektron. Mohou to být paramagnetické ionty některých přechodných kovů nebo vzácných zemin s částečně zaplněnými d a f orbitaly, např. Cu(II), Mn(II), Cr(III, IV), dále organické volné radikály. Pokud na takový systém působí magnetické pole s indukcí B_0 , dojde k rozštěpení původního energetického stavu E_0 na energetické podhladiny, které odpovídají jednotlivým prostorovým orientacím celkového momentu hybnosti elektronu.

Energii jednotlivých hladin popisuje vztah

$$E = -\vec{\mu}_B \vec{B}_0 = -g_e \mu_B \vec{J} \vec{B}_0 \quad (11)$$

kde B_0 je indukce magnetického pole.

Pro rozdíl energie sousedních hladin platí rezonanční podmínka

$$\Delta E = h\nu = g_e \mu_B \vec{B}_0 \quad (12)$$

Z tohoto vztahu vyplývá, že vzdálenost mezi energetickými hladinami elektronu je lineárně závislá na indukci pole. Rozdíly energie mezi hladinami jsou oproti nukleární magnetické rezonanci větší, tyto systémy absorbují záření s vlnovou délkou několik centimetrů. Podobně jako NMR spektrometrii je absorbovaná energie uvolňována relaxačními procesy. Relaxační časy ovlivňují šířku rezonančního signálu[38].

2.4.2.2 Spin-spinové interakce

Pokud nepárový elektron interaguje s magneticky aktivními jádry okolních atomů či s jinými nepárovými elektrony, dojde k rozštěpení signálu na multiplety. V organických radikálech dochází nejčastěji k interakcím mezi nespárovaným elektronem a vodíkovými jádry v jeho okolí. Spin protonu i elektronu je $\frac{1}{2}$, počet čar v multipletu se rovná $n+1$, kde n je počet interagujících jader. Intenzita interakce je charakterizována konstantou hyperjemného štěpení A . U jednodušších spekter je možné získat hodnotu konstanty jako vzdálenost mezi dvěma čarami multipletu, hodnoty jsou udávány v jednotkách magnetické indukce (T). Struktura multipletů je často velmi složitá, proto je vhodné pro odečítání poloh čar používat derivační křivku signálu [38].

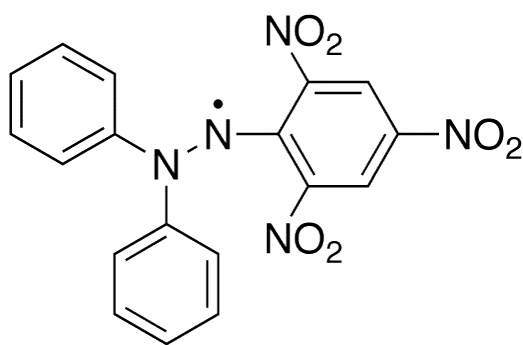
2.4.2.3 Experimentální uspořádání

Při měření EPR spekter je udržována konstantní frekvence mikrovlnného záření, přičemž se plynule mění indukce magnetického pole. Homogenní proměnné magnetické pole je zajišťováno elektromagnetem. Na jeho stabilitu jsou kladeny vysoké požadavky. Vzorek je umístěn přímo ve středu magnetického pole.

Jako zdroj mikrovlnného záření o konstantní frekvenci slouží klystronový oscilátor. Energie záření prošlého vzorkem je měřena pomocí krystalového polovodičového detektoru. Měření lze provádět v plynné, kapalně i pevné fázi. Vzorek je přitom umístěn v křemenné kapiláře [38].

2.4.2.4 Metoda využívající DPPH

Stabilní volný radikál DPPH (difenylpikrylhydrazyl) je jednou z nejpoužívanějších látek pro primární standard v kvantitativní EPR spektroskopii. Použití DPPH pro posouzení antioxidační aktivity čistých látek i směsí je jednou z nejstarších základních metod. Spočívá v reakci volného radikálu s testovanou látkou, kdy dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazin). Radikál DPPH je charakteristický svým tmavě fialovým zbarvením, které se při redukci mění na tmavě žluté. Z těchto důvodů tato reakce bývá kromě EPR spektroskopie často sledována také spektrofotometricky, kdy dochází k poklesu absorbance, ta se měří při 517 nm buď po uplynutí konstantního časového úseku nebo v kinetickém režimu. Další možností je využití HPLC [6] [39].



Obr.11: Radikál DPPH [40]

Metoda TEAC (TEAC-Trolox equivalent antioxidant capacity) je jednou ze základních metod používaných ke stanovení celkové TAA (Total antioxidant activity). Standardní látka trolox je ve vodě rozpustný derivát vitamínu E, s tou je pak porovnávána výsledná antioxidační aktivita[6].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Laboratorní vybavení

3.1.1 Chemikálie

- destilovaná voda (FCH VUT Brno)
- uhličitan sodný bezvodý p.a.(LACH-NER, Neratovice, ČR)
- kyselina chlorovodíková 35% p.a. (LACH-NER, Neratovice, ČR)
- Folin-Ciocalteu roztok(PENTA Chrudim, ČR)
- monohydrát kyseliny gallové(SIGMA-ALDRICH St. Louis, USA)
- aceton (LACH-NER, Neratovice, ČR)
- ethanol čistý (LACH-NER, Neratovice, ČR)
- 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl – DPPH (SIGMA-ALDRICH St. Louis, USA)

3.1.2 Pomůcky

- Běžné laboratorní sklo
- Skleněné vialky 10 ml s pryžovým uzávěrem (Simax, ČR)
- Stojan na zkumavky
- Nůžky
- Dělené pipety
- Automatické pipety
- Mikrofiltry Minisart RC 25, Sartorius Stedim
- Injekční stříkačky 5 ml
- Kyvety plastové
- Parafilm M, Pechiney Plastic Packaging (USA)
- Stříčky

3.1.3 Přístroje

- Chladnička s mrazákem (Gorenje)
- Předvážky (Scaltec, USA)
- Analytické váhy (HELAGO, GR-202-EC, Itálie)
- Třepačka Reax Top(Heidolph, FISHER SCIENTIFIC Pardubice, ČR)
- Třepačka Unimax 1010, Heidolph
- UV-VIS Spektrofotometr Helios Delta, Spektronic Unicam (USA)
- EPR spektrometr Miniscope MS 300

3.2 Analyzované vzorky

Pro experimentální část práce bylo vybráno několik různých doplňků stravy běžně dostupných v internetovém obchodě. Bylo vybráno celkem šest produktů ve čtyřech formách: bylinný čaj Lapacho (značka Energy Group), sušené plody Goji (značka Mikula), CRANVITA šťáva z brusinek a petržele (Pharma Activ), kapsle Maqui Pure, Cordyceps Premium a Graviola Anona (Natural Medicaments).

3.3 UV-VIS experimenty

UV-VIS experimenty byly realizovány pomocí přístroje UV-VIS Spektrofotometr Heλios Delta.

3.3.1 Příprava vzorků

Příprava vzorku bylinného čaje lapacho byla provedena dle doporučeného způsobu přípravy uvedeného na obalu. Jedna lžička čaje byla přidána do 250 ml vroucí destilované vody, povařena 5 minut a ponechána louhovat ještě 15-20 minut. Poté byl čaj zfiltrován.

Pro přípravu vzorku šťávy z brusinek a petržele bylo odebráno 10 ml šťávy, které byly 10x zředěny destilovanou vodou.

Příprava vzorků ze sušených plodů a kapslí probíhala v nasimulovaném prostředí žaludeční šťávy. Tento roztok byl připraven smícháním 100 ml destilované vody a 1 g koncentrované kyseliny chlorovodíkové.

3 g sušených plodů goji byly rozmělněny v ústech a převedeny do připraveného roztoku žaludeční šťávy. Poté byl vzorek třepán na třepačce vyhřáté na 37°C po dobu 4 hodin. Podíly vzorku byly odebírány v různých časových intervalech pomocí mikrofilmů.

Pro přípravu vzorků kapslí byla použita vždy jedna kapsle (Maqui, Cordyceps nebo Graviola), která byla umístěna do připraveného roztoku žaludeční šťávy, třepána na třepačce při 37°C a odebírána v čase pomocí mikrofiltrů, obdobně jako u sušených plodů, po dobu pěti hodin.

3.3.2 Stanovení obsahu celkových polyfenolů

Obsah celkových polyfenolů ve vybraných doplňcích stravy byl stanoven modifikovanou metodou s využitím Folin-Ciocalteuova činidla [41].

3.3.2.1 Kalibrační křivka

Rozpuštěním navážky krystalické kyseliny gallové v destilované vodě byl připraven roztok o koncentraci 250 mg·l⁻¹. Postupným ředěním byla připravena řada kalibračních roztoků o koncentracích 50, 100, 150, 200 a 250 mg·l⁻¹ kyseliny gallové. Pro reakci byl použit 1 ml kalibračního roztoku, 5 ml Folin-Ciocalteuova činidla a po pěti minutách byly přidány 4 ml 7,5% roztoku uhličitanu sodného. Směs byla promíchána na vortexu. Po jedné hodině byla změřena absorbance řady kalibračních roztoků na UV-VIS spektrofotometru při 760 nm.

3.3.2.2 Vlastní stanovení

Ve vybraných doplňcích stravy v různých formách byl stanoven obsah celkových polyfenolů modifikovanou metodou dle Singletona [41]. K 1 ml dle potřeby ředěného vzorku bylo přidáno 5 ml Folin-Ciocalteuova činidla, směs byla promíchána a po 5 minutách byly přidány 4 ml 7,5% roztoku Na₂CO₃. Směs byla promíchána a ponechána stát jednu hodinu. Po hodině byla měřena absorbance jednotlivých vzorků pomocí UV-VIS spektrofotometru při 760 nm. Celkový obsah polyfenolických látek byl zjištěn z kalibrační křivky kyseliny gallové. Tato koncentrace byla následně přepočítána na původní navážku a vyjádřena v g·kg⁻¹.

3.4 EPR experimenty

EPR měření bylo prováděno na přístroji EPR spektrometr Miniscope MS 300.

3.4.1 Příprava extraktů pro EPR experimenty

Extrakty pro EPR experimenty byly připraveny ze vzorků kapslí dvou druhů doplňků stravy a to Maqui a Cordyceps. Pro oba vzorky byla použita jedna kapsle umístěna do 25 ml připravené žaludeční šťávy (popsáno v kapitole 3.3), třepána na třepačce celkem 5 hodin při 37°C. V časových intervalech 40, 90, 180 a 300 minut byl vzorek odebrán z třepačky a zfiltrován přes skládaný filtr. Tímto způsobem bylo získáno celkem 8 různých extraktů.

3.4.2 Stanovení radikál-zhášející aktivity s využitím radikálu DPPH

Radikál zhášející aktivita připravených extraktů byla testována pomocí stabilního radikálu DPPH. Přesně 500 µl dle potřeby zředěného vzorku bylo smícháno s 500 µl roztoku DPPH v ethanolu o koncentraci $2,42 \cdot 10^{-4}$ mol/l. V případě referenčního systému byl do reakční směsi místo vzorku přidán roztok žaludeční šťávy. Směs radikálu a vzorku (resp. reference) byla promíchána a následně umístěna do ploché EPR kyvety.

3.4.2.1 Parametry EPR analýzy

Měření byla realizována pomocí ploché křemenné kyvety opatřené injekční stříkačkou pro snadnější plnění kyvety vzorkem. Kyveta byla umístěna do dutiny EPR spektrometru a po nastavení parametrů měření byl sledován vývoj 10 EPR spekter během 24 minut se začátkem 3 minuty po přidavku radikálu DPPH do systému.

Typické parametry EPR spektrometru:

Magnetic field	3358,0 G
Sweep	150 G
Sweep time	11 s
Smooth	0
Steps	4096
Number	10
Modulation	5000 mG
MW atten	10 dB
Gain	400

Naměřená spektra byla zpracována pomocí programu OriginPro v.7.0., radikál zhášející aktivita doplňků Maqui, resp. Cordyceps byla vyjádřena jako hodnota TEAC, vypočítaná pro hodnoty koncentrace radikálu DPPH naměřené v čase 13 minut po přidání radikálu do systému. Výpočet byl proveden dle vztahu:

$$TEAC_{DPPH} = \frac{(c_{0(DPPH)} - c_{t(DPPH)}) \cdot V_{(DPPH)}}{V_{(vzorku)}} \cdot \nu \cdot F \quad (13)$$

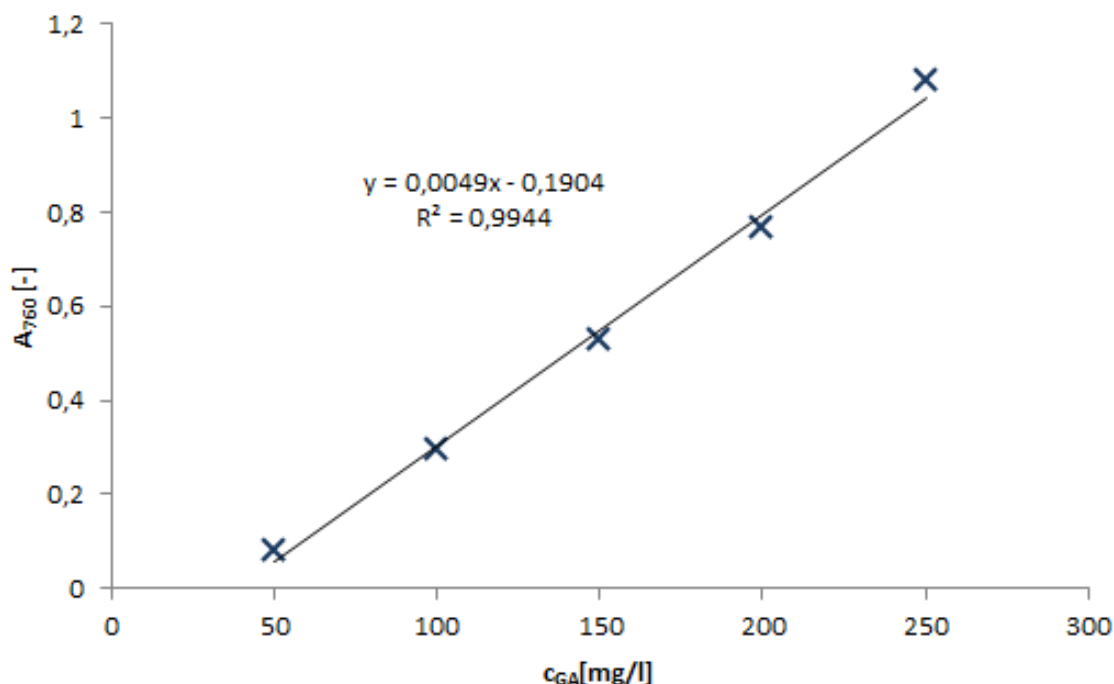
kde $c_{0(DPPH)}$ je počáteční koncentrace roztoku DPPH, $c_{t(DPPH)}$ je koncentrace roztoku DPPH po jeho přidavku do systému ve zvoleném čase t ($t=13$ minut), $V_{(DPPH)}$ je objem radikálu

přidaného do systému, $V_{(vzorku)}$ je objem vzorku přidaného do systému, ν je stechiometrický koeficient reakce DPPH a TROLOX ($\nu=1/2$) a F je faktor zředění.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Stanovení celkových polyfenolů (TPC)

Celkový obsah polyfenolických látek v extraktech vybraných doplňků stravy (čaj, sirup, sušené plody, kapsle) byl stanoven modifikovanou Singletonovou metodou [41]. Výsledné hodnoty TPC byly vyjádřeny jako GAE [$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] pomocí kalibrační křivky sestavené ze standardů kyseliny gallové. Kalibrační křivka je znázorněna na Obr. 12.



Obr. 12: Kalibrační křivka standardů kyseliny gallové, závislost absorpance při 760 nm na koncentraci

4.1.1 Bylinný čaj Lapacho

Vzorek čaje byl připraven podle doporučené přípravy uvedené na obalu výrobku. Poté byl připravený vzorek použit pro reakci s Folin-Ciocalteuovým činidlem a z hodnot absorpance vypočítána koncentrace polyfenolických látek na $65,11 \pm 0,01 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ GAE.

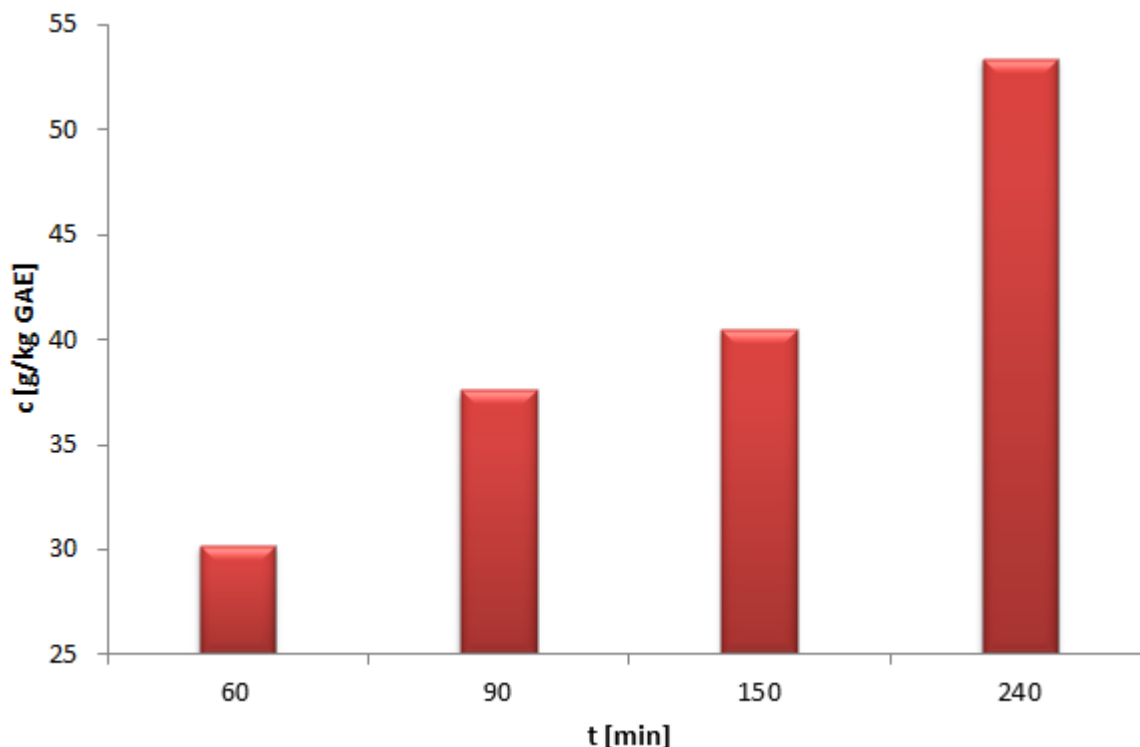
4.1.2 CRANVITA šťáva z brusinek a petržele

Vzorek šťávy byl dle potřeby naředěn, po reakci s Folin-Ciocalteuovým činidlem byla změřena absorpance použita pro výpočet koncentrace polyfenolických látek. Obsah polyfenolických látek byl v případě šťávy CRANVITA stanoven na $4,39 \pm 0,02 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ GAE.

4.1.3 Sušené plody Goji

U vzorku sušených plodů goji byly odebírány alikvotní podíly vzorku v různých časových intervalech během 4 hodin jejich rozpouštění v roztoku žaludeční šťávy. Z výsledků, které jsou znázorněny na Obr. 13, je patrné, že obsah polyfenolů v roztoku se působením žaludeční šťávy na plod s časem zvyšuje. V časovém intervalu od 60 do 240 minut rozpouštění vzorku byl stanoven obsah polyfenolů v rozsahu $30,17 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ GAE až $53,38 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ GAE. Uvedenou

skutečnost je možné interpretovat jako důsledek postupného uvolňování fenolických složek z plodu v průběhu vyluhování.



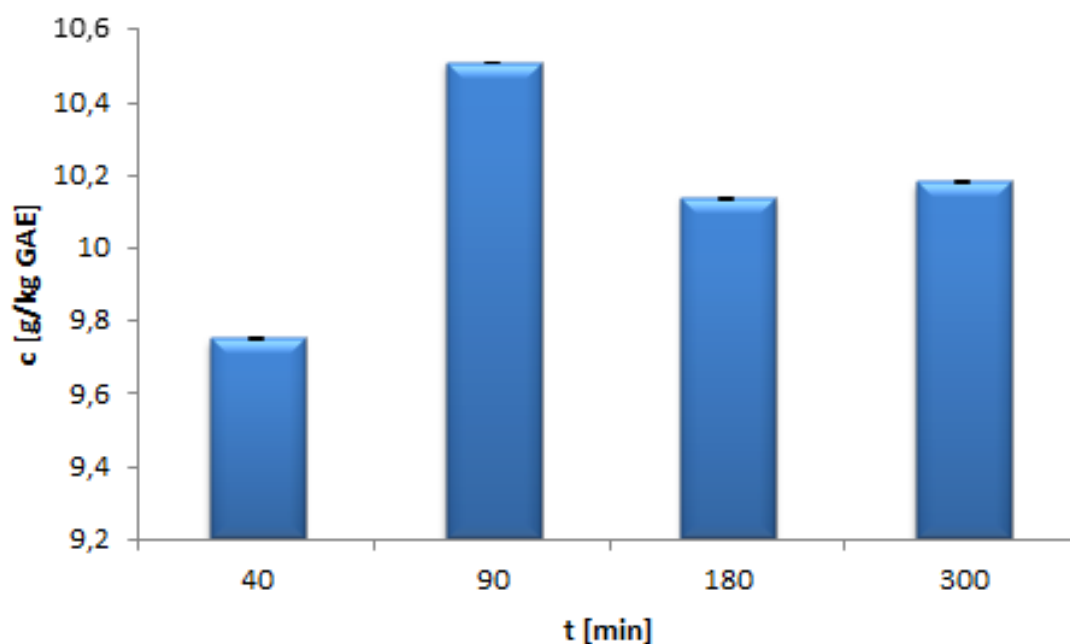
Obr.13: Časová změna celkového obsahu polyfenolických látek stanovených *in vitro* v plodech goji

4.1.4 Kapsle Maqui, Cordyceps, Graviola

U vzorku kapslí Graviola, Cordyceps a Maqui byly odebírány, podobným způsobem jako v případě sušených plodů goji (4.1.3), alikvotní podíly vzorku během 5 hodin jejich rozpouštění v roztoku žaludeční šťávy. Pro každý čas byl stanoven obsah polyfenolických látek ve vzorku jednotlivých kapslí.

4.1.4.1 Kapsle Graviola

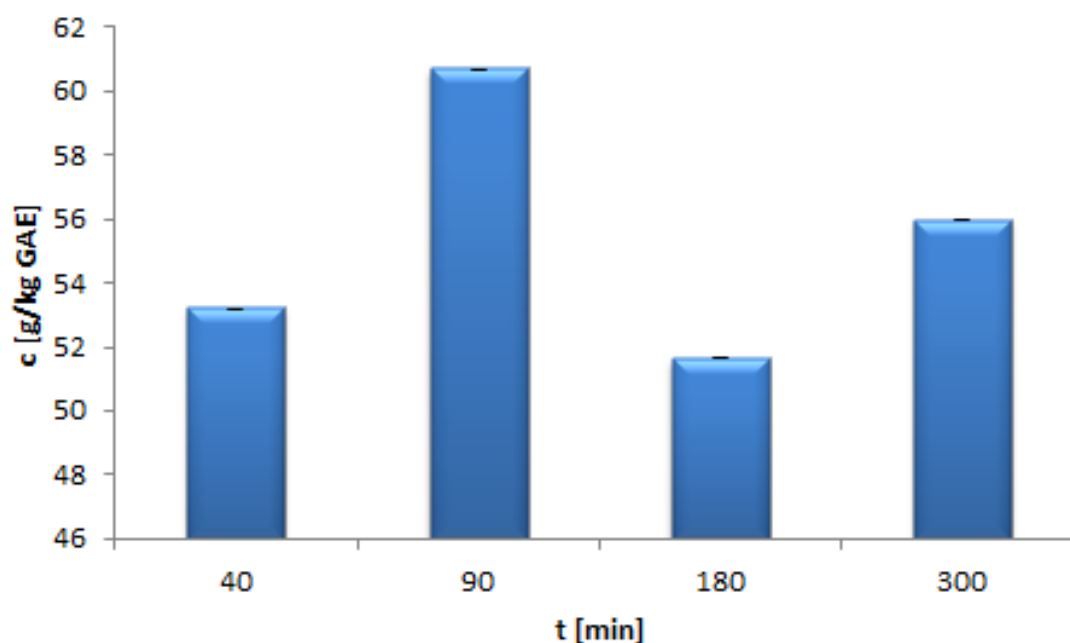
Nejnižší hodnoty koncentrace polyfenolických látek byly stanoveny u kapsle Graviola. Tyto hodnoty jsou znázorněny na Obr. 14. Nejvyšší obsah polyfenolických látek u kapsle Graviola vykazoval extrakt odebraný po 90 minutách a to $10,51 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ GAE. Experimentální fakt, že množství uvolněných polyfenolů prochází přes maximum, je možné vysvětlit skutečností, že v případě kapslí v prostředí žaludeční šťávy dochází také k rozpouštění obalu kapslí.



Obr. 14: Časová změna obsahu polyfenolických látek v extraktech kapsle Graviola

4.1.4.2 Kapsle Cordyceps

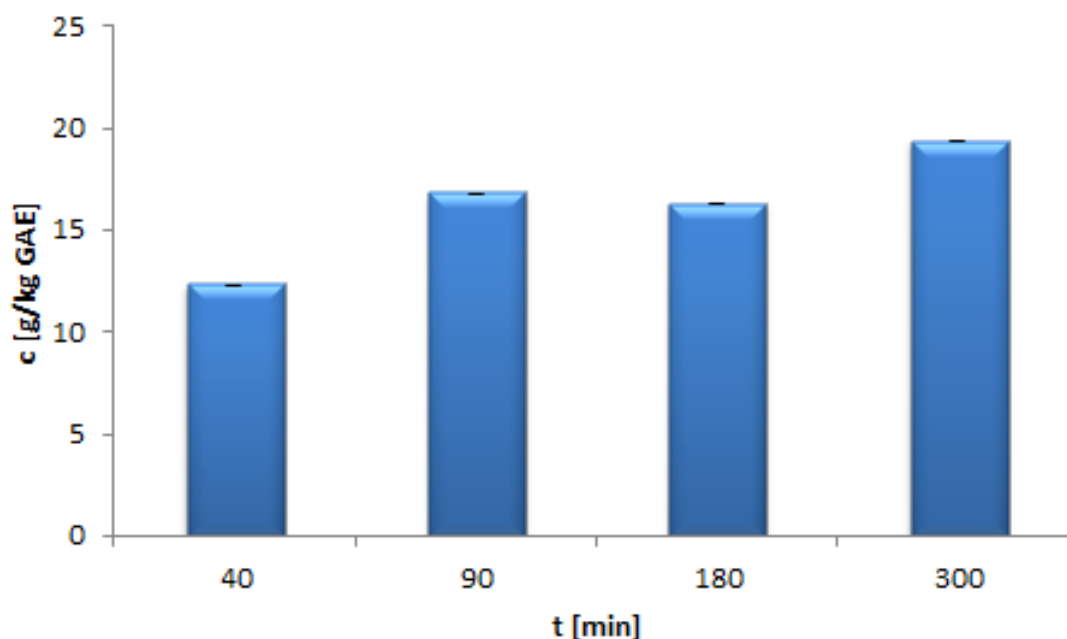
U kapsle Cordyceps byly v porovnání s ostatními typy kapslí zjištěny nejvyšší hodnoty koncentrace polyfenolických látek. Tyto hodnoty pro jednotlivé časy jsou uvedeny na Obr. 15. Také v tomto případě hodnoty obsahu polyfenolů procházejí přes maximum. Nejvyšší obsah polyfenolických látek byl zjištěn také u extraktu odebraného po 90 minutách, a to $60,69 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{GAE}$.



Obr. 15: Časová změna obsahu polyfenolických látek v extraktech kapsle Cordyceps

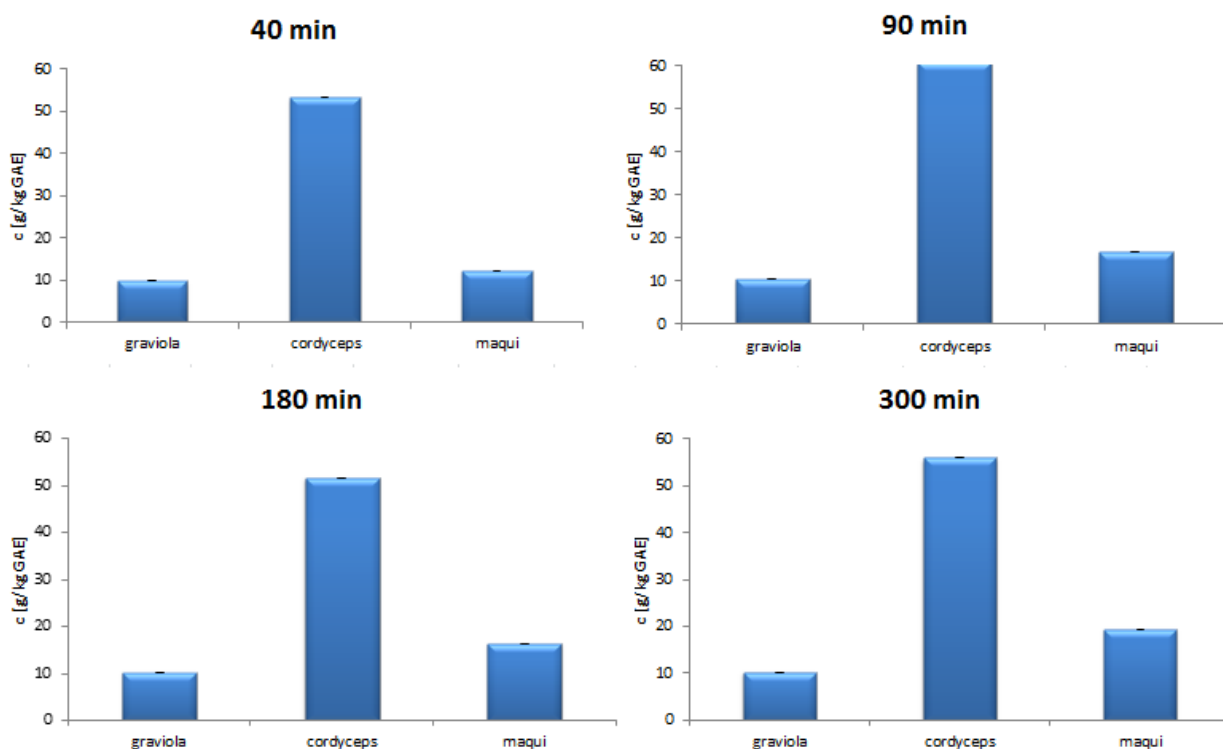
4.1.4.3 Kapsle Maqui

Hodnoty koncentrace polyfenolických látek pro kapsle Maqui jsou znázorněny na Obr. 16. U této kapsle docházelo k časovému nárůstu obsahu polyfenolických látek přibližně do 90. minuty experimentu. V dalším průběhu se hodnoty obsahu polyfenolů již výrazně nemění, což nasvědčuje tomu, že proces jejich uvolňování v přítomnosti žaludeční šťávy je ukončen. Nejvyšší hodnoty bylo dosaženo po 300 minutách extrakce a to $16,80 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{GAE}$.



Obr. 16: Časová změna obsahu polyfenolických látek v extraktech kapsle Maqui

Zřetelnější porovnání obsahu polyfenolických látek ve zkoumaných kapslích v jednotlivých časech je zřejmé z Obr. 17.

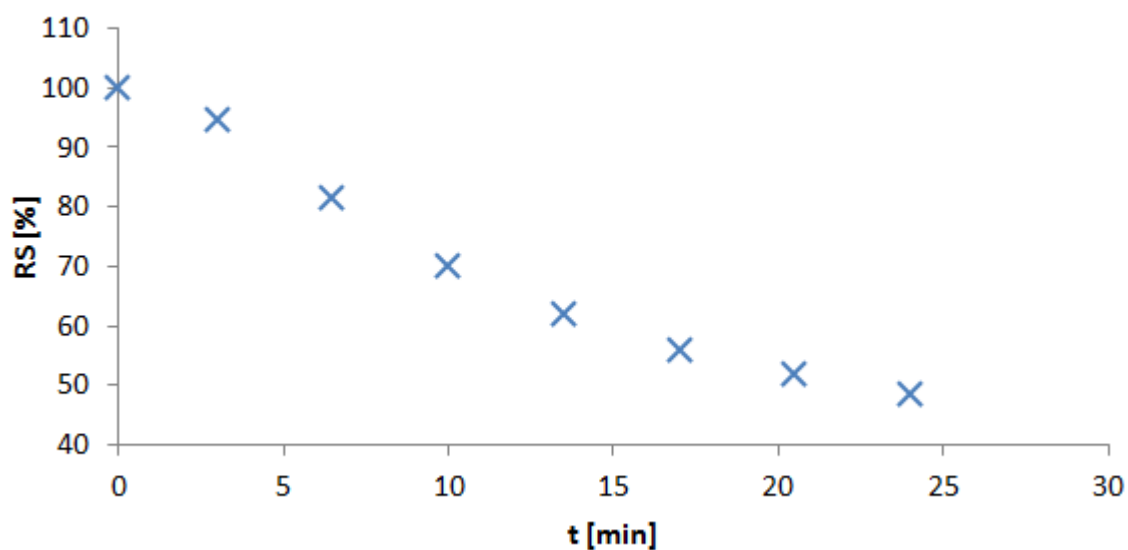


Obr. 17: Obsah polyfenolických látek v kapslích Graviola, Cordyceps a Maqui

4.2 Stanovení DPPH radikál-zhášející aktivity vybraných doplňků stravy

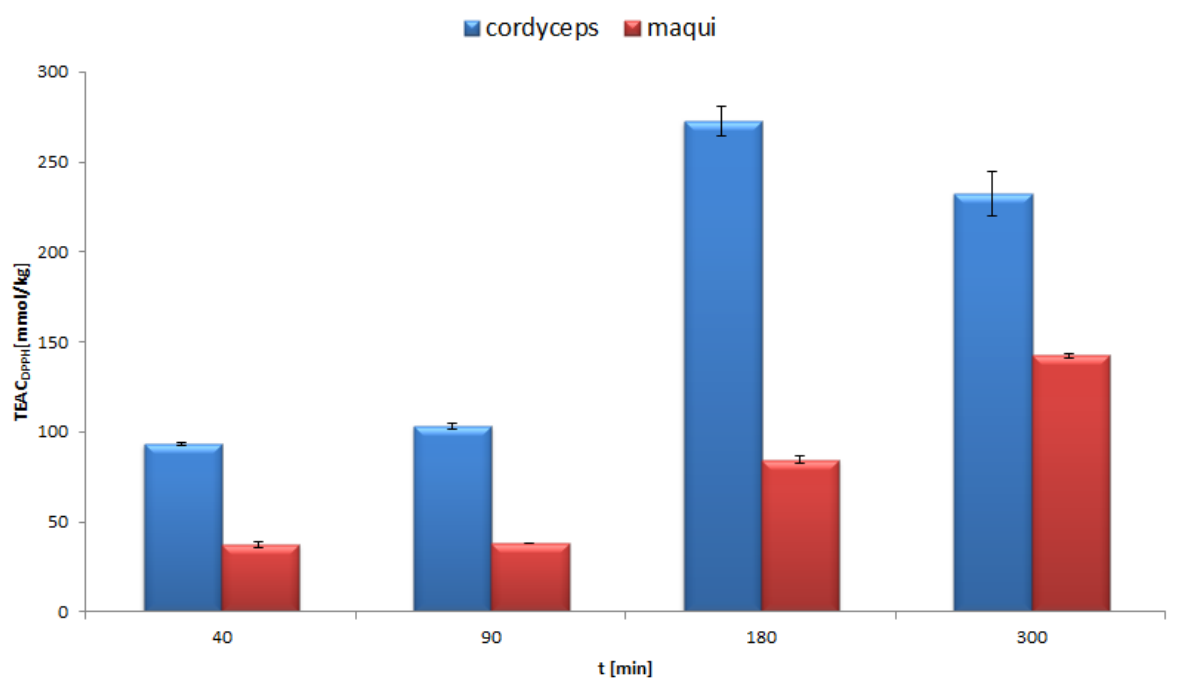
Ke stanovení DPPH radikál-zhášející aktivity metodou EPR spektroskopie byly vybrány dva vzorky a to kapsle Cordyceps a Maqui díky předpokladu nejvyšších hodnot antioxidační aktivity po stanovení celkových polyfenolických látek. Pro měření byly připraveny extrakty těchto kapslí v žaludeční šťávě, odebírané v různých časových intervalech (40, 90, 150 a 300 minut).

Na Obr. 14 můžeme sledovat změnu koncentrace radikálu DPPH v systému během 25 minut měření pro extrakt z kapsle Cordyceps odebraný po 40 minutách. Tento úbytek demonstruje zánik DPPH a tvorbu DPPH-H při reakci radikálu s látkou s antioxidačními vlastnostmi.



Obr. 18: Zhášení radikálu DPPH v čase pro extrakt kapsle Cordyceps odebrán po 40 minutách extrakce

Na základě průběhu zániku DPPH radikálu s časem byly hodnoty antioxidačních aktivit vyjádřeny formou $TEAC_{DPPH}$. Získané výsledky jsou uvedeny na Obr. 19.



Obr. 19: Průměrné hodnoty $TEAC_{DPPH}$ stanovené v extraktech kapslí Cordyceps a Maqui

Z Obr. 19 je patrný značný rozdíl v hodnotách $TEAC_{DPPH}$ demonstrující radikál-zhášející aktivitu vzorků. U kapsle Maqui byl pozorován nárůst této aktivity při extrakci prováděné po delší časový úsek. U kapsle Cordyceps byla pozorována nejvyšší radikál-zhášející aktivita u vzorku odebraného po době 180 minut extrakce. To může být způsobeno nerovnoměrným zastoupením účinné látky v kapsli.

5 ZÁVĚR

Bakalářská práce se zabývá studiem některých vybraných typů potravinových doplňků s antioxidační aktivitou. Pozornost se soustředila na vzorky čaje, sirupu, sušených plodů a vybraných typů kapslí. U vzorků čaje (bylinný čaj Lapacho) a sirupu (šťáva Cranvita) byly metodou UV-VIS spektroskopie stanoveny obsahy polyfenolů. V případě sušených plodů (sušené plody Goji) bylo sledováno uvolňování polyfenolických antioxidantů v průběhu jejich vyluhování v prostředí žaludeční šťávy. Zde byl jednoznačně pozorován nárůst jejich koncentrace s časem. Studium uvolňování polyfenolických struktur z potravinových doplňků na bázi komerčních produktů (kapsle Maqui, Cordyceps, Graviola) je charakteristické tím, že jejich koncentrace v prostředí žaludečních šťáv dosahuje maximální koncentrace (cca v čase 90 minut). V dalším průběhu času dochází k jejímu poklesu resp. koncentrace se výrazně nemění. Při interpretaci uvedeného chování této skupiny doplňků stravy je nutné vzít do úvahy skutečnost, že samotné kapsle se skládají nejen z aktivní látky, ale také z obalu, který rovněž podléhá přeměnám. Produkty těchto přeměn mohou pravděpodobně v pozdějších stádiích experimentu reagovat s již uvolněnými polyfenoly a tím snižovat jejich koncentraci. Ačkoliv nosnou spektroskopickou metodou v rámci bakalářské práce byla UV-VIS spektroskopie, při studiu antioxidačních aktivit doplňků stravy byla v případě kapslí Cordyceps a Maqui použita také EPR spektroskopie. Zde byla aplikována metoda, založená na studiu časového zániku stabilního radikálu DPPH v důsledku jeho inaktivace (zhášení) reakcí s hydroxylovými skupinami polyfenolických sloučenin. Antioxidační aktivity v různých časech byly za těchto okolností vyjádřeny prostřednictvím standardního faktoru $TEAC_{DPPH}$.

Bakalářská práce si nebrala za cíl přesné stanovení číselných hodnot. Pozornost byla soustředěna především na důkaz obsahu antioxidačně aktivních látek a sledování trendů jejich výskytu. Podrobnější výzkum v dané oblasti se předpokládá v rámci dalšího rozvíjení problematiky studia antioxidační aktivity doplňků stravy v budoucnosti.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MACH, Ivan. Doplnky stravy. Vyd. 1. Praha: Svoboda Servis, 2004, 157 s. ISBN 80-863-2034-0.
- [2] TRNA, J., E. TÁBORSKÁ. Přírodní polyfenolové antioxidanty. Dostupné z www.med.muni.cz/biochem/semináře/prirantiox.rtf
- [3] Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích
- [4] Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/46/ES ze dne 10. června 2002, o sblížení právních předpisů členských států týkajících se doplňků stravy
- [5] Vyhláška č. 225/2008 Sb., kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a obohacování potravin
- [6] GUTTERIDGE, John M.C. a Barry HALLIWELL. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2010, vol. 393, issue 4, s. 561-564 [cit. 2014-11-10]. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.02.071. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X10002913>
- [7] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*. 2004, vol. 98, s. 174-179.
- [8] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, xx, 623 s. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [9] SLANINA Jiří, Eva TÁBORSKÁ. Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chemické listy*. 2004, vol. 98, s. 239-245.
- [10] CÉSPEDES, Carlos L., Maribel VALDEZ-MORALES, José G. AVILA, Mohammed EL-HAFIDI, Julio ALARCÓN a Octavio PAREDES-LÓPEZ. Phytochemical profile and the antioxidant activity of Chilean wild black-berry fruits, *Aristotelia chilensis* (Mol) Stuntz (Elaeocarpaceae). *Food Chemistry* [online]. 2010-04-01, vol. 119, issue 3, s. 886-895 [cit. 2014-11-02]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.07.045. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814609009327>.
- [11] GIRONÉS-VILAPLANA, Amadeo, Pedro MENA, Cristina GARCÍA-VIGUERA a Diego A. MORENO. A novel beverage rich in antioxidant phenolic: Maqui berry (*Aristotelia chilensis*) and lemon juice. [online]. [cit. 2014-11-02]. DOI: 10.1016/j.lwt.2012.01.020. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643812000369>
- [12] ESCRIBANO-BAILÓN, María Teresa, Cristina ALCALDE-EON, Orlando MUÑOZ, Julián C. RIVAS-GONZALO a Celestino SANTOS-BUELGA. Anthocyanins in berries of Maqui [*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz]. *Phytochemical Analysis* [online]. 2006, vol. 17, issue 1, s. 8-14 [cit. 2014-11-10]. DOI: 10.1002/pca.872. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pca.872>
- [13] <http://www.berry-maqui.cz/rozdil-mezi-maqui-a-acai/#maqui-berry-bunch-jpg1>
- [14] MINARI, J.B. a U. OKEKE. Chemopreventive effect of *Annona muricata* on DMBA-induced cell proliferation in the breast tissues of female albino mice. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2014, vol. 15, issue 4, s. 327-334. DOI:

- 10.1016/j.ejmhg.2014.05.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1110863014000573>
- [15]GAVAMUKULYA, Yahaya, Faten ABOU-ELELLA, Fred WAMUNYOKOLI a Hany AEL-SHEMY. Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2014, vol. 7, S355-S363. DOI: 10.1016/S1995-7645(14)60258-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1995764514602583>
- [16]JIMÉNEZ, Víctor M., Maike GRUSCHWITZ, Ralf M. SCHWEIGGERT, Reinhold CARLE a Patricia ESQUIVEL. Identification of phenolic compounds in soursop (*Annona muricata*) pulp by high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization mass spectrometric detection. *Food Research International*. 2014, vol. 65, s. 42-46. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.05.051. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996914003664>
- [17]LIMA, Luciana A.R. Santos, Lúcia P.S. PIMENTA a Maria Amélia D. BOAVENTURA. Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. *Food Chemistry*. 2010, vol. 122, issue 4, s. 1129-1138. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.03.100. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610003948>
- [18]<http://botany.cz/cs/annona-muricata/>
- [19]WANG, Ying, Yan WANG, Dan LIU, Wang WANG, Huan ZHAO, Min WANG a Hongping YIN. Cordyceps sinensis polysaccharide inhibits PDGF-BB-induced inflammation and ROS production in human mesangial cells. *Carbohydrate Polymers*. 2015, s. -. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.02.012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861715001253>
- [20]CHOU, Shang-Min, Wan-Jung LAI, Tzu-Wen HONG, Jui-Ya LAI, Sheng-Hong TSAI, Yen-Hsun CHEN, Sz -Hsien YU, Cheng-Hsiang KAO, Richard CHU, Shih-Torng DING, Tsai-Kun LI a Tang-Long SHEN. Synergistic property of cordycepin in cultivated *Cordyceps militaris*-mediated apoptosis in human leukemia cells. *Phytomedicine*. 2014, vol. 21, issue 12, s. 1516-1524. DOI: 10.1016/j.phymed.2014.07.014. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944711314003006>
- [21]CHEN, Ying, Shih-Hung YANG, Dueng-Yuan HUENG, Jhih-Pu SYU, Chih-Chen LIAO a Ya-Chieh WU. Cordycepin induces apoptosis of C6 glioma cells through the adenosine 2A receptor-p53-caspase-7-PARP pathway. *Chemico-Biological Interactions*. 2014, vol. 216, s. 17-25. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.03.010. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279714001136>
- [22]<http://www.blahodarnehouby.cz/cordyceps>
- [23]LI, Jie, Li PAN, C. Benjamin NAMAN, Ye DENG, Heebyung CHAI, William J. KELLER a A. Douglas KINGHORN. Pyrrole Alkaloids with Potential Cancer Chemopreventive Activity Isolated from a Goji Berry-Contaminated Commercial Sample of African Mango. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014-06-04, vol. 62, issue 22, s. 5054-5060. DOI: 10.1021/jf500802x. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf500802x>

- [24]POTTERAT, Olivier. Goji (*Lycium barbarum* and *L. chinense*): Phytochemistry, Pharmacology and Safety in the Perspective of Traditional Uses and Recent Popularity. *Planta Medica* [online]. 2009, vol. 76, issue 01, s. 7-19 [cit. 2015-02-13]. DOI: 10.1055/s-0029-1186218. Dostupné z: <http://www.goji-berry-turkiye.com/docs/Goji%20%28Lycium%20barbarum%20and%20L.%20chinense%29%20Phytochemistry,%20Pharmacology%20and%20Safety%20in%20the%20Perspective%20of%20Traditional%20Uses%20and%20Recent%20Popularity.pdf>
- [25]<http://www.bylinybylin.cz/vegetalis/eshop/400-1-Vsechny-produkty/0/5/2747-Kustovnice-Goji-HQ-vyber-plodu-A-100g-Ning-Xia>
- [26]DOROFJEVA, Karina, Tatjana RAKCEJEVA, Ruta GALOBURDA, Lija DUKALSKA a Jorens KVIESIS. Vitamin C content in Latvian cranberries dried in convective and microwave vacuum driers. *Procedia Food Science*. 2011, vol. 1, s. 433-440. DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.067. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211601X1100068X>
- [27]SOCHOROVÁ, Nataša, Stanislava HILŠEROVÁ a Aleš VIDLÁŘ. Brusinky nejen v urologii. *Urologie pro praxi*. 2012, roč. 2012, 13(4), s. 3. Dostupné z: <http://m.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2012/04/09.pdf>
- [28]JANČA, Jiří. *Herbář léčivých rostlin: 1. díl*. 1. vyd. Praha: EMINENT, 1994, 288 s. ISBN 80-858-7602-7.
- [29]<http://www.nasevyziva.cz/sekce-ovoce/clanek-brusnice-brusinka-vaccinium-vitis-idaea-l--308.html>
- [30]GÓMEZ CASTELLANOS, J. Rubén, José M. PRIETO a Michael HEINRICH. Red Lapacho (*Tabebuia impetiginosa*)—A global ethnopharmacological commodity?. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009, vol. 121, issue 1, s. 1-13. DOI: 10.1016/j.jep.2008.10.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874108005631>
- [31]TSENG, Chih-Hua, Chih-Mei CHENG, Cherng-Chyi TZENG, Shin-I PENG, Chiao-Li YANG a Yeh-Long CHEN. Synthesis and anti-inflammatory evaluations of β -lapachone derivatives. *Bioorganic*. 2013, vol. 21, issue 2, s. 523-531. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.10.047. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968089612008711>
- [32]<http://www.lapachocaj.cz/>
- [33]<http://www.funeat.org.ar/ecologia.html>
- [34]BLEŠOVÁ, Marie, Radka OPATŘILOVÁ a Anna LIŠKOVÁ. *Analýza léčiv: návody na cvičení*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 199 s. ISBN 80-730-5509-0.
- [35]VORLOVÁ, Lenka, Michaela KRÁLOVÁ, Ivana BORKOVCOVÁ a Romana KOSTRHOUNOVÁ. *Chemie potravin a chemické laboratorní metody: Obecné kapitoly*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 57 s. ISBN 978-80-7305-687-2
- [36]NĚMCOVÁ, Irena. *Spektrometrické analytické metody I*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2004, 166 s. ISBN 80-246-0776-X.
- [37]EVERETTE, Jace D., Quinton M. BRYANT, Ashlee M. GREEN, Yvonne A. ABBEY, Grant W. WANGILA a Richard B. WALKER. Thorough Study of

Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin-Ciocalteu Reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010-07-28, vol. 58, issue 14, s. 8139-8144. DOI: 10.1021/jf1005935. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf1005935>

- [38] NĚMCOVÁ, Irena, Pavel ENGST, Ivan JELÍNEK, Jan SEJBAL a Petr RYCHLOVSKÝ. *Spektrometrické analytické metody II*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1998, 162 s. ISBN 80-718-4586-8.
- [39] YORDANOV, N. D. a Aneta G. CHRISTOVA. Quantitative spectrophotometric and EPR-determination of 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH). *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 1997-6-30, vol. 358, issue 5, s. 610-613. DOI: 10.1007/s002160050478. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s002160050478>
- [40] http://trc-canada.com/detail.php?CatNum=D492045&CAS=1898-66-4&Chemical_Name=2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl&Mol_Formula=C18H12N5O6&Synonym=2,2-Diphenylpicrylhydrazyl;%20DPPH;%20DPPH%20Radical;%20Diphenylpicrylhydrazyl;%20N,N-Diphenyl-N%E2%80%99-picrylhydrazyl;%201,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl;%201,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl%20Radical;%202,2-Diphenyl-1-%282,4,6-trinitrophenyl%29hydrazinyl%20%28DPPH%20radical%29;%202,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl;%202,2-Diphenyl-1-%282,4,6-trinitrophenyl%29hydrazyl;%202,2-Diphenyl-1-%282,4,6-trinitrophenyl%29hydrazinyl
- [41] SINGLETON, Vernon L., Rudolf ORTHOFER a Rosa M. LAMUELA-RAVENTÓS. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. s. 152. DOI: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687999990171>

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
EPR	Electron Paramagnetic Resonance
GAE	Gallic Acid Equivalent
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
TAA	Total Antioxidant Activity
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Activity
TPC	Total Polyphenolic Content
UV-VIS	Ultraviolet Visible Spectroscopy