

Středoškolská odborná činnost

2011

Obor č. 7 – zemědělství, potravinářství, lesní a vodní hospodářství

Měření antioxidační aktivity a polyfenolických sloučenin ve vybraných hybridech meruněk

Autor: Petr Pokora

Škola: Gymnázium, Brno-Řečkovice,
Terezy Novákové 2, Brno, 621 00

Kraj: Jihomoravský

Konzultant: Ing. Jiří Sochor

Místo vypracování: Laboratoře metalomiky a nanotechnologií,
Mendelova univerzita v Brně

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci vypracoval samostatně, použil jsem podklady citované v práci a uvedené v příloženém seznamu a postup při zpracování práce je v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Brně dne

podpis:.....

Poděkování

Na tomto místě bych velice rád poděkoval Ing. Jiřímu Sochorovi za odborné vedení práce a také doc. Ing. Renému Kizekovi Ph.D. a Mgr. Michalu Kuňákovi Ph.D. za pomoc a cenné rady a připomínky při vypracovávání mojí práce.

Tato práce vznikla za podpory grantů IGA ZF MENDELU 9/2010/591, 2B08020 NPV II, QI91A032 a REMEDTECH GA ČR 522/07/0692.

Abstrakt

V této práci jsem se zabýval stanovením vybraných chemických analýz u nově vyšlechtěných hybridů meruněk (*Prunus armeniaca* L.). Cílem studie bylo vybrat ze souboru 243 hybridů meruněk hybrid meruňky s největším zdravotním benefitem pro člověka. Tento benefit spočíval v určení nejvyššího obsahu zdraví prospěšných látek – antioxidantů. Způsob, jak určit obsah těchto látek je pomocí tzv. antioxidační aktivity. Antioxidační aktivita byla měřena fotometricky, pomocí čtyř principiálně rozdílných testů. Pomocí DPPH, TEAC, FRAP a DMPD. Pomocí vysoko-účinné kapalinové chromatografie byl detekován obsah vybraných polyfenolických sloučenin, které jsou zajímavé svými antioxidačními účinky. Data byla statisticky a bioinformaticky zpracována a na základě těchto údajů byl vybrán hybrid Dolgocvetna.

Klíčová slova: meruňka (*Prunus armeniaca* L.), antioxidační aktivita, antioxidanty, polyfenolické sloučeniny

Abstract

In this work, I dealt with the determination of selected chemical analysis of newly bred hybrids of apricot (*Prunus armeniaca* L.). The aim of this study was from group of 243 hybrids of apricots select apricot hybrid with the greatest health benefit for humans. This benefit resided in determination of the highest content of health beneficial substances-antioxidants. The way how to determine the content of these substances is by measuring of antioxidant activity. Antioxidant activity was measured photometrically, using four principle different tests. Using the DPPH, TEAC, FRAP and DMPD. Using high-performance liquid chromatography was detected content of selected polyphenolic compounds, which are interesting for their antioxidant effects. Data were statisticly and bioinformaticly processed and on the basis of these data was selected hybrid Dolgocvetna.

Key words: apricot (*Prunus armeniaca* L.), antioxidant activity, antioxidants, polyphenolic compounds

Obsah

Úvod	7
1.1. Volné radikály	7
1.1.1. Druhy volných radikálů.....	8
1.1.1.1. Reaktivní kyslíkové sloučeniny (ROS).....	8
1.1.1.2. Hydroxylové radikály.....	9
1.1.1.3. Singletový kyslík.....	9
1.1.1.4. Peroxid vodíku.....	9
1.2. Antioxidanty	9
1.3. Polyfenoly	10
1.4. Měřené antioxidanty	11
1.4.1. Kyselina gallová.....	11
1.4.2. Kyselina protokatechinová.....	12
1.4.3. Kyselina 4 aminobenzoová.....	12
1.4.4. Kyselina chlorogenová.....	13
1.4.5. Katechin.....	14
1.4.6. Kyselina kávová.....	14
1.4.7. Epikatechin.....	15
1.4.8. Vanilin.....	15
1.4.9. Kyselina p-kumarová.....	16
1.4.10. Rutin.....	16
1.4.11. Kyselina ferulová.....	17
1.4.12. Kvercitrin.....	18
1.4.13. Kyselina salicylová.....	18
1.4.14. Resveratrol.....	19
1.4.15. Kvercetin.....	19
1.5. Stanovení sledovaných parametrů	20
1.5.1. Antioxidační aktivita.....	20
1.5.2. Vysoce-účinná kapalinová chromatografie.....	Chyba! Záložka není definována.
2. Cíle práce	22
3. Metodika měření	23
3.1. Biologické vzorky	23
3.2. Příprava vzorků	24
3.3. Měření	24
3.3.1. Spektrofotometrie.....	24
3.3.1.1. DPPH test.....	25
3.3.1.2. TEAC test (ABTS).....	25
3.3.1.3. FRAP test.....	26
3.3.1.4. DMPD test.....	27
3.3.1.5. Test na celkové polyfenoly.....	27
3.3.2. Vysoce-účinná kapalinová chromatografie.....	Chyba! Záložka není definována.

4. Výsledky	29
4.1. Antioxidační aktivita	29
4.2. Polyfenoly.....	37
5. Závěr	39
6. Seznam použité literatury	40

Úvod

Ovoce a zelenina jsou se svými pozitivními účinky na lidské zdraví nedílnými komponenty lidské stravy. Farmaceuticko-terapeutický význam spočívá ve vysokém obsahu antioxidačních látek tzv. antioxidantů. Jedná se o látky, které zhasí či vychytávají nebezpečné volné radikály. Jedná se především o polyfenolické sloučeniny, vitamíny a minerální prvky. Bylo prokázáno, že pravidelná konzumace ovoce, zeleniny a jiných zdrojů antioxidantů přispívá k prevenci kardiovaskulárních a neurodegenerativních chorob, mají protizánětlivé, antimutagenní a antineurodegenerativní účinky.

1.1. Volné radikály

Volné radikály jsou nestabilní a velmi reaktivní částice (atomy i molekuly), které jsou schopné samostatné existence [1]. Ve své valenční vrstvě obsahují jeden, ojediněle dva volné nepárové elektrony. K tomuto nepárovému elektronu se snaží získat jiný elektron, aby si získal svou vlastní stabilitu. Elektron „vytrhne“ z jakéhokoliv atomu nebo molekuly, na kterou narazí (tuk, bílkovina, i z DNA, kde dochází k poškození dusíkatých bází následným mutacím). Tento proces se nazývá peroxidace, kdy vznikají karcinogenní aldehydy (např. malondialdehyd, 4-hydroxynonenal), hydroperoxydy a lipofusciny. Tímto ovšem svoji nebezpečnost pouze předá dál – vzniká řetězová reakce. Můžeme použít tvrzení, že volné radikály plodí další radikály [2, 3].

Tento proces se dá zastavit třemi způsoby. Buď vazbou mezi dvěma radikály, nebo dvěma podobnými reakcemi s antioxidantem. Reakce mezi dvěma volnými radikály probíhá následovně. Nejdříve se musejí radikály setkat, poté kvůli jejich velmi vysoké reaktivitě vytvoří molekulu, která je dále nereaktivní, protože takto vzniklá molekula nemá už žádný volný nepárový elektron. Reakce s antioxidantem probíhají stejně, pouze se odlišují v tom, kdo komu předá elektron. Buď volný radikál antioxidantu, nebo antioxidant předá radikálu vodíkový radikál. Vzniknou takto dvě samostatné, dále nereaktivní částice, které pro organismus nepředstavují žádné nebezpečí. Volné radikály vznikají jako přirozená součást našeho metabolismu a to buď neenzymaticky (např. v dýchacím řetězci) nebo enzymaticky (např. v cytochromu P450). Nejznámější vznik volných radikálů probíhá v dýchacím řetězci, kde oxidací vzdušným kyslíkem vzniká energie a jako vedlejší produkty volné radikály - superoxid (O_2) a volný hydroxylový radikál (OH). Za normálních okolností 98-99% energie vzniká cestou přes cytochromový systém a jen 1-2% jedoelektronovou redukcí, tj. přes volné radikály [4]. Ovšem v kritických stavech nemocí může vznikat velká většina energie touto

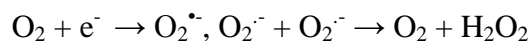
vedlejší cestou. Superoxid je účinkem superoxidodismutázy (SOD) zpracován na peroxid vodíku, který není volným radikálem, ale je neméně škodlivý a proniká přes buněčné membrány a má delší poločas trvání než volné radikály, které mají obvykle poločas v rozmezí 10^{-5} - 10^{-9} sekundy [5]. Tyto metabolické produkty volných radikálů bývají označovány ROS (reactive oxygen species). K ROS látkám patří např. peroxid vodíku, singletový kyslík, kyselina chlorná aj. Ovšem existují i volné radikály s poločasem delším než den. Peroxid vodíku je v organismu zneškodňován hlavně glutathionperoxidázou (GSHPx), méně katalázou (CAT). Ovšem při nedostatku těchto enzymů a v přítomnosti kovů jako Fe, Ni, Co, Cd, Cu vznikají z peroxidu vodíku 2 volné hydroxylové radikály, které teprve s dalším elektronem dají molekulu vody (Fentonova reakce). Dále mohou vznikat vlivy vnějšího prostředí jako například kouřením, pesticidy, znečištěním. Když je volných radikálů více než antioxidantů, stav oxidačního stresu. Ovšem lidské tělo umí volné radikály efektivně využívat. Například v bílých krvinkách je obsaženo mnoho volných radikálů, které dokáží zabít kvasinky, mikroorganismy a jiné parazity. Díky volným radikálům může dojít k oplození vajíčka. Krátkodobý oxidační stres může být důležitý v prevenci stárnutí díky vyvolání procesu známého jako mitohormesis [6]. Volné radikály urychlují nebo jsou dokonce zodpovědné za vznik mnohých nemocí. Například kardiovaskulárních a neurodegenerativních onemocnění. Každá buňka člověka je za den napadena asi 10 000 volnými radikály. Pokud není antioxidační ochrana a reparační pochody dostatečně účinné, vzniká postupně karcinomem iniciovaná buňka, preneoplastická buňka, neoplastická buňka a nakonec klinický nádor. Průměrně 65 – 70 % lidí je příliš zatíženo oxidačním stresem prostřednictvím volných radikálů. Sledování vlastního stavu oxidačního stresu je důležitým opatřením smysluplné prevence zdraví [7].

1.1.1. Druhy volných radikálů

1.1.1.1. Reaktivní kyslíkové sloučeniny (ROS)

Jsou to sloučení kyslíku s volným nepárovým elektronem. Tyto volné radikály opětovaně poškozují mitochondrie a DNA [8]. Nejčastějším zástupcem této skupiny je superoxid (O_2^-). Superoxid patří ke slabším oxidantům. Snadno podléhá dismutaci, takže často reagují dvě molekuly superoxidu, které si vzájemně předávají elektrony, za vzniku molekuly kyslíku a peroxidu vodíku (rovnice 1). Naše tělo proti nim bojuje produkcí superoxidodismutázy (enzym, který přeměňuje superoxidový radikál na peroxid vodíku. Známe 2 druhy tohoto enzymu: cytoplasmatický typ, který obsahuje Cu a Zn jako aktivní

centrum enzymu a mitochondriální typ obsahující mangan – Mn). Superoxid je také často neutralizován vitamínem E (superoxid je odbourán na kyslík vitamínem E, přitom však vzniká radikál vitamínu E, dále vitamin C regeneruje vitamín E za vzniku radikálu vitamínu C a ten je teprve odstraňován redukovaným glutathionem. Ten je zpětně redukován glutathion reduktázou za účasti NADPH) [9].



Rovnice 1: Vznik kyslíkového radikálu

1.1.1.2. Hydroxylové radikály

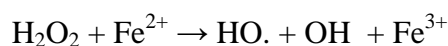
Jedná se sloučeniny kyslíku a vodíku. Je to velmi silné oxidační činidlo, které nejčastěji oxiduje nukleové kyseliny. Vzniká redukcí molekuly kyslíku v elektronovém transportním řetězci. Jedná se o neutrální formu hydroxylového iontu. Na rozdíl od superoxidů nemohou být hydroxylové radikály neutralizovány enzymy. Nejčastěji je neutralizován vitamínem E a albuminem [10].

1.1.1.3. Singletový kyslík

Jedná se o molekulu kyslíku se dvěma nepárovými elektrony s opačným spinem. Je součástí imunitního systému a oxiduje LDL cholesterol. Toto vede ke vzniku pěnových buněk a následnému snížení pružnosti cév. Je neutralizován vitamínem C nebo E [11].

1.1.1.4. Peroxid vodíku

Sám o sobě není peroxid vodíku nějak výjimečně nebezpečný. Hrozbu představuje pouze při reakci s dvoumocným železem za vzniku velice reaktivního hydroxylového radikálu a trojmocného železa (rovnice 2), které dále reaguje se superoxidem. V těle je peroxid vodíku neutralizován enzymy - glutathionperoxidázou obsahující selen nebo katalázou [12].



Rovnice 2: Vznik hydroxylového radikálu

1.2. Antioxidanty

Antioxidanty jsou fytochemikálie, vitamíny a další látky. Dnes je již známo, že antioxidanty jsou látky, které dokáží chránit lidské tělo před nepříznivými účinky některých reaktivních sloučenin - volných radikálů [13]. V lidském organismu nejčastěji volných kyslíkových radikálů (ROS). Je prokázáno, že pravidelná konzumace ovoce, zeleniny a jiných zdrojů antioxidantů (např. sójového oleje) přispívá k prevenci kardiovaskulárních nebo

karcinogenních chorob a mají také protizánětlivé, antimutagenní a antineurodegenerativní účinky (např. vitamín E, beta karoten, selen). Zdroje antioxidantů obsahují mnoho různých sloučenin s antioxidačními účinky. Avšak celkové množství antioxidačních látek nemusí znamenat celkovou antioxidační kapacitu (TAC), jelikož každá takováto látka vykazuje jinou schopnost inhibovat účinky volných kyslíkových radikálů, což závisí na synergické a redoxní interakci mezi jednotlivými molekulami.

Antioxidanty se vyskytují téměř ve všech známých druzích ovoce a zeleniny. Proto můžeme opětovně vidět tyto nápisy na obalech různých potravin a nápojů v supermarketu. Nejčastěji je tomu tak u džusů, čajů, káv, čokolády nebo u ovocných bonbónů. Ve spotřebitelích toto slovo nejspíše vyvolává představu nějakého vitamínu či léku proti četným nemocem, stárnutí a stresu. Výrobci též velice hojně využívají nápisů koenzym Q10 nebo vitamín C, což má přilákat více kupujících. Ovšem není to žádný podvod, tyto látky skutečně antioxidanty jsou, takže není žádný důvod proč výrobcům nevěřit a vinit je ze lživých reklam, že posílí naši imunitu a budeme se cítit lépe (pokud výrobek dané látky opravdu obsahuje, v evropské unii totiž neexistuje žádný zákon, který by upravoval podmínky užívání těchto nápisů). Ale jak se říká „všeho moc škodí“, tak to platí i antioxidantů. Navíc nikdo není schopný určit jaký antioxidant je nejlepší, protože jsou různé volné radikály, a ty se neutralizují různými antioxidanty. Dále nikdo není schopný, určit kolik daného antioxidantu lidské tělo potřebuje, protože potřeby každého lidského organismu jsou zcela individuální. Závisí zejména na fyzické aktivitě, zdravotním stavu a na vnějších vlivech jako je kouření či velké pracovní vytížení, kdy vznikají stresové situace [14].

Podle způsobu účinku rozlišujeme enzymové antioxidanty (SOD, GSHPx aj.) a neenzymové (kyselina močová, vitaminy C, E, β -karoten, bílkoviny, flavonoidy, selen, zinek). Antioxidanty můžeme také dělit na přirozené (přirozené antioxidanty jsou člověkem produkovány nebo přijímány v potravě a zapojují se do metabolismu) a na umělé, které jsou uměle přidávány do jídla. Dále se přirozené antioxidanty dělí na hydrofilní, které účinkují pouze extracelulárně a lipofilní, které se dokáží rozpustit v tucích, díky čemuž pronikají buněčnými membránami a účinkují intercelulárně (účinněji, ale se zpožděním) a na amfofilní, které kombinují obě předchozí schopnosti [2].

1.3. Polyfenoly

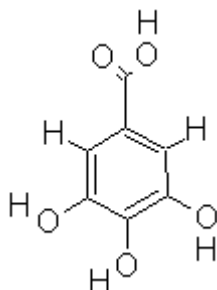
Polyfenoly jsou organické sloučeniny, nejčastěji přítomné v rostlinách [15]. Jsou tvořeny více jednotkami fenolů navázaných na sebe (benzenový kruh s navázanou OH - hydroxylovou skupinou). Polyfenoly se dělí do čtyř základních skupin, hydrolyzované taniny,

fenylpropanoidy, flavonoidy, kondenzované taniny. Jsou asi nejdůležitější skupinou chemických sloučenin, které mají antioxidační účinky. Právě pro jejich velké antioxidační účinky jsou dnes vědci velice zkoumány. Polyfenoly mohou tvořit až 65% všech antioxidantů přítomných v rostlinách. Polyfenolické sloučeniny tvoří mnoho podvojných skupin chemických sloučenin, které vznikají esterifikací, methylací nebo polymerací. Mezi nejvýznamnější zdroje polyfenolických sloučenin patří zelený čaj, lesní ovoce a v neposlední řadě i zkoumané meruňky [16].

1.4. Měřené antioxidanty

1.4.1. Kyselina gallová

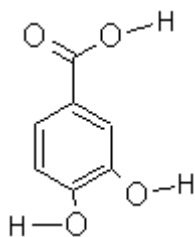
Kyselina gallová je organická kyselina přítomná ve většině rostlin, jako jsou hrozny, chmel nebo dubová kůra. Tuto kyselinu objevil K. W. Schneelee a vyskytuje se v mnoha na tanin bohatých rostlinách jako myrobalánovém (*Terminalia chebula*) ovoci, dividivi (*Caesalpinia coriaria*) luscích, v dhawa listech a kůře zlatého deště (*Cassia fistula*), babul (*Accacia arabica*) a avarum stromech (*Cassia auriculata*), kyselina gallová byla také produkována z tara taninů [17]. Je to fytochemikálie vyskytující se volně nebo v molekule taninu. Tato kyselina působí jako antioxidant, takže neutralizuje volné radikály. Má velmi dobré protiplísňové a antivirové vlastnosti. Čistá kyselina gallová se vyskytuje ve formě bezbarvého krystalického prášku. Získává se hydrolýzou taninu (polymer kyseliny gallové a glukózy) kyselinou sírovou. Tannin acyl hydroláza, běžně označovaná jako tannase, je užíván k biokenverzi taninu na kyselinu gallovou [18]. Kyselinu gallovou též obsahují též některé masti proti lupénce nebo hemoroidům. Kyselina gallová může být také požívána jako výchozí materiál při syntéze psychedelického alkaloidního meskalinu [19]. Kyselina gallová má na benzenové napojena dva druhy funkčních skupin. Je to hydroxylová a karboxylová skupina. Její sumární vzorec je $C_7H_6O_5$. Též se může nazývat 3, 4, 5 trihydroxybenzoová kyselina.



Obrázek 1: Strukturální vzorec kyseliny gallové

1.4.2. Kyselina protokatechinová

Jedna ze šesti isomerních sloučenin kyseliny dihydroxybenzoové, tedy 2, 4 dihydroxybenzoová kyselina. Vyskytuje se ve většině vyšších rostlin. V čisté formě je to bílý krystalický prášek. Vyznačuje se hlavně antikarcinogenními účinky. Údaje o biologické aktivitě kyseliny protokatechinové jsou rozporuplné, některé studie ukázaly, že působí jako antioxidant a potlačuje chemicky indukované karcinogeneze, a jiné, že vyvolává oxidační stres a podporuje růst nádorů [20]. Oxidační polymery protokatechinové kyseliny a huminové kyseliny inhibují in vitro replikaci viru chřipky (H1N1) [21]. Je známo, že protokatechinová kyselina má vliv na kmenové buňky. Léčba s kyselinou protokatechinovou účinně snižuje hladinu apoptózy nervových kmenových buněk [22]. Lokálně aplikovaná protokatechinová kyselina byla přeměněna na směs, které chybí antioxidantní schopnosti anebo mají potenciál zvýšení růstu nádoru [23]. Kyselina protokatechinová může účinně regulovat šíření lidské tukové tkáně od stromálních buněk [24]. Její sumární vzorec je $C_7H_5O_4$. Jiným názvem 3,4 - dihydroxybenzoová kyselina.

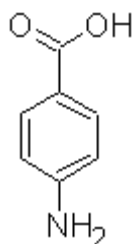


Obrázek 2: Strukturální vzorec kyseliny protokatechinové

1.4.3. Kyselina 4 aminobenzoová

Tato kyselina se skládá z benzoového kruhu a na něj navázané karboxylové skupiny a další aminoskupiny. Jedná se o bezbarvou krystalickou látku. Řadí se mezi deriváty karboxylových kyselin. Její schopnost je snižovat riziko vzniku rakoviny kůže. Je základní živinou pro některé bakterie a meziproducty syntézy bakteriální kyseliny listové. Tyto tetrahedrové vibrační režimy kyseliny 4aminobenzoové poskytují informace pro identifikaci otisků prstů, a nabízejí účinný přístup na studium struktury a vlastností vzorků [25]. Vlnové délky slunečního světla, které způsobuje zarudnutí a vznik rakoviny kůže se pohybuje v rozmezí 290 do 340 nm. Opalovací krémy obvykle obsahují látky, které absorbují světlo v těchto vlnových délkách. Jedna z nejvíce používaných je para-aminobenzoová kyselina (PABA). Předchozí práce ukázaly, že je senzibilizace PABA na letální a mutagenní účinky blízko-ultrafialové (UV) záření v modelu bakteriálního systému. Experimenty s buňkami myšího lymfomu L5178Y line, ukázaly senzibilizaci PABA a smrtící účinek blízko-UV záření, jehož rozsah, po korekci na absorpci záření UV PABA, nese přímý vztah ke

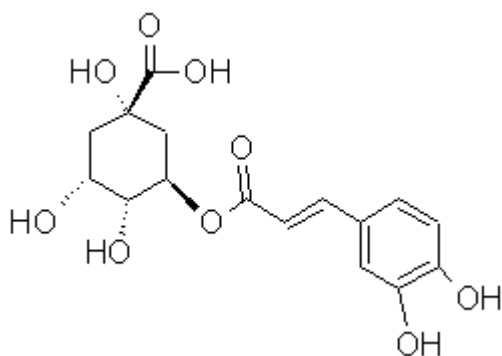
koncentraci PABA [26]. Její sumární vzorec je $C_7H_7NO_2$. Její jiný název je kyselina paraaminobenzoová – PABA, vitamin B_x.



Obrázek 3: Strukturální vzorec kyseliny 4 aminobenzoové

1.4.4. Kyselina chlorogenová

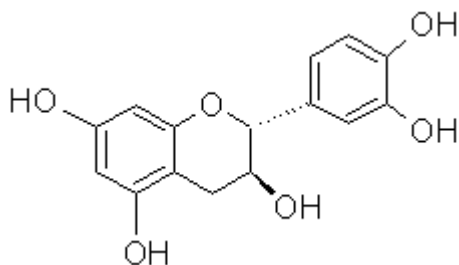
Je to fenolická sloučenina, ester kyseliny kávové se třemi hydroxylovými skupinami. Vyskytuje se v listech a plodech většiny vyšších rostlin a nejvíce v kávě a bambusu. Avšak káva je extrémně bohatým zdrojem kyseliny chlorogenové [27]. Mezi ostatní potravinové zdroje patří jablka, hrušky, jahody, artyčoky a lilky [28]. Je velice důležitou složkou v metabolismu rostlin. Přispívá k prevenci kardiovaskulárních onemocnění a diabetes mellitus. Zpomaluje vstřebávání glukózy do krve po jídle. Nejběžnějším esterem kávové kyseliny je kyselina chlorogenová (5-caffeoylchinová kyselina), která je přítomná v řadě druhů ovoce a zeleniny a v kávě. Šálek kávy obsahuje 50-150 mg kyseliny chlorogenové. Kromě kávy jsou bohatým zdrojem též brambory, jablka, hrušky, meruňky, broskve. Významný obsah chlorogenové kyseliny a jejích derivátů je rovněž v artyčoku, který v některých zemích patří k oblíbené zelenině. Denní příjem konzumentů kávy je 0,5-1g kyseliny chlorogenové. Kávoví abstinenti obvykle přijmou méně než 0,1g [29]. Tato kyselina má velice dobré antivirové, antibakteriální a antizánětlivé účinky, díky čemuž je velice hojně používána ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Kyselina chlorogenová a kávová jsou antioxidanty in vitro, a proto mohou přispět k prevenci kardiovaskulárních onemocnění. Jedna třetina chlorogenové kyseliny se vstřebá v tenkém střevě. To znamená, že část kyseliny se rychle dostává do krve a zbytek dosáhne tlustého střeva, kde může mít biologické účinky. Kyselina chlorogenová může inhibovat poškození DNA in vitro. Ve studiích na zvířatech bylo prokázáno, že in vitro inhibuje hydrolýzu glukózo-6-fosfátového enzymu v nevratném způsobu. Tento mechanismus umožňuje kyselině chlorogenové snížení jaterní glykolýzy (přeměna glykogenu na glukózu) a snížení vstřebávání nové glukózy. Její sumární vzorec je $C_{16}H_{18}O_9$.



Obrázek 4: Strukturální vzorec kyseliny chlorogenové

1.4.5. Katechin

Látka, která se svým složením velmi podobá flavonoidům. Jedná se o sloučeninu složenou ze dvou benzenových kruhů, a dyhydropropyranového heterocyklu s hydroxylovou skupinou. Nejčastěji se vyskytuje v listech čajovníku. Jednotlivé molekuly se spojují a dochází tak ke vzniku oligomerních a polymerních kondenzátů, z nichž velká většina je biologicky účinná zejména jako antioxidanty, vznikají tak zhášeče volných kyslíkových radikálů, protektory cévní stěny, střevní sliznice, jaterních funkcí atd. Mezi jeho hlavní přínosy patří snižování riziko rakoviny a omezování aktivity prvoků v ústech, což vede ke snižování tvorby zubního kazu. Často se vyskytuje ve víně. Též pomáhá hubnout a zlepšuje trávení [30]. Vyskytuje se ve dvou stereoisomerech – (+)-katechin a (-)-katechin. Celkově se dá napsat, že podporuje dlouhověkost. Jeho sumární vzorec je $C_{15}H_{14}O_6$.

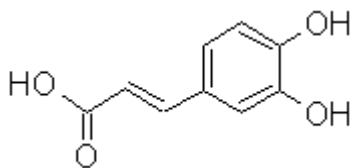


Obrázek 5: Strukturální vzorec katechinu

1.4.6. Kyselina kávová

Jedná se o fenolickou kyselinu, která je asi nejčastějším zdrojem polyfenolů pro člověka. Je odvozena od kyseliny skořicové. Je to metabolit rostlin, který plní funkci obrannou a pigmentovou. Kyselina kávová nemá nic společného s kofeinem, jedná se o dvě odlišné a na sobě nezávislé látky. Tvoří velice důležité estery, např. kyselinu chlorogenovou. Estery se mohou užívat jako vůně a parfémy. Kyseliny chlorogenová a kávová jsou antioxidanty in vitro, a proto mohou přispět k prevenci kardiovaskulárních onemocnění [31]. Téměř všechna kávová kyselina se vstřebává v tenkém střevě člověka. To znamená, že se

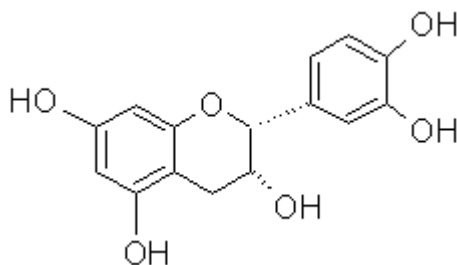
rychle dostává do krve [29]. Mohou zabránit tvorbě karcinogenních a mutageních N-nitro sloučenin, protože jsou inhibitory N-nitrosace in vitro. Její sumární vzorec je $C_9H_8O_4$.



Obrázek 6: Strukturální vzorec kyseliny kávové

1.4.7. Epikatechin

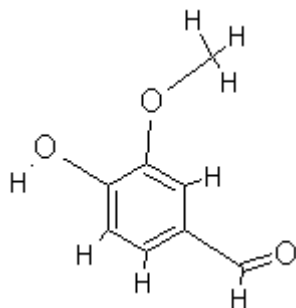
Flavonid, který napodobuje činnost inzulínu. Vyskytuje se ve dvou stereoisomerech (+)-epikatechin a (-)-epikatechin. Je silným antioxidantem proti lipoperoxidaci [32]. Jeho sumární vzorec je $C_{15}H_{14}O_6$.



Obrázek 7: Strukturální vzorec epikatechinu

1.4.8. Vanilin

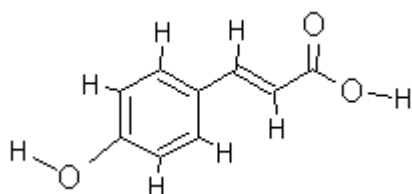
Tato látka se řadí mezi fenoly a aldehydy. Vanilin se v přírodě hojně vyskytuje v rostlinách, obvykle jako glykosid vázaný nebo jako prekurzor vázán na velké molekuly ligninu ve dřevě. Je těkavý a hlavní složkou koření vanilky. Hlavním využitím bývá ochucování pokrmů kořením vanilky v potravinářském průmyslu, různé vůně a parfémů a ve farmaceutickém průmyslu. Vanilin je jednou z nejdůležitějších aromatických sloučenin používaných v potravinách, nápojích, parfémeh a léčivech a je vyráběn v rozsahu více než 10 tisíc tun za rok, prostřednictvím chemické syntézy [33]. Jiným názvem 4hydroxy-3-methoxybenzaldehyd. Jeho sumární vzorec je $C_8H_8O_3$.



Obrázek 8: Strukturální vzorec vanilinu

1.4.9. Kyselina p-kumarová

Derivát kyseliny skořicové. Je jedním ze tří derivátů kyseliny skořicové (o-, m-, p-kumarová) a zároveň také nejběžnějším. Fenolická kyselina obsažená nejvíce v hroznech a ve víně. (E)-p-kumarová kyselina má schopnost chránit proti oxidačnímu stresu a genotoxicitům v kultivovaných savčích buňkách. Také vykazuje schopnost snižovat aktivitu enzymů metabolismu xenobiotik, cytochromu P450 1A a cyklooxygenázu-2. Hydroxyskořicové kyseliny jsou důležité složky stěn rostlinných buněk v některých rostlinných potravinách. Je známo, že působení mikrobiálních hydroxycinnamoyl esteráz může vést k uvolnění hydroxyskořicové kyseliny z vazby ester na polysacharidy buněčné stěny do lidského tlustého střeva. Tak, za předpokladu, že mohou dosáhnout účinné hladiny v tlustém střevě, mohou poskytnout důležitý mechanismus, kterým vláknina z rostlin, jako je špenát nebo obilí, chrání proti rakovině tlustého střeva [34]. Její sumární vzorec je $C_9H_8O_3$.

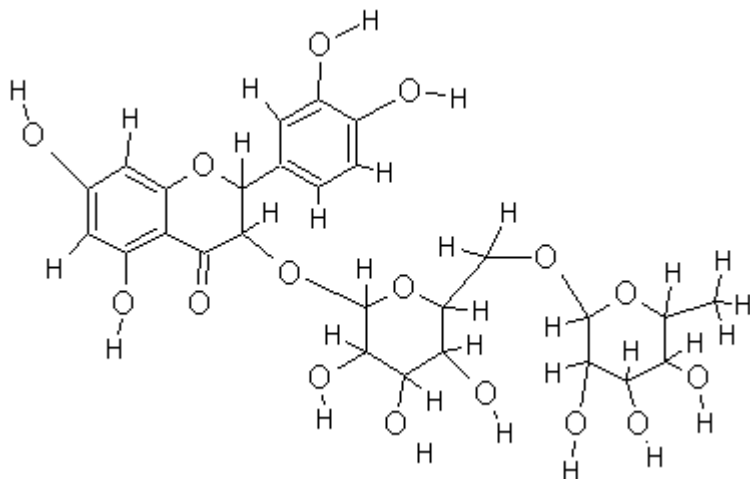


Obrázek 9: Strukturální vzorec kyseliny p-kumarové

1.4.10. Rutin

Flavonoid, někdy označován jako vitamin P. Může být vytvořen navázáním disacharidu na kvercetin. V čistém stavu žlutý krystalický prášek. Dnes je to velice rozšířený doplněk stravy z důvodu jeho příznivých účinků na kardiovaskulární soustavu. Největším přírodním zdrojem tohoto antioxidantu je pohanka. Rostliny syntetizují rutin, flavonoidy, kvercetin prostřednictvím procesu, který nastane během intermediárního metabolitu [35]. Zvyšuje využitelnost kyseliny askorbové. Jeho sumární vzorec je $C_{27}H_{30}O_{16}$. Jiný název je vitamin P₁. Kvercetin a rutin se používají v mnoha zemích jako vasoprotektor a jsou složkou mnoha multivitaminových přípravků a bylinných léků [36]. Flavonoidy jsou skupinou flavonoidů, široce se vyskytující v rostlinách. Tyto sloučeniny, zejména kvercetin vykazuje množství biologických aktivit jako antikarcinogenní, antioxidantní a enzymy modulující. Epidemiologické studie rozpoznali opak asociace mezi dietním příjmem flavonoidů a kardiovaskulárními nemocemi a rakovinou. Poslední studie rovněž naznačují ochranný efekt pití čaje na kardiovaskulární nemoci. Jeden z hlavních konstituentů čaje je rutin (kvercetinrutinoside), který je běžný kvercetinový glykosid hlavně v rostlinách. Kvercetin a hlavně rutin jsou v mnoha zemích ke zmírnění kapilárního zúžení a k léčení nedostatečného

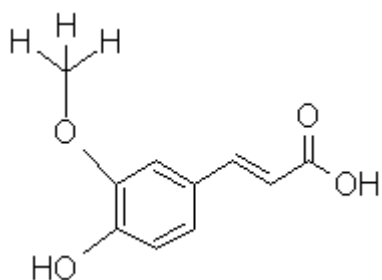
prokrvení dolních končetin. Kvercetin a rutin jsou rovněž ingrediencemi ve velkém množství multivitaminových přípravků a bylinných léků. Dnes je přes 130 přípravků obsahujících kvercetin a rutin registrovaných jako drogy po celém světě v roce 1998 prodeje patřící k rutinové skupině dosáhly 430 mil. USD. Klinické studie podporují užívání kvercetinu a rutinu [36].



Obrázek 10: Strukturální vzorec rutinu

1.4.11. Kyselina ferulová

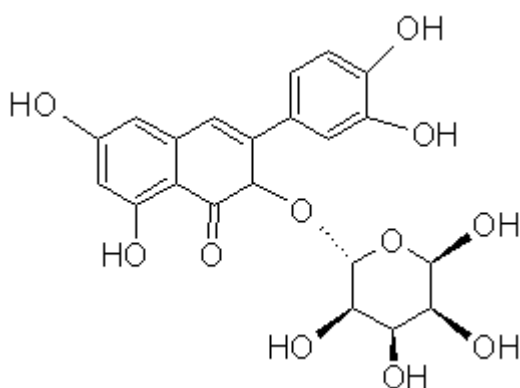
Kyselina ferulová je odvozená kyselina od kyseliny skořicové. Je vyrobena z metabolismu fenylalaninu a tyrosinu. Kyselina ferulová je obvykle asociována s potravinovou vlákninou a je v ní esterovou vazbou vázána k hemicelulose. Bývá užívána jako výchozí surovina pro výrobu jiných fenolických sloučenin. Jedním z hlavních zdrojů kyseliny ferulové jsou tak např. pšeničné otruby (5 mg/g). Dále se nachází v rýži, kávě nebo jablcích. Naměřené hodnoty ukazují, že během extrakce cukru nedochází k výrazným změnám obsahu ferulové kyseliny ve vzorcích řepných řízků. Naopak během zpracování kakaových bobů na kakaovou hmotu dochází k výraznému snížení obsahu ferulové kyseliny a to hlavně během pražení kakaové drti, kdy se ferulová kyselina rozkládá na senzory aktivní látky. Expozice odtučněné rýže nebo klíčků rýže během zahajovací fáze nebo post-zahajovací fáze snížil výskyt nádorů tlustého střeva [37]. Zdvoujnásobuje fotoprotekci slunečního záření-simulované kůže od 4-krát do 8-krát, hodnoceno podle zarudnutí a spálení buněk [38]. Dehydrodimery z ferulové kyseliny jsou důležité konstrukční prvky ve stěně rostlinné buňky a slouží k posílení její tuhosti a pevnosti. Aplikace ferulové kyseliny a enzymy feruloyl esterázy jsou četné a rozmanité. Ferulové kyseliny získané ze zemědělských vedlejších produktů je potenciálním prekurzorem pro výrobu přírodní vanilky, kvůli nižší výrobní nákladu [37]. Jiným názvem 4 hydroxy-3-methoxycinnamiová kyselina. Je také častou složkou anti-age doplňků. Její sumární vzorec je $C_{10}H_{10}O_4$.



Obrázek 11: Strukturální vzorec kyseliny ferulové

1.4.12. Kvercitrin

Flavonoid vyskytující se ve většině vyšších rostlin. Získává se z kůry dubů. Žlutá krystalická látka. Glykosid, jeho hydrolyzou vzniká kvercetin. Účinkuje zejména ve střevech [39]. Jeho sumární vzorec je $C_{21}H_{20}O_{11}$.

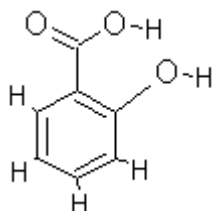


Obrázek 12: Strukturální vzorec kvercitrinu

1.4.13. Kyselina salicylová

Karboxylová kyselina, která se v rostlinách uplatňuje převážně jako hormon. V menších množstvích funguje jako dezinfekce a ve větších je jedovatá. Z acetylsalicylové kyseliny se vyrábí aspirin, takže snižuje horečku a bolesti. Tato studie naznačuje, že aspirin je spojen se zvýšeným výskytem intrakraniálního krvácení v autorově populaci. Používání aspirinu v posledních 3 měsících těhotenství je velmi diskutabilní a pravděpodobně nevhodné [40]. Acetylové kyseliny, jako je aspirin, jsou jedním z nejčastěji používaných léků v západních společnostech. Předávkování aspirinem způsobuje ototoxické vedlejší účinky. U některých pacientů, například dvoustrannou mírnou až středně těžkou percepční nedoslýchavost a tinnitus (pískání v uších). Nedávná literatura popisuje, že salicyláty působí jako kompetitivní inhibitory aniontů Cl^- na anion vazebného místa prestinu a motor proteinu vnější vláskové buňky. Tento molekulární mechanismus dobře koreluje s klinickou audiologickou oporou aspirin-indukované ztráty sluchu. Pouze v závažných intoxikační hemodialýze může být považován za léčbu neurologických, pulmonálních, ledvinových nebo

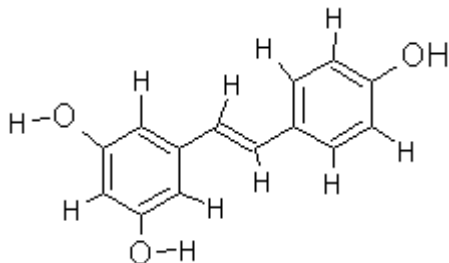
srdeční komplikací [41]. Dále se užívá k odstraňování akné na pokožce. Jiný název je 2-hydroxybenzoová kyselina. Její sumární vzorec je $C_7H_6O_3$.



Obrázek 13: Strukturální vzorec kyseliny salicylové

1.4.14. Resveratrol

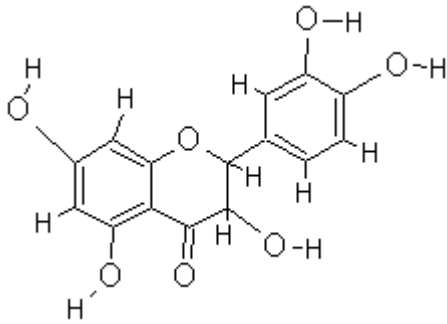
Nejčastěji se vyskytuje v borůvkách, greppu a hlavně ve víně. Hojně se užívá jako doplněk stravy kvůli jeho dobrým antioxidačním schopnostem. Snižuje nepříznivé účinky kadmia. Nalezený resveratrol silně inhibuje NO v generaci aktivovaných makrofágů, měřeno množství dusitanů propuštěných do kultivačního média, resveratrol silně snižoval částku cytosolové iNOS bílkoviny a rovnovážného stavu mRNA [42]. Nedávno byla prokázána jeho neuroprotektivní aktivita proti oxidačnímu stresu ve studiích in vitro. Léčba trans resveratrolem brání poškození motoru, zvýšení hladiny MDA a redukováného glutathionu a také výrazně snižuje objem infarktu ve srovnání s kontrolou [43]. Došlo se k závěru, že resveratrol je fytoestrogen, a že vystavuje variabilní stupně monizmu estrogenových receptorů v různých testovacích systémech. Jeho sumární vzorec je $C_{14}H_{12}O_3$.



Obrázek 14: Strukturální vzorec resveratrolu

1.4.15. Kvercetin

Jeden z nejrozšířenějších flavonoidů. Skládá se ze tří benzoových kruhů a pěti hydroxylových skupin. Je obsažen téměř v každém ovoci. Jako doplněk stravy se užívá ke zvýšení koncentrace a zvýšení výkonnosti [44]. Jeho sumární vzorec je $C_{15}H_{10}O_7$.



Obrázek 15: Strukturální vzorec kvercetinu

1.5. Stanovení sledovaných parametrů

1.5.1. Antioxidační aktivita

Pro stanovení antioxidační aktivity existuje řada analytických metod. V oblasti chemických analýz a biologického hodnocení antioxidačních charakteristik byly v posledních letech vypracovány četné metody umožňující stanovení antioxidační aktivity. Jsou principiálně odlišné a postupně se vyvíjí jejich modifikace [45]. Jejich základním smyslem je charakterizovat antioxidační aktivitu v podmínkách blízkých fyziologickému prostředí, avšak většina z nich není optimalizována pro automatizovanou analýzu. Cílem bylo navrhnout a optimalizovat fotometrické testy na automatickém analyzátoru BS-200. Většina používaných metod je založena na eliminaci radikálů – například metoda DPPH, TEAC, ORAC, PCL nebo na hodnocení redoxních vlastností - FRAP, voltametrie, vysoce-účinná kapalinová chromatografie. Při hodnocení antioxidační aktivity je posuzováno působení látek různé chemické povahy s odlišnými reakčními mechanismy a používají se metody založené na různém principu. K charakterizaci potravinového materiálu z hlediska antioxidačních vlastností je proto vhodné použít více metod [46].

1.5.2. Vysoce-účinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Proces analýzy je založen na separaci látek, která se odehrává na chromatografické koloně. Kolona je naplněna hydrofobním sorbentem (reverzní fáze), který je nejčastěji tvořen řetězci uhlíku se 4, 8 až 18 uhlíky. Jedná se o nepolární alifatické řetězce. Řetězce jsou navázány na silikagelový polymer v podobě kuliček o velmi malém průměru, v řádu mikrometrů. Mobilní fáze je do systému vpravena pod vysokým tlakem až 60 MPa, aby bylo dosaženo vyšší efektivity a rychlosti separace. Zadržování molekul přímo závisí na hydrofobicitě detekované molekuly. Při separaci na reverzní fázi se používá vzestupný gradient nepolárního rozpouštědla (acetonitril, metanol) s komplementárně se snižujícím

gradientem polárního rozpouštědlem (voda, organická kyselina). Po průchodu kolonou jsou látky detekovány pomocí UV detektoru. Detekce je založena na schopnosti látek absorbovat záření v ultrafialové oblasti [47].

2. Cíl práce

Cílem práce bylo na základě provedených statistických analýz u 243 nově vyšlechtěných hybridů meruněk určit hybrid meruňky s nejvyšším zdravotním benefitem pro člověka. Nejdříve bylo nutno optimalizovat metody pro měření antioxidační aktivity a polyfenolických sloučenin. Dalším cílem bylo změřit, pomocí HPLC, obsah vybraných polyfenolických sloučenin.

2. Metodika měření

2.1. Biologické vzorky

Na ústavu ovocnářství Mendelovy university bylo vyšlechtěno 243 hybridů meruněk. Hybridy byly pěstovány na jižní Moravě v katastru obce Lednice ve velmi teplé klimatické oblasti T4. V níže uvedené tabulce (tabulka 1) jsou uvedeny dekádní úhrny srážek a průměrné dekádní teploty v obci Lednice od 1. 1. 2010 do 20. 8. 2010. Následně byly plody sklizeny v období konzumní zralosti v období od 1. 7. do 15. 8. 2010.

Dekáda	Dekádní úhrn srážek (mm)	Průměrná dekádní teplota (°C)
10.1.2010	54	-1
20.1.2010	13	-2
30.1.2010	4	-7
10.2.2010	3	-3
20.2.2010	15	-1
29.2.2010	11	4
10.3.2010	4	0
20.3.2010	8	5
30.3.2010	4	12
10.4.2010	13	10
20.4.2010	44	10
30.4.2010	4	13
10.5.2010	44	15
20.5.2010	50	12
30.5.2010	39	16
10.6.2010	40	19
20.6.2010	41	19
30.6.2010	1	20
10.7.2010	5	22
20.7.2010	58	25
30.7.2010	45	20
10.8.2010	39	20
20.8.2010	23	21

Tabulka 1: Dekádní úhrny srážek a průměrné dekádní teploty

2.2. Příprava vzorků

Ihned po sběru byly plody zamrazeny v mrazicím boxu až do doby započetí našeho experimentu. Následně byly tři plody od každého hybridu meruňky homogenizovány v třecích miskách a byl odebrán vzorek o navážce dvacet gramů. Tento vzorek byl umístěn do 50ml umělohmotné zkumavky a homogenizován s 20 ml 99% metanolu. Zbytek rozmělněných meruněk byl vložen do 50ml umělohmotných zkumavek a ty byly uloženy do mrazicího boxu pro budoucí možné využití v jiných experimentech. Umělohmotné zkumavky byly ponechány 30 minut na vortexu, dále byly odstředovány v centrifuze při 16 400 ot./min. po dobu 15 minut. Z této zkumavky bylo odpipetováno 1,5 ml čiré tekutiny do mikrozukumavky eppendorf. Tento vzorek byl přefiltrován přes teflonové membránové disky (0,45 μ m). Výsledný supernatant byl odpipetován do 1,5ml mikrozukumavky a umístěn do patričního přístroje pro analýzu.

2.3. Měření

2.3.1. Spektrofotometrie

První metodou, která byla v experimentu užitá, bylo stanovení celkové antioxidační aktivity. Proto byl použit přístroj BS 200 Mindray, China. Tento přístroj je fotometr, je složen z kyvetového prostoru s konstantní teplotou 37 ± 1 °C, reagenčním prostorem s karuselem pro reagencie a přípravu vzorků s konstantní teplotou 4 ± 1 °C. Pipetování reagencií a vzorků je zajištěno robotnickými rameny s dávkovací jehlou. Riziko kontaminace vzorků je sníženo na minimum díky proplachování všech částí, které přijdou se vzorkem do styku miliQ vodou. Pro detekci bylo možné využít vlnových délek: 340, 405, 450, 510, 546, 578, 630, 670 nm. Analyzátor do plastické kyvety napipetuje níže uvedené množství reagencie (DPPH, TEAC, FRAP, DMPD) a automatickým míchadlem promíchá. Poté změří absorbanci dané látky v čase t_0 a uloží. Následně do kyvety nepipetuje supernatant o objemu 5 μ l z námi vložené 1,5ml mikrozukumavky a v šestnáctisekundových intervalech měří absorbanci po dobu 21 minut od smíchání obou činidel při níže uvedených vlnových délkách a optické dráze 5 mm. Inkubace probíhala při 37 °C. Reagencie i naše vzorky jsou uloženy v chlazeném karuselu při teplotě 4 °C. Nejdůležitějšími hodnotami jsou první a poslední změřené absorbance, které od sebe přístroj odečte a určí antioxidační aktivitu pro danou reagencii. Zdrojem záření byla halogenowolframová žárovka.

Prvním z cílů, abychom mohli stanovit biologické vzorky, bylo potřeba všechny metody měření antioxidační aktivity a metodu pro stanovení celkových polyfenolů zoptimalizovat. Výsledkem tohoto cíle bylo sestavení kalibračních křivek. Tyto křivky slouží

k možnosti přepočítání změřené absorbance supernatantů na koncentraci ekvivalentu kyseliny gallové, díky čemuž můžeme všechny naměřené hodnoty porovnávat a na základě těchto výsledků určit hybrid meruňky s nejvyšším zdravotním benefitem pro člověka. Vytvoření kalibračních křivek probíhá následovně. Podle výše uvedeného postupu se nechá změřit absorbance různých koncentrací kyseliny gallové (0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50; 0,60; 0,70; 0,80; 0,90; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75; 2,00; 2,50; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00; 8,00; 9,00; 10,00; 12,5; 15,00; 17,50; 20,00; 25,00; 30,00; 35,00; 40,00; 45,00; 50,00; 75,00 a 100,00 mg·100g⁻¹) Z těchto hodnot sestavíme graf, ze kterého lze zpětně jednoduše spočítat, jaká hodnota absorbance supernatantu, odpovídá které koncentraci kyseliny gallové.

2.3.1.1. DPPH test

DPPH[•] test je založen na schopnosti stabilního volného radikálu 2,2 difenyl 1-pikrylhydrazylu reagovat s donory vodíku. DPPH[•] vykazuje silnou absorpci v UV-VIS spektru. Při tomto testu se po redukcí antioxidantem (AH) nebo radikálem (R[•]) roztok odbarví dle následující reakce $\text{DPPH}^{\bullet} + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH}^{\bullet}\text{-H} + \text{A}^{\bullet}$, $\text{DPPH}^{\bullet} + \text{R}^{\bullet} \rightarrow \text{DPPH}^{\bullet}\text{R}$ [48]. Tato metoda je jednoduchá a časově nenáročná i pro manuální analýzu.

Příprava reagensie: $9.5 \cdot 10^{-5}$ molární radikál DPPH[•] (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) o navážce na 50 ml, m = 0.00094 g. Nejprve jej rozpustíme ve 25 ml DMSO (dimethylsulfoxid) a poté doplníme na 50 ml ACS vodou. Reagensii připravenou tímto způsobem můžeme používat po dobu dvou týdnů při uskladnění v temném prostředí karuselu při teplotě 4 °C.

Postup měření pro automatický analyzátor: Do plastových kyvet bylo automaticky odpipetováno 200 μl reagensie, poté bylo napipetováno 20 μl měřeného vzorku. Absorbance byla měřena 1520 sekund při $\lambda = 515$ nm. Pro výpočet byla použita hodnota před poklesem absorbance (14 cyklus měření, 224 sekunda – A₁₄) – tj. samotná reagensie a poslední hodnoty měření (95. cyklus měření, 1520 sekunda – A₉₅). Výsledná hodnota byla vypočítána dle vzorce: změna absorbance (%) = $100 - [(A_{95}/A_{14}) \times 100]$ [46].

2.3.1.2. TEAC test (ABTS)

Metoda pomocí ABTS radikálu je jednou z nejčastěji používaných metod k určení koncentrace radikálů. Je založena na neutralizaci radikalkationtu vzniklého jednoelektronovou oxidací syntetického chromoforu ABTS^{•+} (2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonátu) na radikál ABTS[•] – e⁻ ABTS^{•+}. Tato reakce se sleduje fotometricky na základě změny absorpčního spektra. Tato metoda se většinou převádí na koncentraci troloxu a v literatuře je popisována jako „Trolox Equivalent Antioxidant Capacity“ (TEAC). Pro čisté

látky je TEAC definována jako mikromolární koncentrace ekvivalentu Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) vykazující stejnou antioxidační aktivitu jako testovaná látka (při koncentraci $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) [34, 49].

Příprava reagentie: $7 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztok ABTS* (2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina) připravíme navážkou $m = 0.0192 \text{ g}$ na 10 ml a $4.95 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ peroxidisíran draselný o navážce $m = 0.00668 \text{ g}$ na 10 ml se míchají a rozpustí v ACS vodě. Roztok se naředí ACS vodou v poměru $1 : 10$ (10 ml se přelije do 100 ml baňky a zředí ACS vodou). Následně roztok se ponecháme 12 hodin ve tmě a chladu. Reagentie je použitelná čtrnáct dnů za teploty $4 \text{ }^\circ\text{C}$, uskladněná v temném prostředí.

Postup měření pro automatický analyzátor: Do plastových kyvet bylo automaticky odpipetováno $245 \text{ }\mu\text{l}$ reagentie, následně bylo přidáno $5 \text{ }\mu\text{l}$ vzorku (kyselina gallová, trolox). Absorbance byla měřena při $\lambda = 670 \text{ nm}$ po dobu 1520 sekund. Pro výpočet bylo použito hodnoty před poklesem absorbance ($14.$ cyklus měření, 224 sekunda – A14) tj. samotná reagentie a poslední hodnoty měření (1520 sekunda – A95). Výsledná hodnota se vypočítá dle vzorce: změna absorbance (%) = $100 - [(A95/A14) \times 100]$ [46].

2.3.1.3. FRAP test

Metoda FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) je založena na redukci železitých komplexů TPTZ (2,4,6-tripyridyl-S-triazin) s chloridem železitým (FeCl_3), které jsou téměř bezbarvé (popř. slabě nahnědlé) a po redukci se tvoří modře zbarvený železnatý komplex. Metoda má své limity spočívající v tom, že měření probíhá při nefyziologicky nízké hodnotě pH (3.6) a nejsou zachyceny s komplexem pomalu reagující polyfenolické látky a thiooly [35, 36, 50, 51].

Příprava reagentie: 1. $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztok TPTZ: navážka na 25 ml , $m = 0.07802 \text{ g}$, doplnit po rysku 40 mM kyselinou chlorovodíkovou (HCl). 2. roztok 20 mM FeCl_3 : navážka na 25 ml , $m = 0.13513 \text{ g}$, doplnit po rysku ACS vodou. 3. acetátový pufr 0.02 M , pH 3.6 : 0.31 g octanu sodného, doplnit po rysku 100 ml ACS vody a upravit pH pomocí kyseliny octové. Tyto tři roztoky smíchám v poměru: TPTZ : FeCl_3 : acetátový pufr – $1 : 1 : 10$. Reagentie je použitelná týden při uskladnění v temném prostředí a teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Postup měření pro automatický analyzátor: Do plastových kyvet bylo pipetováno $245 \text{ }\mu\text{l}$ reagentie, následně bylo přidáno $5 \text{ }\mu\text{l}$ vzorku (kyselina gallová, trolox). Absorbance byla měřena 95 cyklů (1520 sekund) při: primární $\lambda = 578 \text{ nm}$ a sekundární $\lambda = 630 \text{ nm}$. Následně byly od sebe absorbance odečteny (absorbance primární - absorbance sekundární =

absorbance diferenciální). Pro výpočet antioxidační aktivity bylo použito diferenciální absorbance [46].

2.3.1.4.DMPD test

Sloučenina DMPD (N,N-dimethyl-1,4-diaminobenzen) se v experimentálním roztoku převede, pomocí působení železité soli, na relativně stabilní a barevnou radikálovou formu. Po přidání vzorku se v přítomnosti redukčních faktorů radikál zhasí a tím odbarvuje [52, 53].

Příprava reagensie: 1. roztok (acetátový pufr o pH 5.25): 1a) 5.5 g octanu sodného doplnit po rysku ACS vodou (200 ml). 1b) 0.75 ml koncentrované kyseliny octové (>99.5 %, v/v) doplnit po rysku ACS vodou (50 ml). Tyto dva roztoky - 1a) a 1b) se smíchají, vznikne požadovaný acetátový pufr o pH 5.5 (roztok 1). 2. roztok chloridu železitého: 10 mg FeCl₃ doplnit po rysku ACS vodou (50 ml). 3. roztok DMPD: 25 mg DMPD rozpustit v 5 ml ACS vody. Tyto tři roztoky se smíchají poměru: 40 ml pufru: 2 ml roztoku chloridu železitého: 2 ml roztoku DMPD, vznikne reagensie pro stanovení antioxidační aktivity.

Upozornění: 3. roztok – roztok DMPD musí být vždy čerstvý, jeho stabilita je 24 hodin.

Postup měření pro automatický analyzátor: Do plastových kyvet bylo pipetováno 200 µl reagensie a následně bylo přidáno 5 µl vzorku (kyselina gallová, trolox). Absorbance byla měřena 95 cyklů (1520 sekund) při $\lambda = 510$ nm. Pro výpočet bylo použito hodnoty před poklesem absorbance (14. cyklus měření, 224 sekunda – A₁₄) a poslední hodnoty měření (95 cyklus, 1520 sekunda – A₉₅). Výsledná hodnota se vypočítá dle vzorce: Rozdíl absorbancí: = A₉₅ - A₁₄ [46].

2.3.1.5.Test na celkové polyfenoly

Pro stanovení celkových polyfenolů bylo použito folin-ciocalteovo činidlo. Tato metoda je založená na redukci fosfotungsten-fosfomolybdátového komplexu fenoly na modré reakční produkty

Příprava reagensie: Vzorek o objemu 0,5 ml byl nepipetován do kyvety a zředěn 1,5 ml ACS vody. Následovně bylo 0,05 ml z folin-ciocalteova činidla přidáno a inkubováno při 22 °C po dobu 30 minut. Absorbance byla změřena užitím dvoupaprskového spektrofotometru SPECORD 210 (Carl-Zeiss Jena, Germany) a paprsku o vlnové délce $\lambda=670$ nm proti prázdné kyvetě (všechny chemikálie bez vzorku i kyseliny gallové). Absorbance byla měřena třikrát. Výsledky byly přepočítány do ekvivalentu kyseliny gallové. Metoda byla kalibrována dobře známou fenolickou sloučeninou, kyselinou gallovou. Byla vypočítána logaritmická koncentrace závislosti a použili pro kvantifikaci obsahu všech polyfenolů v hybridech meruněk [46].

2.3.2. Vysoce-účinná kapalinová chromatografie (HPLC)

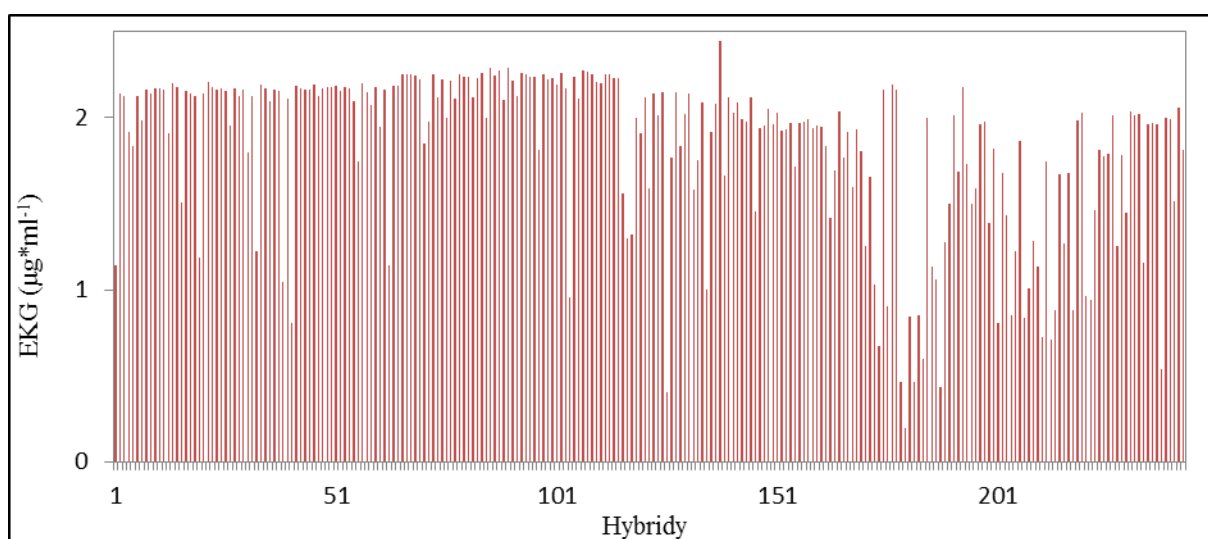
Ke stanovení HPLC profilu jednotlivých odrůd a hybridů bylo využito spektrofotometrického a elektrochemického detektoru v tandemu HPLC-ED-UV-VIS. Systém byl složen ze dvou chromatografických pump Model 582 ESA (ESA Inc., Chelmsford, MA, pracovní rozsah $0.001-9.999 \text{ ml min}^{-1}$) a chromatografické kolony s reverzní fází Zorbax SB C18 (150×4.6 ; $5 \mu\text{m}$ velikost částic, Agilent Technologies, USA). K UV detekci byl použit UV detektor Shimadzu Model 528. Detektor i reakční kolona byly udržovány při konstantní teplotě. Vzorek o objemu $15 \mu\text{l}$ byl nepipetován užitím autosam pleru (model 540 Microtiter HPLC, ESA, USA). Chromatografické podmínky byly optimalizovány podle průtokové rychlosti mobilní fáze $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, při teplotě $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Následují A: acetic acid (50mM), B: acetin acid (50mM) v acetonitrilu. Vlnová délka UV paprsku byla 260 nm.

3. Výsledky

3.1. Antioxidační aktivita

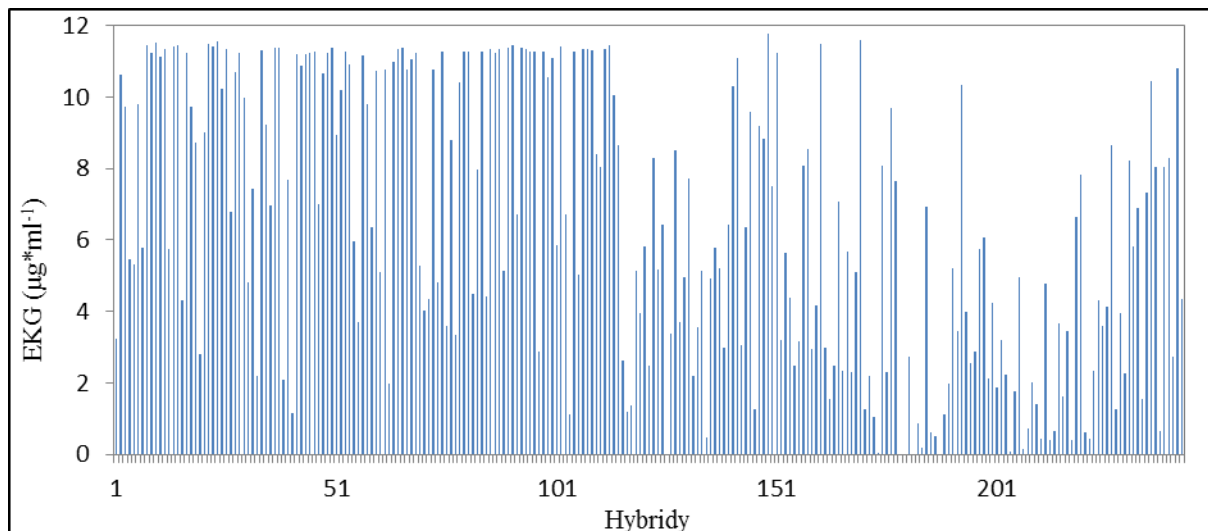
Vyhodnocení těchto testů bylo provedeno sestavením matice. Hybridy byly rozděleny do 8 intervalů, kterým byla přiřazena čísla od 1 do 8 podle výše hodnot. Čím nižší číslo, tím jsou hodnoty v daném intervalu vyšší.

Při stanovování antioxidační aktivity u metody DPPH se na prvních místech umístily hybridy Sundrop a Favorit s hodnotami 2,443 a 2,288 EKG (ekvivalentu kyseliny gallové, $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Naopak na posledních místech se umístily hybridy Lakanyj a Olimp s hodnotami 0,196 a 0,401 EKG. Průměrná hodnota u metody DPPH je 1,835 EKG.



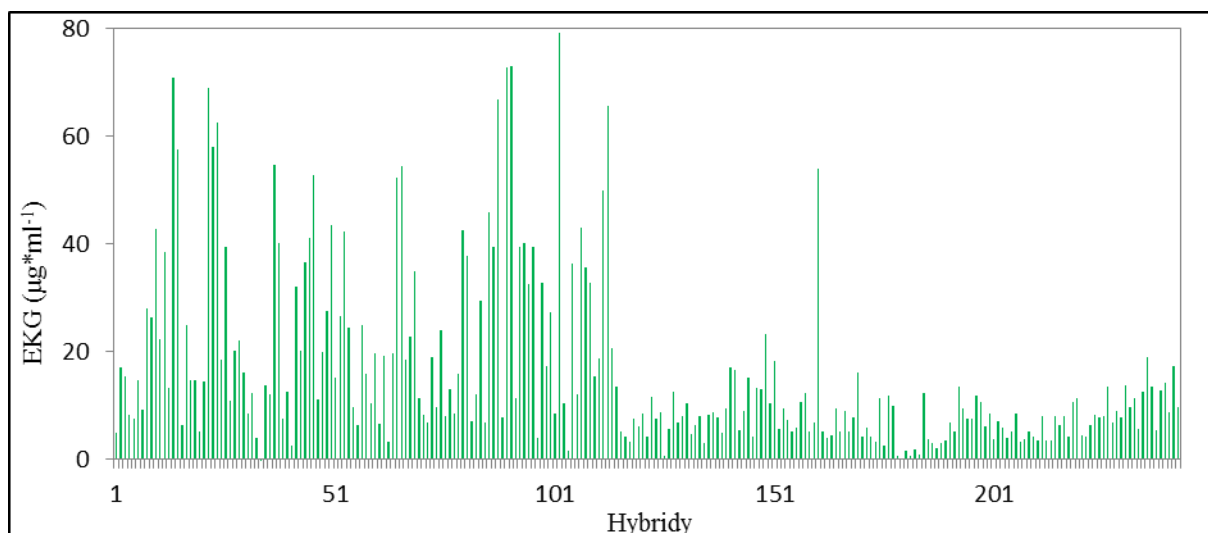
Graf 1: Hodnoty DPPH testu u 243 hybridů meruněk

Při stanovování antioxidační aktivity metodou TEAC se na prvních místech umístily hybridy Vyndrop a Harglow s hodnotami 11,768 a 11,588 EKG. Naopak nejhůře se v testu jevily hybridy Lakanyj a Olimp s hodnotami pod detekčním limitem automatického analyzátoru. Průměrná hodnota u metody TEAC je 6,466 EKG.



Graf 2: Hodnoty TEAC testu u 243 hybridů meruněk

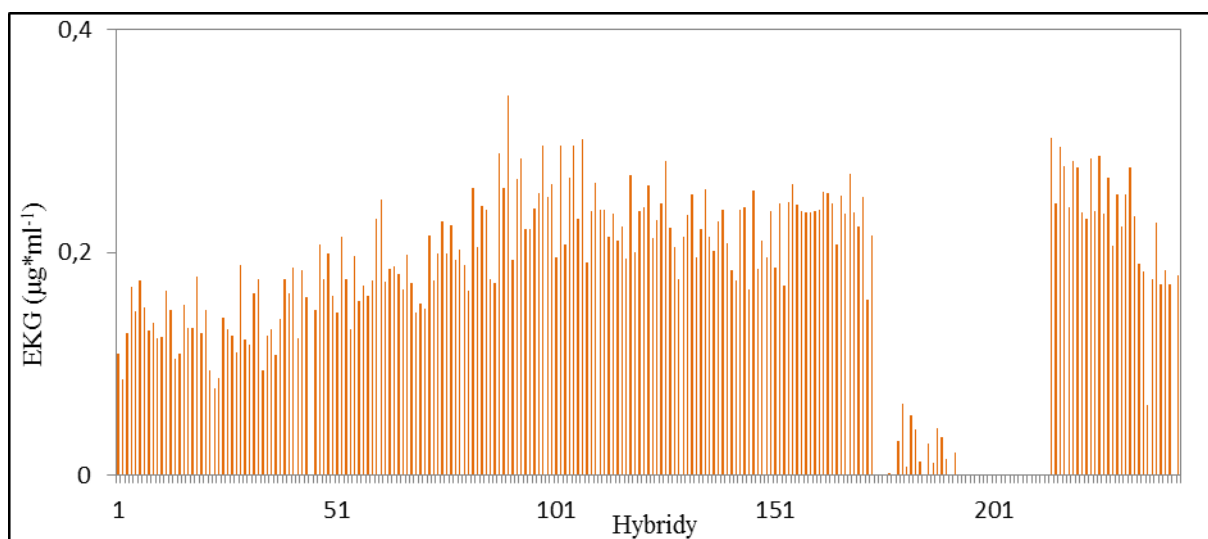
Při stanovování antioxidační aktivity metodou FRAP se na prvních místech umístily hybridy Forum a Jubilejnij s hodnotami 72,922 a 79,305 EKG. Naopak nejhůře se v testu umístily hybridy Lakanyj a LE-4725 s hodnotami 0,111 EKG a pod detekčním limitem analyzátoru. Průměrná hodnota u tohoto testu je 16,212 EKG.



Graf 3: Hodnoty FRAP testu u 243 hybridů meruněk

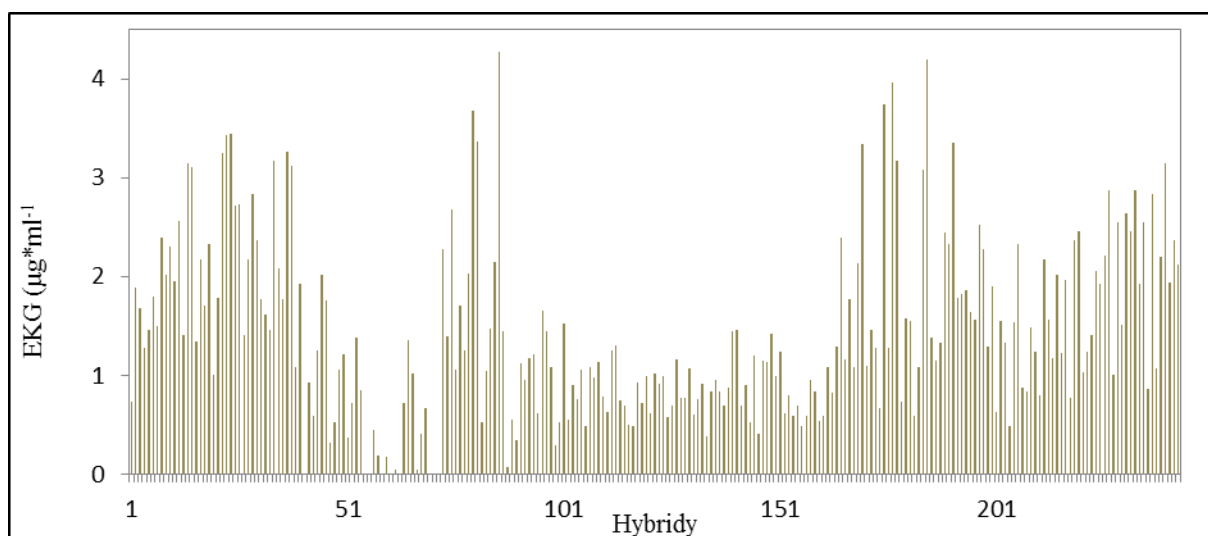
Při stanovování ant akt metodou DMPD se na prvních místech umístily hybridy Favorit a Růžová ranná s hodnotami 0,341 a 0,302 EKG. Nejhůře se v testu umístily hybridy

Legolda a Churmai s hodnotami pod detekčním limitem analyzátoru. Průměrná hodnota u tohoto testu byla 0,152 EKG.



Graf 4: Hodnoty DMPD testu u 243 hybridů meruněk

Při stanovování antioxidační aktivity všech polyfenolů se na prvních místech umístily hybridy Dolgocvetna a Leala s hodnotami 4,193 a 4,193 EKG. Naopak nejhůře se umístily hybridy SEO-104 a Velita s hodnotami pod detekčním limitem analyzátoru. Průměrná hodnota u tohoto testu byla 1,401 EKG.

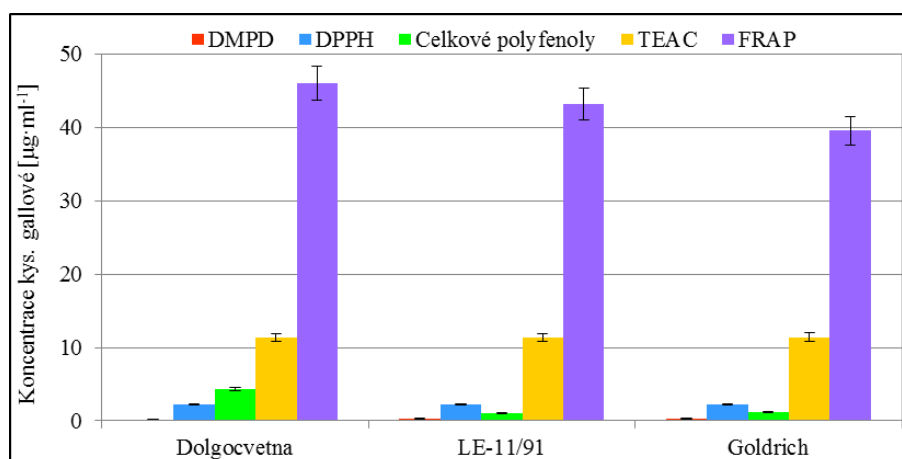


Graf 5: Hodnoty testu na celkové polyfenoly u 243 hybridů meruněk

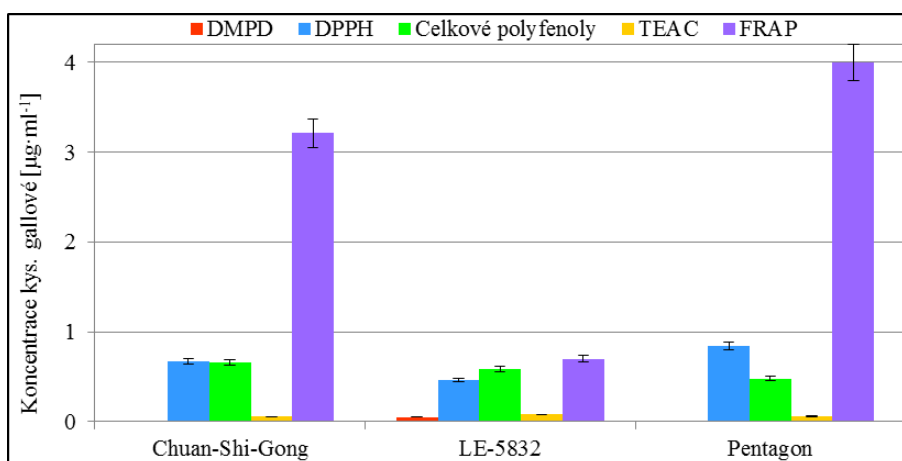
Na základě výsledků těchto pěti testů a sestavené matice byl určen hybrid meruňky s největším zdravotním benefitem pro člověka, kterým je hybrid DOLGOCVETNA, následovaný hybridem LE 11/91 a Goldrich.



Obrázek 16: Hybrid Dolgocvetna



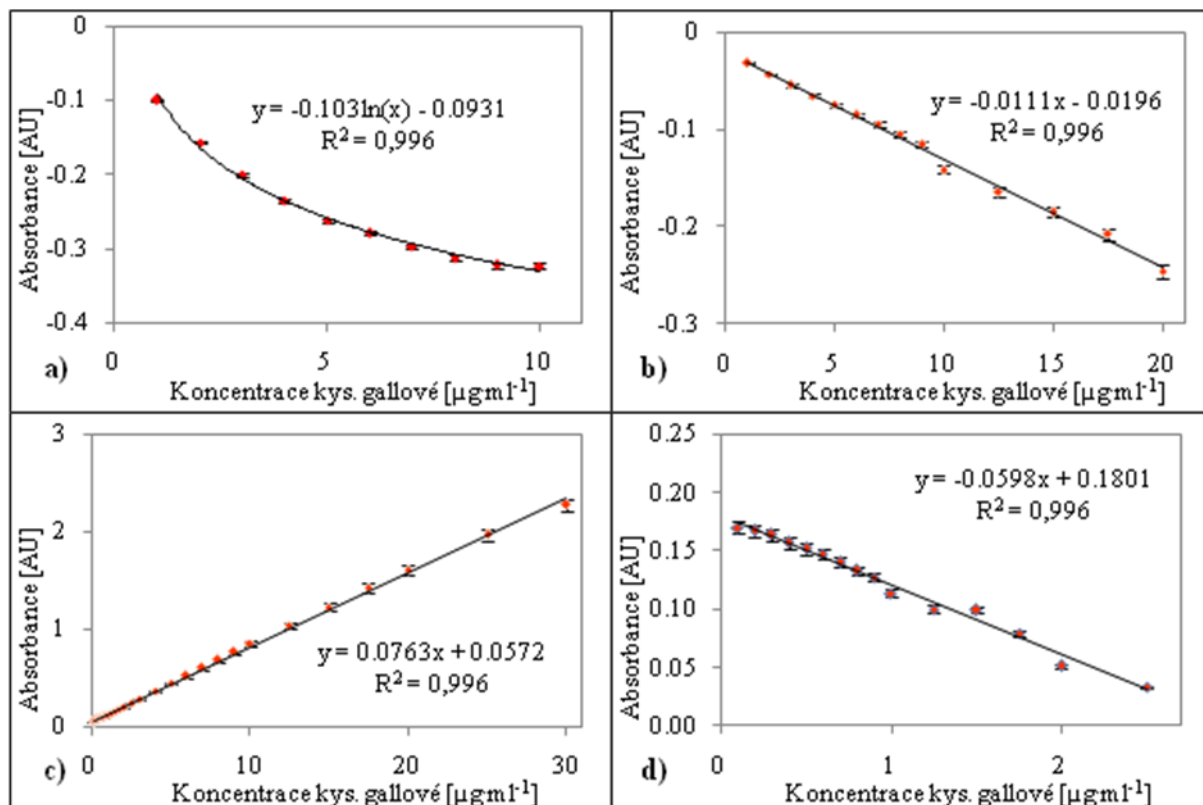
Graf 6: Výsledky testů tří nutričně nejhodnotnějších hybridů



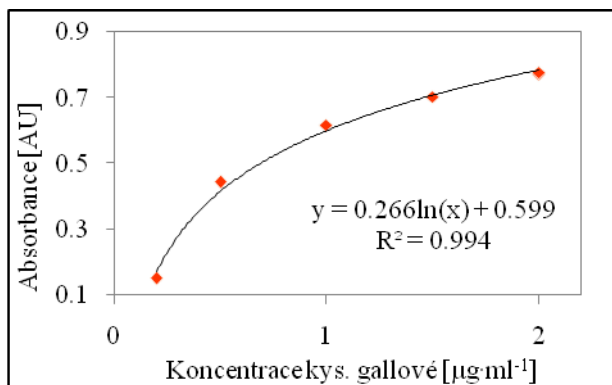
Graf 7: Výsledky testů tří nutričně nejméně hodnotných hybridů

Na dvou výše uvedených grafech jsou hodnoty v jednotlivých testech u třech nejlepších hybridů a u třech nejhorších hybridů. Mezi nejlepšími a nejhoršími hybridy jsou značné rozdíly, jelikož hodnoty u nejhorších jsou až 10x nižší než u hybridů nejlepších.

Konkrétně se jedná o testy TEAC a FRAP. U ostatních testů nejsou rozdíly tak velké, přesto jsou hodnoty nejhorších několikanásobně nižší. U hybridů s nejlepšími výsledky vidíme, že žádný v nějakém testu nějak výrazně nevyniká nad ostatními, takže tyto hybridy jsou nutričně velice podobné. Naopak u nejhorších hybridů jsou hodnoty u všech testů dosti odlišné. Není tomu tak při pouhém porovnání samotných hodnot, ale při porovnání jejich procentuálních rozdílů, který je například u DPPH testu velmi vysoký. Hodnota u hybridu Pentagon je o 83% vyšší než u hybridu LE-5832 a u testu DMPD je rozdíl až 1000%.

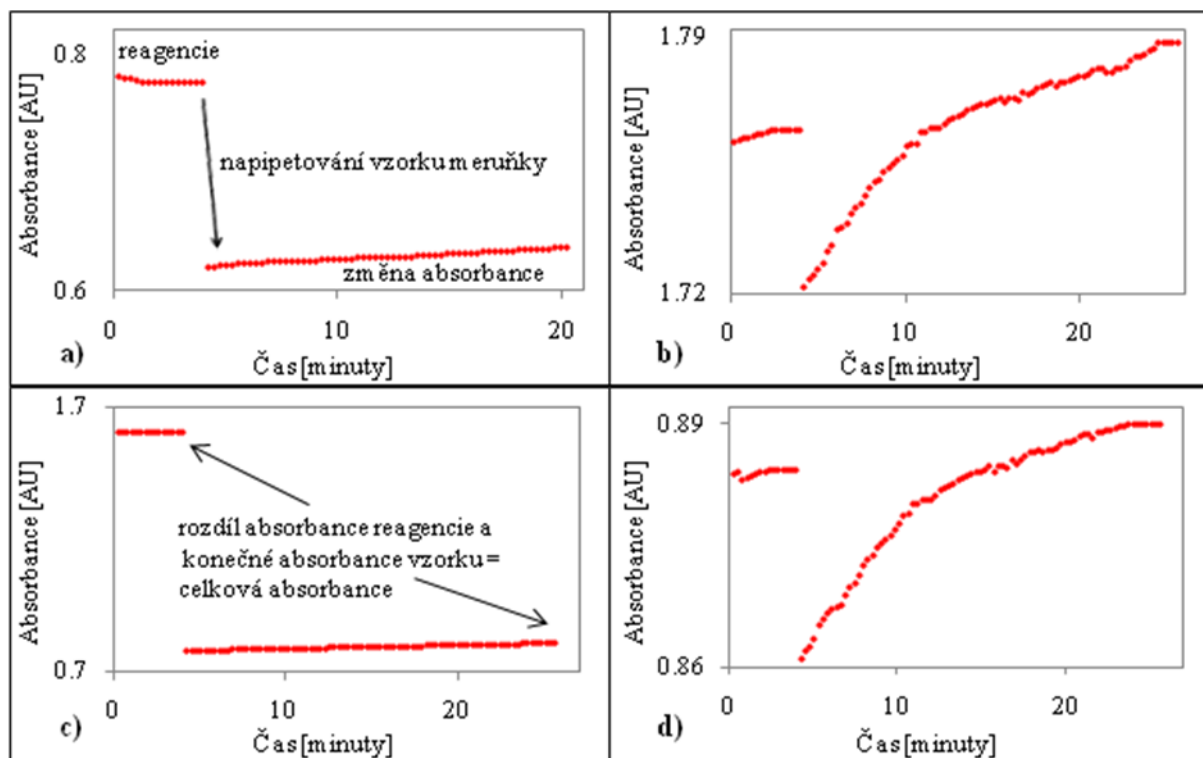


Graf 8: Kalibrační křivky pro testy a) DPPH, b) TEAC, c) FRAP, d) DMPD



Graf 9: Kalibrační křivka pro test na celkové polyfenoly

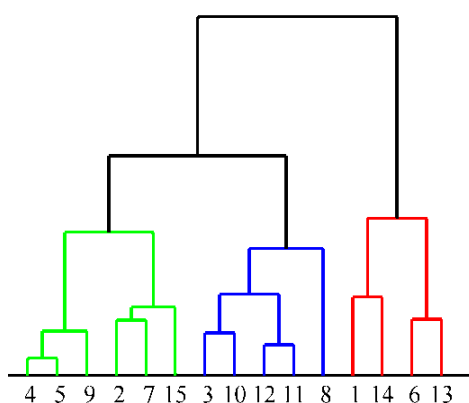
Na grafech 8 je vidět kalibrační křivka ke každé z metod, která nám slouží k možnosti přepočítání změřené absorpce na koncentraci kyseliny gallové. Křivka se vytváří změřením absorpací výše uvedených koncentrací kyseliny gallové (str. 25). Tímto se povedlo zoptimalizovat výše uvedené metody. Graf 9 je oddělen od ostatních grafů kalibračních křivek, protože se jedná o jiný způsob určování antioxidační aktivity.



Graf 10: Průběh hodnoty absorpce v čase u metody a) DPPH, b) TEAC, c) FRAP, d) DMPD

Nejdříve se do kyvety napipetovala samotná reagenzie a temperovala se na požadovanou teplotu (změna absorpce je způsobena skladováním reagenzie v karuselu o teplotě 4 °C a jejím napipetováním do kyvety o teplotě 37 °C). Po ustálení absorpce se do kyvety napipetoval vzorek meruňky, čímž se rapidně snížila absorpce. Poté se absorpce

měřila v šestnáctisekundových intervalech až do jejího ustálení. První a poslední hodnoty jsou nejdůležitější, přístroj je od sebe odečte, a tím se získá výsledná absorbance vzorku meruňky.



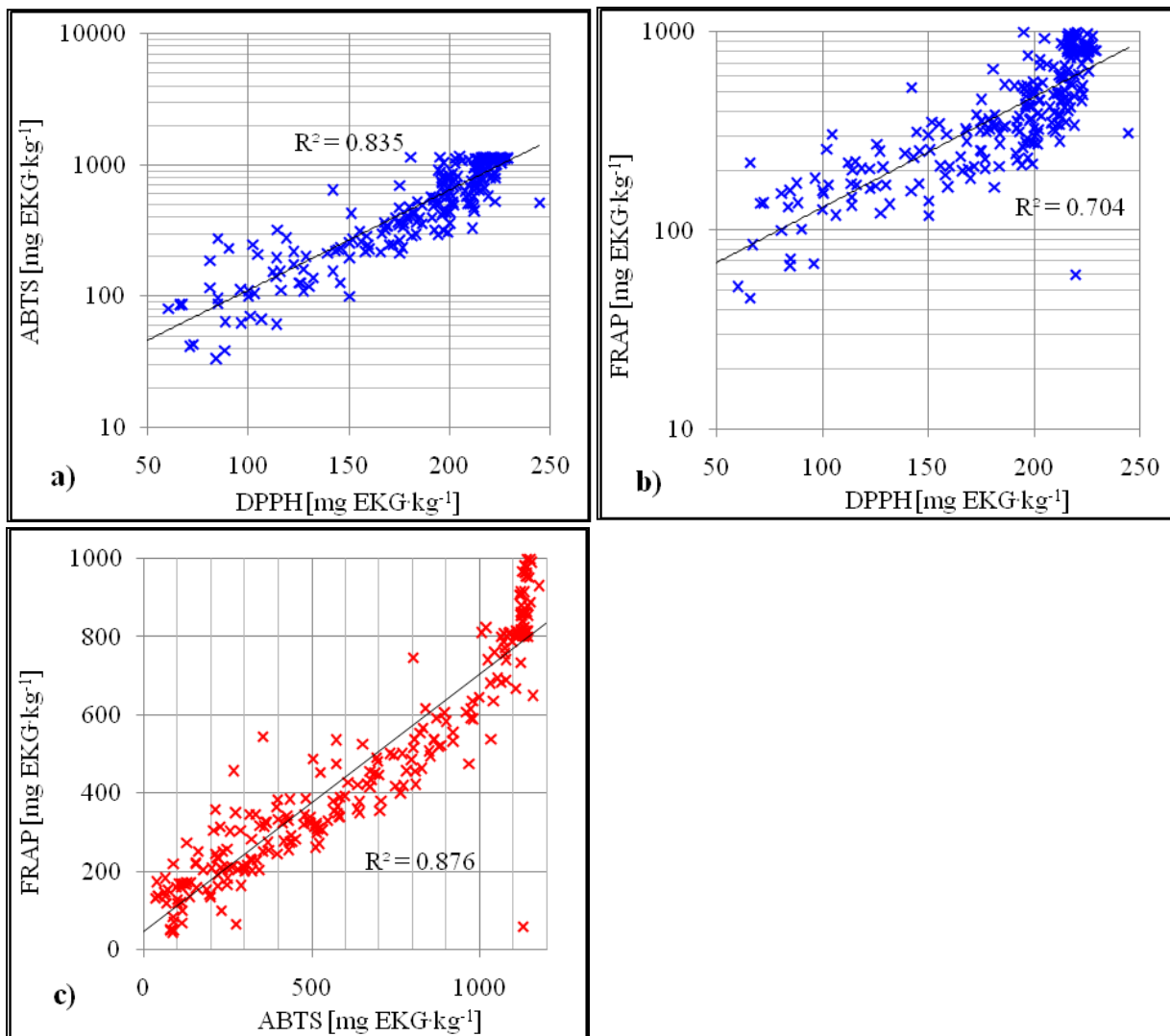
Graf 12: Dendrogram výsledků shlukové analýzy

	ABTS	FRAP	DMPD
DPPH	0.821	0.750	0.290
ABTS		0.936	0.108
FRAP			0.110

Tabulka 3: Hodnoty korelačních koeficientů mezi jednotlivými metodami antioxidační aktivity

V tabulce 3 jsou souhrnně vypsány hodnoty korelačních koeficientů mezi jednotlivými metodami antioxidační aktivity. Na vysoké hodnoty antioxidační aktivity u tohoto ovoce poukazuje více autorů, jejichž studie byly potvrzeny [54]. Zdůvodňují to především vysokým obsahem polyfenolických sloučenin.

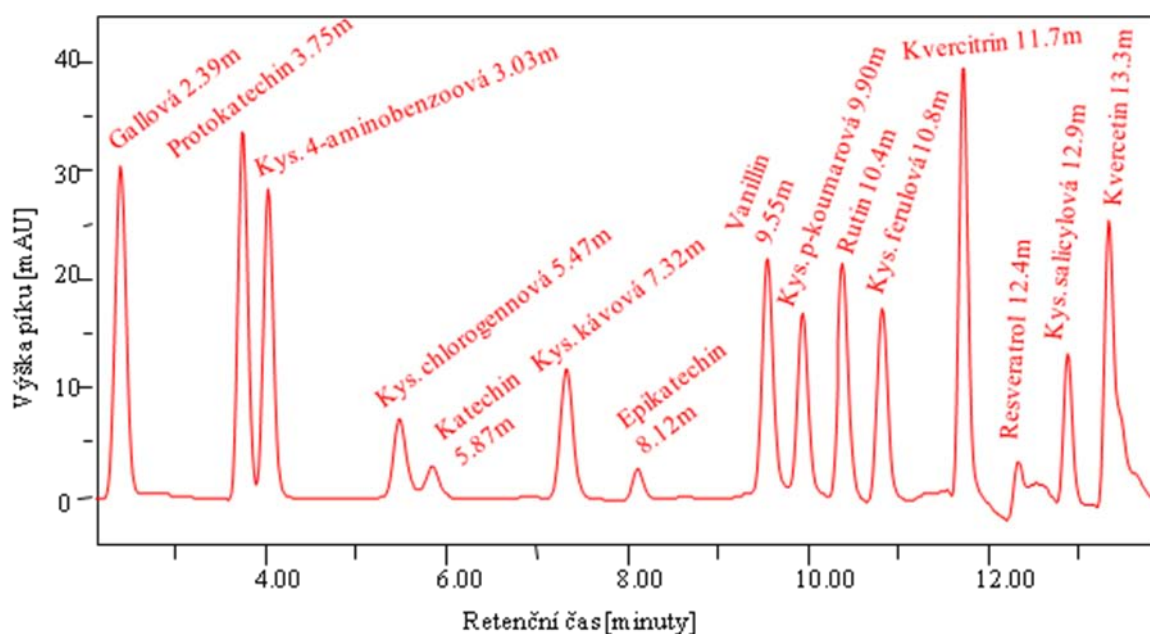
Vysvětlení jevu na grafu 11, získaného shlukovými technikami, můžeme dosáhnout pomocí sledování závislostí mezi jednotlivými metodami. Nejprve byl stanoven stupeň vzájemné korelace jednotlivých metod. Bylo zjištěno, že dvě z nich - ABTS a FRAP mají mezi sebou výraznou lineární závislost. Jejich stupeň korelace s lineární regresí vykazuje spolehlivost 83 %. Hodnoty těchto dvou metod navíc vykazují exponenciální závislost na změřených hodnotách DPPH. Na grafech 12a,b jsou ukázány korelogramy s lineární regresí (spolehlivost 83 %) vykreslené pro logaritmické měřítko osy hodnot DPPH. Stupeň korelace mezi těmito čtyřmi metodami rovněž neklesá pod 75 %. Jediná použitá měřicí metoda, která nemá žádnou závislost vzhledem ostatním je DMPD. Stupeň korelace je okolo 20 %.



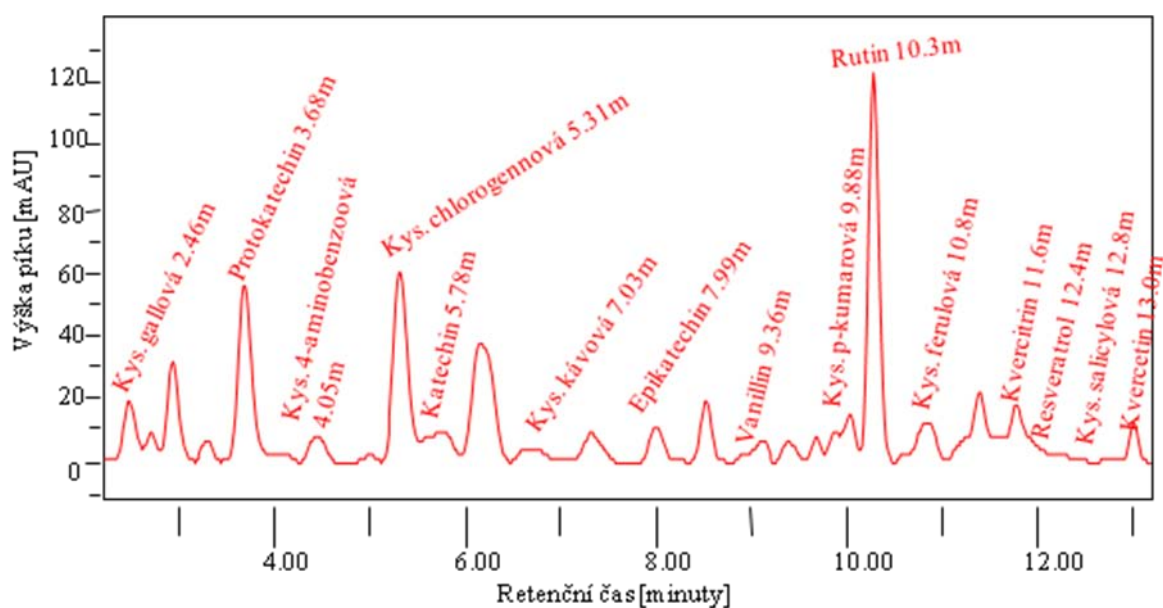
Graf 12 a, b, c: Korelace mezi uvedenými metodami

3.2. Polyfenoly

V plodech meruněk byl analyzován a detekován profil fenolických sloučenin, které jsou zajímavé z hlediska svých antioxidačních účinků. Byla vypracována chromatografická metoda s několika stupňovým lineárně se zvyšujícím gradientem pro rychlou a účinnou separaci 15 fenolických látek (kyselina gallová, 4-aminobenzoová, ferulová, chlorogenová, p-kumarová, salicylová a protokatechin, katechin, epikatechin, vanillin, rutin, kvercitrin, kvercetin). Doba analýzy jednoho vzorku byla včetně regenerace chromatografické kolony díky této originální metodě zkrácena na minimálních 25 minut. Fenoly mají široké spektrum biologických aktivit a naše výsledky ukázaly na jejich vysoký obsah ve zkoumaných plodech.



Graf 13: Chromatografický záznam detekovaných polyfenolických sloučenin



Graf 14: Chromatografický záznam reálného vzorku

Na chromatogramu reálného vzorku můžeme vidět, že i přes přítomnost nečistot se podařilo měřené látky rozseparovat a jsou dobře viditelné. Obsah každé látky odpovídá ploše příslušného píku. Nejvyššího obsahu dosáhl rutin v retenčním čase 10,3 minuty a naopak nejnižší hodnoty dosáhla kyselina salicylová v retenčním čase 12,8 minuty.

Polyfenol	Rozmezí hodnot ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Průměrná hodnota ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
Kyselina gallová	1,3 - 78,2	17,8
Kyselina protokatechinová	6,1 - 632,2	102,5
Kyselina 4 aminobenzoová	0,1 - 78,9	13,2
Kyselina chlorogenová	33,3 - 2421,3	403,9
Kyselina kávová	2,7 - 1189,6	94,9
Vanilin	2,3 - 80,1	26,1
Kyselina p-kumarová	1,1 - 30,6	8,9
Rutin	5,8 - 5261,2	745,5
Kyselina ferulová	0,1 - 206,2	31,4
Kvercetin	1,9 - 484,5	52,9

Tabulka 2: Rozmezí hodnot a průměrné hodnoty u stanovovaných polyfenolů

4. Závěr

Úspěšně byly zoptimalizovány čtyři fotometrické metody pro stanovení antioxidační aktivity a metoda pro stanovení celkových polyfenolických sloučenin. Pomocí těchto metod bylo změřeno 243 hybridů meruněk. Dále byl pomocí vysoko-účinné kapalinové chromatografie detekován profil 15 fenolických sloučenin, které jsou velmi silnými antioxidanty. Měření v hybridech potvrdila vysoký obsah těchto zdraví prospěšných látek. Díky měření hybridů těmito metodami se podařilo vybrat hybrid meruňky s nejvyšší biologickou hodnotou pro člověka. Vybraný hybrid Dolgocvetna bude pod názvem „Betyнка“ zařazen do státní odrůdové knihy a následně pěstován zemědělci.

5. Seznam použité literatury

1. Beklova, M., et al., *Electroanalytical techniques for determination of flavonoids*. Toxicology Letters, 2008. 180: p. S230-S230.
2. Kaushik, R.D., R.P. Singh, and Shashi, *Kinetic-mechanistic stud of periodate oxidation of p-chloroaniline*. Asian Journal of Chemistry, 2003. 15(3): p. 1485-1490.
3. Thamizharasi, S., P. Gnanasundaram, and S. Balasubramanian, *Synthesis, characterization, and reactivity ratios of copolymers derived from 4-nitrophenyl acrylate and n-butyl methacrylate*. Journal of Applied Polymer Science, 2003. 88(7): p. 1817-1824.
4. Halliwell, B., *The wanderings of a free radical*. Free Radical Biology and Medicine, 2009. 46(5): p. 531-542.
5. Gutteridge, J.M.C. and B. Halliwell, *Comments on review of free radicals in biology and medicine*. Free Radical Biology and Medicine, 1992. 12(1): p. 93-95.
6. Gazdik, Z., et al., *Electrochemical Determination of the Antioxidant Potential of Some Less Common Fruit Species*. Sensors, 2008. 8(12): p. 7564-7570.
7. Blazekovic, B., et al., *Evaluation of Antioxidant Potential of Lavandula x intermedia Emeric ex Loisel. 'Budrovka': A Comparative Study with L. angustifolia Mill*. Molecules, 2010. 15(9): p. 5971-5987.
8. Fridovich, I., *Biology of oxygen radicals*. Science, 1978. 201(4359): p. 875-880.
9. Halliwell, B., *Reactive oxygen species and teh central nervous system*. Journal of Neurochemistry, 1992. 59(5): p. 1609-1623.
10. Smirnoff, N. and Q.J. Cumbes, *Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes*. Phytochemistry, 1989. 28(4): p. 1057-1060.
11. al Housari, F., et al., *Reactive photoinduced species in estuarine waters. Characterization of hydroxyl radical, singlet oxygen and dissolved organic matter triplet state in natural oxidation processes*. Photochemical & Photobiological Sciences. 9(1): p. 78-86.
12. Boveris, A., B. Chance, and N. Oshino, *Cellular production of hydrogen peroxide*. Biochemical Journal, 1972. 128(3): p. 617-&.
13. Mittler, R., *Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance*. Trends in Plant Science, 2002. 7(9): p. 405-410.
14. Sies, H., *Oxidative stress: Oxidants and antioxidants*. Experimental Physiology, 1997. 82(2): p. 291-295.
15. Bravo, L., *Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*. Nutrition Reviews, 1998. 56(11): p. 317-333.
16. Manach, C., et al., *Polyphenols: food sources and bioavailability*. American Journal of Clinical Nutrition, 2004. 79(5): p. 727-747.
17. Pourrat, H., et al., *Production of gallic acid from tara by a strain of aspergillus niger*. Journal of Fermentation Technology, 1985. 63(4): p. 401-403.
18. Kar, B. and R. Banerjee, *Biosynthesis of tannin acyl hydrolase from tannin-rich forest residue under different fermentation conditions*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2000. 25(1): p. 29-38.
19. Tsao, M.U., *A new synthesis of mescaline*. Journal of the American Chemical Society, 1951. 73(11): p. 5495-5496.
20. Babich, H., A. Sedletcaia, and B. Kenigsberg, *In vitro cytotoxicity of protocatechuic acid to city cultured human cells from oral tissue: Involvement in oxidative stress*. Pharmacology & Toxicology, 2002. 91(5): p. 245-253.
21. Lu, F.J., et al., *In vitro anti-influenza virus activity of synthetic humate analogues derived from protocatechuic acid*. Archives of Virology, 2002. 147(2): p. 273-284.

22. Guan, S., et al., *Protocatechuic acid promotes cell proliferation and reduces basal apoptosis in cultured neural stem cells*. *Toxicology in Vitro*, 2009. 23(2): p. 201-208.
23. Nakamura, Y., et al., *A simple phenolic antioxidant protocatechuic acid enhances tumor promotion and oxidative stress in female ICR mouse skin: dose- and timing-dependent enhancement and involvement of bioactivation by tyrosinase*. *Carcinogenesis*, 2000. 21(10): p. 1899-1907.
24. Wang, H., et al., *Effect of protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* on proliferation of human adipose tissue-derived stromal cells in vitro*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2009. 330(1-2): p. 47-53.
25. Song, Q., et al., *Measurement and DFT Calculation on Terahertz Spectroscopy of 4-aminobenzoic Acid*. *Journal of Infrared Millimeter and Terahertz Waves*, 2010. 31(3): p. 310-318.
26. Osgood, P.J., S.H. Moss, and D.J.G. Davies, *The synthesis of near ultraviolet radiation killing of mammal cells by the sunscreen agent para aminobenzoic acid*. *Journal of Investigative Dermatology*, 1982. 79(6): p. 354-357.
27. Clifford, M.N., *Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000. 80(7): p. 1033-1043.
28. Clifford, M.N., *Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999. 79(3): p. 362-372.
29. Olthof, M.R., P.C.H. Hollman, and M.B. Katan, *Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans*. *Journal of Nutrition*, 2001. 131(1): p. 66-71.
30. Donovan, J.L., et al., *Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine*. *Journal of Nutrition*, 1999. 129(9): p. 1662-1668.
31. Chen, J.H. and C.T. Ho, *Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997. 45(7): p. 2374-2378.
32. Terao, J., M. Piskula, and Q. Yao, *Protective effect of epicatechin on lipid peroxidation*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1994. 308(1): p. 278-284.
33. Priefert, H., J. Rabenhorst, and A. Steinbuchel, *Biotechnological production of vanillin*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001. 56(3-4): p. 296-314.
34. Ferguson, L.R., S.T. Zhu, and P.J. Harris, *Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29 cells*. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2005. 49(6): p. 585-593.
35. Lucci, N. and P. Mazzafera, *Rutin synthase in fava d'anta: Purification and influence of stressors*. *Canadian Journal of Plant Science*, 2009. 89(5): p. 895-902.
36. Erlund, I., et al., *Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers*. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2000. 56(8): p. 545-553.
37. Mathew, S. and T.E. Abraham, *Ferulic acid: An antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2004. 24(2-3): p. 59-83.
38. Lin, F.H., et al., *Ferulic acid stabilizes a solution of vitamins C and E and doubles its photoprotection of skin*. *Journal of Investigative Dermatology*, 2005. 125(4): p. 826-832.
39. DeMedina, F.S., et al., *Effect of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1996. 278(2): p. 771-779.
40. Rumack, C.M., et al., *Neonatal intra cranial hemorrhage and maternal use of aspirin*. *Obstetrics and Gynecology*, 1981. 58(5): p. S52-S56.

41. Wecker, H. and A. Laubert, *Reversible reduction in hearing with acute salicylate intoxication*. Hno, 2004. 52(4): p. 347-351.
42. Tsai, S.H., S.Y. Lin-Shiau, and J.K. Lin, *Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NF kappa B in macrophages by resveratrol*. British Journal of Pharmacology, 1999. 126(3): p. 673-680.
43. Sinha, K., G. Chaudhary, and Y.K. Gupta, *Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats*. Life Sciences, 2002. 71(6): p. 655-665.
44. Pekal, A., M. Biesaga, and K. Pyrzynska, *Interaction of quercetin with copper ions: complexation, oxidation and reactivity towards radicals*. Biometals. 24(1): p. 41-49.
45. Roy, M.K., et al., *ORAC and DPPH assay comparison to assess antioxidant capacity of tea infusions: Relationship between total polyphenol and individual catechin content*. International Journal of Food Sciences and Nutrition. 61(2): p. 109-124.
46. Sochor, J., et al., *Fully Automated Spectrometric Protocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages*. Molecules, 2010. 15(12): p. 8618-8640.
47. Zitka, O., et al., *High performance liquid chromatographic assay for detection of phytochelatin-synthase*. Listy Cukrovarnicke a Reparske. 126(11): p. 418-419.
48. Parejo, L., et al., *Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH center dot (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay*. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 2000. 44(3): p. 507-512.
49. Re, R., et al., *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free Radical Biology and Medicine, 1999. 26(9-10): p. 1231-1237.
50. Jerkovic, I. and Z. Marijanovic, *Oak (Quercus frainetto Ten.) Honeydew Honey- Approach to Screening of Volatile Organic Composition and Antioxidant Capacity (DPPH and FRAP Assay)*. Molecules, 2010. 15(5): p. 3744-3756.
51. Ou, B.X., et al., *Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. 50(11): p. 3122-3128.
52. Gulcin, I., et al., *Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey*. Food and Chemical Toxicology, 2010. 48(8-9): p. 2227-2238.
53. Jagtap, U.B., S.N. Panaskar, and V.A. Bapat, *Evaluation of Antioxidant Capacity and Phenol Content in Jackfruit (Artocarpus heterophyllus Lam.) Fruit Pulp*. Plant Foods for Human Nutrition, 2010. 65(2): p. 99-104.
54. Sochor, J., et al., *Content of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity in Fruits of Apricot Genotypes*. Molecules. 15(9): p. 6285-6305.