

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Hodnocení antioxidační aktivity přírodních látek

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Miroslav Polášek, CSc.

Hradec Králové, 2017

Klára Kunovská

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové,

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí diplomové práce doc. PharmDr. Haně Sklenářové, Ph.D. za odborné vedení a poskytnutí cenných rad při vypracování této diplomové práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Klára Kunovská

Školitel: doc. PharmDr. Hana Sklenářová, PhD.

Konzultant: doc. RNDr. Miroslav Polášek, CSc.

Název diplomové práce: Hodnocení antioxidační aktivity přírodních látek

Cílem této diplomové práce bylo hodnocení antioxidační aktivity přírodních látek pomocí chemiluminiscenční detekce v průtokovém systému sekvenční injekční analýzy (SIA). Výhodou tohoto systému je vysoká citlivost, jednoduchost a vysoká opakovatelnost jednotlivých analýz. Jako antioxidační aktivita byla hodnocena závislost chemiluminiscenčního signálu na koncentraci testovaného antioxidantu a následně odvozen index Q. Jako chemiluminiscenční činidlo zde sloužil luminol, který v bazickém prostředí při oxidaci peroxidem vodíku za přítomnosti katalyzátoru vykazoval chemiluminiscenční záření. Jako katalyzátor byl použit roztok hexakynoželezitanu draselného a celé měření probíhalo při pracovním napětí 435 mV. Chemiluminiscenční signál byl snímán po dobu 60 s. U každé testované látky proběhly 3 cykly měření. Výsledky testování byly hodnoceny pomocí plochy a výšky chemiluminiscenčního signálu a srovnány s experimentem bez testovaného antioxidantu.

Nejprve byly hodnoceny jednotlivé vybrané látky s antioxidační aktivitou, a to kvercitrin, kyselina kávová, epikatechin, floridzin a floretin, které byly porovnávány s Troloxem, který zde sloužil jako standard pro hodnocení antioxidační aktivity. Z hodnocení vyplynulo, že kvercitrin, kyselina kávová a epikatechin jsou silnější antioxidanty než Trolox a floridzin s floretinem o něco slabší. Dále byly hodnoceny směsi látek s antioxidační aktivitou obsažených v extraktech odrůd černého bezu a v extraktech slupky a dužniny jablek odrůdy Golden delicious. Bylo potvrzeno, že z odrůd černého bezu vykazuje největší antioxidační aktivitu planý bez, dále odrůda Samyl a nejméně odrůda Sambu. U jablek vykazovaly větší antioxidační aktivitu methanolové roztoky než roztoky vodné, a zároveň byla potvrzena větší antioxidační aktivita u jablečné slupky v porovnání s jablečnou dužninou.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Klára Kunovská

Supervisor: doc. PharmDr. Hana Sklenářová, PhD.

Consultant: doc. RNDr. Miroslav Polášek, CSc.

Title of Diploma Thesis: Evaluation of antioxidant activity of natural compounds

The aim of this thesis was to evaluate antioxidant activity of natural compounds by chemiluminescence detection in flow system based on sequential injection analysis (SIA). The advantages of this system are high sensitivity, simplicity and high repeatability of individual analyses. The antioxidant activity was evaluated like dependence of chemiluminiscent signal on the concentration of tested antioxidant and then index Q was derived. Luminol was used as chemiluminiscent reagent, which showed chemiluminiscent emission in alkaline environment during oxidation of hydrogen peroxide together with a catalyst. As the catalyst, solution of potassium ferricyanide was used and whole measurement was conducted during working voltage of 435 mV. Chemiluminescent signal was monitored for a period of 60 seconds. For each tested substance, 3 cycles of measurement were conducted. The results of testing were evaluated using the area and height of the chemiluminescent signal and compared with the experiment without the tested antioxidant.

At first, individual selected substances with antioxidant activity (quercitrin, caffeic acid, epicatechin, phloretin and phloridzin) were evaluated, then they were compared with Trolox, which is used as the standard for evaluation of antioxidant activity. The evaluation concluded that quercitrin, caffeic acid and epicatechin are stronger antioxidants than Trolox and phloridzin with phloretin are slightly weaker. Then mixtures of substances with antioxidant activity contained in extracts of varieties of elderberry and extracts of peel and pulp of apple variety Golden Delicious were also evaluated. It was confirmed that in case of elderberry, wild elderberry has the highest antioxidant activity, then variety Samyl and the least variety Sambu. In apples testing, methanol extracts showed higher antioxidant activity than aqueous extracts and at the same time, it was confirmed that higher antioxidant activity has apple peel than apple pulp.

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK | 3 |
| 1 ÚVOD | 5 |
| 2 ZADÁNÍ A CÍL PRÁCE | 6 |
| 3 TEORETICKÁ ČÁST | 7 |
| 3.1 ANTIOXIDANTY A VOLNÉ RADIKÁLY | 7 |
| 3.2 PŘÍRODNÍ ANTIOXIDANTY | 7 |
| 3.3 TESTOVANÉ ANTIOXIDANTY | 9 |
| 3.3.1 <i>Kvercitrin</i> | 9 |
| 3.3.2 <i>Kyselina kávová</i> | 9 |
| 3.3.3 <i>Epikatechin</i> | 9 |
| 3.3.4 <i>Floridzin</i> | 10 |
| 3.3.5 <i>Floretin</i> | 10 |
| 3.3.6 <i>Trolox</i> | 11 |
| 3.4 ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA | 11 |
| 3.5 CHEMILUMINISCENCE..... | 12 |
| 3.6 SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZA..... | 13 |
| 3.7 HODNOCENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY | 14 |
| 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 16 |
| 4.1 MATERIÁL..... | 16 |
| 4.1.1 <i>Chemikálie</i> | 16 |
| 4.1.2 <i>Přírodní materiál</i> | 16 |
| 4.1.3 <i>Laboratorní přístroje</i> | 17 |
| 4.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ | 17 |
| 4.2.1 <i>Zásobní roztoky</i> | 17 |
| 4.2.2 <i>Pracovní roztoky</i> | 18 |
| 4.2.3 <i>Vzorky</i> | 19 |
| 4.3 POSTUP MĚŘENÍ | 20 |
| 5 VÝSLEDKY A DISKUZE | 24 |
| 5.1 STANDARDS | 25 |
| 5.1.1 <i>Kvercitrin</i> | 25 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 5.1.2 | <i>Kyselina kávová</i> | 27 |
| 5.1.3 | <i>Epikatechin</i> | 30 |
| 5.1.4 | <i>Floridzin</i> | 32 |
| 5.1.5 | <i>Floretin</i> | 35 |
| 5.1.6 | <i>Trolox</i> | 37 |
| 5.2 | REÁLNÉ VZORKY | 40 |
| 5.2.1 | <i>Extrakty z jablek Golden delicious</i> | 40 |
| 5.2.2 | <i>Extrakty odrůd černého bezu</i> | 46 |
| 5.3 | SOUHRNNÉ GRAFY PRO STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY LÁTEK | 51 |
| 5.3.1 | <i>Standardy</i> | 51 |
| 5.3.2 | <i>Jablečné extrakty</i> | 52 |
| 6 | ZÁVĚR | 54 |
| 7 | POUŽITÁ LITERATURA | 55 |

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABTS – 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazol-6-sulfonát)

AO – antioxidant

CL – chemiluminiscence

CUPRAC – hodnocení antioxidační kapacity redukcí měďnatých iontů (Cupric Reducing Antioxidant Capacity)

DPPH – 2,2-di(4-tert-oktylfenyl)-1-pikrylhydrazyl

ET – elektronový přenos (Electron Transfer)

FIA – průtoková injekční analýza (Flow Injection Analysis)

FRAP – hodnocení antioxidační kapacity redukcí železitých iontů (Ferric Reducing Antioxidant Power)

HAT – přesun atomu vodíku (Hydrogen Atom Transfer)

HO₂• – hydroperoxylový radikál

ICL₀ – chemiluminiscenční signál slepého vzorku

ICL_X – chemiluminiscenční signál testovaného vzorku s antioxidační aktivitou

NO• – radikál oxidu dusnatého

NO₂• – radikál oxidu dusičitého

O₂• – superoxidový radikál

•OH – hydroxylový radikál

-OH – hydroxylová funkční skupina

ORAC – kapacita absorpce kyslíkových radikálů (Oxygen Radical Absorption Capacity)

PTFE – polytetrafluorethylen

RNS – reaktivní formy dusíku (Reactive Nitrogen Species)

RO• – alkoxylový radikál

ROO• – peroxylový radikál

ROS – reaktivní formy kyslíku (Reactive Oxygen Species)

RSD – relativní směrodatná odchylka (Relative Standard Deviation)

SD – směrodatná odchylka (Standard Deviation)

SIA – sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis)

TEAC – troloxový ekvivalent antioxidační kapacity (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

TRAP – antioxidační parametr popisující celkový záchyt radikálů (Total Radical-trapping Antioxidant Parameter)

1 ÚVOD

V poslední době roste zájem o přírodní látky, hlavně ty s antioxidační aktivitou. Přírodní antioxidanty nalezneme v několika přírodních zdrojích, jako jsou některé druhy ovoce a zeleniny a u mnoha léčivých a aromatických rostlin. Tyto látky dokáží eliminovat volné radikály, chrání náš organismus před působením oxidačního stresu, a tím nám slouží i jako důležitá prevence různých civilizačních onemocnění. Díky zájmu o co nejvyšší podíl těchto látek v naší stravě, je testována jejich antioxidační aktivita pomocí různých chemických a fyzikálních metod. Metod pro hodnocení antioxidační aktivity existuje několik a lze díky nim hodnotit, jak antioxidační vlastnosti izolovaných látek, tak i celkovou antioxidační aktivitu složitých směsí.

2 ZADÁNÍ A CÍL PRÁCE

Zadáním mé práce bylo hodnocení antioxidační aktivity přírodních látek, jak izolovaných, tak i ve směsích obsažených v reálných vzorcích, konkrétně v extraktech jablečné slupky a dužniny odrůdy Golden delicious a v extraktech odrůd černého bezu. Všechny látky byly testovány chemiluminiscenční metodou využitím techniky sekvenční injekční analýzy (SIA).

Cílem práce bylo hodnocení antioxidační aktivity jako závislosti chemiluminiscenčního signálu na koncentraci testovaného antioxidantu. Následně pak odvození indexu Q (quenching efficacy index) a porovnání antioxidační aktivity jednotlivých látek s Troloxem, jako standardem pro měření antioxidační aktivity, a reálných vzorků mezi sebou.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 ANTIOXIDANTY A VOLNÉ RADIKÁLY

Antioxidanty jsou látky, které chrání organismus před oxidačním stresem způsobeným vznikem volných radikálů a hrají významnou roli v prevenci a rozvoji zánětlivých a degenerativních onemocnění.

Volnými radikály nazýváme ionty, atomy nebo molekuly s nepárovými elektrony, které jsou krátkodobě schopné samostatné existence, a které mají několik fyziologických funkcí.

Při oxidačním stresu však vznikají volné reaktivní radikály, a to převážně reaktivní formy kyslíku (ROS) a reaktivní formy dusíku (RNS), které mají negativní vliv na důležité buněčné sloučeniny, jako jsou tuky, bílkoviny a nukleové kyseliny.

Mezi kyslíkové radikály (ROS) patří radikál superoxidový ($O_2^{\bullet-}$), hydroperoxylový (HO_2^{\bullet}), hydroxylový ($\bullet OH$), peroxylový (ROO^{\bullet}) a alkoxylový (RO^{\bullet}) a mezi dusíkové radikály (RNS) řadíme radikál oxidu dusnatého (NO^{\bullet}) a oxidu dusičitého (NO_2^{\bullet}). Díky volnému nepárovému elektronu zasahují do buněčných struktur, narušují jejich funkci a následně dochází k poškození tkání, orgánů a postupně i celého organismu [1,2,3].

3.2 Přírodní antioxidanty

I v lidském organismu nalezneme několik endogenních antioxidantů, kterými jsou například koenzym Q10, glutathion či kyselina močová. Jsou to převážně nízkomolekulární sloučeniny, které v organismu plní svou nezastupitelnou funkci. Avšak více látek s antioxidační aktivitou přijímáme potravou, a tak stále stoupá zájem o hledání nových a dostupných přírodních zdrojů těchto látek a hodnocení jejich účinnosti. Největší obsah přírodních antioxidantů nalezneme v mnoha druzích ovoce a zeleniny, dále v čaji, vínu a samozřejmě i u mnoha aromatických a léčivých rostlin.

Jedná se především o vitaminy C, E a karotenoidy, ale největší pozornost se v poslední době věnuje především skupině fenolických sloučenin [3].

Fenolické sloučeniny

Fenolické sloučeniny tvoří rozmanitou skupinu sekundárních metabolitů obsažených převážně v rostlinách a různých druzích ovoce a zeleniny. Jejich celkový denní příjem z různých zdrojů je větší než u antioxidačních vitaminů (C a E) a byl odhadnut na množství 1 g.

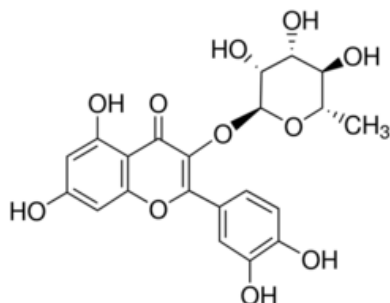
Do této společné skupiny zahrnujeme sloučeniny jako flavonoidy, fenolické kyseliny, fenolické diterpeny a další. Hlavním strukturním znakem všech látek je vždy jedno nebo více aromatických jader substituovaných nejméně jednou hydroxylovou skupinou (-OH). Vyskytují se jak ve formě aglykonů, tak i glykosidů a mají antioxidační účinky [3,4,5].

Nejrozmanitější a nejrozšířenější skupinou polyfenolů jsou flavonoidy. Je známo více než 7000 různých flavonoidů, ale jejich počet se díky výzkumu v této oblasti stále zvyšuje. Jsou obsaženy v listech a semenech květin, v kůře stromů, v ovoci a zelenině. Flavonoidy mají i mnoho příznivých biologických účinků pro naše tělo, jako přírodní antioxidanty pomáhají v předcházení mnoha onemocnění, včetně kardiovaskulárních a onkologických. Na biologickou aktivitu flavonoidů má vliv i poloha substituentů v jejich struktuře. Hlavní struktura flavonoidů je tvořena dvěma fenolickými kruhy A a B spojenými 3 uhlíkatým řetězcem, který je obvykle přes atom kyslíku uzavřen do třetího kruhu C. Díky rozdílům v jejich struktuře se flavonoidy dále rozdělují do několika skupin. Patří sem například flavony, flavonoly, isoflavonoly, anthokyanidiny a chalkony [6].

3.3 Testované antioxidanty

3.3.1 Kvercitrin

Synonymum: kvercetin-3-O- α -L-rhamnosid

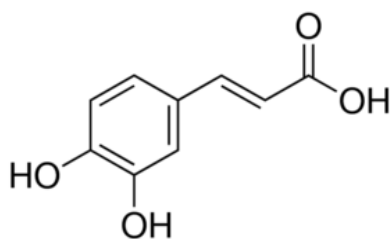


Obr. 1 – Strukturální vzorec kvercitrinu [7]

Kvercitrin je glykosidová forma kvercetinu, bioflavonoidu hojně zastoupeného v ovoci a zelenině. Cukerná složka je zde rhamnosa [8].

3.3.2 Kyselina kávová

Systematický název: 3,4-dihydroxyskořicová kyselina

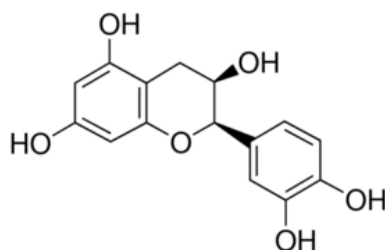


Obr. 2 – Strukturální vzorec kyseliny kávové [9]

Kyselina kávová je derivát kyseliny skořicové, patřící do skupiny fenolových kyselin. Je hojně zastoupena v ovoci, zelenině, čaji a kávě [10].

3.3.3 Epikatechin

Systematický název : (2*R*,3*R*)-2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,4-dihydro-1(2*H*)-benzopyran-3,5,7-triol

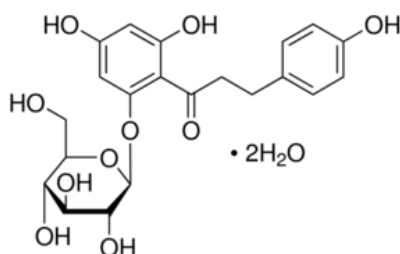


Obr. 3 – Strukturální vzorec epikatechinu [11]

Epikatechin patří do skupiny flavonolů a je obsažen hlavně v zeleném čaji, víně a kakau [12].

3.3.4 Floridzin

Synonymum: floretin 2'- β -D-glukopyranosid

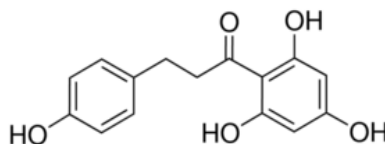


Obr. 4 – Strukturální vzorec floridzinu [13]

Floridzin je glykosidová forma floretinu, patřící do chemické skupiny dihydrochalkonů. Cukerná složka je zde β -D-glukopyranosa [14].

3.3.5 Floretin

Systematický název: 3-(4-hydroxyfenyl)-1-(2,4,6-trihydroxyfenyl)-1-propanon

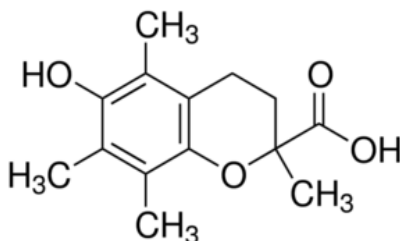


Obr. 5 – Strukturální vzorec floretinu [15]

Floretin je aglykon floridzinu, patřící mezi dihydrochalkony. Obsažen je hlavně v jablcích [16].

3.3.6 Trolox

Systematický název : (±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina



Obr. 6 – Strukturní vzorec Troloxu [17]

Trolox je ve vodě rozpustný analog tokoferolu, neboli vitaminu E. Je běžně používán jako standard pro měření celkové antioxidační kapacity (TAC) [18].

3.4 ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITA

Existuje několik analytických metod pro hodnocení antioxidační aktivity, díky kterým lze měřit jak izolované látky, což nám slouží především k lepšímu porozumění vztahu mezi strukturou látky a její reaktivitou s volnými radikály, tak i směsi více látek. Ovšem většina látek s antioxidační aktivitou je přijímána našim tělem ve formě složitých směsí, a tak se více uplatňuje hodnocení celkové antioxidační kapacity (TAC). TAC je parametr, který nám udává celkovou schopnost vzorku eliminovat volné radikály a pro lepší spolehlivost výsledků je doporučováno použít více metod pro hodnocení antioxidační aktivity [3,19].

Metody hodnocení antioxidační aktivity

Antioxidační aktivitu lze změřit chemickými nebo fyzikálními metodami. Hlavním principem chemických metod je využití činidel, která tvoří s volnými radikály barevné produkty. Hlavní úlohou antioxidantů je zde zabránění vzniku těchto produktů a výsledný efekt se zde měří nejčastěji spektrofotometricky [20]. Chemické metody dále rozdělujeme do dvou základních skupin podle toho, zda při reakci dochází k přenosu atomu vodíku, tzv. HAT (hydrogen atom transfer) testy, nebo přenosu elektronu, ET (electron transfer) testy.

HAT testy hodnotí schopnost antioxidantu zhášet volné reaktivní radikály pomocí vodíkového atomu a patří sem například testy ORAC (oxygen radical absorbance capacity), TRAP (total radical-trapping antioxidant parameter) nebo lipidová peroxidace.

ET testy jsou založeny na redukci oxidantů obsažených ve vzorcích a následném hodnocení jejich zbarvení. Stupeň zbarvení závisí na koncentraci antioxidantu ve vzorku. Do této skupiny testů patří například ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity), TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity), DPPH (2,2-di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl) a FRAP (ferric reducing antioxidant power) [21, 22].

Mezi fyzikální metody řadíme například hodnocení redoxního potenciálu, elektronovou spinovou rezonanci či chemiluminiscenci, kde dochází ke stanovení antioxidační aktivity hodnocením změn fyzikálních vlastností, které doprovázejí chemickou reakci.

3.5 CHEMILUMINESCENCE

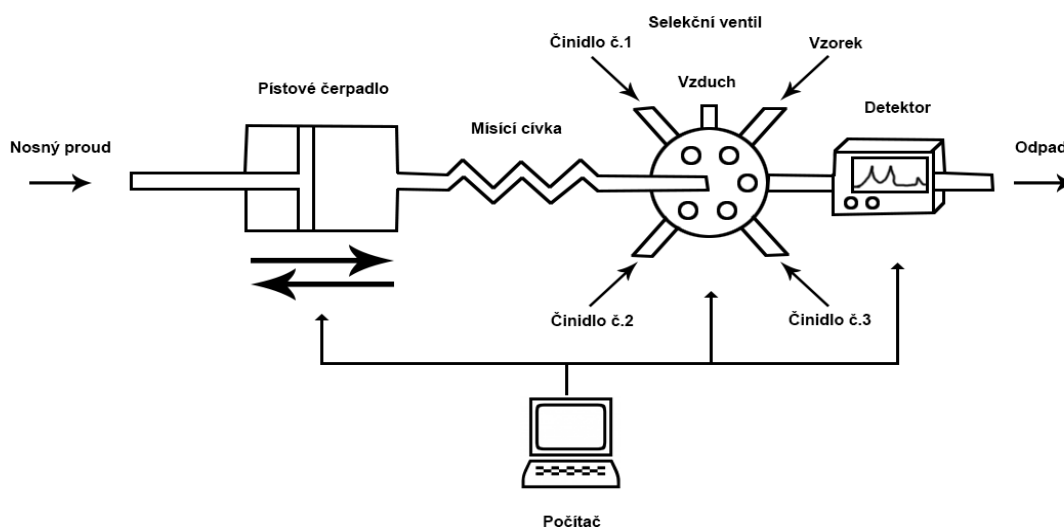
Základním principem chemiluminiscence (CL) je přeměna chemické energie na světelnou, kdy pomocí chemické reakce vzniká produkt, který se dostane do excitovaného stavu a při jeho přechodu zpět do základního energetického stavu se vyzáří přebytečná energie ve formě fotonů. Světlo bývá nejčastěji emitováno ve viditelné oblasti, ale k emisi může dojít i v ultrafialové a infračervené oblasti. Chemiluminiscenční metody se pro svou vysokou citlivost využívají pro stopové analýzy a navíc v kombinaci s průtokovými injekčními metodami nabízí vysokou reprodukovatelnost a jednoduchost analýz [23,24].

3.6 SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZA

Sekvenční injekční analýza (SIA) se řadí mezi průtokové analytické metody, kde díky automatizaci a synchronizaci složitých postupů, jako je dávkování činidel a vzorků, lze stanovit velké množství vzorků během poměrně krátké doby. Od průtokové injekční analýzy (FIA) se SIA liší geometrií nosného proudu, kdy dochází ke změně přímého a zpětného toku, a tím pádem i k lepší přeměně testované látky na výsledný hodnocený produkt.

Princip metody

Hodnocenou látku, obsaženou v testovaném roztoku, nejprve převedeme chemickou reakcí s činidlem na produkt, u kterého následně hodnotíme vhodnou analytickou vlastnost. Celý tento děj probíhá v systému, který je složen z vícecestného selekčního ventilu, přes který dochází k postupné aspiraci činidel, nosného proudu a testovaného vzorku pomocí pístového čerpadla do mísící cívky, kde díky obrácenému toku pomocí čerpadla dojde k dokonalému promísení všech složek za vzniku reakčního produktu, který je následně detekován v detekční cele. Výsledkem měření je signál ve tvaru píku, který je vyhodnocen pomocí počítače, který je zároveň důležitý pro řízení jednotlivých kroků měřicího cyklu [25,26].



Obr. 7 – Schématické uspořádání SIA systému

Převzato a upraveno ze zdroje [25].

3.7 Hodnocení antioxidační aktivity

Tab. 1 – Testy antioxidační aktivity z odborných zdrojů

| MATRICE | TESTOVANÉ LÁTKY | METODA | DETEKCE | CITACE |
|-----------------------------------|--|-------------------|--------------------------------------|--------|
| - | flavony | ABTS, DPPH | Spektrofotometrie | [6] |
| Solidago microglossa | Kvercitrin | TBARS | Spektrofotometrie | [8] |
| Pivo, chmelové extrakty a granule | polyfenoly | ABTS, DPPH a FRAP | Spektrofotometrie | [19] |
| Víno (červené, bílé) | Polyfenoly – kys. gallová | FIA/SIA | Chemiluminiscence | [27] |
| Víno (červené, bílé) | Polyfenoly – kys. gallová, kávová, kumarová, (epi)katechin | SIA | Chemiluminiscence | [28] |
| Olivový olej | Polyfenoly – Kys. gallová a protokatechová | FIA ABTS, DPPH | bioluminiscence spektrofotometrie | [29] |

Ve všech výše zmíněných případech byly hodnoceny polyfenolické látky. Je to pravděpodobně tím, že v poslední době se jim věnuje velká pozornost a jejich podíl v přírodních zdrojích je poměrně velký. Díky tomu je velká rozmanitost ve výběru testovaných matric, které vždy obsahují různé polyfenoly v odlišném množství.

Antioxidační aktivitu je možné hodnotit jak metodami průtokovými, tak neprůtokovými. Zde jsou uvedeny vybrané metody [19, 27, 28, 29] pro jejich vzájemné porovnání.

V prvním testu byla testována antioxidační aktivita polyfenolů obsažených v pivu a chmelových extraktech a granulích. K dispozici bylo 20 různých vzorků pív, mezi která patřila jak piva světlá, polotmavá, tmavá a dokonce i nealkoholická. Dále byly k dispozici chmelové extrakty, které byly extrahovány methanolem či superkritickým CO₂, a chmelové granule. Hodnocení antioxidační aktivity proběhlo metodou ABTS a DPPH, kde byla využita schopnost antioxidantů eliminovat barevné reaktivní volné radikály. Tyto dvě metody byly využity u všech hodnocených vzorků, na rozdíl od metody FRAP, která byla díky nerozpustnosti extraktů a granulí ve vodě, využita jen u vzorků pív. U této metody byly výsledky o něco nižší, protože jsou zde spíše měřeny redukční vlastnosti

látek, než přímo antioxidační aktivita. Všechny výsledky byly porovnávány s Troloxem [19].

Ve druhém případě byla hodnocena antioxidační aktivita polyfenolických sloučenin obsažených v bílém a červeném víně. Bylo hodnoceno 15 bílých a 10 červených vín zakoupených v běžných obchodech. Testované vzorky byly následně ředěny destilovanou vodou, a to v poměru 1:100 u bílých a 1:500 u červených vín. Pro hodnocení byla využita chemiluminiscenční metoda v hybridním systému průtokových metod FIA a SIA. Tato metoda je založena na inhibici chemiluminiscenční reakce luminolu a manganistanu draselného v bazickém prostředí. Výhodou systému je velká rychlost a jednoduchá reprodukovatelnost měření [27]. Stejně vzorky byly již dříve testovány pomocí jednotného průtokového systému, SIA. Díky využití chemiluminiscenční detekce umožňovala metoda vysokou citlivost a pomocí průtokového systému bylo otestováno 60 vzorků za hodinu [28].

V posledním případě bylo testováno 50 vzorků extra panenského olivového oleje různých řeckých odrůd. Vzorky byly extrahovány methanolem a vodou v poměru 80:20 a následně odstředovány v centrifuze rychlostí 5000 otáček/min. V tomto případě bylo úkolem porovnání průtokové metody FIA s neprůtokovými metodami DPPH a ABTS pro hodnocení antioxidační aktivity látek v olejích, konkrétně kyseliny gallové. I zde je největší výhodou rychlost analýzy. Je to dáno měřením výsledného produktu reakce, které u FIA proběhne za 1 s a u ostatních metod za 1 hodinu. Díky tomu je možné pomocí FIA metody otestovat více vzorků během jedné analýzy [29].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 MATERIÁL

4.1.1 *Chemikálie*

Epikatechin, > 90% - Fluka - Sigma Aldrich, Praha, Česká Republika

Floretin, \geq 99% - Sigma Aldrich, Praha, Česká Republika

Floridzin dihydrát, \geq 99% - Sigma Aldrich, Praha, Česká Republika

Kvercitrin hydrát, \geq 78% - Sigma Aldrich, Praha, Česká Republika

Kyselina kávová, 97% - Sigma Aldrich, Praha, Česká Republika

Trolox, 99% - Sigma Aldrich, Praha, Česká Republika

Hexakynoželezitan draselný, p. a. - Sigma Aldrich, Praha, Česká Republika

Hydroxid sodný, p. a. - Penta, Chrudim, Česká Republika

Luminol, p. a. – Serva, Německo

Ethanol denaturovaný methanolem, 96% - Lihovar Kolín, Česká Republika

Methanol, pro HPLC – Sigma Aldrich, Praha, Česká Republika

Peroxid vodíku, 30% - Fluka – Sigma Aldrich, Praha, Česká Republika

Demineralizovaná voda – připravená na Katedře analytické chemie

Methanolové a vodné extrakty z jablek odrůdy Golden Delicious – připraveny ve Výzkumném a šlechtitelském ústavu ovocnářském v Holovousích.

4.1.2 *Přírodní materiál*

Plody černého bezu – vzorky získány z Katedry farmakognozie

4.1.3 Laboratorní přístroje

Analytické váhy

Průtokový systém pracující na principu sekvenční injekční analýzy:

Ovládací software FaFSia verze 1.0

Pístové čerpadlo o objemu 2,5 ml – Cavro XL – 3000, USA

10- cestný selekční ventil – Vici Valco, USA

Mísící cívka a spojovací teflonové hadičky (PTFE) o vnitřním průměru 0,50mm a 0,75mm

Chemiluminiscenční cela pro kinetická měření - Katedra analytické chemie

Fotonásobič Hamamatsu – H5784-01, Japonsko

4.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

4.2.1 Zásobní roztoky

Zásobní roztok hexakynoželezitanu draselného o koncentraci 1 mmol/l byl připraven rozpuštěním 0,0329 g hexakynoželezitanu draselného o molární hmotnosti 329,24 g/mol ve vodě a doplněním na objem 100 ml.

Pro přípravu roztoku luminolu o koncentraci 1 mmol/l bylo potřeba nejprve připravit roztok hydroxidu sodného o koncentraci 0,1 mol/l, a to rozpuštěním 0,4 g hydroxidu sodného o molární hmotnosti 39,997 g/mol v 100 ml vody. Následně bylo ve vzniklém roztoku hydroxidu sodného rozpuštěno 0,0177 g luminolu o molární koncentraci 177,20 g/mol a doplněno vodou na 100 ml.

Oba tyto zásobní roztoky byly připraveny pouze jednou před prvním měřením a byly využívány do úplného spotřebování. Po celou dobu byly uchovávány v lednici ve skleněných odměrných baňkách.

Zásobní roztok peroxidu vodíku o koncentraci 1 mmol/l byl kvůli jeho nízké stabilitě připravován vždy čerstvý před každou sérií měření.

Pro jeho přípravu byl k dispozici 30% peroxid vodíku, ze kterého bylo automatickou pipetou odměřeno 560 μl a doplněno vodou na 50 ml. Výsledný roztok vznikl odebráním 1 ml a doplněním vodou na objem 100 ml.

K přípravě všech roztoků byla použita voda demineralizovaná, připravená na Katedře analytické chemie.

4.2.2 Pracovní roztoky

Základní roztok kvercitrinu o koncentraci 1 mmol/l vznikl nejprve rozpuštěním 0,0448 g kvercitrinu o molární hmotnosti 448,38 g/mol ve vodě a doplněním na 100 ml, kde se však dostatečně nerozpustil, a tak byl doplněn do 200 ml methanolem. Proto jsem nadále pro zbylé roztoky volila jako rozpouštědlo methanol.

Pro přípravu základního roztoku kyseliny kávové o koncentraci 1 mmol/l bylo naváženo 0,0180 g kyseliny kávové o molární hmotnosti 180,16 g/mol a rozpuštěno ve 100 ml methanolu.

Základní roztok epikatechinu o koncentraci 1 mmol/l byl připraven rozpuštěním 0,0290 g epikatechinu o molární hmotnosti 290,28 a doplněn methanolem na 100 ml.

Základní roztok floridzinu o koncentraci 1 mmol/l vznikl rozpuštěním 0,0472 g floridzinu o molární hmotnosti 472,44 g/mol v methanolu a doplněním na objem 100 ml.

Základního roztoku floretinu o koncentraci 1 mmol/l bylo kvůli jeho malému množství připraveno jen 50 ml. Naváženo bylo 0,0137 g floretinu o molární hmotnosti 274,27 g/mol a doplněno methanolem na daný objem.

Ze stejného důvodu bylo připraveno 50 ml základního roztoku Troloxu o koncentraci 1 mmol/l, a to rozpuštěním 0,0125 g Troloxu o molární hmotnosti 250,29 g/mol a doplněním methanolem na příslušný objem.

Ze všech těchto základních roztoků byly následně připraveny roztoky v testovaném koncentračním rozmezí. Nejprve bylo ze základního roztoku odebráno 5 ml roztoku a v 10 ml baňce smíseno v poměru 1:1 s destilovanou vodou. Tímto vznikl druhý roztok, ze kterého se připravil roztok třetí stejným způsobem. Roztoky byly postupně ředěny až do koncentrace, jejíž CL signál dosáhl při měření stejné úrovně jako slepý vzorek, proto

bylo množství naředěných roztoků u každé látky jiné. Průměrně bylo od každého základního roztoku připraveno deset roztoků sestupných koncentrací.

4.2.3 *Vzorky*

Základní roztoky extraktů z plodů černého bezu byly připraveny ze zmrazených plodů odrůd planého bezu, odrůdy Samyl a odrůdy Sambu, předem zbavených stopek. Nejprve bylo naváženo 5 g zmrazených plodů každé odrůdy a rozmačkáno v třecí misce tloučkem. Z každého vzorku byl následně navážen 1 g, ke kterému bylo do zkumavky pro stabilizaci přidáno 0,1 g kyseliny citronové. Každá zkumavka obsahovala jen jednu odrůdu černého bezu. Do každé zkumavky pak bylo pipetováno 10 ml 50% etanolu. Vzorky byly extrahovány 10 min v ultrazvukové lázni za laboratorní teploty a poté byly odstředěny v centrifuze 15 min při 1500 otáčkách/min a teplotě 15 °C. Po odstředění byl supernatant vždy opatrně slit do jiné předem připravené zkumavky a ke zbytku materiálu byly přidány 4 ml 50% etanolu. Následně se vzorky znovu extrahovaly 10 min v ultrazvukové lázni a 15 min odstřeďovaly v laboratorní centrifuze při stejných otáčkách a teplotě. Supernatant byl opět přidán k prvnímu podílu. Takto získaný extrakt odpovídající 1 g rostlinného materiálu v 15 ml extraktu byl důkladně promíchán.

Z každého vzorku se pak postupným ředěním vodou v poměru 1:1 vytvořila testovaná řada roztoků.

Pro přípravu methanolového a vodného extraktu z jablek odrůdy Golden delicious musela být jablka i se slupkou nejprve rozmixovaná tyčovým mixérem. Pro přípravu obou vzorků bylo odebráno 6 g materiálu, ke kterému bylo ve zkumavce přidáno 10 ml destilované vody (vodný extrakt) nebo methanolu (methanolový extrakt) na objem 10 ml. Další postup pak probíhal u obou typů extraktu stejně. Nejprve byly vzorky extrahovány 10 min v ultrazvukové lázni, pak 10 min třepány v laboratorní třepačce a následně 10 min odstřeďovány v centrifuze při 7000 otáčkách/min a 15 °C. Nakonec byly vzorky přefiltrovány přes PTFE filtr (0,45 μm).

Testované řady byly opět vytvořeny postupným ředěním vzorků vodou.

4.3 POSTUP MĚŘENÍ

Podmínky měření, jako výchozí koncentrace pracovních roztoků, sekvence aspirace roztoků, průtoková rychlost a doba měření, byly převzaty z předchozí diplomové práce Gabriely Chládkové [21], kde již byly optimalizovány.

Před každým měřením série standardů nebo vzorků bylo třeba průtokový systém nejprve důkladně promýt vodou a všemi potřebnými roztoky. Nejprve došlo k přepnutí ventilu u pístového čerpadla do polohy IN a následné aspiraci 1000 μl nosného proudu průtokovou rychlostí 50 $\mu\text{l/s}$. Následovalo přepnutí ventilu do polohy OUT a díky tomu k propojení mezi cívkou a čerpadlem. Po té bylo aspirováno 100 μl vody z jednotlivých portů (2, 3, 7 a 6) průtokovou rychlostí 30 $\mu\text{l/s}$ a po promytí byl celý objem odveden portem č. 5 do odpadní láhve.

Po promytí byl následně spuštěn program pro měření antioxidační aktivity zkoumané látky nebo vody, sloužící jako slepý roztok. Nejprve došlo k přepnutí ventilu do polohy IN a aspiraci 100 μl nosného proudu průtokovou rychlostí 50 $\mu\text{l/s}$. Následovalo přepnutí ventilu do polohy OUT a postupná aspirace všech složek z jednotlivých portů průtokovou rychlostí 30 $\mu\text{l/s}$. Nejprve bylo aspirováno 10 μl vzduchu portem č. 8, ten zde hrál velmi důležitou roli, protože vzduchové bublinky bránily vzájemnému smísení a následné reakci látek ještě před detekční celou. Proto byl vzduch nasáván vždy po aspiraci každého roztoku. Dále bylo aspirováno 40 μl peroxidu vodíku portem č. 2, následně po aspiraci vzduchu došlo k aspiraci 40 μl luminolu portem č. 3, po oddělení vzduchem bylo aspirováno 10 μl hexakynoželezitanu draselného portem č. 7 a jako poslední byla portem č. 6 aspirovaná měřená antioxidační látka, nebo v případě měření slepého vzorku, voda. Po aspiraci všech složek byl celý obsah transportován do detekční cely, kde byly všechny látky navzájem smíchány probubláním bublinkami vzduchu, který byl následně vypouštěn přídavným otvorem ven. V detekční cele byla pomocí chemiluminiscence následně sledována antioxidační aktivita po dobu předem nastaveného času 60 s. Po uplynutí daného času byl z cely vyčerpán celý její obsah a odveden portem č. 5 do odpadní láhve. Program byl ukončen promytím cely 500 μl vody a jejím odvedením do odpadní láhve. Jednotlivé kroky programu jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tab. 2: Měřicí program

| | | |
|------------------|-----------------------------------|------------------------|
| Syringe pump | valve position IN | |
| Syringe pump | set flow rate [$\mu\text{l/s}$] | 50 |
| Syringe pump | aspirate [μl] | 100 (voda) |
| Detector | on | |
| Syringe pump | valve position OUT | |
| Syringe pump | set flow rate [$\mu\text{l/s}$] | 30 |
| multi-port valve | set valve position | 8 |
| Syringe pump | aspirate [μl] | 10 (vzduch) |
| multi-port valve | set valve position | 2 |
| Syringe pump | aspirate [μl] | 40 (peroxid) |
| multi-port valve | set valve position | 8 |
| Syringe pump | aspirate [μl] | 10 (vzduch) |
| multi-port valve | set valve position | 3 |
| Syringe pump | aspirate [μl] | 40 (luminol) |
| multi-port valve | set valve position | 8 |
| Syringe pump | aspirate [μl] | 10 (vzduch) |
| multi-port valve | set valve position | 7 |
| Syringe pump | aspirate [μl] | 10 (železitan) |
| multi-port valve | set valve position | 8 |
| Syringe pump | aspirate [μl] | 10 (vzduch) |
| multi-port valve | set valve position | 6 |
| Syringe pump | aspirate [μl] | 50 (voda, antioxidant) |
| Syringe pump | set flow rate [$\mu\text{l/s}$] | 50 |

| | | |
|------------------|----------------------------|---------------|
| multi-port valve | set valve position | 9 (cela IN) |
| Syringe pump | empty syringe | |
| Timer | pause [s] | 60 |
| multi-port valve | set valve position | 10 (cela OUT) |
| Syringe pump | aspirate [μ l] | 300 |
| multi-port valve | set valve position | 5 (odpad) |
| Syringe pump | set flow rate [μ l/s] | 60 |
| Syringe pump | empty syringe | |
| Syringe pump | valve position IN | |
| Syringe pump | aspirate [μ l] | 500 (promyti) |
| Syringe pump | valve position OUT | |
| multi-port valve | set valve position | 9 (cela IN) |
| Syringe pump | dispense [μ l] | 250 |
| multi-port valve | set valve position | 10 (cela OUT) |
| Syringe pump | aspirate [μ l] | 300 |
| multi-port valve | set valve position | 5 (odpad) |
| Syringe pump | empty syringe | |

Number of cycles 3

U každého standardu příslušné koncentrace nebo vzorku proběhly 3 cykly měření a před měřením následujícího vzorku o nižší koncentraci byla hadička pro aspiraci standardu promyta 150 μ l daného roztoku. Všechny standardy/vzorky byly porovnávány se slepým vzorkem, kde místo antioxidační látky byla aspirována voda a po změření celé testované řady vzorků měřeného roztoku byl celý systém promyt vodou.

Luminol zde sloužil jako chemiluminiscenční činidlo, které v bazickém prostředí (v roztoku hydroxidu sodného) při oxidaci peroxidem vodíku a za přítomnosti katalyzátoru vykazovalo chemiluminiscenční záření. Jako katalyzátor byl použit roztok hexakynoželezitanu draselného.

Celé měření probíhalo při pracovním napětí 435 mV, nastaveném na fotonásobiči Hamamatsu.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Všechny výsledné hodnoty, výšky a plochy signálů, vzorků i slepého roztoku byly odečteny v programu FaFSia v. 1.0 pomocí modulu Peak detection. Tyto odečtené hodnoty závisely na chemiluminiscenční aktivitě, a ta závisela na koncentraci testované antioxidační látky. Následně byly hodnoty zpracovány v programu Microsoft Office Excel 2013, kde byly vypočítány průměrné hodnoty získaných dat, směrodatné odchylky, relativní směrodatné odchylky a index Q (quenching efficacy index).

Index Q, neboli quenching efficacy index, byl vypočítán z průměrné výšky nebo plochy CL signálu slepého vzorku (ICL_0) a průměrné výšky nebo plochy CL signálu testovaného vzorku s antioxidační aktivitou (ICL_x) podle následujícího vzorce a výsledek byl uveden v procentech.

$$Q = (1 - ICL_x / ICL_0) * 100$$

Z výsledných hodnot byly následně sestrojeny bodové grafy. První znázorňoval závislost CL signálu vyjádřeného pomocí výšky nebo plochy na koncentraci testovaného roztoku a druhý závislost indexu Q na koncentraci testovaného roztoku s antioxidační aktivitou.

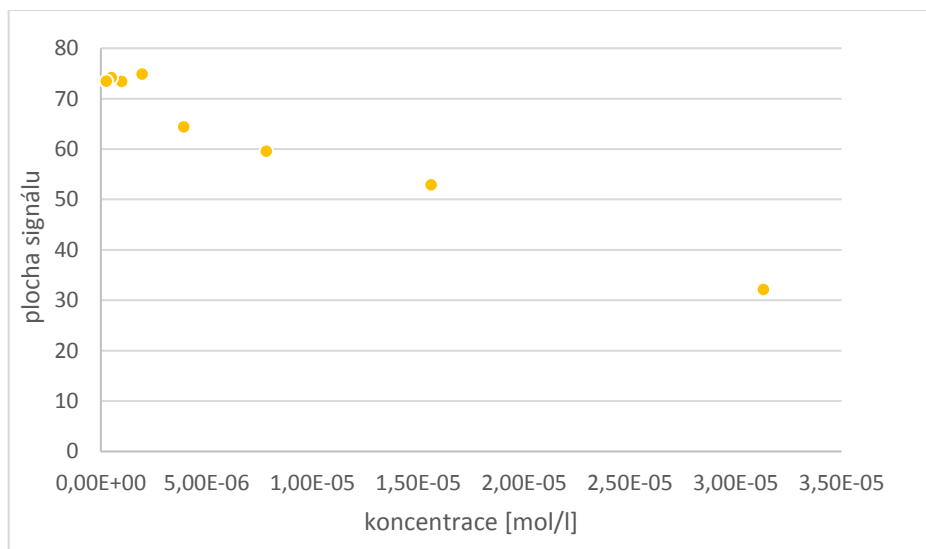
Výsledky jednotlivých testovaných látek byly porovnávány s Troloxem jako běžným standardem pro hodnocení antioxidační aktivity. Pro porovnání byl použit index $Q_{50\%}$, který odpovídá koncentraci látky potřebné pro 50% snížení původního CL signálu.

5.1 Standardy

5.1.1 Kvercitrin

Tab. 3 – Antioxidační aktivita kvercitrinu znázorněná pomocí ploch CL signálů

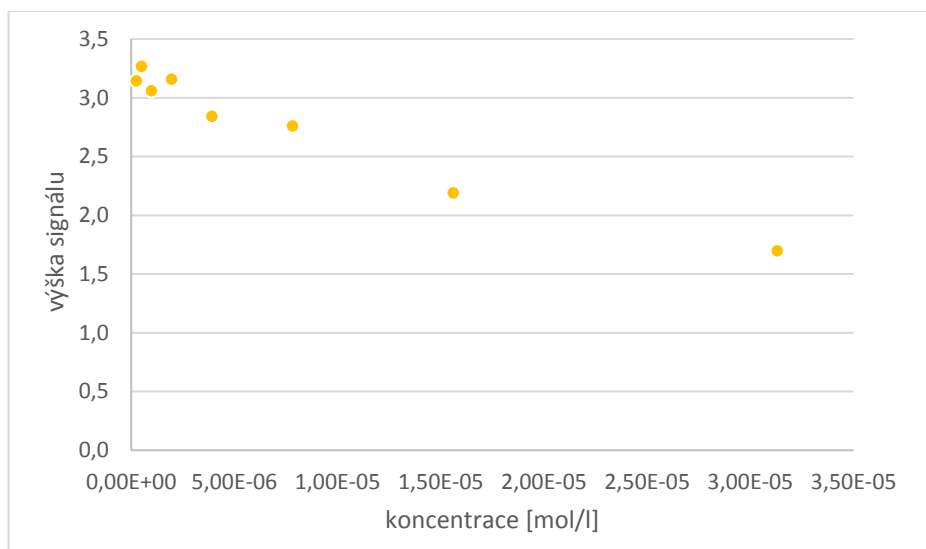
| vzorek | c [mol/l] | plocha 1 | 2 | 3 | průměr | SD | RSD [%] | Q [%] |
|--------|------------------------|----------|-------|-------|--------|------|---------|--------|
| slepý | 0 | 72,99 | 73,56 | 81,36 | 75,97 | 3,82 | 5,03 | 0 |
| 1 | $5,00 \times 10^{-04}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 2 | $2,50 \times 10^{-04}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 3 | $1,25 \times 10^{-04}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 4 | $6,25 \times 10^{-05}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 5 | $3,13 \times 10^{-05}$ | 31,49 | 34,65 | 30,31 | 32,15 | 1,83 | 5,70 | 57,68 |
| 6 | $1,56 \times 10^{-05}$ | 52,85 | 43,70 | 62,12 | 52,89 | 7,52 | 14,22 | 30,38 |
| 7 | $7,81 \times 10^{-06}$ | 58,93 | 57,53 | 62,14 | 59,53 | 1,93 | 3,24 | 21,64 |
| 8 | $3,91 \times 10^{-06}$ | 63,07 | 65,90 | 64,09 | 64,35 | 1,17 | 1,82 | 15,29 |
| 9 | $1,95 \times 10^{-06}$ | 72,73 | 75,42 | 76,51 | 74,89 | 1,59 | 2,12 | 1,43 |
| 10 | $9,75 \times 10^{-07}$ | 74,65 | 76,01 | 69,53 | 73,40 | 2,79 | 3,80 | 3,39 |
| 11 | $4,88 \times 10^{-07}$ | 70,88 | 75,29 | 76,28 | 74,15 | 2,35 | 3,17 | 2,40 |
| 12 | $2,44 \times 10^{-07}$ | 71,55 | 76,04 | 72,74 | 73,44 | 1,90 | 2,59 | 3,33 |



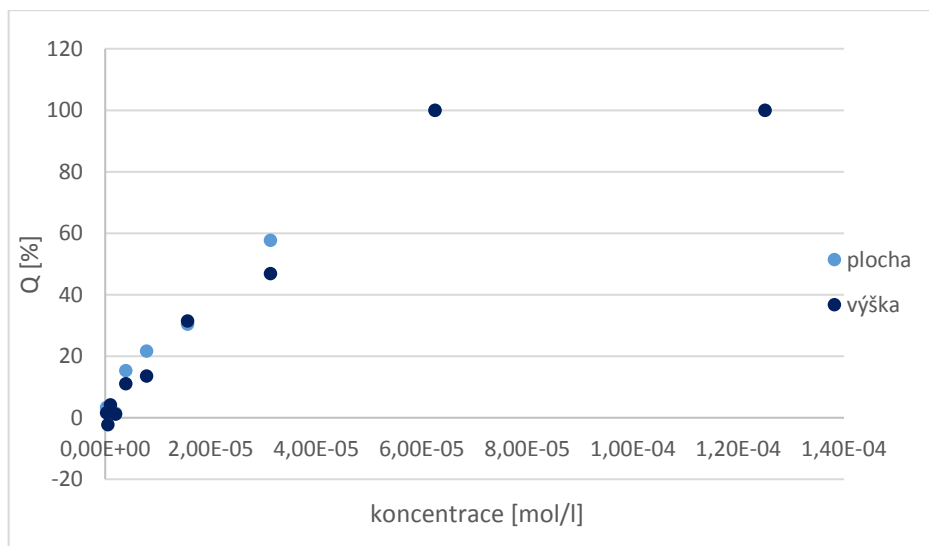
Obr. 8 – Graf závislosti CL signálu na koncentraci kvercitrinu (hodnoceno plochou)

Tab. 4 – Antioxidační aktivita kvercitrinu znázorněná pomocí výšek CL signálů

| vzorek | c [mol/l] | výška 1 | 2 | 3 | průměr | SD | RSD [%] | Q [%] |
|--------|------------------------|---------|------|------|--------|------|---------|--------|
| slepý | 0 | 3,16 | 3,03 | 3,39 | 3,19 | 0,15 | 4,67 | 0 |
| 1 | $5,00 \times 10^{-04}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 2 | $2,50 \times 10^{-04}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 3 | $1,25 \times 10^{-04}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 4 | $6,25 \times 10^{-05}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 5 | $3,13 \times 10^{-05}$ | 1,63 | 1,91 | 1,55 | 1,70 | 0,15 | 9,07 | 46,85 |
| 6 | $1,56 \times 10^{-05}$ | 2,05 | 2,05 | 2,47 | 2,19 | 0,20 | 9,04 | 31,41 |
| 7 | $7,81 \times 10^{-06}$ | 2,70 | 2,60 | 2,98 | 2,76 | 0,16 | 5,83 | 13,56 |
| 8 | $3,91 \times 10^{-06}$ | 2,86 | 2,93 | 2,73 | 2,84 | 0,08 | 2,92 | 11,06 |
| 9 | $1,95 \times 10^{-06}$ | 3,06 | 3,24 | 3,17 | 3,16 | 0,07 | 2,34 | 1,13 |
| 10 | $9,75 \times 10^{-07}$ | 3,05 | 3,23 | 2,90 | 3,06 | 0,14 | 4,41 | 4,17 |
| 11 | $4,88 \times 10^{-07}$ | 3,01 | 3,29 | 3,50 | 3,27 | 0,20 | 6,12 | -2,32 |
| 12 | $2,44 \times 10^{-07}$ | 3,11 | 3,12 | 3,20 | 3,14 | 0,04 | 1,27 | 1,57 |



Obr. 9 – Graf závislosti CL signálu na koncentraci kvercitrinu (hodnoceno výškou)



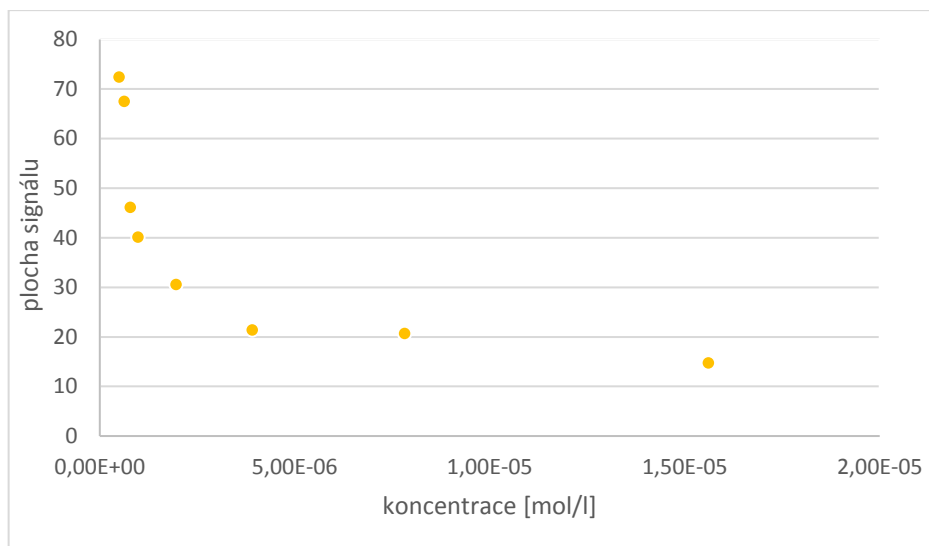
Obr. 10 – Graf závislosti indexu Q na koncentraci kvercitrinu
(hodnoceno plochou a výškou)

Kvercitrin byl hodnocen v koncentračním rozmezí $3,13 \times 10^{-5}$ - $2,44 \times 10^{-7}$ mol/l a koncentrace, u které index Q dosáhl 50 %, byla $3,13 \times 10^{-5}$ mol/l pro oba typy hodnocení.

5.1.2 Kyselina kávová

Tab. 5 – Antioxidační aktivita kyseliny kávové znázorněná pomocí ploch CL signálů

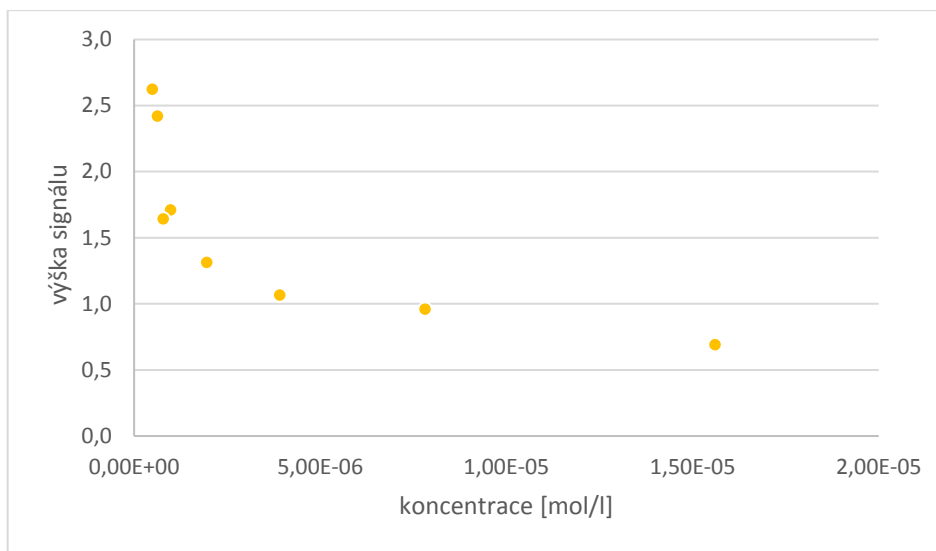
| vzorek | c [mol/l] | plocha 1 | 2 | 3 | průměr | SD | RSD [%] | Q [%] |
|--------|-----------------------|----------|-------|-------|--------|------|---------|--------|
| slepý | 0 | 66,10 | 72,31 | 70,48 | 69,63 | 2,61 | 3,74 | 0 |
| 1 | $1,00 \times 10^{-3}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 2 | $5,00 \times 10^{-4}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 3 | $2,50 \times 10^{-4}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 4 | $1,25 \times 10^{-4}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 5 | $6,25 \times 10^{-5}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 6 | $3,13 \times 10^{-5}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 7 | $1,56 \times 10^{-5}$ | 13,71 | 14,89 | 15,70 | 14,77 | 0,82 | 5,53 | 78,79 |
| 8 | $7,81 \times 10^{-6}$ | 19,27 | 20,67 | 22,15 | 20,70 | 1,18 | 5,68 | 70,28 |
| 9 | $3,91 \times 10^{-6}$ | 20,53 | 21,52 | 22,07 | 21,37 | 0,64 | 2,98 | 69,30 |
| 10 | $1,95 \times 10^{-6}$ | 27,72 | 28,72 | 35,20 | 30,55 | 3,32 | 10,86 | 56,13 |
| 11 | $9,75 \times 10^{-7}$ | 37,33 | 38,70 | 44,37 | 40,13 | 3,05 | 7,59 | 42,36 |
| 12 | $7,81 \times 10^{-7}$ | 47,00 | 43,64 | 47,74 | 46,13 | 1,78 | 3,88 | 33,75 |
| 13 | $6,25 \times 10^{-7}$ | 62,78 | 70,85 | 68,86 | 67,50 | 3,43 | 5,09 | 3,06 |
| 14 | $4,88 \times 10^{-7}$ | 67,30 | 69,25 | 80,73 | 72,43 | 5,93 | 8,18 | -4,02 |



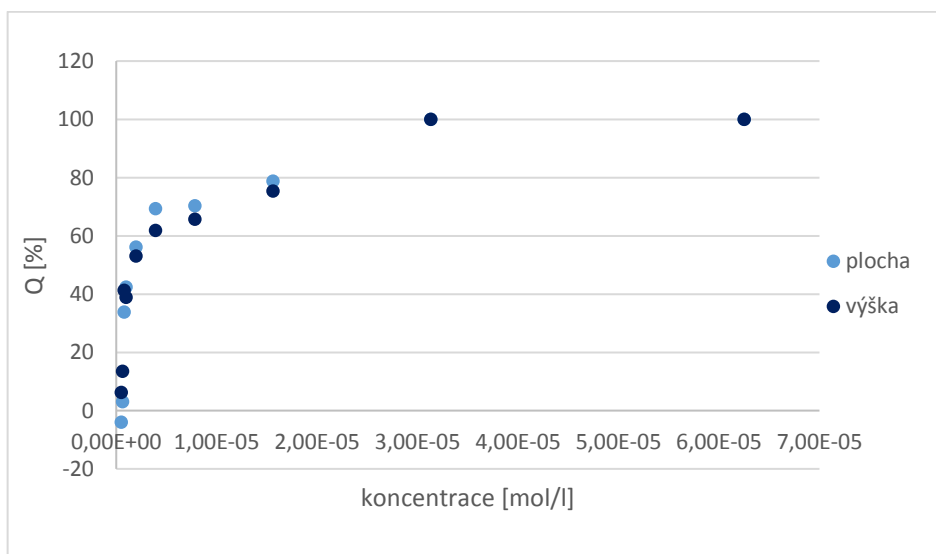
Obr. 11 – Graf závislosti CL signálu na koncentraci kyseliny kávové (hodnoceno plochou)

Tab. 6 – Antioxidační aktivita kyseliny kávové znázorněná pomocí výšek CL signálů

| vzorek | c [mol/l] | výška 1 | 2 | 3 | průměr | SD | RSD [%] | Q [%] |
|--------|-----------------------|---------|------|------|--------|------|---------|--------|
| slepý | 0 | 2,77 | 2,73 | 2,89 | 2,80 | 0,07 | 2,43 | 0 |
| 1 | $1,00 \times 10^{-3}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 2 | $5,00 \times 10^{-4}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 3 | $2,50 \times 10^{-4}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 4 | $1,25 \times 10^{-4}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 5 | $6,25 \times 10^{-5}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 6 | $3,13 \times 10^{-5}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 7 | $1,56 \times 10^{-5}$ | 0,67 | 0,68 | 0,72 | 0,69 | 0,02 | 3,19 | 75,33 |
| 8 | $7,81 \times 10^{-6}$ | 1,04 | 0,90 | 0,94 | 0,96 | 0,06 | 6,15 | 65,68 |
| 9 | $3,91 \times 10^{-6}$ | 1,18 | 0,92 | 1,10 | 1,07 | 0,11 | 10,22 | 61,85 |
| 10 | $1,95 \times 10^{-6}$ | 1,27 | 1,30 | 1,37 | 1,31 | 0,04 | 3,20 | 53,06 |
| 11 | $9,75 \times 10^{-7}$ | 1,64 | 1,63 | 1,86 | 1,71 | 0,11 | 6,20 | 38,86 |
| 12 | $7,81 \times 10^{-7}$ | 1,78 | 1,49 | 1,66 | 1,64 | 0,12 | 7,24 | 41,26 |
| 13 | $6,25 \times 10^{-7}$ | 2,14 | 2,58 | 2,54 | 2,42 | 0,20 | 8,22 | 13,48 |
| 14 | $4,88 \times 10^{-7}$ | 2,33 | 2,43 | 3,11 | 2,62 | 0,35 | 13,23 | 6,22 |



Obr. 12 – Graf závislosti CL signálu na koncentraci kyseliny kávové (hodnoceno výškou)



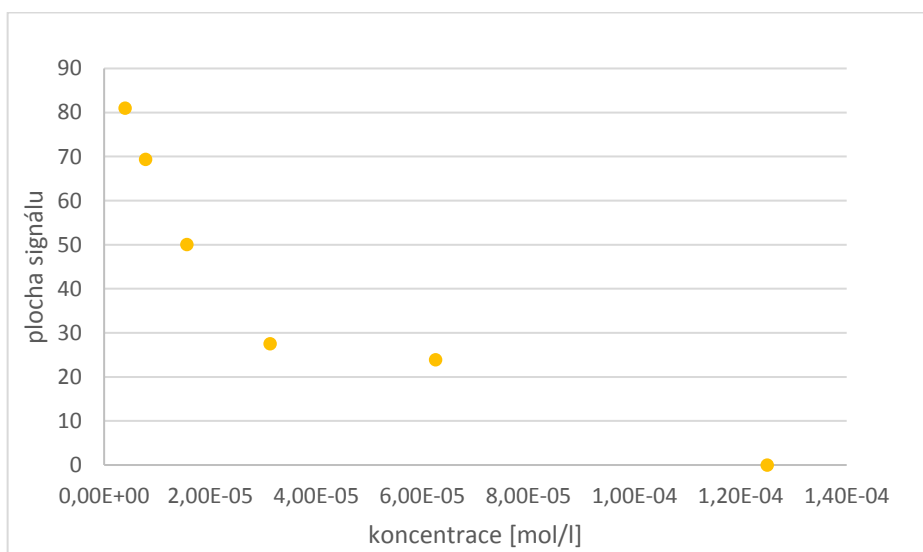
Obr. 13 – Graf závislosti indexu Q na koncentraci kyseliny kávové (hodnoceno plochou a výškou)

Kyselina kávová byla hodnocená v koncentračním rozmezí $1,56 \times 10^{-5}$ - $4,88 \times 10^{-7}$ mol/l a koncentrace, u které index Q dosáhl 50 %, byla $1,95 \times 10^{-6}$ mol/l pro oba typy hodnocení.

5.1.3 Epikatechin

Tab. 7 – Antioxidační aktivita epikatechinu znázorněná pomocí ploch CL signálů

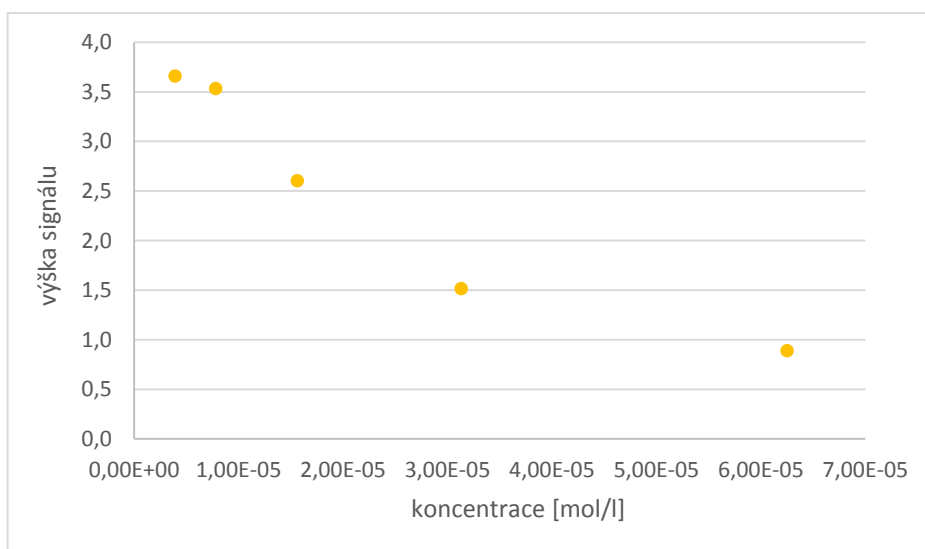
| vzorek | c [mol/l] | plocha 1 | 2 | 3 | průměr | SD | RSD [%] | Q [%] |
|--------|-----------------------|----------|-------|-------|--------|------|---------|--------|
| slepý | 0 | 89,90 | 93,77 | 86,79 | 90,15 | 2,86 | 3,17 | 0 |
| 1 | $1,00 \times 10^{-3}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 2 | $5,00 \times 10^{-4}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 3 | $2,50 \times 10^{-4}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 4 | $1,25 \times 10^{-4}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 5 | $6,25 \times 10^{-5}$ | 19,22 | 22,90 | 29,51 | 23,88 | 4,26 | 17,83 | 73,52 |
| 6 | $3,13 \times 10^{-5}$ | 28,11 | 26,66 | 27,74 | 27,50 | 0,62 | 2,24 | 69,49 |
| 7 | $1,56 \times 10^{-5}$ | 45,43 | 49,74 | 54,99 | 50,05 | 3,91 | 7,81 | 44,48 |
| 8 | $7,81 \times 10^{-6}$ | 67,41 | 68,01 | 72,68 | 69,37 | 2,36 | 3,40 | 23,06 |
| 9 | $3,91 \times 10^{-6}$ | 80,12 | 88,33 | 74,51 | 80,99 | 5,68 | 7,01 | 10,17 |



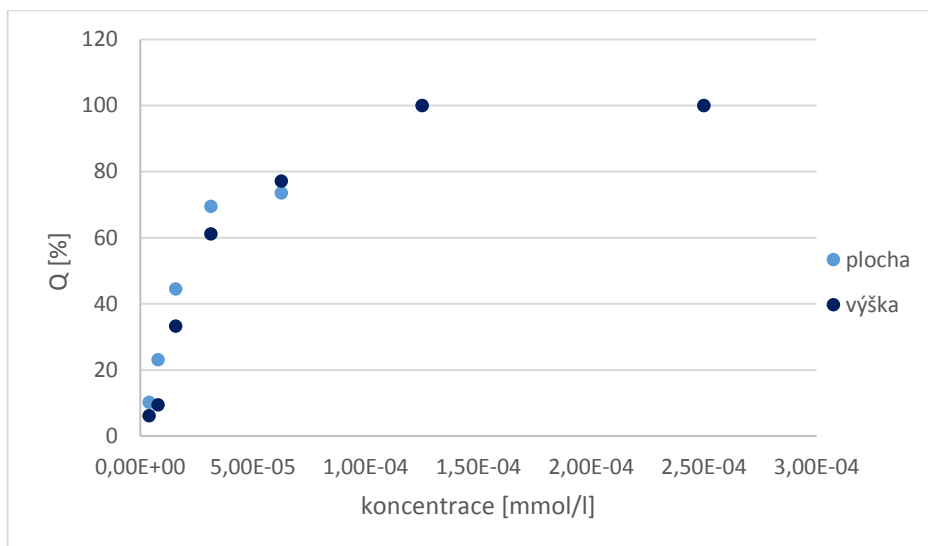
Obr. 14 – Graf závislosti CL signálu na koncentraci epikatechinu (hodnoceno plochou)

Tab. 8 – Antioxidační aktivita epikatechinu znázorněná pomocí výšek CL signálů

| vzorek | c [mol/l] | výška 1 | 2 | 3 | průměr | SD | RSD [%] | Q [%] |
|--------|------------------------|---------|------|------|--------|------|---------|--------|
| slepý | 0 | 3,89 | 3,88 | 3,93 | 3,90 | 0,02 | 0,55 | 0 |
| 1 | $1,00 \times 10^{-03}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 2 | $5,00 \times 10^{-04}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 3 | $2,50 \times 10^{-04}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 4 | $1,25 \times 10^{-04}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 5 | $6,25 \times 10^{-05}$ | 0,88 | 0,83 | 0,96 | 0,89 | 0,05 | 6,02 | 77,18 |
| 6 | $3,13 \times 10^{-05}$ | 1,58 | 1,58 | 1,39 | 1,52 | 0,09 | 5,91 | 61,11 |
| 7 | $1,56 \times 10^{-05}$ | 2,60 | 2,76 | 2,45 | 2,60 | 0,13 | 4,86 | 33,25 |
| 8 | $7,81 \times 10^{-06}$ | 3,21 | 3,43 | 3,96 | 3,53 | 0,31 | 8,91 | 9,40 |
| 9 | $3,91 \times 10^{-06}$ | 3,79 | 3,98 | 3,21 | 3,66 | 0,33 | 8,95 | 6,15 |



Obr. 15 – Graf závislosti CL signálu na koncentraci epikatechinu (hodnoceno výškou)



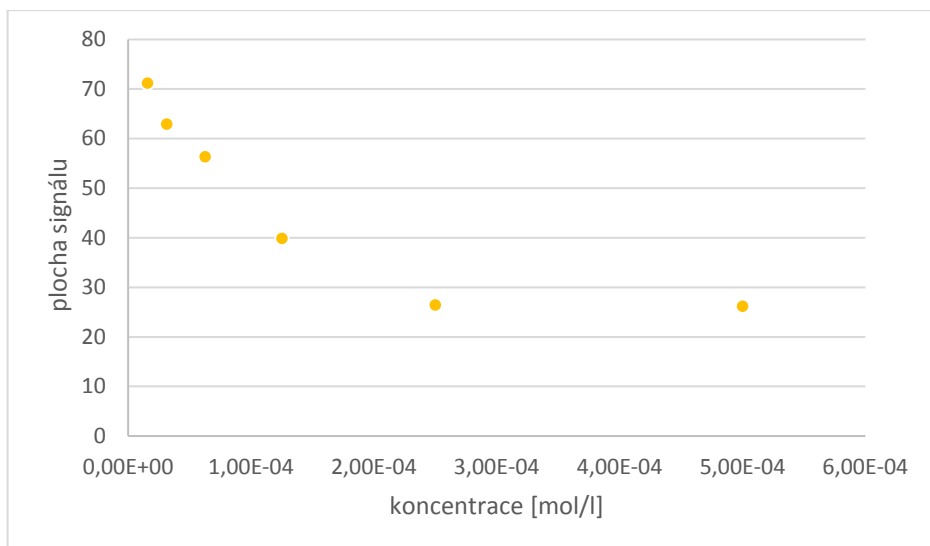
Obr. 16 – Graf závislosti indexu Q na koncentraci epikatechinu (hodnoceno plochou a výškou)

Epikatechin byl hodnocen v koncentračním rozmezí $6,25 \times 10^{-5}$ - $3,91 \times 10^{-6}$ mol/l a koncentrace, u které Q index dosáhl 50 %, byla nižší než $3,13 \times 10^{-5}$ mol/l pro oba typy hodnocení.

5.1.4 Floridzin

Tab. 9 – Antioxidační aktivita floridzinu znázorněná pomocí ploch CL signálů

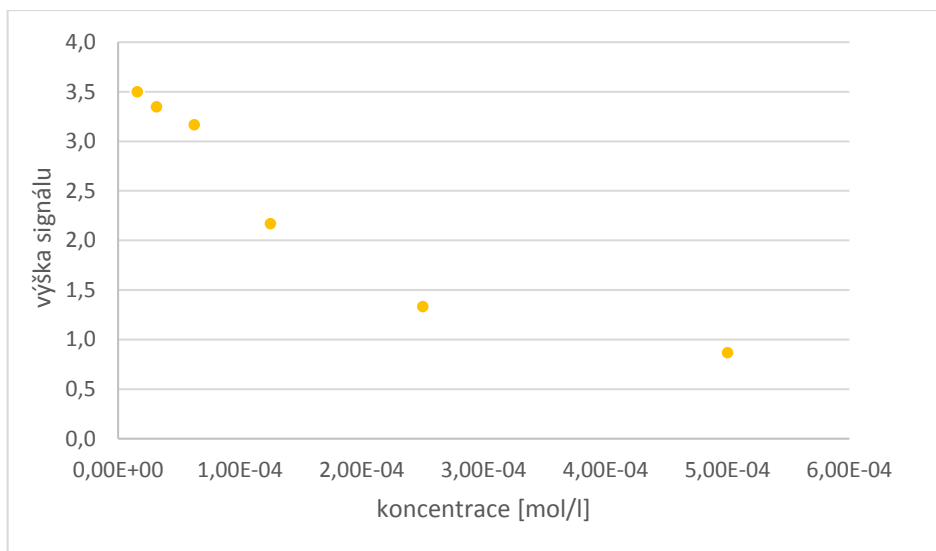
| vzorek | c [mol/l] | plocha 1 | 2 | 3 | průměr | SD | RSD [%] | Q [%] |
|--------|-----------------------|----------|-------|-------|--------|------|---------|--------|
| slepý | 0 | 86,64 | 81,35 | 82,49 | 83,49 | 2,27 | 2,72 | 0 |
| 1 | $1,00 \times 10^{-3}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 2 | $5,00 \times 10^{-4}$ | 23,66 | 26,97 | 27,95 | 26,19 | 1,84 | 7,01 | 68,63 |
| 3 | $2,50 \times 10^{-4}$ | 26,24 | 27,28 | 25,71 | 26,41 | 0,65 | 2,47 | 68,37 |
| 4 | $1,25 \times 10^{-4}$ | 38,81 | 40,99 | 39,79 | 39,86 | 0,89 | 2,24 | 52,26 |
| 5 | $6,25 \times 10^{-5}$ | 53,89 | 59,94 | 55,18 | 56,34 | 2,60 | 4,62 | 32,52 |
| 6 | $3,13 \times 10^{-5}$ | 59,05 | 64,58 | 65,04 | 62,89 | 2,72 | 4,33 | 24,68 |
| 7 | $1,56 \times 10^{-5}$ | 70,97 | 72,05 | 70,48 | 71,17 | 0,66 | 0,92 | 14,76 |



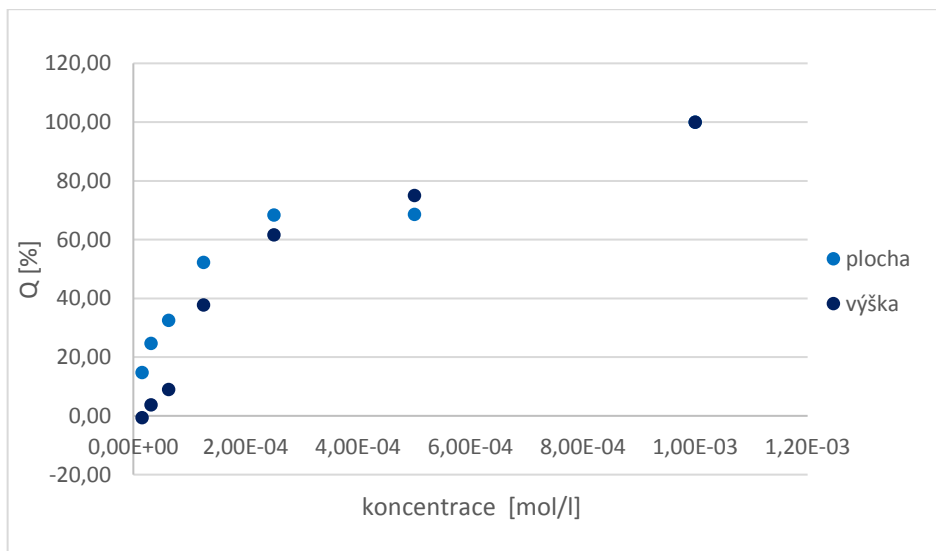
Obr. 17 – Graf závislosti CL signálu na koncentraci floridzinu
(hodnoceno plochou)

Tab. 10 – Antioxidační aktivita floridzinu znázorněná pomocí výšek CL signálů

| Vzorek | c [mol/l] | výška 1 | 2 | 3 | průměr | SD | RSD [%] | Q [%] |
|--------|------------------------|---------|------|------|--------|------|---------|--------|
| Slepý | 0 | 3,42 | 3,45 | 3,57 | 3,48 | 0,07 | 1,88 | 0 |
| 1 | $1,00 \times 10^{-03}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 2 | $5,00 \times 10^{-04}$ | 0,75 | 0,92 | 0,93 | 0,87 | 0,08 | 9,57 | 75,09 |
| 3 | $2,50 \times 10^{-04}$ | 1,30 | 1,49 | 1,21 | 1,33 | 0,12 | 8,78 | 61,70 |
| 4 | $1,25 \times 10^{-04}$ | 2,06 | 2,28 | 2,16 | 2,17 | 0,09 | 4,11 | 37,73 |
| 5 | $6,25 \times 10^{-05}$ | 2,78 | 3,42 | 3,30 | 3,17 | 0,28 | 8,78 | 8,99 |
| 6 | $3,13 \times 10^{-05}$ | 3,31 | 3,36 | 3,37 | 3,35 | 0,03 | 0,78 | 3,82 |
| 7 | $1,56 \times 10^{-05}$ | 3,63 | 3,50 | 3,37 | 3,50 | 0,11 | 3,03 | -0,57 |



Obr. 18 – Graf závislosti CL signálu na koncentraci floridzinu (hodnoceno výškou)



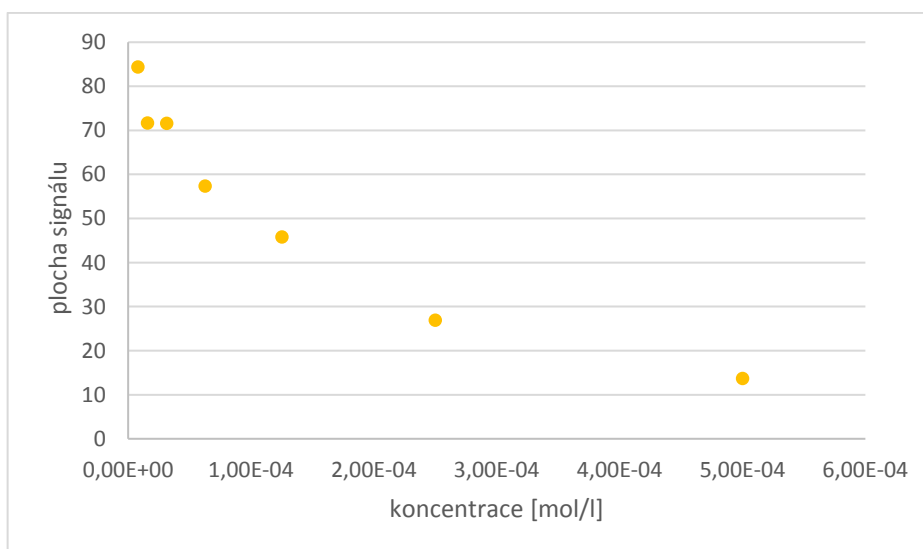
Obr. 19 – Graf závislosti indexu Q na koncentraci floridzinu (hodnoceno plochou a výškou)

Floridzin byl hodnocen v koncentračním rozmezí $5,00 \times 10^{-4}$ - $1,56 \times 10^{-5}$ mol/l a koncentrace, u které dosáhl index Q 50 %, byla $1,25 \times 10^{-4}$ mol/l pro hodnocení plochou a pro hodnocení výškou byla koncentrace vyšší než $1,25 \times 10^{-4}$ mol/l.

5.1.5 Floretin

Tab. 11 – Antioxidační aktivita floretinu znázorněná pomocí ploch CL signálů

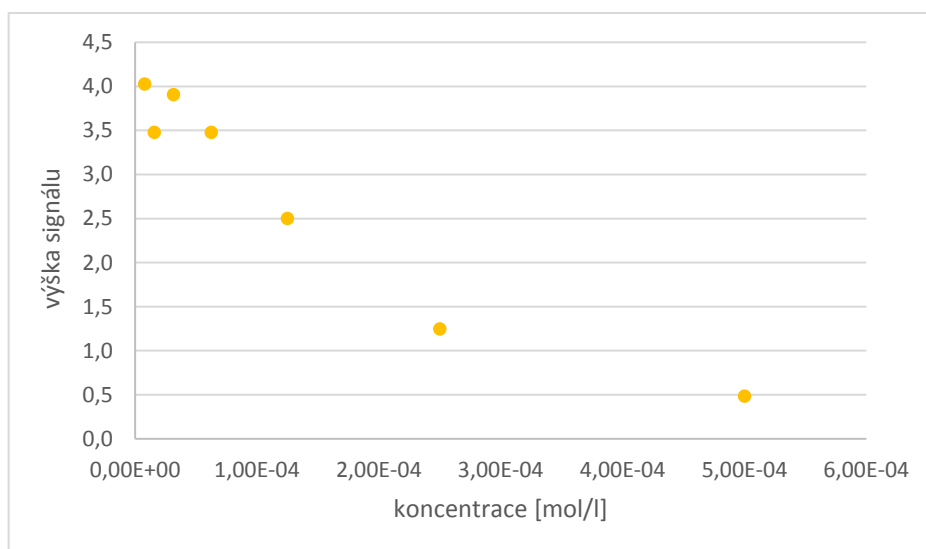
| vzorek | c [mol/l] | plocha 1 | 2 | 3 | průměr | SD | RSD [%] | Q [%] |
|--------|------------------------|----------|-------|-------|--------|------|---------|--------|
| slepý | 0 | 88,36 | 91,96 | 86,22 | 88,85 | 2,37 | 2,67 | 0 |
| 1 | $1,00 \times 10^{-03}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 2 | $5,00 \times 10^{-04}$ | 11,65 | 14,26 | 15,15 | 13,69 | 1,49 | 10,85 | 84,59 |
| 3 | $2,50 \times 10^{-04}$ | 25,84 | 28,48 | 26,32 | 26,88 | 1,15 | 4,27 | 69,75 |
| 4 | $1,25 \times 10^{-04}$ | 45,48 | 45,07 | 46,73 | 45,76 | 0,71 | 1,54 | 48,50 |
| 5 | $6,25 \times 10^{-05}$ | 55,67 | 57,98 | 58,43 | 57,36 | 1,21 | 2,11 | 35,44 |
| 6 | $3,13 \times 10^{-05}$ | 73,62 | 69,98 | 71,07 | 71,56 | 1,53 | 2,13 | 19,46 |
| 7 | $1,56 \times 10^{-05}$ | 78,92 | 67,92 | 68,03 | 71,62 | 5,16 | 7,20 | 19,39 |
| 8 | $7,81 \times 10^{-06}$ | 84,58 | 83,57 | 85,01 | 84,39 | 0,60 | 0,72 | 5,02 |



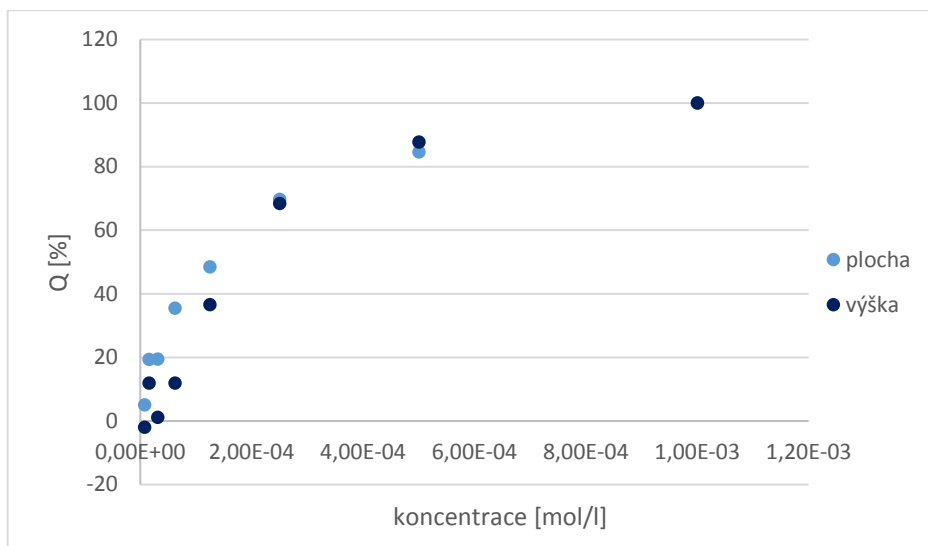
Obr. 20 – Graf závislosti CL signálu na koncentraci floretinu (hodnoceno plochou)

Tab. 12 – Antioxidační aktivita floretinu znázorněná pomocí výšek CL signálů

| vzorek | c [mol/l] | výška 1 | 2 | 3 | průměr | SD | RSD [%] | Q [%] |
|--------|-----------------------|---------|------|------|--------|------|---------|--------|
| slepý | 0 | 4,13 | 4,08 | 3,64 | 3,95 | 0,22 | 5,57 | 0 |
| 1 | $1,00 \times 10^{-3}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 2 | $5,00 \times 10^{-4}$ | 0,39 | 0,48 | 0,59 | 0,49 | 0,08 | 16,81 | 87,68 |
| 3 | $2,50 \times 10^{-4}$ | 1,22 | 1,30 | 1,22 | 1,25 | 0,04 | 3,03 | 68,44 |
| 4 | $1,25 \times 10^{-4}$ | 2,69 | 2,42 | 2,4 | 2,50 | 0,13 | 5,28 | 36,62 |
| 5 | $6,25 \times 10^{-5}$ | 3,54 | 3,44 | 3,46 | 3,48 | 0,04 | 1,24 | 11,90 |
| 6 | $3,13 \times 10^{-5}$ | 3,98 | 3,81 | 3,93 | 3,91 | 0,07 | 1,83 | 11,10 |
| 7 | $1,56 \times 10^{-5}$ | 3,99 | 3,02 | 3,43 | 3,48 | 0,40 | 11,42 | 11,90 |
| 8 | $7,81 \times 10^{-6}$ | 4,07 | 4,01 | 4,00 | 4,03 | 0,03 | 0,78 | -1,94 |



Obr. 21 – Graf závislosti CL signálu na koncentraci floretinu
(hodnoceno výškou)



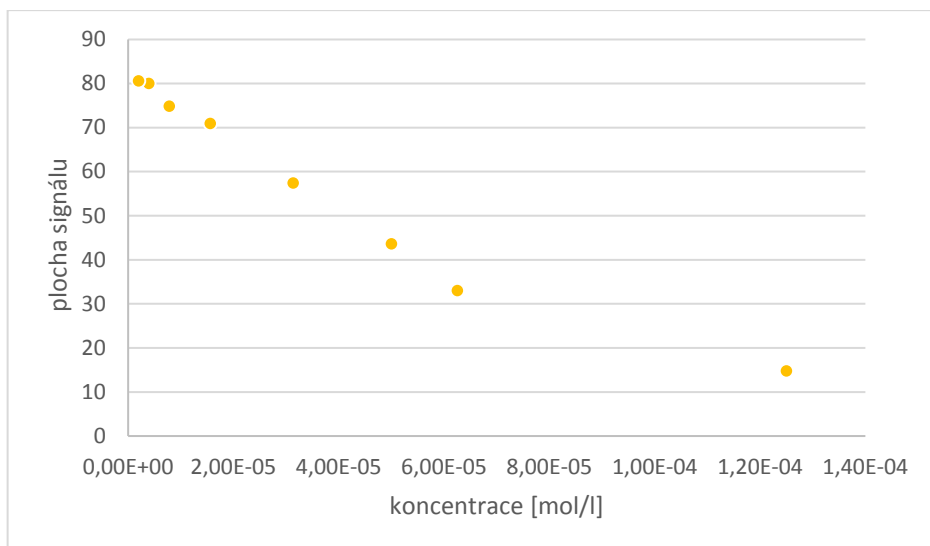
Obr. 22 – Graf závislosti indexu Q na koncentraci floretinu
(hodnoceno plochou a výškou)

Floretin byl hodnocen v koncentračním rozmezí $5,00 \times 10^{-4}$ - $7,81 \times 10^{-6}$ mol/l a koncentrace, u které dosáhl index Q 50 %, byla $1,25 \times 10^{-4}$ mol/l pro hodnocení plochou a pro hodnocení výškou byla vyšší než $1,25 \times 10^{-4}$ mol/l.

5.1.6 Trolox

Tab. 13 – Antioxidační aktivita Troloxu znázorněná pomocí ploch CL signálů

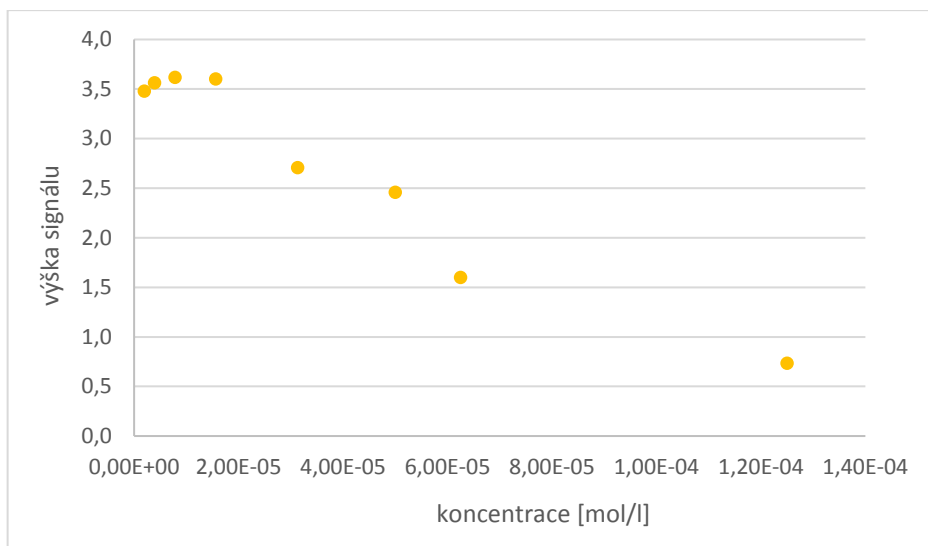
| vzorek | c [mol/l] | plocha 1 | 2 | 3 | průměr | SD | RSD [%] | Q [%] |
|--------|-----------------------|----------|-------|-------|--------|------|---------|--------|
| slepý | 0 | 82,74 | 83,24 | 85,28 | 83,75 | 1,10 | 1,31 | 0 |
| 1 | $1,00 \times 10^{-3}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 2 | $5,00 \times 10^{-4}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 3 | $2,50 \times 10^{-4}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 4 | $1,25 \times 10^{-4}$ | 13,10 | 15,96 | 15,29 | 14,78 | 1,22 | 8,26 | 82,35 |
| 5 | $6,25 \times 10^{-5}$ | 31,57 | 33,37 | 34,15 | 33,03 | 1,08 | 3,27 | 60,56 |
| 6 | $5,00 \times 10^{-5}$ | 42,20 | 44,65 | 44,04 | 43,63 | 1,04 | 2,39 | 47,91 |
| 7 | $3,13 \times 10^{-5}$ | 60,34 | 58,36 | 53,46 | 57,39 | 2,89 | 5,04 | 31,48 |
| 8 | $1,56 \times 10^{-5}$ | 70,34 | 70,95 | 71,52 | 70,94 | 0,48 | 0,68 | 15,30 |
| 9 | $7,80 \times 10^{-6}$ | 73,56 | 77,25 | 73,76 | 74,86 | 1,69 | 2,26 | 10,62 |
| 10 | $3,91 \times 10^{-6}$ | 78,28 | 81,69 | 80,04 | 80,00 | 1,39 | 1,74 | 4,48 |
| 11 | $1,95 \times 10^{-6}$ | 80,74 | 81,39 | 79,56 | 80,56 | 0,76 | 0,94 | 3,81 |



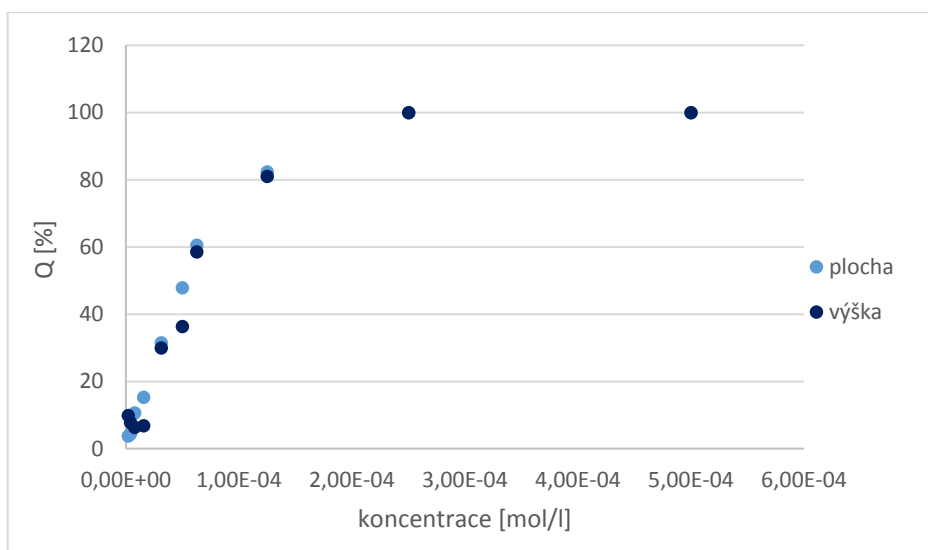
Obr. 23 – Graf závislosti CL signálu na koncentraci Troloxu (hodnoceno plochou)

Tab. 14 – Antioxidační aktivita Troloxu znázorněná pomocí výšek CL signálů

| vzorek | c [mol/l] | výška 1 | 2 | 3 | průměr | SD | RSD [%] | Q [%] |
|--------|------------------------|---------|------|------|--------|------|---------|--------|
| slepý | 0 | 3,97 | 3,86 | 3,76 | 3,86 | 0,09 | 2,23 | 0 |
| 1 | $1,00 \times 10^{-03}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 2 | $5,00 \times 10^{-04}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 3 | $2,50 \times 10^{-04}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 4 | $1,25 \times 10^{-04}$ | 0,66 | 0,78 | 0,76 | 0,73 | 0,05 | 7,09 | 81,03 |
| 5 | $6,25 \times 10^{-05}$ | 1,43 | 1,61 | 1,76 | 1,60 | 0,14 | 8,44 | 58,58 |
| 6 | $5,00 \times 10^{-05}$ | 2,56 | 2,36 | 2,45 | 2,46 | 0,08 | 3,34 | 36,40 |
| 7 | $3,13 \times 10^{-05}$ | 2,78 | 2,69 | 2,65 | 2,71 | 0,05 | 1,99 | 29,92 |
| 8 | $1,56 \times 10^{-05}$ | 3,56 | 3,57 | 3,67 | 3,60 | 0,05 | 1,39 | 6,81 |
| 9 | $7,80 \times 10^{-06}$ | 3,66 | 3,82 | 3,37 | 3,62 | 0,19 | 5,14 | 6,37 |
| 10 | $3,91 \times 10^{-06}$ | 3,53 | 3,67 | 3,49 | 3,56 | 0,08 | 2,16 | 7,77 |
| 11 | $1,95 \times 10^{-06}$ | 3,66 | 3,46 | 3,32 | 3,48 | 0,14 | 4,02 | 9,91 |



Obr. 24 – Graf závislosti CL signálu na koncentraci Troloxu
(hodnoceno výškou)



Obr. 25 – Graf závislosti indexu Q na koncentraci Troloxu
(hodnoceno plochou a výškou)

Trolox byl hodnocen v koncentračním rozmezí $1,25 \times 10^{-04}$ - $1,95 \times 10^{-06}$ mol/l a koncentrace, u které dosáhl index Q 50 %, byla $5,00 \times 10^{-05}$ mol/l pro hodnocení plochou a pro hodnocení výškou byla koncentrace nižší než $6,25 \times 10^{-05}$ mol/l.

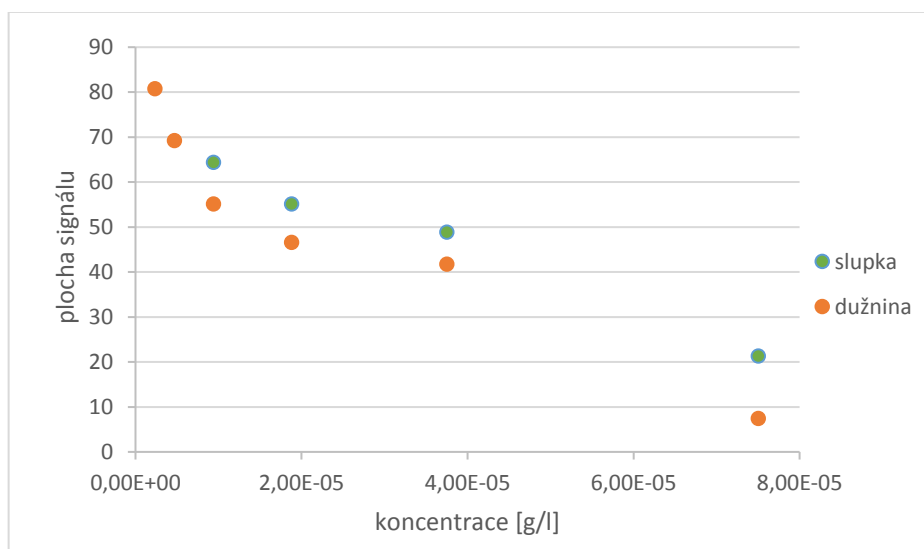
5.2 Reálné vzorky

5.2.1 Extrakty z jablek Golden delicious

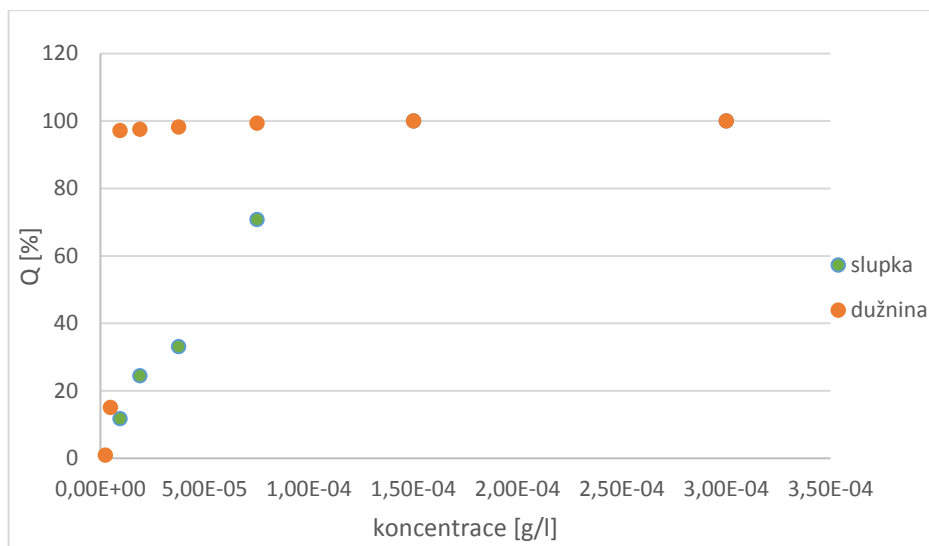
5.2.1.1 Methanolové jablečné extrakty

Tab. 15 – Antioxidační aktivita jablečných extraktů znázorněná pomocí ploch CL signálů

| vzorek | c [g/l] | SLUPKA | | | DUŽNINA | | |
|--------|------------------------|--------|---------|--------|---------|---------|--------|
| | | průměr | RSD [%] | Q [%] | průměr | RSD [%] | Q [%] |
| slepý | 0 | 72,94 | 0,55 | 0,00 | 81,48 | 6,90 | 0,00 |
| 1 | $6,00 \times 10^{-04}$ | 0,00 | - | 100,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 2 | $3,00 \times 10^{-04}$ | 0,00 | - | 100,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 3 | $1,50 \times 10^{-04}$ | 0,00 | - | 100,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 4 | $7,50 \times 10^{-05}$ | 0,00 | - | 100,00 | 7,41 | 15,38 | 99,36 |
| 5 | $3,75 \times 10^{-05}$ | 0,00 | - | 100,00 | 41,72 | 3,47 | 98,23 |
| 6 | $1,88 \times 10^{-05}$ | 21,32 | 21,51 | 70,78 | 46,58 | 1,75 | 97,55 |
| 7 | $9,38 \times 10^{-06}$ | 48,83 | 1,59 | 33,06 | 55,11 | 4,85 | 97,14 |
| 8 | $4,69 \times 10^{-06}$ | 55,08 | 7,59 | 24,49 | 69,21 | 6,14 | 15,05 |
| 9 | $2,34 \times 10^{-06}$ | 64,35 | 4,92 | 11,78 | 80,74 | 5,73 | 0,90 |



Obr. 26 – Graf závislosti CL signálu na koncentraci methanolových jablečných extraktů (hodnoceno plochou)

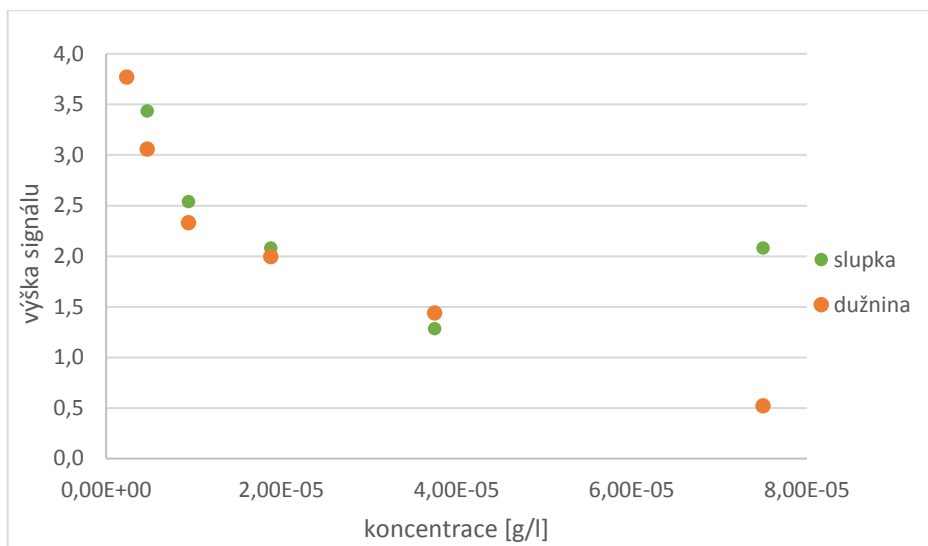


Obr. 27 – Graf závislosti indexu Q na koncentraci methanolových jablečných extraktů (hodnoceno plochou)

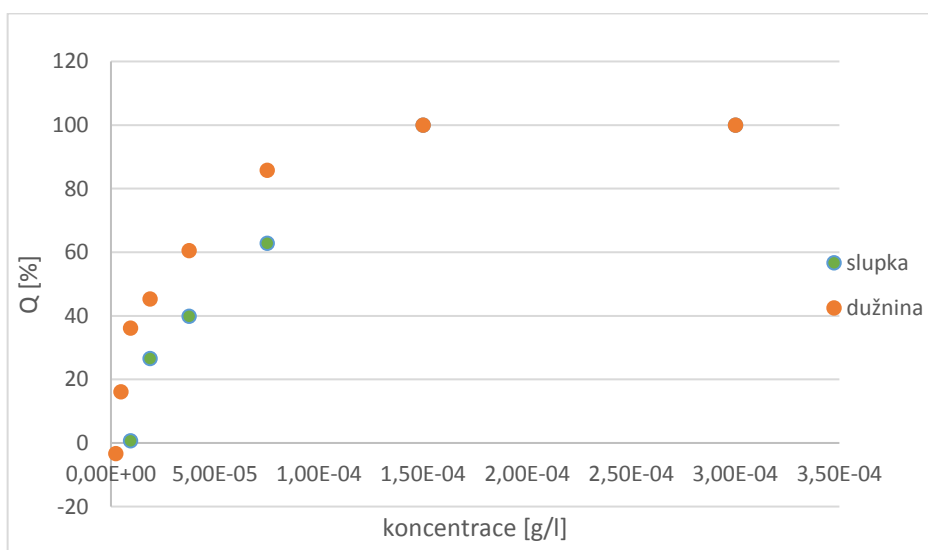
Hodnocené koncentrační rozmezí pomocí plochy bylo u extraktu ze slupky $1,88 \times 10^{-05}$ až $2,34 \times 10^{-06}$ g/l a u dužniny $7,50 \times 10^{-05}$ až $2,34 \times 10^{-06}$ g/l. Koncentrace, u které dosáhl index Q hodnoty 50 %, byla vyšší než $9,38 \times 10^{-06}$ g/l u extraktu z jablečné slupky a u extraktu z jablečné dužniny byla tato koncentrace nižší než $9,38 \times 10^{-06}$ g/l.

Tab. 16 – Antioxidační aktivita jablečných extraktů znázorněná pomocí výšek CL signálů

| vzorek | c [g/l] | SLUPKA | | | DUŽNINA | | |
|--------|------------------------|--------|---------|--------|---------|---------|--------|
| | | průměr | RSD [%] | Q [%] | průměr | RSD [%] | Q [%] |
| slepý | 0 | 3,46 | 3,44 | 0,00 | 3,65 | 13,46 | 0,00 |
| 1 | $6,00 \times 10^{-04}$ | 0,00 | - | 100,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 2 | $3,00 \times 10^{-04}$ | 0,00 | - | 100,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 3 | $1,50 \times 10^{-04}$ | 0,00 | - | 100,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 4 | $7,50 \times 10^{-05}$ | 0,00 | - | 100,00 | 0,52 | 15,38 | 85,74 |
| 5 | $3,75 \times 10^{-05}$ | 0,00 | - | 100,00 | 1,44 | 3,47 | 60,52 |
| 6 | $1,88 \times 10^{-05}$ | 1,29 | 9,73 | 62,83 | 2,00 | 1,75 | 45,30 |
| 7 | $9,38 \times 10^{-06}$ | 2,08 | 7,69 | 39,83 | 2,33 | 4,85 | 36,11 |
| 8 | $4,69 \times 10^{-06}$ | 2,54 | 9,06 | 26,53 | 3,06 | 4,28 | 16,10 |
| 9 | $2,34 \times 10^{-06}$ | 3,44 | 10,04 | 0,64 | 3,77 | 1,86 | -3,37 |



Obr. 28 – Graf závislosti CL signálu na koncentraci methanolových jablečných extraktů (hodnoceno výškou)



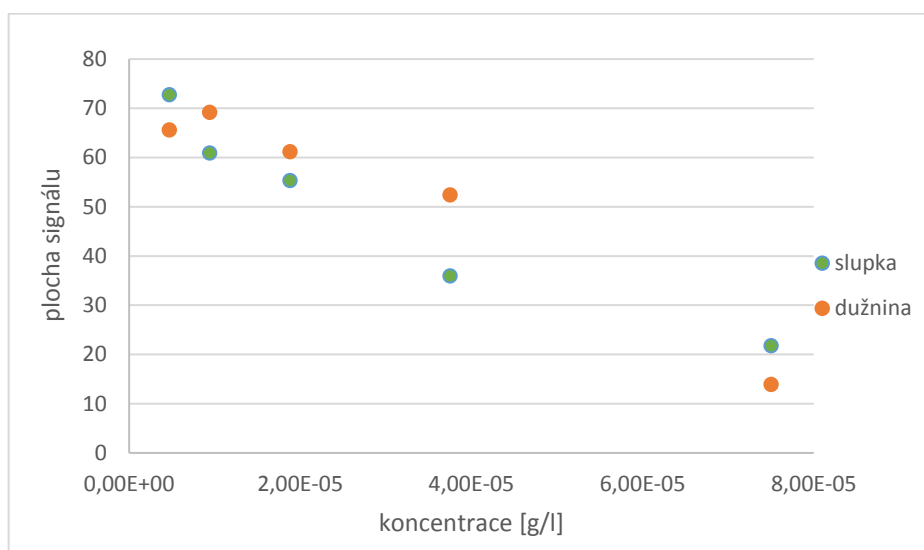
Obr. 29 – Graf závislosti indexu Q na koncentraci methanolových jablečných extraktů (hodnoceno výškou)

Hodnocené koncentrační rozmezí pomocí výšky bylo u extraktu ze slupky $1,88 \times 10^{-5}$ až $2,34 \times 10^{-6}$ g/l a u dužniny $7,50 \times 10^{-5}$ až $2,34 \times 10^{-6}$ g/l. Koncentrace, u které dosáhl index Q hodnoty 50 %, byla nižší než $1,88 \times 10^{-5}$ g/l u extraktu z jablečné slupky a vyšší než $1,88 \times 10^{-5}$ g/l u extraktu z jablečné dužniny. Z grafů vyplývá, že jablečná dužnina má větší antioxidační aktivitu než jablečná slupka.

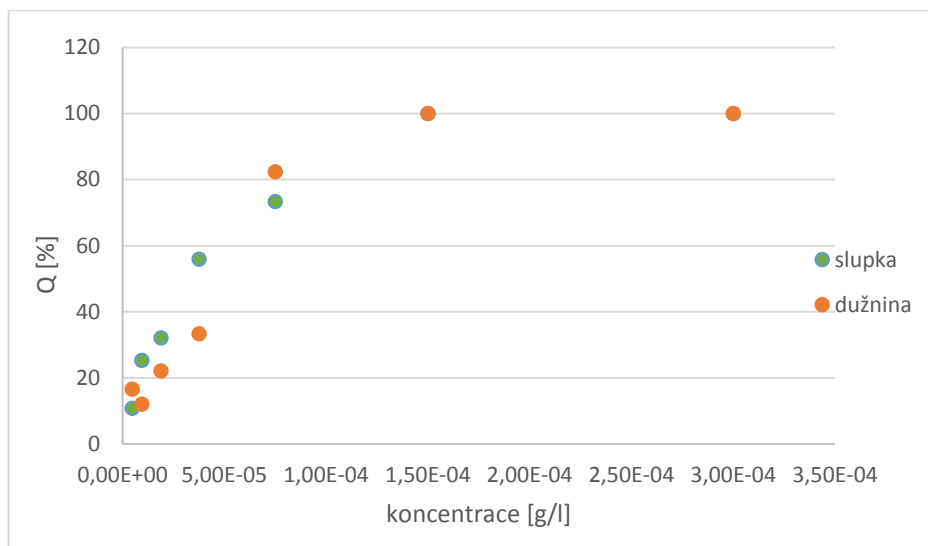
5.2.1.2 Vodné jablečné roztoky

Tab. 17 – Antioxidační aktivita jablečných extraktů znázorněná pomocí ploch CL signálů

| vzorek | c [g/l] | SLUPKA | | | DUŽNINA | | |
|--------|-----------------------|--------|---------|--------|---------|---------|--------|
| | | průměr | RSD [%] | Q [%] | průměr | RSD [%] | Q [%] |
| slepý | 0 | 81,53 | 4,66 | 0,00 | 78,61 | 3,44 | 0,00 |
| 1 | $6,00 \times 10^{-4}$ | 0,00 | - | 100,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 2 | $3,00 \times 10^{-4}$ | 0,00 | - | 100,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 3 | $1,50 \times 10^{-4}$ | 0,00 | - | 100,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 4 | $7,50 \times 10^{-5}$ | 21,77 | 5,67 | 73,31 | 13,89 | 4,36 | 82,34 |
| 5 | $3,75 \times 10^{-5}$ | 35,96 | 6,61 | 55,90 | 52,42 | 3,29 | 33,32 |
| 6 | $1,88 \times 10^{-5}$ | 55,35 | 0,23 | 32,12 | 61,20 | 3,14 | 22,15 |
| 7 | $9,38 \times 10^{-6}$ | 60,90 | 3,30 | 25,31 | 69,14 | 5,59 | 12,04 |
| 8 | $4,69 \times 10^{-6}$ | 72,75 | 1,04 | 10,78 | 65,57 | 4,47 | 16,58 |



Obr. 30 – Graf závislosti CL signálu na koncentraci vodných jablečných extraktů (hodnoceno plochou)

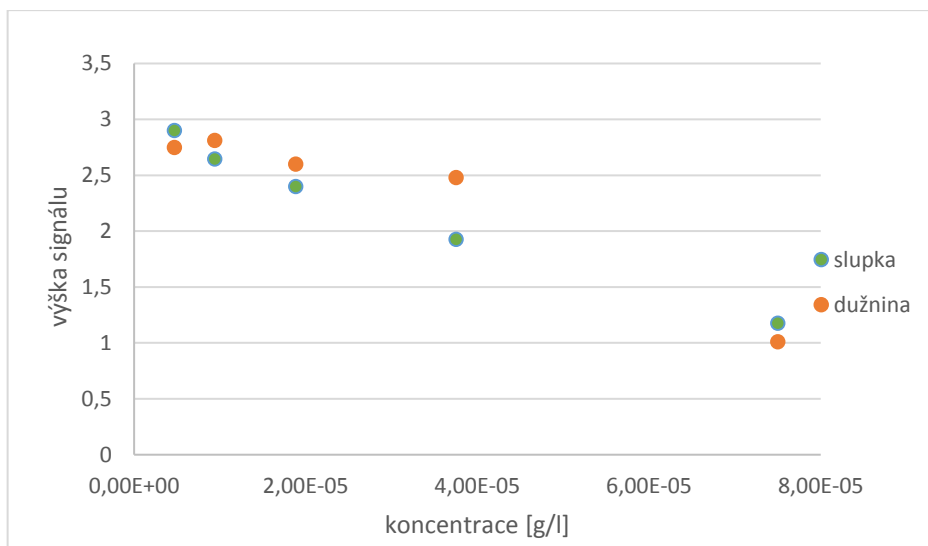


Obr. 31 – Graf závislosti indexu Q na koncentraci vodných jablečných extraktů (hodnoceno plochou)

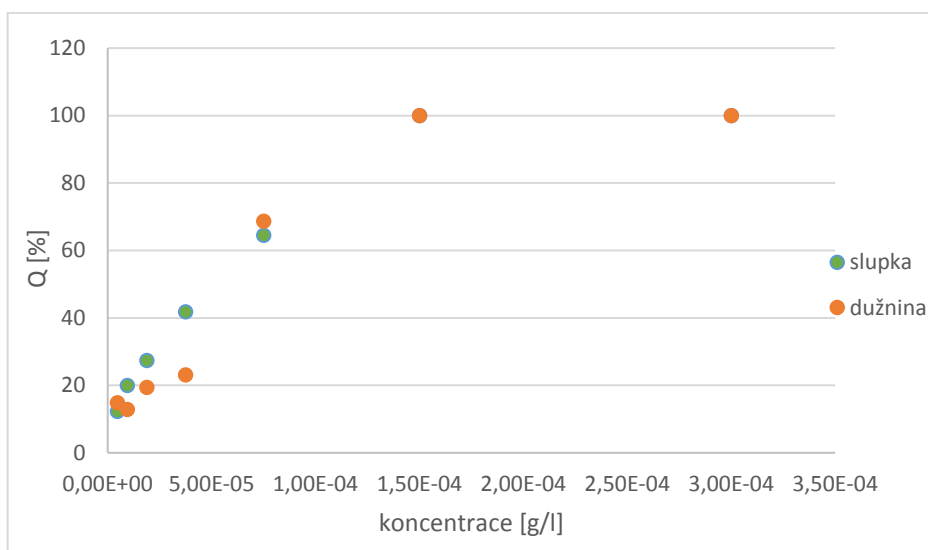
Hodnocené koncentrační rozmezí pomocí plochy bylo u obou extraktů stejné, a to $7,50 \times 10^{-5}$ až $4,69 \times 10^{-6}$ g/l. Koncentrace, u které dosáhl index Q hodnoty 50 %, byla u jablečné slupky $3,75 \times 10^{-5}$ g/l. U jablečné dužniny byla koncentrace vyšší než $3,75 \times 10^{-5}$ g/.

Tab. 18 – Antioxidační aktivita jablečných extraktů znázorněná pomocí výšek CL signálů

| vzorek | c [g/l] | SLUPKA | | | DUŽNINA | | |
|--------|-----------------------|--------|---------|--------|---------|---------|--------|
| | | průměr | RSD [%] | Q [%] | průměr | RSD [%] | Q [%] |
| slepý | 0 | 3,30 | 9,67 | 0,00 | 3,22 | 8,33 | 0,00 |
| 1 | $6,00 \times 10^{-4}$ | 0,00 | - | 100,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 2 | $3,00 \times 10^{-4}$ | 0,00 | - | 100,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 3 | $1,50 \times 10^{-4}$ | 0,00 | - | 100,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 4 | $7,50 \times 10^{-5}$ | 1,18 | 1,28 | 64,43 | 1,01 | 1,98 | 68,67 |
| 5 | $3,75 \times 10^{-5}$ | 1,93 | 5,97 | 41,73 | 2,48 | 7,26 | 23,06 |
| 6 | $1,88 \times 10^{-5}$ | 2,40 | 1,25 | 27,35 | 2,60 | 6,41 | 19,34 |
| 7 | $9,38 \times 10^{-6}$ | 2,65 | 8,51 | 19,93 | 2,81 | 9,45 | 12,82 |
| 8 | $4,69 \times 10^{-6}$ | 2,90 | 8,62 | 12,21 | 2,75 | 7,73 | 14,79 |



Obr. 32 – Graf závislosti CL signálu na koncentraci vodných jablečných extraktů (hodnoceno výškou)



Obr. 33 – Graf závislosti indexu Q na koncentraci vodných jablečných extraktů (hodnoceno výškou)

Hodnocené koncentrační rozmezí pomocí výšky bylo u obou extraktů stejné, a to $7,50 \times 10^{-5}$ až $4,69 \times 10^{-6}$ g/l. Koncentrace, u které dosáhl index Q hodnoty 50 %, byla u obou vyšší než $3,75 \times 10^{-5}$ g/l. Z grafů vyplývá, že jablečná slupka má větší antioxidační aktivitu než jablečná dužnina.

5.2.2 Extrakty odrůd černého bezu

SAMBU

Tab. 19 – AO aktivita extraktu odrůdy SAMBU znázorněná pomocí ploch CL signálů

| vzorek | c [g/l] | plocha 1 | 2 | 3 | průměr | SD | RSD [%] | Q [%] |
|--------|------------------------|----------|-------|-------|--------|------|---------|--------|
| slepý | 0 | 75,85 | 62,39 | 66,83 | 68,36 | 5,60 | 8,19 | 0,00 |
| 1 | $4,00 \times 10^{-05}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 2 | $2,00 \times 10^{-05}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 3 | $1,00 \times 10^{-05}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 4 | $5,00 \times 10^{-06}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 5 | $2,50 \times 10^{-06}$ | 22,81 | 22,91 | 26,39 | 24,04 | 1,66 | 6,93 | 64,84 |
| 6 | $1,25 \times 10^{-06}$ | 49,69 | 55,15 | 53,92 | 52,92 | 2,34 | 4,42 | 22,58 |
| 7 | $6,25 \times 10^{-07}$ | 55,77 | 61,74 | 63,15 | 60,22 | 3,20 | 5,31 | 11,90 |
| 8 | $3,13 \times 10^{-07}$ | 68,82 | 74,72 | 73,65 | 72,40 | 2,57 | 3,55 | -5,91 |

SAMYL

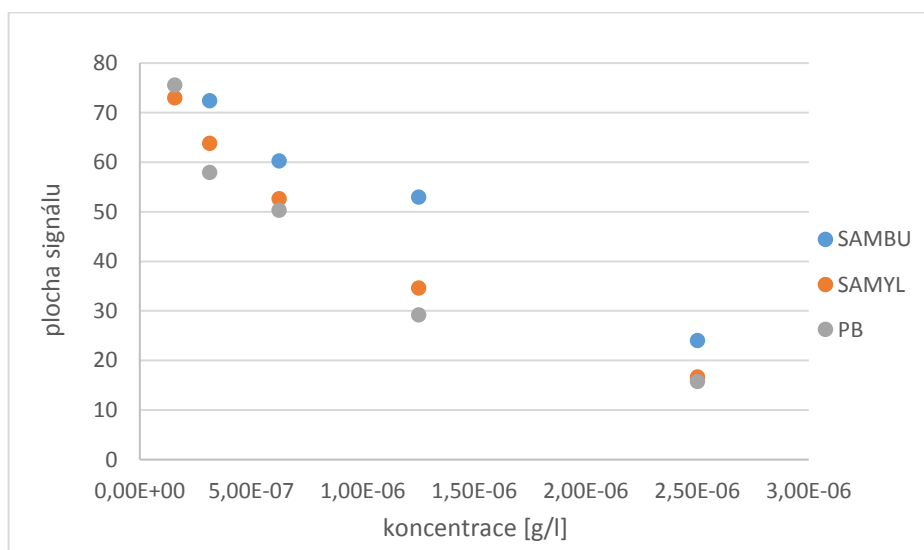
Tab. 20 – AO aktivita extraktu odrůdy SAMYL znázorněná pomocí ploch CL signálů

| vzorek | c [g/l] | plocha 1 | 2 | 3 | průměr | SD | RSD [%] | Q [%] |
|--------|------------------------|----------|-------|-------|--------|------|---------|--------|
| slepý | 0 | 79,04 | 75,86 | 87,37 | 80,76 | 4,85 | 6,01 | 0,00 |
| 1 | $4,00 \times 10^{-05}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 2 | $2,00 \times 10^{-05}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 3 | $1,00 \times 10^{-05}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 4 | $5,00 \times 10^{-06}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 5 | $2,50 \times 10^{-06}$ | 17,59 | 17,36 | 15,05 | 16,67 | 1,15 | 6,88 | 79,36 |
| 6 | $1,25 \times 10^{-06}$ | 31,98 | 36,17 | 35,71 | 34,62 | 1,88 | 5,42 | 57,13 |
| 7 | $6,25 \times 10^{-07}$ | 52,04 | 55,57 | 50,21 | 52,61 | 2,22 | 4,23 | 34,86 |
| 8 | $3,13 \times 10^{-07}$ | 63,62 | 66,43 | 61,37 | 63,81 | 2,07 | 3,24 | 20,99 |
| 9 | $1,57 \times 10^{-07}$ | 71,66 | 72,58 | 74,66 | 72,97 | 1,25 | 1,72 | 9,65 |

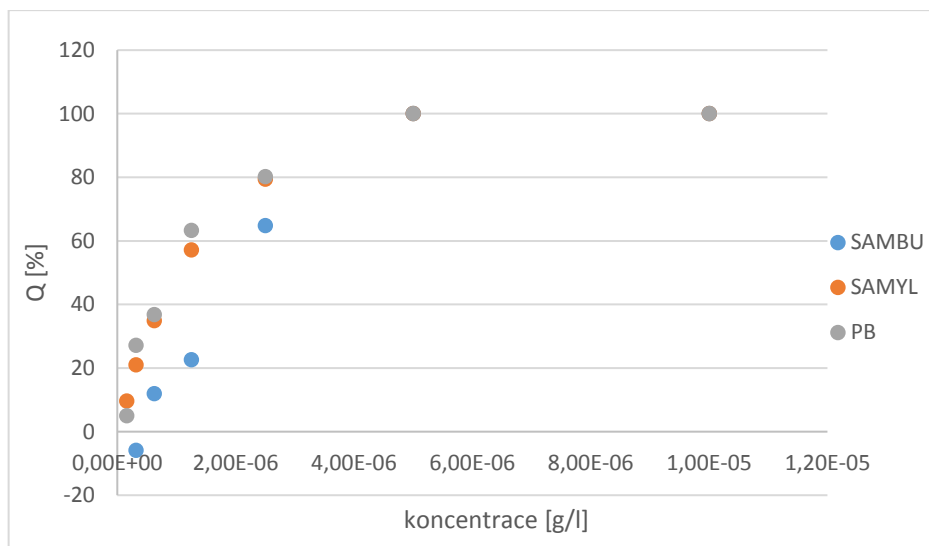
PLANÝ BEZ

Tab. 21 – AO aktivita extraktu z Planého bezu znázorněná pomocí ploch CL signálů

| vzorek | c [g/l] | plocha 1 | 2 | 3 | průměr | SD | RSD [%] | Q [%] |
|--------|-----------------------|----------|-------|-------|--------|------|---------|--------|
| slepý | 0 | 85,81 | 73,34 | 79,48 | 79,54 | 5,09 | 6,40 | 0,00 |
| 1 | $4,00 \times 10^{-5}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 2 | $2,00 \times 10^{-5}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 3 | $1,00 \times 10^{-5}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 4 | $5,00 \times 10^{-6}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 5 | $2,50 \times 10^{-6}$ | 15,65 | 18,51 | 13,18 | 15,78 | 2,18 | 13,80 | 80,16 |
| 6 | $1,25 \times 10^{-6}$ | 35,88 | 28,17 | 23,43 | 29,16 | 5,13 | 17,59 | 63,34 |
| 7 | $6,25 \times 10^{-7}$ | 49,99 | 52,02 | 48,88 | 50,30 | 1,30 | 2,58 | 36,77 |
| 8 | $3,13 \times 10^{-7}$ | 60,41 | 55,58 | 57,83 | 57,94 | 1,97 | 3,41 | 27,16 |
| 9 | $1,57 \times 10^{-7}$ | 76,71 | 74,78 | 75,14 | 75,54 | 0,84 | 1,11 | 5,03 |



Obr. 34 – Souhrnný graf závislosti CL signálu na koncentraci extraktů černého bezu (hodnoceno plochou)



Obr. 35 – Souhrnný graf závislosti indexu Q na koncentraci extraktů černého bezu (hodnoceno plochou)

Všechny bezové extrakty byly hodnoceny plochou v koncentračním rozmezí $2,50 \times 10^{-6}$ až $1,57 \times 10^{-7}$ g/l a koncentrace, u které index Q dosáhl 50 %, byla u planého bezu a odrůdy Samyl nižší než $1,25 \times 10^{-6}$ g/l a u odrůdy Sambu byla koncentrace nižší než $2,50 \times 10^{-6}$ g/l.

SAMBU

Tab. 22 – AO aktivita extraktu odrůdy SAMBU znázorněná pomocí výšek CL signálů

| vzorek | c [g/l] | výška 1 | 2 | 3 | průměr | SD | RSD [%] | Q [%] |
|--------|-----------------------|---------|------|------|--------|------|---------|--------|
| slepý | 0 | 3,86 | 3,58 | 3,47 | 3,64 | 0,16 | 4,51 | 0,00 |
| 1 | $4,00 \times 10^{-5}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 2 | $2,00 \times 10^{-5}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 3 | $1,00 \times 10^{-5}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 4 | $5,00 \times 10^{-6}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 5 | $2,50 \times 10^{-6}$ | 1,74 | 1,52 | 1,53 | 1,60 | 0,10 | 6,35 | 56,10 |
| 6 | $1,25 \times 10^{-6}$ | 2,57 | 2,25 | 2,6 | 2,47 | 0,16 | 6,40 | 31,99 |
| 7 | $6,25 \times 10^{-7}$ | 2,73 | 3,07 | 3,4 | 3,07 | 0,27 | 8,92 | 15,67 |
| 8 | $3,13 \times 10^{-7}$ | 3,41 | 4,07 | 3,5 | 3,66 | 0,29 | 7,98 | -0,64 |

SAMYL

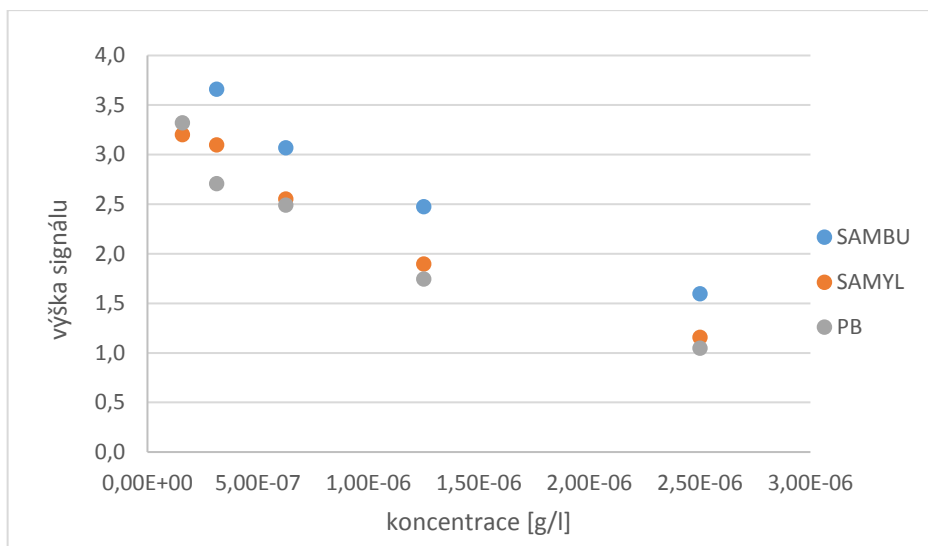
Tab. 23 – AO aktivita extraktu odrůdy SAMYL znázorněná pomocí výšek CL signálů

| vzorek | c [g/l] | výška 1 | 2 | 3 | průměr | SD | RSD [%] | Q [%] |
|--------|-----------------------|---------|------|------|--------|------|---------|--------|
| slepý | 0 | 3,37 | 3,19 | 3,50 | 3,35 | 0,13 | 3,79 | 0,00 |
| 1 | $4,00 \times 10^{-5}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 2 | $2,00 \times 10^{-5}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 3 | $1,00 \times 10^{-5}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 4 | $5,00 \times 10^{-6}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 5 | $2,50 \times 10^{-6}$ | 1,18 | 1,25 | 1,04 | 1,16 | 0,09 | 7,55 | 65,51 |
| 6 | $1,25 \times 10^{-6}$ | 1,77 | 2,07 | 1,85 | 1,90 | 0,13 | 6,69 | 43,44 |
| 7 | $6,25 \times 10^{-7}$ | 2,59 | 2,77 | 2,30 | 2,55 | 0,19 | 7,58 | 23,86 |
| 8 | $3,13 \times 10^{-7}$ | 3,07 | 3,38 | 2,84 | 3,10 | 0,22 | 7,15 | 7,65 |
| 9 | $1,57 \times 10^{-7}$ | 3,21 | 3,13 | 3,26 | 3,20 | 0,05 | 1,67 | 4,57 |

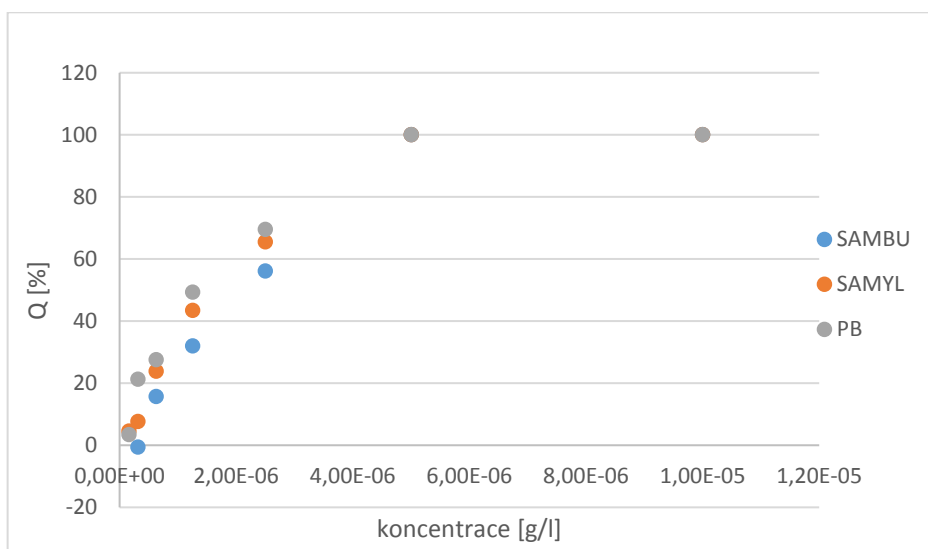
PLANÝ BEZ

Tab. 24 – AO aktivita extraktu z Planého bezu znázorněná pomocí ploch CL signálů

| vzorek | c [g/l] | výška 1 | 2 | 3 | průměr | SD | RSD [%] | Q [%] |
|--------|-----------------------|---------|------|------|--------|------|---------|--------|
| slepý | 0 | 3,73 | 3,06 | 3,52 | 3,44 | 0,28 | 8,14 | 0,00 |
| 1 | $4,00 \times 10^{-5}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 2 | $2,00 \times 10^{-5}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 3 | $1,00 \times 10^{-5}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 4 | $5,00 \times 10^{-6}$ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | - | 100,00 |
| 5 | $2,50 \times 10^{-6}$ | 1,04 | 1,26 | 0,84 | 1,05 | 0,17 | 16,39 | 69,54 |
| 6 | $1,25 \times 10^{-6}$ | 2,05 | 1,69 | 1,49 | 1,74 | 0,23 | 13,29 | 49,27 |
| 7 | $6,25 \times 10^{-7}$ | 2,43 | 2,71 | 2,33 | 2,49 | 0,16 | 6,46 | 27,55 |
| 8 | $3,13 \times 10^{-7}$ | 2,91 | 2,47 | 2,74 | 2,71 | 0,18 | 6,69 | 21,24 |
| 9 | $1,57 \times 10^{-7}$ | 3,44 | 3,35 | 3,17 | 3,32 | 0,11 | 3,38 | 3,39 |



Obr. 36 – Souhrnný graf závislosti CL signálu na koncentraci extraktů černého bezu (hodnoceno výškou)



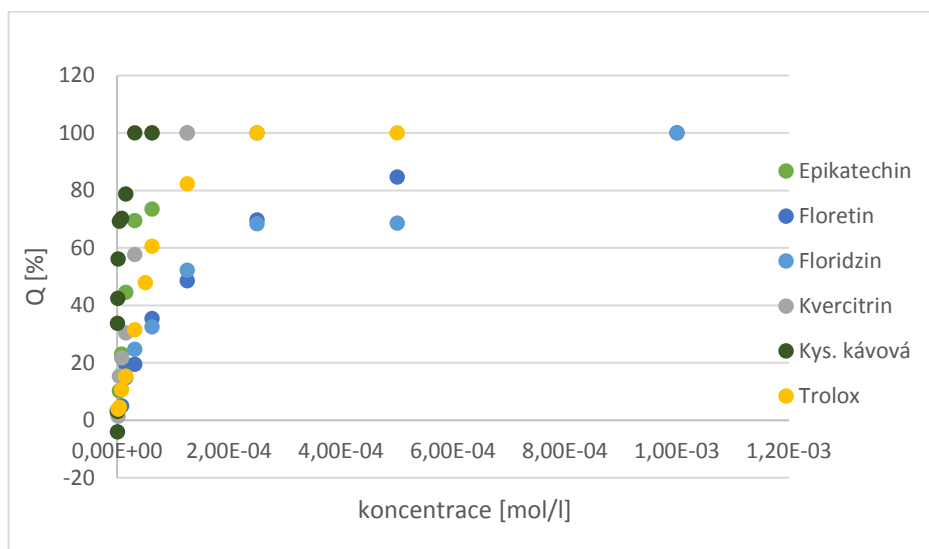
Obr. 37 – Souhrnný graf závislosti indexu Q na koncentraci extraktů černého bezu (hodnoceno výškou)

Všechny bezové extrakty byly hodnoceny plochou v koncentračním rozmezí $2,50 \times 10^{-6}$ až $1,57 \times 10^{-7}$ g/l a koncentrace, u které index Q dosáhl 50 %, byla u planého bezu $1,25 \times 10^{-6}$ g/l. U odrůdy Samyl byla vyšší než $1,25 \times 10^{-6}$ g/l a u Sambu byla koncentrace nižší než $2,50 \times 10^{-6}$ g/l. Z grafů vyplývá, že největší antioxidační aktivitu a pravděpodobně i největší množství antioxidačních látek obsahuje planý bez, dále odrůda Samyl a nejméně odrůda Sambu.

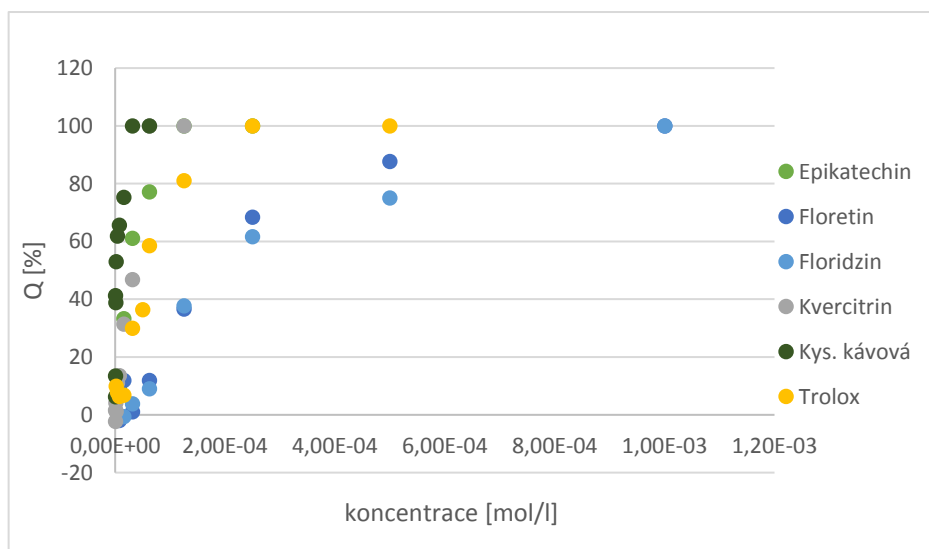
5.3 Souhrnné grafy pro stanovení antioxidační aktivity látek

5.3.1 Standardy

Porovnání indexů Q všech standardů s indexem Q Troloxu, hodnocených pomocí ploch (Obr. 37) a výšek (Obr. 38) CL signálů.



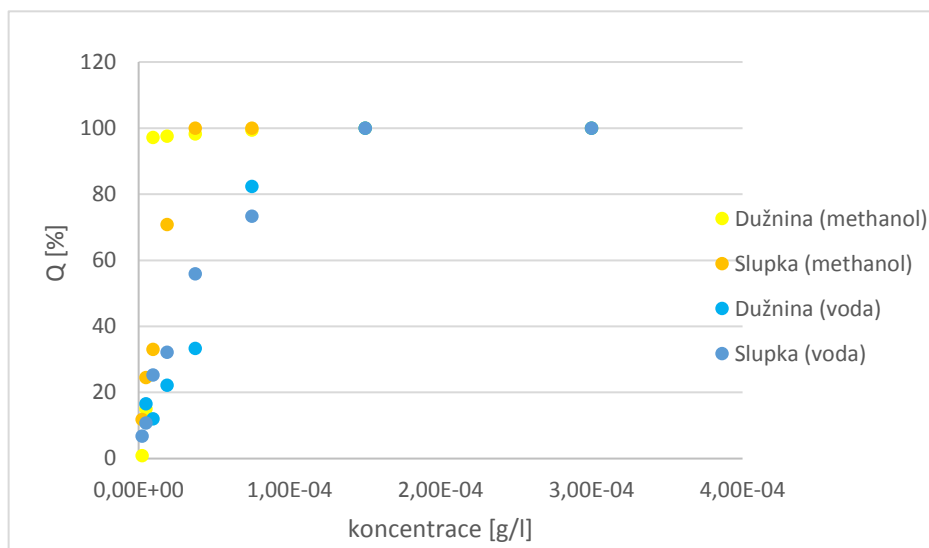
Obr. 38 – Souhrnný graf závislosti indexu Q všech standardů na jejich koncentraci (hodnoceno plochou)



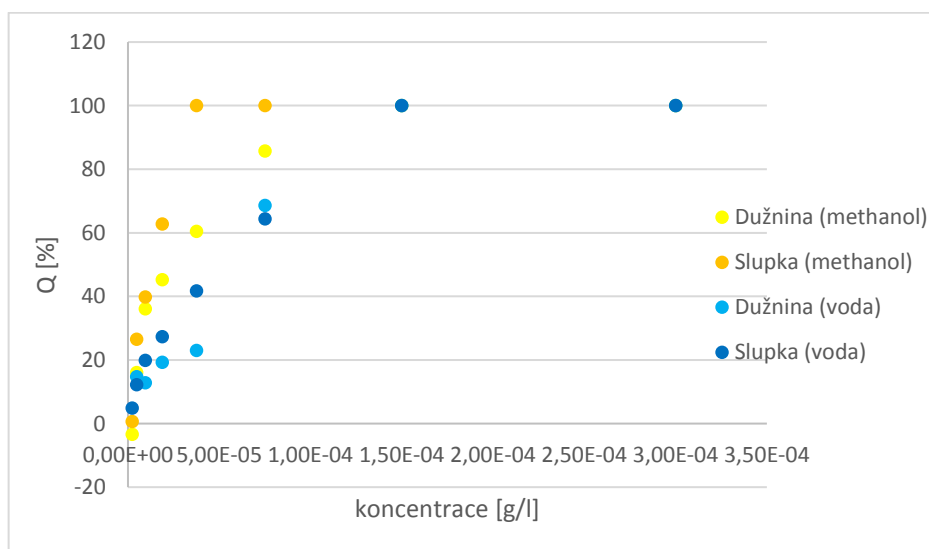
Obr. 39 – Souhrnný graf závislosti indexu Q všech standardů na jejich koncentraci (hodnoceno výškou)

Z obou grafů nejsou patrné velké rozdíly v antioxidační aktivitě. V porovnání s troloxem však vyplývá, že kyselina kávová, epikatechin a kvercitrin vykazují větší antioxidační aktivitu než trolox a naopak floretin a floridzin vykazují antioxidační aktivitu o něco nižší.

5.3.2 Jablečné extrakty



Obr. 40 – Souhrnný graf závislosti indexu Q všech jablečných extraktů na jejich koncentraci (hodnoceno plochou)



Obr. 41 – Souhrnný graf závislosti indexu Q všech jablečných extraktů na jejich koncentraci (hodnoceno výškou)

Z grafů je patrné, že methanолоvé extrakty vykazují vyšší antioxidační aktivitu v porovnání s vodnými extrakty, což se dá přisoudit menšímu obsahu fenolických látek extrahovaných vodou v porovnání s methanolem. Tento fakt byl ověřen i HPLC stanovením, kde obsah látek ve vodném extraktu je výrazně nižší než v methanolickeém extraktu.

Dále bylo potvrzeno, že extrakty jablečné slupky vykazují vyšší antioxidační aktivitu než extrakty jablečné dužniny. Znovu je rozdíl v aktivitě dán vyšším obsahem fenolických látek ve slupce, což bylo opět potvrzeno HPLC separací.

6 ZÁVĚR

V této práci byla hodnocena antioxidační aktivita přírodních látek pomocí luminolového chemiluminiscenčního systému v průtokovém systému sekvenční injekční analýzy (SIA). Tento systém díky svému jednoduchému ovládní, vysoké citlivosti a opakovatelnosti umožnil hodnocení větší série vzorků v poměrně krátkém čase.

U všech látek byly hodnoceny plochy a výšky chemiluminiscenčního signálu, které byly porovnávány se slepým vzorkem, vodou. Z výsledných průměrných hodnot byly následně odvozeny směrodatné odchylky, relativní směrodatné odchylky a index Q.

Následně byly sestrojeny grafy, kde byly porovnávány antioxidační aktivity jednotlivě testovaných látek s Troloxem, který zde sloužil jako standard pro měření antioxidační aktivity. Z toho vyplynulo, že kyselina kávová, kvercitrin a epikatechin vykazují větší antioxidační aktivitu než Trolox, a floridzin s floretinem vykazují antioxidační aktivitu o něco nižší.

Dále byly hodnoceny reálné vzorky, které představovaly směs více látek s antioxidační aktivitou, byla u nich tedy hodnocena celková antioxidační aktivita (TAC).

Nejprve byly měřeny extrakty odrůd černého bezu a výsledné hodnoty byly navzájem porovnány. Z testování vyplynulo, že největší antioxidační aktivitu a pravděpodobně i největší podíl látek s antioxidační aktivitou obsahuje planý bez, dále odrůda Samyl a nejméně odrůda Sambu.

Jako poslední byly hodnoceny methanolvé a vodné extrakty slupky a dužniny jablek odrůdy Golden delicious. Z hodnocení vyplynulo, že methanolvé extrakty vykazují vyšší antioxidační aktivitu než extrakty vodné, což se dá přisoudit většímu podílu fenolických látek vyextrahovaných methanolem v porovnání s vodou. Dále bylo potvrzeno, že vyšší antioxidační aktivitu vykazuje jablečná slupka v porovnání s jablečnou dužninou.

7 POUŽITÁ LITERATURA

¹ J. Pláteník. Volné radikály, antioxidanty a stárnutí. Interní medicína pro praxi 11(1), 2009, 30-33.

² J. Racek, V. Holeček. Enzymy a volné radikály. Chemické listy 93, 1999, 774-780.

³ H. Paulová, H. Bochořáková a E. Táborská. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. Chemické listy 98, 2004, 174-179.

⁴ K. Robards, P. D. Prenzler, G. Tucker, P. Swatsitang, W. Glover. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. Food Chemistry 66, 1999, 401-436.

⁵ M. S. Brewer. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 10, 2011, 221-247.

⁶ A. Masek, E. Chrzescijanska, M. Latos, M. Zaborski. Influence of hydroxyl substitution on flavanone antioxidants properties. Food Chemistry 215, 2017, 501-507.

⁷ Vzorec kvercitrinu. Dostupné z:

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/00740580?lang=en®ion=CZ>

(březen 2017)

⁸ C. Wagner, R. Fachineto, C. L. D. Corte, V. B. Brito, D. Severo, G. O. C. Dias, A. F. Morel, C. V. Nogueira. Quercitrin, a glycoside form of quercetin, prevents lipid peroxidation in vitro. Brain Research 1107, 2006, 192-198.

⁹ Vzorec kyseliny kávové. Dostupné z:

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c0625?lang=en®ion=CZ>

(březen 2017)

¹⁰ F. A. Khan, A. Maalik, G. Murtaza. Inhibitory mechanism against oxidative stress of caffeic acid. Journal of Food and Drug Analysis 24, 2016, 695-702.

¹¹ Vzorec epikatechinu. Dostupné z:

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/03940590?lang=en®ion=CZ>

(březen 2017)

- ¹² B. Knezevic, K. Lukowiak. The flavonol epicatechin reverses the suppressive effects of a stressor on long-term memory formation. *Journal of Experimental Biology* 217, 2014, 4004-4009.
- ¹³ Vzorec floridzinu. Dostupné z:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/274313?lang=en®ion=CZ>
(březen 2017)
- ¹⁴ Ch. Gosch, H. Halbwirth, K. Stich. Phloridzin: Biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants. *Phytochemistry* 71, 2010, 838-843.
- ¹⁵ Vzorec floretinu. Dostupné z:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p7912?lang=en®ion=CZ>
(březen 2017)
- ¹⁶ Phloretin. Pubchem, Open chemistry database. Dostupné z:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/phloretin#section=Top> (březen 2017)
- ¹⁷ Vzorec Troloxu. Dostupné z:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/238813?lang=en®ion=CZ&gclid=CJqngKSg59ICFdZsGwodFzQARA> (březen 2017)
- ¹⁸ Trolox, Cayman Chemical, 2017. Dostupné z:
<https://www.caymanchem.com/product/10011659> (březen 2017)
- ¹⁹ M. Fidler, L. Kolářová. Analýza antioxidantů v chmelu a pivu. *Chemické listy* 103, 2009, 232-235.
- ²⁰ M. Karabín, P. Dostálek, P. Hofta. Přehled metod pro stanovení antioxidační aktivity v pivovarství. *Chemické listy* 100, 2006, 184-189.
- ²¹ G. Chládková. Diplomová práce – Testování antioxidační aktivity pomocí luminolového chemiluminiscenčního systému, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové UK v Praze, Katedra analytické chemie, Hradec Králové 2015 (duben 2017)
- ²² R. Apak, S. Gorinstein, V. Böhm, K. M. Schaich, M. Özyürek and K. Güçlü. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* 85, 2013, 957–998.

- ²³ Lumigen, A Beckman Coulter Company, 2016. Dostupné z: <http://www.lumigen.com/detection-technologies/chemiluminescence> (duben 2017)
- ²⁴ P. Campins-Falcó, L. A. Tortajada-Genaro, F. Bosch-Reig. A new flow cell design for chemiluminescence analysis. *Talanta* 55, 2001, 403-413
- ²⁵ H. Paseková, M. Polášek, P. Solich. Sekvenční injekční analýza. *Chemické listy* 93, 1999, 354-359.
- ²⁶ N. W. Barnett, C. E. Lenehan, S. W. Lewis. Sequential injection analysis: an alternative approach to proces analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry* 18, 1999, 346-353.
- ²⁷ D. Karampelas, A. Economou, A. Calokerinos. A novel hybrid flow-injection/sequential-injection methodology for the rapid evaluation of the total antioxidant capacity of wines using inhibition of the alkaline luminol-potassium permanganate chemiluminescent reaction. *Microchemical Journal* 118, 2015, 223-230.
- ²⁸ E. Fassoula, A. Economou, A. Calokerinos. Development and validation of a sequential-injection method with chemiluminescence detection for the high throughput assay of the total antioxidant capacity of wines. *Talanta* 85, 2011, 1412-1418.
- ²⁹ K. S. Miniotti, C. A. Georgiou. High throughput flow injection bioluminometric method for olive oil antioxidant capacity. *Food Chemistry* 109, 2008, 455-461.