

METODY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY PŘÍRODNÍCH LÁTEK *IN VITRO*

HANA PAULOVÁ, HANA BOCHOŘÁKOVÁ
a EVA TÁBORSKÁ

Biochemický ústav Lékařské fakulty Masarykovy university,
Komenského nám. 2, 662 43 Brno
hpaulova@med.muni.cz

Došlo 22.10.02, přepracováno 24.9.03, přijato 14.10.03.

Klíčová slova: antioxidační aktivita, radikály, antioxidanty,
rostlinné extrakty

Obsah

1. Úvod
2. Základní metody stanovení antioxidační aktivity
 - 2.1. Metody založené na eliminaci radikálů
 - 2.1.1. Metody hodnotící eliminaci syntetických radikálů
 - 2.1.2. Metody hodnotící eliminaci kyslíkových radikálů
 - 2.1.3. Metody hodnotící eliminaci lipidové peroxidace
 - 2.2. Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek
 - 2.2.1. Metody chemické
 - 2.2.2. Metody elektrochemické
3. Závěr

1. Úvod

V posledních desetiletích se zvyšuje množství poznatků a úroveň znalostí o úloze volných radikálů při oxidačním stresu u živých organismů. Volným radikálům, které vznikají *in vivo* a mají řadu fyziologických funkcí (např. účast v protizánětlivých reakcích, v procesu fagocytosy), se v současnosti věnuje velká pozornost a sleduje se jejich negativní působení na organismus při řadě onemocnění. Jde především o reaktivní kyslíkové radikály (ROS – reactive oxygen species) a dusíkové radikály (RNS – reactive nitrogen species). Tyto radikály působí na biologicky významné sloučeniny, především lipidy, bílkoviny a nukleové kyseliny, pozměňují jejich strukturu a tím modifikují jejich funkci. Kaskáda reakcí iniciovaná radikály vede k následným změnám ve struktuře buněk, k poškození celých tkání, orgánů a důležitých funkcí v organismu. Reparativní procesy v organismu nemohou samy plně eliminovat poškození biomolekul, významnou roli při ochraně před volnými radikály hraje prevence, tj. redukce příčin jejich vzniku.

Jednou z možností, jak organismus chránit před vlivem

exogenních i endogenních volných radikálů, je působení antioxidantů. Podle již klasické definice jsou antioxidanty molekuly, které – jsou-li přítomny v malých koncentracích ve srovnání s látkami, jež by měly chránit – mohou zabránit nebo omezovat oxidační destrukci těchto látek¹.

Kromě endogenních nízkomolekulárních antioxidantů, jako je glutathion, kyselina močová, koenzym Q a další, se v poslední době do centra pozornosti řadí mnoho látek přírodního původu, které se do lidského organismu dostávají společně s potravou. Některé potraviny rostlinného původu tak vedle své nutriční a energetické hodnoty mají důležitou roli jako zdroj antioxidantů. K přírodním látkám s antioxidačními účinky, které jsou přijímané potravou, jsou v první řadě tradičně řazeny antioxidační vitaminy C, E a karotenoidy. V poslední době se však mnohem větší význam přikládá dalším přírodním látkám, zejména polyfenolickým sloučeninám. Mezi ně patří např. flavonoidy, katechiny a fenolické kyseliny. Zdrojem těchto látek jsou zelenina, ovoce, vláknina, čaj, vína a aromatické a léčivé rostliny². Celkový denní příjem polyfenolů z různých zdrojů byl odhadnut na 1 g a je tedy vyšší než příjem antioxidačních vitaminů. V řadě experimentálních studií bylo také prokázáno, že antioxidační aktivita mnoha rostlinných fenolických látek je vyšší než účinek antioxidačních vitaminů. Klinické a epidemiologické studie rovněž prokazují korelaci mezi antioxidační aktivitou látek přijímaných v potravě a prevencí některých onemocnění např. kardiovaskulárních chorob, karcinogeneze, neurologických poruch nebo procesů stárnutí.

Z uvedených důvodů vzrůstá zájem stanovit antioxidační aktivitu různých látek rostlinného původu. Jeden z přístupů ve výzkumu přírodních antioxidantů je testování reaktivity individuálních izolovaných látek vůči jednotlivým volným radikálům. Slouží především k odvození vztahů mezi strukturou a reaktivitou příslušných sloučenin. Většinu přírodních antioxidantů však přijímáme jako součást složitých směsí, jejichž složky mohou reagovat s různými radikály různými mechanismy, mohou též na sebe vzájemně působit (synergicky i inhibičně). Proto je také snaha charakterizovat antioxidační aktivitu směsných vzorků i jako celku. Předkládaná práce uvádí přehled nejčastěji citovaných postupů, které se používají pro testování antioxidační aktivity přírodních látek a lze je rovněž použít pro charakterizaci chování směsných vzorků (rostlinných extraktů, potravin).

Pro vzájemné porovnávání antioxidačních účinků různých směsí byl některými autory zejména v souvislosti s analýzou potravinových vzorků zaveden pojem celková antioxidační aktivita (total antioxidant activity – TAA, cit.^{3,4}). TAA je parametrem, který kvantifikuje kapacitu vzorku biologického materiálu eliminovat radikály³. Z velkého počtu popsáných metod mají při stanovení TAA nejčastější použití níže zmíněné metody TEAC, FRAP a ORAC. Pojem celková antioxidační kapacita je však v mno-

ha publikacích používán v širším významu a rozmanitost používaných metod při jejím stanovení je značná.

Přestože hodnocení antioxidačních vlastností přírodních látek je v oblasti výzkumu věnována široká pozornost, je třeba připomenout, že řada látek přijímaných v rostlinném materiálu podléhá metabolickým změnám již v trávicím traktu a jejich účinek v organismu je dále podstatně ovlivněn mírou resorpce a dalším metabolismem. Proto výrazná antioxidační aktivita zjištěná *in vitro* nemusí znamenat adekvátně významný účinek *in vivo*. O metabolických procesech v trávicím traktu, biodostupnosti a farmakokinetice přírodních látek nejrůznějšího charakteru je přitom dosud známo velmi málo.

2. Základní metody stanovení antioxidační aktivity

V literatuře lze nalézt velký počet metod používaných ke stanovení antioxidační aktivity. Jejich rozmanitost vyplývá ze skutečnosti, že nízkomolekulární antioxidanty mohou působit různými mechanismy. Nejčastěji jde o přímou reakci s radikály (zhášení, vychytávání) nebo reakci s přechodnými kovy. Přesnější chemické vymezení mechanismu jejich účinku je však často problematické. Proto také postupy hodnotící míru antioxidačního působení jsou založeny na různých principech. Obecně mohou být kategorizovány do dvou skupin – na metody hodnotící schopnost eliminovat radikály a dále na metody posuzující redoxní vlastnosti látek.

2.1. Metody založené na eliminaci radikálů

Metody spočívají v hodnocení schopnosti vzorku vychytávat volné radikály. Radikály mohou být v reakční směsi generovány nebo jsou do reakční směsi přidávány. Z hlediska chemického jde o radikály kyslíkové (hydroxyl, peroxy, superoxidový anion-radikál) nebo syntetické stabilní radikály (DPPH, ABTS^{•+}, galvinoxyl). Zvláštní skupinu tvoří metody testující schopnost inhibovat nebo zpomalovat lipidovou peroxidaci.

2.1.1. Metody hodnotící eliminaci syntetických radikálů

Metoda používající ABTS (metoda TEAC)

Je jednou ze základních a nejpoužívanějších metod pro stanovení celkové antioxidační aktivity TAA. Testuje schopnost vzorku či látek zhášet kation-radikál ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)). Je také označována jako metoda TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity, cit.⁵), vzhledem k tomu, že výsledná antiradikálová aktivita vzorku je srovnávána s antiradikálovou aktivitou syntetické látky Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2- karboxylová kyselina).

Zhášení radikálu ABTS^{•+} antioxidanty, které se chovají jako donory vodíku, se sleduje spektrofotometricky na základě změny absorpčního spektra ABTS^{•+} (nejčastěji se měří

absorbance při 734 nm). V reakční směsi se kation-radikál ABTS^{•+} generuje oxidací ABTS. Převážně je používán systémem ABTS/H₂O₂/peroxidasa (cit.⁶) nebo ABTS / methmyoglobin/H₂O₂ (cit.⁵). Jsou také uváděny i možnosti chemické oxidace ABTS, např. peroxodisíranem draselným⁷ nebo oxidem manganičitým⁸. Při vlastním experimentálním měření se užívají dva postupy. V prvním se antioxidant přidává do reakční směsi, ve které byl již vytvořen radikál ABTS^{•+}, při druhém postupu je antioxidant v reakční směsi přítomen při generování radikálu ABTS^{•+}. Častěji se užívá uspořádání, při němž se antioxidant přidává k radikálu ABTS^{•+} již vyprodukovanému pomocí peroxidasy⁹. Stanovení celkové antioxidační aktivity je možno provádět i komerčně vyráběnými sety (např. Randox Laboratories Ltd). Používá se i sériově na mikrotitračních destičkách¹⁰.

TAA vzorků se hodnotí parametrem TEAC (cit.⁵). Označuje antioxidační kapacitu vzorku ekvivalentní definovanému množství syntetického derivátu Troloxu. Pro číslé látky je TEAC definována⁵ jako milimolární koncentrace Troloxu vykazující stejnou antioxidační aktivitu jako testovaná látka při koncentraci 1 mmol.l⁻¹. Pro směsi TEAC udává koncentraci Troloxu (mmol.l⁻¹), která je rovná antioxidační aktivitě vzorku¹¹.

Pro spektrofotometrickou metodu stanovení celkové antioxidační aktivity s ABTS jsou popsány aplikace měření v hydrofilním i lipofilním prostředí^{6,7,10}. Byla rovněž vypracována metoda¹² kombinující HPLC separaci látek s následnou detekcí radikálových zhášečů na základě reakce s ABTS^{•+}.

Metoda stanovení TAA vzorků pomocí ABTS je jednoduchá, rychlá v provedení a má široké uplatnění, od hodnocení antioxidační aktivity látek různého původu až po směsné vzorky.

Metoda používající DPPH

Tato metoda je považována za jednu ze základních metodik pro posouzení antiradikálové aktivity čistých látek i různých směsných vzorků¹³. Spočívá v reakci testované látky se stabilním radikálem difenylpikrylhydrazylem – DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl). Při reakci dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazin). Reakce je nejčastěji sledována spektrofotometricky. Pokles absorbance při 517 nm se měří buď po uplynutí určitého konstantního času¹⁴ nebo se pracuje v kinetickém režimu¹⁵. Test lze provádět i na mikrotitračních destičkách¹⁶. Reakci je možno sledovat i metodou elektronové spinové rezonance (ESR, cit.¹⁷) nebo HPLC (cit.¹⁸). Použití detekce HPLC, při které je hodnocen pík radikálu DPPH, je výhodné zvláště u barevných vzorků, kdy se na rozdíl od spektrofotometrie zbarvení vzorku eliminuje.

U směsných vzorků se radikálová aktivita někdy vyjadřuje v ekvivalentech askorbové kyseliny¹⁶ nebo v jednotkách standardu Troloxu¹⁹. Jsou používány aplikace na TLC¹⁵, vhodné pro screening radikálové zhášečské aktivity směsných vzorků. Podobnou modifikací je kombinace testu se separací látek ze směsi metodou HPLC, kdy látky rozděl-

lené na koloně reagují kontinuálně s DPPH a spektrofotometricky se deteguje pik radikálu²⁰.

Metoda používající galvinoxyl

K metodám využívajícím reakci antioxidantu se stabilními radikály patří také test s galvinoxylem (2,6-di-*terc*-butyl-4-[(3,5-di-*terc*-butyl-4-oxocyklohexa-2,5-dien-1-yliden)methyl]fenoxyl, cit.²¹). Princip metody spočívá v redukcí stabilního radikálu galvinoxylu látkami poskytujícími vodík podobně jako při testu DPPH. Reakce se sleduje spektrofotometricky při vlnové délce 428 nm nebo na základě ESR.

Využití jiných stabilních radikálů

Pro hodnocení schopnosti látek poskytovat vodíkový atom nebo elektron se používá také syntetický volný radikál Fremyho sůl (nitrosodisulfonan draselný), detekce a hodnocení reakce se provádí pomocí ESR (cit.²²).

2.1.2. Metody hodnotící eliminaci kyslíkových radikálů

Metoda ORAC

Při použití metody ORAC (oxygen radical absorbance capacity) se v testovaném systému generují kyslíkové radikály a hodnotí se schopnost testované látky zpomalit nebo zastavit radikálovou reakci²³. Detekce je založena na sledování úbytku fluorescence β -fykoerytrinu (β -PE) po ataku radikály. Pro generaci peroxylových radikálů se používá AAPH (2,2'-azobis(isobutyrimidamid)-dihydrochlorid, cit.²³), při generaci hydroxylových radikálů pak systém²³ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cu}^{2+}$. Vzhledem k tomu, že tyto radikály patří k nereaktivnějším, patří test ORAC k důležitým parametrům charakterizujícím antioxidanty. Originální metoda ORAC, která používá jako sondu β -PE (ORAC_{PE}), má široké využití a poskytuje významné informace o antioxidační kapacitě vzorků různého typu^{23,24}. Při stanovení antioxidační kapacity polyfenolů však byla popsána některá omezení, která se týkají vlastností β -PE (např. omezená fotostabilita)²⁵. Zavedením jiného typu fluorescenční sondy, a sice fluoresceinu (FL), se metodika (ORAC_{FL}) zpřesňuje. Uvádí se, že metoda ORAC_{FL} je exaktnější v důsledku přesného a jednoduchého reakčního mechanismu, který spočívá v klasickém přenosu vodíku²⁵.

Metody založené na vychytávání OH-radikálů

Při těchto metodách jsou OH-radikály generovány různými postupy (Fentonovou reakcí²⁶, UV fotolýzou peroxidu vodíku²⁷, fotolýzou syntetických derivátů²⁸).

Detekce je založena na vychytávání radikálu látkami, jejichž reakční produkty lze snadno stanovit. Antioxidanty vychytávající OH[•] snižují tvorbu těchto produktů. Jedním z možných postupů je vychytávání OH[•] salicylovou kyselinou. Vznikají hydroxylované produkty salicylové

kyseliny, jejichž detekce a kvantifikace se provádí metodou HPLC s UV detekcí²⁹. Jiným postupem je použití 2,2-dimethyl-2H-pyrrol-1-oxidu (DMPO) jako lapače OH[•]. Adukt DMPO-OH může být kvantifikován pomocí ESR (cit.²⁶) nebo HPLC-ECD (cit.²⁷). Další možností je vychytávání OH[•] deoxyribosou³⁰, jejíž degradační produkty jsou stanovovány reakcí s thiobarbiturovou kyselinou (TBA, cit.³¹). Výhodou tohoto postupu je možnost stanovit jak antioxidační, tak i prooxidační vlastnosti látek. Vychytávání OH[•] radikálů lze rovněž sledovat specifickou chemiluminiscenční sondou indoxyl- β -glukuronidem (IBG, cit.³²).

Metody založené na vychytávání superoxidového anion-radikálu

K produkci radikálu je užívána např. neenzymová reakce 5-methylfenazinium-methyl-sulfátu a NADH (cit.³³) nebo systém xanthin/xanthinoxidasa³⁴. Vzniklý radikál redukuje nitrotetrazoliovou modř, detekce se provádí spektrofotometricky při 550–560 nm. V testech UV může být nitrotetrazoliová modř nahrazena syntetickým formazanovým barvivem WST-1, které je vzhledem k dobré rozpustnosti vhodnější pro provádění testu na mikrotitračních destičkách³⁵. Je rovněž možná detekce metodou ESR (cit.³⁶) na základě reakce superoxidového anion-radikálu s DMPO. Další postup, který se používá, je kombinace HPLC a chemiluminiscence³⁷. Měří se inhibice chemiluminiscence luminolu látkami separovanými při HPLC. Jelikož luminol je schopen reagovat s různými reaktivními kyslíkovými radikály, postihuje tato metoda široké spektrum antioxidační aktivity látek.

2.1.3. Metody hodnotící eliminaci lipidové peroxidace

Lipidová peroxidace vyvolaná volnými radikály je jedním z nejvýznamnějších patologických pochodů v organismu. Při studiu látek s antiradikálovými účinky se proto řada metod zaměřuje přímo na testování inhibičních účinků na lipidovou peroxidaci. Látky potlačující lipidovou peroxidaci mohou eliminovat jak iniciační kyslíkové radikály (OH[•]), tak sekundárně vznikající radikálové meziproducty (peroxyl, alkoxy) a mohou též působit jako látky chelatající ionty přechodných kovů. Navíc je účinek antioxidantu *in vivo* ovlivněn jeho lipofilitou. Bylo vyvinuto mnoho metod hodnotících vliv antioxidantů na lipidovou peroxidaci, od nejjednodušších, které jsou prováděny s jednoduchými lipidy a v jednoduchých fázových systémech, až po složitější biologické modely simulující situaci *in vivo* a využívající biologické membrány jako matici. Častým postupem je užití fosfolipidových liposomů³⁸. Jinou možností je studium na mikrosomech³⁹. Další modifikací je sledování lipidové peroxidace na tkáňových homogenátech⁴⁰, mitochondriích⁴¹ nebo LDL-částicích (low-density lipoproteins, cit.⁴²).

K nejjednodušším testům patří metody založené na detekci produktů peroxidace linolové kyseliny. Jako iniciátor radikálové reakce je často užíván AAPH (cit.⁴³), produkty

peroxidace jsou sledovány spektrofotometricky při 234 nm. Metoda je prováděna v řadě modifikací lišících se přípravou lipidové fáze a způsobem detekce^{43–45}. Často je užíván postup využívající spřaženou oxidaci β -karotenu a linolové kyseliny vzdušným kyslíkem^{46,47}. Antioxidační účinek látek je hodnocen spektrofotometricky při vlnové délce 470 nm podle spotřeby β -karotenu⁴⁷, přičemž provedení je možné i na mikrotitračních destičkách⁴⁸. Stanovení se také provádí v modifikaci na TLC (cit.⁴⁶). Metoda s β -karotenem se užívá pro hodnocení vzorků TAA, je vhodná i pro screening směsných vzorků⁴⁹.

Jednou z nejužívanějších metod k hodnocení schopnosti látek eliminovat lipidovou peroxidaci je metoda TBA-MDA. Je založena na stanovení jednoho ze sekundárních produktů lipidové peroxidace malondialdehydu (MDA) na základě jeho barevné reakce s kyselinou thiobarbiturovou (TBA), měří se absorbance při 532 nm. Spektrofotometrické stanovení aduktů TBA-MDA je jednoduché a citlivé, avšak nespecifické, zahrnuje stanovení všech látek reagujících s TBA (TBARs produkty, cit.⁵⁰). Výhodou je, že test lze realizovat i na mikrotitračních destičkách⁵¹. Specifičtější vyhodnocením kvantitativní aduktů TBA-MDA je metoda HPLC (cit.⁵²).

2.2. Metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek

Neenzymové antioxidanty mohou být charakterizovány jako redukční činidla, která reagují s oxidanty, redukují je a tím je inaktivují. Z tohoto pohledu lze antioxidační aktivitu posuzovat na základě redukční schopnosti látky.

2.2.1. Metody chemické

Metoda FRAP

Na principu redoxní reakce je založena metoda FRAP (ferric reducing antioxidant potential, cit.²²). Při této metodě redukují antioxidanty ze vzorku komplex Fe^{3+} -2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazin) (Fe^{3+} -TPTZ). Nárůst absorbance při 593 nm odpovídající množství komplexu Fe^{2+} -TPTZ je mírou antioxidační aktivity vzorku. Metoda má své limity spočívající v tom, že měření probíhá při nefyziologické nízké hodnotě pH (3,6), nejsou zachyceny s komplexem pomalu reagující polyfenolické látky a thioly, navíc vznikající Fe^{2+} je *in vivo* jedním z reaktantů Fentonovy reakce. Metoda FRAP tak odráží pouze schopnost látek redukovat ion Fe^{3+} a s celkovou antioxidační aktivitou vzorku nemusí pozitivně korelovat⁵³.

2.2.2. Elektrochemické metody

Cyklická voltametrie

Redoxní vlastnosti látek je možno hodnotit cyklickou voltametrií, která indikuje schopnost látek odštěpovat elektrony^{54,55}. Při této metodě se na pracovní elektrodu vkládá potenciálový pulz s určitou rychlostí polarizace a

současně se sledují proudové odezvy v roztoku studované látky. Získaný záznam zachycuje křivka – tzv. cyklický voltamogram. Redukční schopnost látek se vyhodnocuje dvěma parametry, a to z potenciálu anodického oxidačního píku E_A a jeho anodického proudu I_A . Čím je nižší hodnota E_A , tím látka snadněji odevzdává elektrony a může být lepším antioxidantem. Z hodnoty výšky proudu anodického píku I_A je možné určit koncentraci látek. Cyklická voltametrie je vhodná pro získání informace, zda látka je schopna snadno odevzdávat elektrony a poté je možné zvolit určitou metodu na stanovení antioxidační kapacity. Je prokázáno, že v řadě případů hodnoty E_A korelují s antioxidační aktivitou látek určenou jinými metodami, např. s lipoperoxidací⁵⁴, DPPH (cit.⁵⁵).

HPLC metoda s elektrochemickou detekcí

Elektroaktivní látky je možno velmi přesně a citlivě detegovat použitím amperometrických nebo coulochemických detektorů při analýze HPLC (HPLC-ECD). Při HPLC-ECD se na pracovní elektrodu detektoru vkládá určitý kladný potenciál. Pík látky se projeví pouze tehdy, je-li látka při tomto potenciálu oxidována. Látku je tak možno charakterizovat nejen retenčním časem, ale také potenciálem, při kterém se oxiduje. To umožňuje analyzovat komplexní směsi a identifikovat v nich jednotlivé účinné antioxidační komponenty na základě hodnoty potenciálu aplikovaného na elektrodu⁵⁴. Při analýze neruší zbarvení směsí, ale je nutné dožít vysokou čistotu reagentů v mobilní fázi (včetně snížení koncentrace stopových prvků). Hodnocení antioxidačních vlastností látek pomocí HPLC-ECD koreluje s různými jinými metodami na testování celkové antioxidační aktivity látek, např. s metodou DPPH (cit.^{54,56}).

3. Závěr

V moderní společnosti stoupá počet civilizačních onemocnění, která souvisí s působením volných radikálů. Vzdělávací snaha chránit organismus před těmito radikály. K eliminaci jejich vlivu může přispívat vyšší příjem exogenních antioxidantů, proto vzrůstá tendence hodnotit antioxidační vlastnosti čistých přírodních látek, rostlinných extraktů i potravinových doplňků. Uvedený přehled metodik je výběrem z postupů, které jsou nejčastěji k tomuto účelu užívány. Přestože popsané metody poskytují cenné údaje o testovaných látkách, žádná z nich dosud nemá charakter úplné informace o celkové antioxidační aktivitě, která by komplexně vyhodnocovala účinek látky v organismu. K tomu přispívá i skutečnost, že antioxidanty přijímané potravou mohou působit buď přímo v gastrointestinálním traktu, nebo mohou být resorbovány do organismu. Při jejich resorpci a následném metabolismu v játrech a ostatních tkáních dochází k přeměně na další metabolity, jejichž antioxidační účinek může být odlišný. Souběžně s testováním antioxidační aktivity přírodních látek a jejich směsí *in vitro* je proto třeba věnovat pozornost hodnocení antioxidačního stavu organismu *in vivo* po jejich podání.

LITERATURA

1. Halliwell B.: *Free Radical Res. Commun.* 9, 1 (1990).
2. Rice-Evans C., Miller N. J., Paganga G.: *Free Radical Biol. Med.* 20, 933 (1996).
3. Arnao M. B., Cano A., Acosta M.: *Recent Res. Dev. Agric. Food Chem.* 2, 893 (1998).
4. Miller N. J., Rice-Evans C.: *Redox Rep.* 2, 161 (1996).
5. Rice-Evans C., Miller N. J., Bolwell P. G., Bramley P. M., Pridham J. B.: *Free Radical Res.* 22, 375 (1995).
6. Arnao M. B., Cano A., Acosta M.: *Food Chem.* 73, 239 (2001).
7. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C.: *Free Radical Biol. Med.* 26, 1231 (1999).
8. Miller N. J., Sampson J., Candeias L. P., Bramley P. M., Rice-Evans C. A.: *FEBS Lett.* 384, 240 (1996).
9. Cano A., Hernández-Ruiz J., García-Canovas F., Acosta M., Arnao M. B.: *Phytochem. Anal.* 9, 196 (1998).
10. Cano A., Acosta M., Arnao M. B.: *Redox Rep.* 5, 365 (2000).
11. Verhagen J. V., Haenen G. R. M. M., Bast A.: *J. Agric. Food Chem.* 44, 3733 (1996).
12. Koleva I. I., Niederländer H. A. G., van Beek T. A.: *Anal. Chem.* 73, 3373 (2001).
13. Blois M. S.: *Nature* 181, 1199 (1958).
14. Yokozawa T., Chen C. P., Dong E., Tanaka T., Nonaka G. I., Nishioka I.: *Biochem. Pharmacol.* 56, 231 (1998).
15. Espin J. C., Soler-Rivas C., Wichers H. J.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 648 (2000).
16. Du Toit R., Volsteedt Y., Apostolides Z.: *Toxicology* 166, 63 (2001).
17. Nanjo F., Goto K., Seto R., Suzuki M., Sakai M., Hara Y.: *Free Radical Biol. Med.* 21, 895 (1996).
18. Yamaguchi T., Takamura H., Matoba T., Terao J.: *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 62, 1201 (1998).
19. Choi H. S., Song H. S., Ukeda H., Sawamura M.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 4156 (2000).
20. Koleva I. I., Niederländer H. A. G., van Beek T. A.: *Anal. Chem.* 72, 2323 (2000).
21. Shi H., Noguchi N., Niki E., v knize: *Methods in Enzymology*, str.157. Academic Press, London 2001.
22. Pedersen C. B., Kyle J., Jenkinson A. Mc. E., Gardner P. T., McPhail D. B., Duthie G. G.: *Eur. J. Clin. Nutr.* 54, 405 (2000).
23. Cao G., Sofic E., Prior R.: *J. Agric. Food Chem.* 44, 3426 (1996).
24. Cao G., Sofic E., Prior R. L.: *Free Radical Biol. Chem.* 22, 749 (1997).
25. Ou B., Hampsch-Woodill M., Prior R. L.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 4619 (2001).
26. Yoshioka H., Ohashi Y., Akaboshi M., Senba Y., Yoshioka H.: *Free Radical Res.* 35, 265 (2001).
27. Husain S. R., Cillard J., Cillard P.: *Phytochemistry* 26, 2489 (1987).
28. Matsugo S., Kayamori N., Ohta T., Konishi T.: *Chem. Pharm. Bull.* 39, 545 (1991).
29. Paulová H., Bochořáková H., Slanina J., Táborská E.: *Pharm. Pharmacol. Lett.* 10, 27 (2000).
30. Halliwell B., Gutteridge J. M. C., Aruoma O. I.: *Anal. Biochem.* 165, 215 (1987).
31. Halliwell B., Gutteridge J. M. C.: *FEBS Lett.* 128, 347 (1981).
32. Tsai Ch. H., Stern A., Chio J. F., Chern Ch. L., Liu T. Z.: *J. Agric. Food Chem.* 49, 2137 (2001).
33. Robak J., Gryglewski R. J.: *Biochem. Pharmacol.* 37, 837 (1988).
34. Lu Y., Foo L. Y.: *Food Chem.* 75, 197 (2001).
35. Wood J. E., Senthilmohan S. T., Peskin A. V.: *Food Chem.* 77, 155 (2002).
36. Unno T., Yayabe F., Hayakawa T., Tsuge H.: *Food Chem.* 76, 259 (2002).
37. Dapkevicius A., van Beek T. A., Niederländer H. A. G.: *J. Chromatogr., A.* 912, 73 (2001).
38. Tsuda T., Watanabe M., Ohshima K., Norinobu S., Choi S. W., Kawakishi S., Osawa T.: *J. Agric. Food Chem.* 42, 2407 (1994).
39. Quinlan G. J., Halliwell B., Moorhouse C. P., Gutteridge J. M. C.: *Biochim. Biophys. Acta* 962, 126 (1988).
40. Yokozawa T., Dong E., Liu Z. W., Shimizu M.: *Phytother. Res.* 11, 446 (1997).
41. Mathiesen L., Malterud K. E., Sund R. B.: *Planta Med.* 61, 515 (1995).
42. Yamanaka N., Oda O., Nagao S.: *FEBS Lett.* 405, 186 (1997).
43. Rapisarda P., Tomaino A., Cascio R. L., Bonina F., Pascuale A. D., Saija A.: *J. Agric. Food Chem.* 47, 4718 (1999).
44. Terao J., Piskula M., Yao Q.: *Arch. Biochem. Biophys.* 308, 278 (1994).
45. Yen G. Ch., Hsieh Ch. L.: *J. Agric. Food Chem.* 46, 3952 (1998).
46. Pratt D. E., Miller E. E.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61, 1064 (1984).
47. Miller H. E.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 48, 91 (1971).
48. Fukumoto L. R., Mazza G.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 3597 (2000).
49. Daglia M., Papetti A., Gregotti C., Berte F., Gazzani G.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 1449 (2000).
50. Haenen G. R. M. M., Bast A.: *FEBS Lett.* 159, 24 (1983).
51. Van der Sluis A. A., Dekker M., Verkerk R., Jongen W. M. F.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 4116 (2000).
52. Nielsen F., Mikkelsen B. B., Nielsen J. B., Andersen H. R., Grandjean P.: *Clin. Chem.* 43, 1209 (1997).
53. Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M., Flanagan J. A., Deemer E. K.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 1322 (2002).
54. Rapta P., Mišík V., Staško A., Vrábel I.: *Free Radical Biol. Med.* 18, 901 (1995).
55. Nakamura T., Nishi H., Kokusunya Y., Sato T.: *Chem. Pharm. Bull.* 46, 1388 (1998).

56. Peyrat-Maillard M. N., Bonnely S., Berset C.: *Talanta* 51, 709 (2000).

H. Paulová, H. Bochořáková, and E. Táborská
(Department of Biochemistry, Faculty of Medicine,
Masaryk University, Brno): ***In vitro* Methods for
Estimation of the Antioxidant Activity of Natural
Compounds**

The role of free radicals in pathogenesis of many dysfunctions such as carcinogenesis, cardiovascular diseases and aging is intensively studied. Attention is focused on the contribution of natural antioxidants to protection against the processes. During the last decade, many analytical methods

have been developed to determine the antioxidant activity of natural compounds and their mixtures *in vitro*. This paper reviews the assays used most frequently for this purpose. The procedures are divided into two groups. The first group involves the methods based on the generation of various radical species and their elimination by treatment with potential antioxidant compounds. The tests used for the evaluation of total antioxidant activity (e.g., Trolox equivalent antioxidant capacity, diphenylpicrylhydrazyl, oxygen radical absorbance capacity) and the methods testing the ability to prevent lipid peroxidation are included. The other group includes the procedures that are based on measurement of redox properties of compounds (ferric reducing antioxidant potential assay, cyclic voltammetry, HPLC with coulochemical detection).

Už jste navštívili www.knovel.com?

Tento významný faktografický a referenční zdroj pro přírodní vědy a technické obory je od 1. 1. 2004 v České republice volně* k dispozici konzorciu těchto institucí:

Praha: Univerzita Karlova – Přírodovědecká fakulta, Akademie věd ČR – Ústřední knihovna, Česká zemědělská univerzita, Státní zdravotní ústav, VŠCHT, Národní knihovna ČR; **Olomouc:** Univerzita Palackého – Přírodovědecká fakulta; **Ústí nad Labem:** Univerzita J. E. Purkyně; **Brno:** Vysoké učení technické, Veterinární a farmaceutická univerzita, Masarykova univerzita – Přírodovědecká fakulta; **Ostrava:** Ostravská univerzita; **Pardubice:** Univerzita Pardubice; **Zlín:** Univerzita T. Bati

Kromě konzorcia si může každá instituce/podnik vyžádat krátkodobý **zkušební přístup zdarma** (na adrese www.aip.cz/vyzkousejte.php#7) a/nebo každý akademicky subjekt (VŠ, AV ČR a velká veřejná knihovna) může požádat o bezplatné časově neomezené zpřístupnění kolekce **CHEMessential** (Kontakt: Jiří Kadlecěk; e-mail: jiri.kadlecěk@aip.cz, tel.: 222 231 212).

Více informací o Knovelu viz Chemické listy 98, 45 (2004).

Kontakt: koordinátorka konzorcia a hlavní řešitelka grantového projektu RNDr. Alena Balvínová (Přf UK, Praha), e-mail: svi@natur.cuni.cz, tel.: 221 951 591.

*) financováno z grantového projektu programu LI Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR