

VLIV VNĚJŠÍCH FAKTORŮ NA AKTIVITU ANTIOXIDANTŮ

ZUZANA RÉBLOVÁ

Ústav chemie a analýzy potravin, Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
zuzana.reblova@vscht.cz

Došlo 9.2.11, přijato 31.3.11.

Klíčová slova: antioxidační aktivita, antioxidanty, volné
radikály

Obsah

1. Úvod
2. Faktory obecně ovlivňující aktivitu antioxidantů
3. Faktory ovlivňující aktivitu antioxidantů *in vivo*
4. Faktory ovlivňující aktivitu antioxidantů při *in vitro* metodách stanovení této aktivity
5. Závěr

1. Úvod

Při výzkumu antioxidantů (ať již je cílem tohoto výzkumu prodloužení skladovatelnosti potravin a omezení nežádoucích změn lipidů probíhajících během jejich zpracování nebo zvýšení obsahu antioxidantů v potravinách a jejich možný preventivní účinek proti rozvoji některých chorob) se pro stanovení antioxidační aktivity používá nespočet metod a pracovních postupů, které obecně poskytují vzájemně odlišné výsledky. Přestože tato skutečnost je dobře známá a je zdůrazňovaná v souhrnných pracích věnujících se stanovení antioxidační aktivity (účinnosti)^{1,2} nebo aktivitě antioxidantů^{3–6}, a v dalších publikacích^{7–10}, často nejsou identifikovány (či dokumentovány) faktory způsobující disproporce v hodnotách stanovených různými metodami či zjištěných za odlišných podmínek (nebo dokonce není vliv těchto faktorů ani uvažován).

Tato práce si proto klade za cíl poskytnout zájemcům výčet vnějších faktorů ovlivňujících antioxidační aktivitu (doplňeny některými příklady a vysvětleními), tak aby mohli vliv těchto faktorů uvažovat, ať již při interpretaci vlastních výsledků, tak při zvažování významu již publikovaných dat.

2. Faktory obecně ovlivňující aktivitu antioxidantů

Obecně (tj. jak v modelových experimentech, tak v potravinách, *in vivo*, ale i v dalších možných systémech) ovlivňují antioxidační aktivitu zejména koncentrace antioxidantů^{11–14}, oxidovaný substrát^{15,16}, přítomnost jiných antioxidantů (a s tím související možnost synergismu nebo antagonismu mezi jednotlivými antioxidanty^{11,14}), použité rozpouštědlo (při reakcích v roztoku)^{16,17}, homogenita či vícefázovost sledovaného systému^{6,17,18} (a typ vícefázového systému¹³), pH (cit.^{15,17}), přítomnost dalších látek (např. dalších složek potravin¹², zejména pak bílkovin^{19,20}), oxidační činidlo či fyzikální faktor (např. světlo) iniciující oxidaci¹³, teplota^{12,13}, parciální tlak kyslíku^{14,15}, resp. obecně přístup kyslíku¹⁶ (daný např. velikostí povrchu oxidovaného systému¹³), a přítomnost iontů kovů s proměnlivou valencí^{13,15}.

Koncentrace antioxidantů používané při metodách *in vitro* jsou přitom často i řádově vyšší než reálné koncentrace antioxidantů *in vivo*. Například typické koncentrace kvercetinu v plasmě (které jen výjimečně překračují hodnotu 1 $\mu\text{mol l}^{-1}$) jsou 2 až 20krát nižší než koncentrace potřebné pro inhibici oxidace LDL lipoproteinů pomocí tohoto antioxidantu¹³. Zdůraznit je však nutné také skutečnost, že některé antioxidanty mohou při vyšších koncentracích vykazovat prooxidační působení¹⁴.

Při stabilizaci lipidů je výsledný antioxidační účinek ovlivněn zejména jejich nasyceností, ale také tím, zda se jedná o fosfolipidy, triacylglyceroly či volné mastné kyseliny, a významný je i počáteční stupeň oxidace¹³. Při reakci v roztoku může pak použité rozpouštědlo ovlivnit reaktivitu antioxidantů nebo jejich rozpustnost, ale také např. tvorbu micel (a tím vzájemnou přístupnost či naopak nepřístupnost antioxidantů, resp. jejich reaktivních skupin, a oxidovaného substrátu či iniciátorů oxidace¹⁰).

Ve vícefázových systémech rozhoduje o antioxidačním účinku především lokalizace antioxidantů (ale i dalších látek, např. katalyticky působících iontů kovů¹⁸) v jednotlivých fázích a na mezifázovém rozhraní¹³. U antioxidantů je tato lokalizace primárně dána jejich polaritou, může však být ovlivněna řadou faktorů, u emulzí např. použitým emulgátorem¹⁶.

Způsob použitý pro iniciaci oxidace pak může ovlivnit nejen rychlost probíhající oxidace, ale také (převažující) mechanismus této oxidace¹¹. Například karotenoidy přitom vykazovaly obecně srovnatelnou účinnost s flavonoidy při inhibici tvorby hydroperoxidů kumenu v chlorbenzenu (iniciovanou AMVN), avšak o tři řády vyšší schopnost inaktivovat singletový kyslík²¹.

Významný vliv na antioxidační aktivitu však mohou mít i způsob sledování oxidace^{13,16} nebo způsob kvantifikace antioxidačního účinku¹⁶, a s tím související určení

konce (či limitního stupně) oxidace, pokud se tento parametr při kvantifikaci antioxidačního účinku uplatňuje^{13,15}.

Při sledování účinku v tucích a olejích je přitom rozhodující zejména to, zda se sleduje vznik hydroperoxidů, tj. primárních produktů oxidace, nebo např. aldehydů, tj. sekundárních produktů oxidace. Některé antioxidanty (např. tokoferoly) mohou totiž zvyšovat obsah primárních produktů oxidace (hydroperoxidů) svou schopností poskytnout proton peroxylovým radikálům a/nebo mohou zpomalovat rozklad hydroperoxidů, a tedy také vznik nízkomolekulárních sekundárních produktů oxidace¹⁸. Důležité však může být i to, že konjugované dieny, často používané pro sledování oxidace tuků a olejů, vznikají jen z polyenových mastných kyselin¹⁷, a výrazně odlišných výsledků se dosahuje v případě, že se sleduje prodloužení indukční periody ve srovnání s vlivem na rychlost oxidace během indukční periody¹⁰.

3. Faktory ovlivňující aktivitu antioxidantů *in vivo*

V lidském organismu a v systémech používaných k objasnění aktivity antioxidantů *in vivo* (tj. např. v tkáňových kulturách) ovlivňuje antioxidační aktivitu, kromě faktorů uvedených v předchozí kapitole, i řada dalších skutečností. Za nejvýznamnější faktor způsobující rozpor mezi antioxidační aktivitou *in vitro* a účinkem antioxidantů v lidském organismu se přitom považuje jejich biologická dostupnost, zahrnující tři základní složky (kroky), a to uvolnění daných látek z potravinové matrice, jejich vstřebání v trávicím traktu a přestup do buněk²².

Naprostá většina *in vitro* metod pro stanovení antioxidační aktivity vyžaduje extrakci analyzovaných tuhých potravin. Část antioxidantů však při tomto procesu nepřechází do extraktu, a to z různých důvodů: některé antioxidanty jsou nerozpustné (zejména taniny s vyšším stupněm polymerace a melanoidiny vznikající reakcí neenzymového hnědnutí), část antioxidantů je kovalentně vázána na nerozpustné složky potravin (např. ferulová kyselina je v cereáliích esterově vázána na polysacharidy buněčné stěny, časté jsou však také vazby antioxidantů na bílkoviny, ať již se jedná o přirozeně přítomné složené proteiny nebo o vazby vzniklé při zpracování či skladování potravin), část obecně extrahovatelných antioxidantů zůstává vázána na extrakční zbytek vodíkovými můstky či jinými nekovalentními vazbami a část antioxidantů je také uzavřena v buněčných či jiných strukturách (např. karotenoidy jsou často uzavřeny v chloroplastech nebo chromoplastech a flavonoidy mohou být v některých případech, např. ve slupce rajčat, uzavřeny v prostorové síti tvořené pektinem)²³. V trávicím traktu však předchází „extrakci“ antioxidantů hydrolyza řady přítomných (zejména makromolekulárních) sloučenin, což vede k uvolnění vázaných antioxidantů, a tím ke vzrůstu antioxidační aktivity²⁴.

Antioxidační aktivita se však během trávení může zvýšit i u extrahovatelných antioxidantů, např. díky hydrolyze rozpustných polymerních forem fenolů²⁵ nebo glyko-

sidů a esterů²². Na druhou stranu může ale během trávení docházet i ke ztrátám antioxidantů (pravděpodobně oxidací), jak bylo zjištěno během *in vitro* simulace trávení rajčat, kdy došlo ke snížení celkové antioxidační aktivity na přibližně polovinu a k úplnému vymizení askorbové kyseliny²⁶.

Vstřebatelnost uvolněných antioxidantů je v trávicím traktu člověka obecně relativně nízká^{27,28}. Například efektivita vstřebávání ellagové kyseliny a anthokyanů z malin (podávaných ve formě prášku připraveného ze sušených plodů) činila jen 1 % (cit.²⁹), a podobně nízkou míru vstřebatelnosti uvádí i další literatura³⁰, zatímco např. typická absorpce glykosidů kvercetinů se pohybuje v rozmezí 20 až 50 % (cit.¹³). Mezi obecně dobře vstřebatelné antioxidanty přitom patří zejména gallová kyselina a isoflavonony, následované katechiny, flavanony a glukosidy kvercetinů^{13,27}, a dále pak proanthokyanidiny a anthokyaniny¹³.

Velká část esterů a glykosidů antioxidantů (s výjimkou anthokyanů a některých dalších antioxidantů³¹) je v trávicím traktu vstřebatelná až po hydrolyze²². Přitom hydrolytické enzymy lidského trávicího traktu nejsou schopné hydrolyzovat všechny přítomné vazby, a hydrolyzovatelnost řady sloučenin tak závisí na složení střevní mikroflory³¹. Střevní mikroflora však může modifikovat antioxidanty přijímané s potravou i jinými způsoby, a tím měnit jejich vstřebatelnost a/nebo biologickou aktivitu³². Kvercetin např. některé střevní bakterie metabolizují za vzniku 3,4-dihydroxyfenylacetové kyseliny s nižší antioxidační aktivitou než má výchozí sloučenina³¹.

Avšak i antioxidanty, které nebyly v trávicím traktu vstřebány, mohou pozitivně působit na lidský organismus, a to právě v trávicím traktu, který je neustále vystavený řadě oxidantů, jejichž zdrojem jsou např. reakce askorbové kyseliny s železnatými ionty, hydroperoxydy, aldehydy a další oxidační produkty lipidů konzumované spolu s potravou, peroxid vodíku přítomný v některých nápojích nebo aktivace imunitních buněk gastrointestinálního traktu bakteriemi či toxiny. Antioxidanty přitom v trávicím traktu mohou, kromě vlastního antioxidačního působení a chelatace prooxidačně působících iontů, také např. příznivě ovlivňovat složení střevní mikroflory. Působení antioxidantů v trávicím traktu tak může oddalovat vznik nádorů tlustého střeva a konečníku²⁸, přičemž podle některých autorů je tento účinek antioxidantů významnější než jejich působení *in vivo* (tj. po vstřebání v trávicím traktu)³³.

Účinnost a rychlost vstřebávání antioxidantů jsou pak, podobně jako u jiných složek potravin, ovlivněny současně přijímanými živinami (a dalšími složkami potravy) a některými dalšími (příbuznými) faktory. Je, například, obecně známou skutečností, že vláknina snižuje vstřebávání fenolů, zatímco tuk, alkohol a emulgátory podporují vstřebávání lipofilních antioxidantů^{13,14,22}. V rámci novějších výzkumů však bylo zjištěno, že efektivita vstřebávání je ovlivněna také druhem přijímaného tuku³⁴. Vstřebávání antioxidantů může být ale ovlivněno také současným příjmem jiných antioxidantů³⁵. Například naringenin, karotenoidy a pravděpodobně také γ -tokoferol mohou snižovat vstřebávání α -tokoferolu, zatímco askorbová kyselina

a fenolové kyseliny jeho vstřebávání neovlivňují³⁶. Železo a bílkoviny (testované ve formě masa a kaseinu) pak snížily (během simulovaného trávení *in vitro*) antioxidační aktivitu zeleného čaje³⁷, a to pravděpodobně v důsledku iniciace oxidace přítomných antioxidantů nebo jejich vazbou na bílkoviny³⁰. Podobně bylo zvyšování antioxidační aktivity plasmy pozorovatelné po příjmu tmavé čokolády nebo zeleného či černého čaje výrazně sníženo, jestliže byly tyto potraviny konzumovány společně s mlékem (i když ne všechny studie tuto interakci potvrdily)^{27,30}.

Kinetika změn antioxidační aktivity plasmy je ale ovlivněna také typem potraviny, prostřednictvím které jsou antioxidanty přijímány. Zatímco po vypití nápojů antioxidační aktivita plasmy vzrůstá relativně rychle (v rozmezí 30 až 60 minut) a poté opět relativně rychle klesá, po konzumaci tuhých potravin obsahujících antioxidanty se tento parametr zvyšuje i snižuje pozvolněji, s dosažením maxima po 2 až 3 hodinách a návratem na původní hodnotu po 4 až 5 hodinách³⁰. Dlouhodobý zvýšený příjem nějakého antioxidantu pak snižuje jeho absorpci. Například u krys krmených potravou s vysokým obsahem flavonolů bylo vstřebávání následně samostatně podávaného kvercetinu významně sníženo ve srovnání s krysami krmenými dietou chudou na tento antioxidant³¹.

Míra a rychlost vstřebávání antioxidantů (zejména karotenoidů přirozeně vázaných v chloroplastech a dalších strukturách) může být dále ovlivněna (obvykle zvýšena) předchozím kulinárním zpracováním potravin. Například lykopen je lépe využitelný z rajčatových výrobků než ze syrových rajčat a β -karoten z tepelně opracované mrkve či špenátu než ze syrové zeleniny. Pozitivní účinek tepelného opracování na využitelnost antioxidantů byl však popsán také pro další antioxidanty, např. pro naringenin a chlorogennou kyselinu přítomné v rajčatech²².

Výše zmíněné okruhy však nejsou jediné, které ovlivňují účinnost antioxidantů *in vivo* a/nebo interpretaci výsledků dosahovaných v této oblasti výzkumu.

Některé antioxidanty (resp. látky vykazující antioxidační aktivitu *in vitro*) mohou v lidském organismu (kromě schopnosti inaktivovat volné radikály) vykazovat i řadu dalších prospěšných aktivit^{13,16,38}, a to jak souvisejících s antioxidační obranou, tak i výrazně odlišných. Mohou, například, vázat do komplexů prooxidačně působící ionty kovů^{15,39}, deaktivovat singletový kyslík¹⁵, inhibovat prooxidačně působící enzymy^{15,39,40}, stimulovat antioxidační enzymy²⁹, aktivovat či naopak inhibovat řadu dalších enzymů³⁹ (např. inhibovat α -amylasu³⁹ či telomerasu^{28,33}), podporovat opravy DNA (výrazný byl tento účinek např. u ferulové kyseliny²⁹), modulovat signální cesty^{13,29} (související např. s buněčným dělením, apoptosou nebo tvorbou zánětu²⁹), vázat se na některé proteiny, a tím měnit jejich konformaci (a tedy i biologickou aktivitu)¹⁶, nebo modulovat expresi některých genů^{29,38,39}. Tímto způsobem (ale i dalšími mechanismy) mohou antioxidanty pozitivně ovlivňovat např. zacházení organismu s glukosou, sekreci insulinu, metabolismus lipidů nebo vznik metastas^{33,39}. Řada zde zmíněných aktivit se tak významně podílí, nebo může podílet, na vlivu antioxidantů na vznik či rozvoj řady

onemocnění, např. diabetu 2. typu³⁹, nádorových onemocnění³³, chorob kardiovaskulárních^{16,33} nebo některých chorob neurodegenerativních (jako jsou Alzheimerova či Parkinsonova choroba⁴¹). Přitom podle některých autorů jsou tyto „ostatní“ účinky významnější než antioxidační aktivita těchto látek *in vivo*⁴⁰.

Naproti tomu, některé ze sloučenin vykazujících antioxidační aktivitu mohou mít zároveň některé nežádoucí vlastnosti, např. cytotoxicitu⁴². Tato cytotoxicita souvisí především s prooxidačním působením některých antioxidantů³¹. Příčinou cytotoxicity však může být i oxidace polyfenolů za vzniku semichinonů a chinonů, které jsou potenciálně cytotoxické⁴⁰.

Reaktivní formy kyslíku, iniciující oxidační stres a tím řadu onemocnění, plní v organismu také řadu fyziologických funkcí, a ani jejich role v rozvoji některých onemocnění není jednoznačně negativní. Reaktivní formy kyslíku se např. podílí jak na iniciaci nádorového bujení, tak na kontrole jeho vzniku a jeho případné eliminaci, a to zejména iniciací apoptosy⁴³. Z tohoto důvodu nemusí tedy být ani možný prooxidační efekt *in vivo* některých flavonoidů hodnocen jednoznačně negativně³², a to také s ohledem na to, že mírný oxidační stres podněcuje zvyšování přirozené (tj. zejména enzymové) antioxidační obrany organismu a další obranné mechanismy⁴⁰.

Řada antioxidantů, zejména flavonoidů, je po vstřebání rychle metabolizována²⁸ (což typicky vede ke snížení antioxidační aktivity^{13,32,40}) a/nebo vylučována z těla²². Naproti tomu, specifické postavení některých antioxidantů v rámci ochrany vůči nežádoucí oxidaci *in vivo*, jako je tomu např. u α -tokoferolu (a to nejen vůči např. flavonoidům, což je dáno výrazně vyšší lipofilitou tokoferolů, ale také vůči ostatním tokoferolům), pak souvisí např. s existencí speciálních transportních systémů pro tyto látky. U α -tokoferolu přitom existuje specifický vazebný protein zajišťující přednostní vazbu tohoto tokoferolu, resp. jeho (2*R*,4'*R*,8'*R*)-isomeru, do VLDL lipoproteinů, i když není mezi jednotlivými tokoferoly rozdíl např. mezi efektivitou jejich vstřebávání a/nebo rychlostí transportu do jater¹².

Řada rostlinných potravin obsahuje kromě antioxidantů i další sloučeniny, které mohou působit preventivně vůči rozvoji některých onemocnění spojených tradičně s oxidačním stresem a antioxidanty, např. vlákninu^{13,33}, listovou kyselinu a některé další sloučeniny¹³, které se tak spolupodílí na ochranném efektu těchto potravin vůči kardiovaskulárním a nádorovým onemocněním^{13,33}. Navíc, strava bohatá na ovoce a zeleninu obsahuje obvykle málo tuku (tj. rizikového faktoru pro rozvoj kardiovaskulárních onemocnění, diabetu a některých druhů karcinomu³³).

Zejména u individuálně podávaných sloučenin (např. vitaminů s antioxidačním účinkem nebo β -karotenu) se jejich pozitivní účinek zvyšuje jen do určité dávky. U zdravě se stravujících jedinců tak může samostatné podávání vybrané sloučeniny vyvolat dojem, že tato sloučenina nevykazuje předpokládanou aktivitu *in vivo*³³. V intervenčních studiích proto nemusí být zjištěn pozitivní

efekt u osob majících před zahájením studie dostatečnou (adekvátní) koncentraci antioxidantů v plasmě (na rozdíl od osob majících před zahájením studie tyto koncentrace snižené^{41,44}) a/nebo u osob konzumujících dostatečné (větší) množství ovoce a zeleniny⁴⁴.

Při organizaci intervenčních studií zaměřených na studium účinku antioxidantů je však nutné věnovat pozornost také dalším faktorům, jako jsou fyzická aktivita, hormonální aktivita, obezita, věk, stres, vystavení organismu znečištěnému ovzduší či životní styl (zejména konzumace alkoholu a/nebo kouření) a některé další^{41,44}, které ovlivňují přirozenou antioxidační obranu organismu a/nebo *in vivo* produkci reaktivních forem kyslíku. Přitom platí, že přirozená antioxidační obrana organismu se snižuje s věkem, s nímž rovněž roste produkce reaktivních forem kyslíku, podobně jako roste produkce těchto reaktantů při zvýšené fyzické aktivitě⁴¹. Zvláštní pozornost je pak nutné věnovat zejména zatížení účastníků rizikovými faktory, které mohou výrazně zvyšovat oxidační stres a tím iniciovat nádorové bujení, jako jsou např. kouření a další. V případě již probíhajících (zatím klinicky nedetekovatelných) nádorových změn⁴⁵ (nebo dokonce i jen za podmínek vysokého oxidačního stresu¹⁴) mohou totiž vysoké dávky některých antioxidantů (např. β -karotenu) působit negativně, tj. zvyšovat riziko nádorových onemocnění a/nebo urychlovat jejich rozvoj^{14,45}, což souvisí s možnou konverzí některých antioxidantů (např. právě β -karotenu) na prooxidyanty za těchto podmínek¹⁴.

Nezanedbatelné je také to, že antioxidační aktivita sloučenin *in vivo* může být snížena současným příjmem látek zvyšujících oxidační stres, jako jsou oxidované lipidy⁴⁶ nebo polyenové mastné kyseliny⁴⁷.

Procesy vedoucí ke vzniku aterosklerotických lézí pak u člověka probíhají relativně velmi pomalu, řadu (až desítky) let (na rozdíl od laboratorních zvířat, kde lze celý tento proces pozorovat typicky během několika měsíců^{13,48}). Zvýšený příjem antioxidantů se tak může projevit až za velmi dlouhou dobu, přičemž podle některých autorů nemohou být antioxidanty přijímané stravou efektivní v pokročilejších stádiích rozvoje aterosklerózy¹³.

Celková antioxidační kapacita plasmy, jako prakticky nejčastěji používaný ukazatel pro hodnocení antioxidační obrany organismu, ve skutečnosti tuto obranu reprezentuje jen částečně, neboť koncentrace antioxidantů v jednotlivých tkáních a orgánech může být výrazně odlišná⁴⁹. Navíc, na celkové antioxidační kapacitě plasmy se významnou měrou podílí přítomné bílkoviny¹⁵, močová kyselina^{30,33} a některé další sloučeniny²⁷. Jejich obsah je přitom ovlivněn řadou faktorů³², a může se např. zvyšovat také po požití některých potravin bohatých na antioxidanty, jako je tomu v případě močové kyseliny, jejíž obsah v plasmě vzrůstá např. po příjmu kávy nebo červeného vína²⁷. Kromě toho nebyl jednoznačně prokázán vztah mezi celkovou antioxidační kapacitou plasmy a rizikem vzniku onemocnění spojovaných tradičně s oxidačním stresem³². Podobně je diskutabilní i vypovídací hodnota obsahu oxidačních produktů DNA v různých tělních teku-

tinách jako indikátoru rizika vzniku nádorových onemocnění a míry účinku antioxidantů *in vivo*^{13,50}.

A nakonec, tkáňové kultury, používané v poslední době také často pro studium možného efektu antioxidantů *in vivo*, modelují situaci v lidském organismu jen částečně. Na rozdíl od buněk lidského těla se totiž tkáňové kultury nacházejí typicky ve stavu hyperoxie, tj. za zvýšeného oxidačního stresu, a navíc jsou tyto kultury typicky deficitní na antioxidanty, zejména tokoferoly a askorbovou kyselinu⁴⁰.

4. Faktory ovlivňující aktivitu antioxidantů při *in vitro* metodách stanovení této aktivity

Jedním z hlavních faktorů ovlivňujících výsledek u metod používaných pro testování antioxidační aktivity *in vitro*^{15,17,51} je princip použité metody, tj. zda se jedná o metodu sledující inaktivaci volných radikálů nebo o metodu měřící redukční schopnost antioxidantů¹⁵. Ačkoliv v řadě případů byla zjištěna dobrá korelace mezi výsledky získanými oběma typy metod^{52–55}, existují přece jen mezi těmito metodami rozdíly v reaktivitě jednotlivých sloučenin. Například u metod měřících redukční schopnost (např. metoda založená na redukci železitých iontů (metoda FRAP) nebo stanovení „veškerých fenolů“ pomocí Folinova-Ciocalteuova činidla) neposkytují (na rozdíl od metod sledujících inaktivaci volných radikálů) odezvu karotenoidů⁵⁶ a další sloučeniny (např. metoda FRAP nedetekuje thioly^{10,15}). Naproti tomu může s použitým oxidačním činidlem reagovat celá řada sloučenin nevyzkazujících schopnost inaktivovat volné radikály¹⁵, jako je tomu v případě použití Folinova-Ciocalteuova činidla např. u oxidu siřičitého či měďných a železnatých iontů, některých sacharidů a řady dalších sloučenin^{10,56}. Někdy je však obtížné odlišit, zda reakce probíhá jako reakce redukční nebo na základě předání vodíkového atomu, a často oba tyto mechanismy probíhají současně^{10,15}, přičemž jejich vzájemný poměr je dán strukturou testovaných antioxidantů, jejich rozpustností v daném systému, pH a použitým rozpouštědlem¹⁰. Typické metody, u nichž se mohou uplatňovat oba reakční mechanismy, jsou přitom metody založené na inaktivaci DPPH a ABTS radikálů^{10,15,17}.

U obou typů metod, tj. jak u metod založených na inaktivaci volných radikálů, tak u metod sledujících redukční vlastnosti antioxidantů, pak záleží na použitém volném radikálu resp. oxidačním činidle¹⁵. Rozhodující přitom je především vztah mezi reaktivitou daného volného radikálu (oxidačního činidla) a testovaného antioxidantu, který definuje možnost proběhnutí příslušné reakce z termodynamického hlediska³⁸. V případě metod založených na redukci vhodných oxidačních činidel jsou mírou této reaktivity příslušné redoxní potenciály¹⁵. U metod sledujících schopnost inaktivace volných radikálů je pak mírou reaktivity disociační entalpie (energie) vazeb^{15,38}, která je však často také nahrazována redoxními potenciály^{11,15,38}. Vliv však mají i další faktory, a to např. vzájemná sterická dostupnost reaktivních skupin oxidačního činidla

(volného radikálu) a antioxidantu, či náboje nesené jednotlivými reaktanty, které mohou způsobit vzájemné přitahování nebo odpuzování reaktantů³⁸.

Výsledky mohou být při stanovení antioxidační aktivity ovlivněny také tím, zda se jedná o kompetitivní nebo nekompetitivní způsob sledování působení antioxidantů. Zatímco u nekompetitivních metod je sledována přímo reakce mezi antioxidantem a oxidačním činidlem (volným radikálem apod.), u kompetitivních metod se reakce (sekvence reakcí) účastní také cílová sloučenina, která je do reakční směsi přidávána jako reprezentant biomolekul, které jsou *in vivo* atakovány oxidanty, a/nebo pro umožnění snadnějšího sledování reakce mezi antioxidantem a oxidovadlem. V případě kompetitivních metod soutěží cílová sloučenina a antioxidant o oxidant (a reakce je obvykle sledována jako úbytek cílové sloučeniny nebo vznik jejího oxidačního produktu). Antioxidační aktivita testované látky je tak ovlivněna (na rozdíl od nekompetitivních metod) nejen rychlostí její reakce s oxidovadlem, ale také rychlostí reakce mezi oxidovadlem a cílovou sloučeninou⁵⁶.

O antioxidační aktivitě však rozhoduje nejen to, zda se jedná o metodu kompetitivní nebo nekompetitivní, ale (v případě kompetitivního stanovení) také použitá cílová sloučenina⁵⁶ a její koncentrace^{56,57}, která ovlivňuje např. reakce radikálů tvořících se z antioxidantů s cílovou sloučeninou (maskující antioxidační aktivitu testovaných látek⁵⁷). Zdůraznit je také nutné skutečnost, že ačkoliv se kompetitivní přístup snaží modelovat situaci *in vivo* (viz dříve), koncentrace cílové sloučeniny je obvykle nižší než koncentrace testovaných antioxidantů, což neodpovídá reálné situaci v organismu, kdy je koncentrace antioxidantů výrazně nižší než koncentrace oxidovatelného substrátu (lipidů, proteinů atd.)^{15,56}.

Dalšími významnými faktory ovlivňujícími výsledek u *in vitro* metod pro stanovení antioxidační aktivity jsou pak doba, po kterou je reakce sledována (pokud je inaktivace volných radikálů nebo redukční schopnost určována vždy po stejné době a nejsou detailně hodnoceny kinetické parametry), neboť různé antioxidanty mohou s použitým radikálem (oxidačním činidlem) reagovat různou rychlostí^{10,15}, způsob vyjádření výsledků a sloučenina použitá pro kalibraci, zejména pokud mají být porovnávány antioxidační aktivity za různých podmínek. Přitom např. hodnota IC₅₀ (EC₅₀; vyjádřená např. v $\mu\text{g ml}^{-1}$), velmi často používaná pro hodnocení schopnosti inaktivovat volné radikály, závisí na použité vstupní koncentraci oxidantu (volného radikálu)⁵⁸. Podobně je rozdíl ve výsledcích v případě, že jsou hodnoceny stechiometrické vlastnosti antioxidantů (tj. počet volných radikálů, které může inaktivovat jedna molekula antioxidantu) ve srovnání s jejich kinetickými vlastnostmi (tj. rychlostí inaktivace volných radikálů⁵⁹). Trolox pak může být použit jako srovnávací standard jak ve vodném, tak lipofilním prostředí, naproti tomu močová kyselina není vhodným srovnávacím standardem při stanovení antioxidační aktivity, a to v důsledku její omezené rozpustnosti ve vodném prostředí při neutrálním pH (cit.⁶⁰).

A v neposlední řadě se u těchto metod může i poměrně výrazně uplatnit existence různých typů interferencí a některé další příbuzné faktory. Z klasických interferencí se přitom může jednat zejména o absorpci záření fenolovými sloučeninami v UV oblasti nebo barvivy ve viditelné oblasti spektra¹⁵. U metod, kde se používají (zejména pro generování volných radikálů) enzymy, se může uplatnit (vedle schopnosti inaktivovat volné radikály) také schopnost některých antioxidantů inaktivovat tyto enzymy^{15,17} a metod, kde se stanovení účasti ionty kovů (zejména železa a mědi), se může (vedle schopnosti antioxidantů redukovat tyto ionty) uplatňovat také jejich chelatační aktivita¹⁵. Možné jsou také další „neplánované“ reakce, jako např. reakce mezi antioxidanty a cílovou sloučeninou u kompetitivních metod¹⁵, přičemž velmi známé jsou zejména nespecifické reakce (vazby způsobující falešně nižší výsledky^{10,15}), ke kterým docházelo mezi polyfenoly, zejména proanthokyanidiny¹⁰, a B-fykoerytrinem, používaným ve starší variantě metody ORAC jako cílová sloučenina^{15,17}.

5. Závěr

Výše uvedené faktory se jak v lidském organismu, tak v potravinách nebo modelových systémech neprojevují izolovaně, ale ve vzájemné součinnosti. Proto je velmi obtížné standardizovat metody pro stanovení antioxidační aktivity, a antioxidanty musí být obecně testovány v systémech, resp. za podmínek, co nejvíce odpovídajících reálnému stavu, ať již se jedná o potraviny nebo organismus^{13,16,38}. Přesto má však svůj nesporný význam také výzkum vlivu jednotlivých faktorů na účinnost antioxidantů. Tomuto studiu však nebyla doposud věnována vždy náležitá pozornost a naše znalosti v této oblasti nejsou stále úplné. Tento výzkum přitom nemusí být náročný na vstupní investice, a je založen především na kombinaci experimentální práce a dobrých znalostí chemie, biochemie a/nebo fyziologie. Proto zde může být velký prostor pro rozšíření stávajícího českého, resp. slovenského příspěvku (např. cit.^{61–65}) ke studiu antioxidantů.

Seznam zkratk

ABTS	2,2'-azinodi(3-ethylbenzothiazol-6-sulfonová kyselina)
AMVN	2,2'-azinodi(2,4-dimethylvaleronitril)
DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl
EC ₅₀	half maximal effective concentration – koncentrace schopná inaktivovat 50 % přítomných volných radikálů
FRAP	ferric reducing antioxidant potential – schopnost antioxidantů redukovat železité ionty
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration – viz EC ₅₀
LDL	low density lipoproteins – lipoproteiny s nízkou hustotou

ORAC	oxygen radical absorbance capacity – schopnost inaktivovat kyslíkové (resp. peroxylové) radikály
VLDL	very low density lipoproteins – lipoproteiny s velmi nízkou hustotou

LITERATURA

- Collins A. R.: *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 261S (2005).
- Roginsky V., Lissi E. A.: *Food Chem.* 92, 235 (2005).
- Sherwin E. R.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 55, 809 (1978).
- Yanishlieva N. V., Marinova E. M.: *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 103, 752 (2001).
- Jacobsen C., Let M. B., Nielsen N. S., Meyer A. S.: *Trends Food Sci. Technol.* 19, 76 (2008).
- Yoshida Y., Saito Y., Jones L. S., Shigeri Y.: *J. Biosci. Bioeng.* 104, 439 (2007).
- Pérez-Jiménez J., Arranz S., Tabernero M., Díaz-Rubio M. E., Serrano J., Goñi I., Saura-Calixto F.: *Food Res. Inter.* 41, 274 (2008).
- Kim D.-O., Lee C. Y.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44, 253 (2004).
- Sun T., Tanumihardjo S. A.: *J. Food Sci.* 72, R159 (2007).
- Prior R. L., Wu X., Schaich K.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 4290 (2005).
- Choe E., Min D. B.: *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 8, 345 (2009).
- Kamal-Eldin A., Appelqvist L.-Å.: *Lipids* 31, 671 (1996).
- Frankel E. N., Finley J. W.: *J. Agric. Food Chem.* 56, 4901 (2008).
- Kiokias S., Gordon M. H.: *Food Rev. Inter.* 20, 99 (2004).
- Karadag A., Ozcelik B., Saner S.: *Food Anal. Methods* 2, 41 (2009).
- Frankel E. N., Meyer A. S.: *J. Sci. Food Agric.* 80, 1925 (2000).
- MacDonald-Wicks L. K., Wood L. G., Garg M. L.: *J. Sci. Food Agric.* 86, 2046 (2006).
- Decker E. A., Warner K., Richards M. P., Shahidi F.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 4303 (2005).
- Tsai P.-J., She C.-H.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 8491 (2006).
- Arts M. J. T. J., Haenen G. R. M. M., Voss H.-P., Bast A.: *Food Chem. Toxicol.* 39, 787 (2001).
- Beutner S., Bloedorn B., Frixel S., Hernández-Blanco I., Hoffmann T., Martin H.-D., Mayer B., Noack P., Ruck C., Schmidt M., Schülke I., Sell S., Ernst H., Haremza S., Seybold G., Sies H., Stahl W., Walsh R.: *J. Sci. Food Agric.* 81, 559 (2001).
- Porrini M., Riso P.: *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 18, 647 (2008).
- Gökmen V., Serpen A., Fogliano V.: *Trends Food Sci. Technol.* 20, 278 (2009).
- Serrano J., Goñi I., Saura-Calixto F.: *Food Res. Inter.* 40, 15 (2007).
- Noguer M., Cerezo A. B., Rentzsch M., Winterhalter P., Troncoso A. M., García-Parrilla M. C.: *J. Agric. Food Chem.* 56, 8879 (2008).
- Toor R. K., Savage G. P., Lister C. E.: *Int. J. Food Sci. Nutr.* 60, 119 (2009).
- Fernandez-Pancho M. S., Villano D., Troncoso A. M., García-Parrilla M. C.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 48, 649 (2008).
- Halliwel B., Rafter J., Jenner A.: *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 268S (2005).
- Stoner G. D., Wang L.-S., Casto B. C.: *Carcinogenesis* 29, 1665 (2008).
- Serafini M., Villano D., Spera G., Pellegrini N.: *Nutr. Cancer* 56, 232 (2006).
- Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J.: *J. Nutr. Biochem.* 13, 572 (2002).
- Scalbert A., Johnson I. T., Saltmarsh M.: *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 215S (2005).
- Halliwel B.: *J. Sci. Food Agric.* 86, 1992 (2006).
- Lakshminarayana R., Raju M., Keshava Prakash M. N., Baskaran V.: *Lipids* 44, 799 (2009).
- Reboul E., Thap S., Tourniaire F., André M., Juhel C., Morange S., Amiot M.-J., Lairon D., Borel P.: *Br. J. Nutr.* 97, 440 (2007).
- Reboul E., Thap S., Perrot E., Amiot M. J., Lairon D., Borel P.: *Eur. J. Clin. Nutr.* 61, 1167 (2007).
- Alexandropoulou I., Komaitis M., Kapsokefalou M.: *Food Chem.* 94, 359 (2006).
- Becker E. M., Nissen L. R., Skibsted L. H.: *Eur. Food Res. Technol.* 219, 561 (2004).
- Dembinska-Kiec A., Mykkänen O., Kiec-Wilk B., Mykkänen H.: *Br. J. Nutr.* 99, ES109 (2008).
- Halliwel B.: *Arch. Biochem. Biophys.* 476, 107 (2008).
- Herrera E., Jiménez R., Aruoma O. I., Hercberg S., Sánchez-García I., Fraga C.: *Nutr. Rev.* 67, S140 (2009).
- Li N., Liu J.-H., Zhang J., Yu B.-Y.: *J. Agric. Food Chem.* 56, 3876 (2008).
- Seifried H. E., Anderson D. E., Fisher E. I., Milner J. A.: *J. Nutr. Biochem.* 18, 567 (2007).
- Kendall M., Batterham M., Prenzler P. D., Ryan D., Robards K.: *Food Chem.* 108, 425 (2008).
- Hercberg S., Czernichow S., Galan P.: *Br. J. Nutr.* 96, S28 (2006).
- Vázquez-Añón M., Nocek J., Bowman G., Hampton T., Atwell C., Vázquez P., Jenkins T.: *J. Dairy Sci.* 91, 3165 (2008).
- Kamal-Eldin A., Pickova J.: *Lipid Technol.* 20, 80 (2008).
- Frankel E. N., German J. B.: *J. Sci. Food Agric.* 86, 1999 (2006).
- Serafini M.: *J. Sci. Food Agric.* 86, 1989 (2006).
- Loft S., Møller P., Cooke M. S., Rozalski R., Olinski R.: *Eur. J. Nutr.* 47, 19 (2008).
- Paulová H., Bochořáková H., Táborská E.: *Chem. Listy* 98, 174 (2004).
- Cosio M. S., Buratti S., Mannino S., Benedetti S.: *Food Chem.* 97, 725 (2006).

53. Dudonné S., Vitrac X., Coutière P., Woillez M., Mérillon J. M.: *J. Agric. Food Chem.* 57, 1768 (2009).
54. Katsube T., Tabata H., Ohta Y., Yamasaki Y., Anuurad E., Shiwaku K., Yamane Y.: *J. Agric. Food Chem.* 52, 2391 (2004).
55. Wojdyło A., Oszmiański J., Laskowski P.: *J. Agric. Food Chem.* 56, 6520 (2008).
56. Magalhães L. M., Segundo M. A., Reis S., Lima J. L. F. C.: *Anal. Chim. Acta* 613, 1 (2008).
57. López-Alarcón C., Aspée A., Lissi E.: *Food Chem.* 104, 1430 (2007).
58. Scherer R., Godoy H. T.: *Food Chem.* 112, 654 (2009).
59. McPhail D. B., Hartley R. C., Gardner P. T., Duthie G. G.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 1684 (2003).
60. Nenadis N., Lazaridou O., Tsimidou M. Z.: *J. Agric. Food Chem.* 55, 5452 (2007).
61. Fidler M., Kolářová L.: *Chem. Listy* 103, 232 (2009).
62. Zeman M., Stopka P., Vecka M., Žák A., Písaříková A., Jiráček R., Staňková B., Vávrová L., Kodydková J., Křížová J., Macáček J.: *Chem. Listy* 103, 667 (2009).
63. Ježková K., Pavlíková P., Dobiáš P., Adam M., Ventura K.: *Chem. Listy* 104, s17 (2010).
64. Nadaský P., Šmogrovičová D.: *Chem. Listy* 104, 838 (2010).
65. Patlevič P., Vašková J., Vaško L., Guzy J., Kluchová D.: *Chem. Listy* 105, 46 (2011).

Z. Réblová (*Department of Food Chemistry and Analysis, Institute of Chemical Technology, Prague*): **External Factors Affecting Antioxidant Activity**

The antioxidant activities depend not only on their reactivity towards radicals (i.e. on their structure), but also on external factors. These are: general factors (temperature, substrate type, pH, or oxygen access), factors acting *in vivo* (bioavailability, interactions with other nutrients or other biological effects of the studied compounds) and the factors acting during *in vitro* determination of the antioxidant activity (the reaction used, interferences).