

Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti

Galušić, Stela

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:477579>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Stela Galušić

7181/BT

**Određivanje antioksidacijske aktivnosti – metode u kojima se primjenjuju
kulture stanica**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 4

Mentor: izv.prof.dr.sc. Kristina Radošević

Zagreb, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti

Stela Galušić, 0058208109

Sažetak: Antioksidansi su spojevi koji pomažu u neutraliziranju slobodnih radikala pa stoga njihovo ispitivanje privlači sve veći interes. Oksidacija izazvana slobodnim radikalima može izazvati razgradnju stanične membrane, mutacije u DNK i razvoj raznih bolesti ljudskog organizma. Za određivanje antioksidacijske aktivnosti nekog spoja koriste se niz metoda koje su zasnovane na različitim principima mjerenja. Ovaj rad daje uvid u razne kemijske metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti. Većina tih metoda ne uzima u obzir biološke parametre potrebne za procjenu utjecaja antioksidansa u *in vivo* uvjetima. Metodom, kod koje se koriste *in vitro* kulture stanica, ispituje se potencijal antioksidansa u staničnom okruženju te se uzima u obzir složenost biološkog sustava i na taj način je moguća bolja procjena utjecaja ispitivanih spojeva u *in vivo* uvjetima.

Ključne riječi: antioksidansi, slobodni radikal, antioksidacijska aktivnost, metode

Rad sadrži: 23 strane, 13 slika, 1 tablicu, 17 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici

**Prehrambeno - biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva
23, 10 000 Zagreb**

Mentor: izv.prof.dr.sc. Kristina Radošević

Datum obrane: 15.09.2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Biotechnology

Department of Bioengineering

Laboratory of Cell Technology and Biotransformation

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Methods for determination of antioxidant activity

Stela Galušić, 0058208109

Abstract: Antioxidants are compounds that help neutralize free radicals and therefore there is an increasing interest for their determination. Oxidation caused by free radicals can cause the breakdown of the cell membrane, mutations in DNA and the development of various diseases of the human body. Various methods based on different reaction principles are used to determine the antioxidant activity of a compound. This paper provides insight into various chemical methods for determination of antioxidant activity. Most of those methods do not take into account the biological parameters which are important for the estimation of antioxidant's effect *in vivo*. The method based on *in vitro* cell culture examines the potential of antioxidants in the cellular environment and takes into account the complexity of the biological system. Therefore, such method provides better activity assessment of the tested compounds related to the *in vivo* conditions.

Keywords: antioxidants, free radicals, antioxidant activity, methods

Thesis contains: 23 pages, 13 figures, 1 table, 17 references

Original in: Croatian

Thesis is printed and electronic form deposited in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: izv.prof.dr.sc. Kristina Radošević

Defence date: 15th of September, 2020

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1 Antioksidansi	2
2.2 Slobodni radikali.....	3
2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti	5
2.3.1. Mehanizmi ispitivanja antioksidacijskog djelovanja	6
2.3.2. Kemijske metode za određivanje antioksidacijskog djelovanja	7
2.3.2.1. ORAC metoda	7
2.3.2.2. TRAP metoda	8
2.3.2.3. PSC metoda	8
2.3.2.4. FRAP metoda	9
2.3.2.5. DPPH metoda.....	9
2.3.2.6. ABTS metoda	10
2.3.2.7. CUPRAC metoda.....	11
2.3.2.8. CERAC metoda	12
2.3.2.9. Test inhibicije lipidne peroksidacije (LPO)	12
2.3.2.10. HORAC metoda	13
2.3.2.11. PFRAP metoda.....	14
2.3.2.12. DMPD metoda	14
2.3.2.13. Testovi za izbjeljivanje	15
2.3.2.14. Ukupni fenolni test Folin-Ciocalteu reagensom	16
2.3.3. Test staničnog antioksidativnog kapaciteta	16
3. ZAKLJUČAK	21
4. LITERATURA	22

1. UVOD

Antioksidansi su spojevi koji sprječavaju ili usporavaju oksidacijske procese u našem organizmu do kojih dolazi zbog djelovanja slobodnih radikala. Zbog reakcija slobodnih radikala s raznim molekulama u ljudskom organizmu može doći do razvoja raznih bolesti čovjeka. Ukoliko slobodne radikale nije moguće ukloniti antioksidacijskom obranom našeg organizma dolazi do oksidacijskog stresa koji uzrokuje oštećenja stanice. Stoga je za zdravlje i pravilan rad stanica od velike važnosti održavanje ravnoteže između antioksidansa i slobodnih radikala u organizmu.

U ovom završnom radu opisane su metode za mjerenje antioksidacijske aktivnosti budući da se one danas vrlo često koriste u raznim istraživanjima antioksidativnog djelovanja raznih tvari, od novosintetiziranih spojeva, spojeva izoliranih iz većinom biljnog materijala do raznih biljnih ekstrakata. Potraga i otkriće spojeva s antioksidacijskim djelovanjem važno je za razna područja primjene, a ponajprije za prehrambenu i farmaceutsku industriju. Ne postoji univerzalna metoda za ispitivanje antioksidacijskog kapaciteta, već se koriste razne metode koje se temelje na različitim reakcijskim mehanizmima. Mehanizmi na kojima se temelji najveći broj metoda je prijenos atoma vodika i prijenos elektrona. Za odabir odgovarajuće metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta važno je razumijevanje mehanizama metode te poznavanje njenih prednosti i nedostataka. Bitno je izabrati odgovarajuću metodu kako bismo dobili što bolji uvid u stvarni potencijal ispitivanog antioksidansa. *In vitro* kemijska ispitivanja ne daju podatke o apsorpciji i metabolizmu antioksidanata jer ne odražavaju fiziološka stanja, stoga spoj koji pokazuje dobra antioksidacijska svojstva u *in vitro* kemijskim ispitivanjima nije nužno i biološki aktivan. Kemijske metode za ispitivanje antioksidacijskog kapaciteta opisane u ovom radu su ORAC, ABTS, FRAP, DPPH, DMPD, TRAP, PSC, PFRAP, CUPRAC, CERAC, HORAC, testovi za izbjeljivanje i test inhibicije lipidne peroksidacije. U radu je pojašnjen i test staničnog antioksidativnog kapaciteta (CAA, eng. *cellular antioxidant activity assay*), *in vitro* metode kojim se postiže bolji uvid u stvarne antioksidacijske sposobnosti ispitivanih spojeva, jer se antioksidacijsko djelovanje spoja određuje u prisutnosti stanica.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Antioksidansi

Antioksidansi su tvari koje štite stanice od oksidacijskog djelovanja slobodnih radikala. Glavni mehanizam djelovanja antioksidansa je stupanje u reakcije sa slobodnim radikalima. Antioksidans predaje svoj elektron slobodnom radikalumu i na taj način ga stabilizira, a sam ne postaje slobodni radikal. Mehanizam djelovanja antioksidansa uključuje onemogućavanje stvaranje novih slobodnih radikala, uništavanje postojećih radikala ili popravljjanje oštećenja uzrokovano slobodnim radikalima. Glavne skupine spojeva s antioksidacijskim aktivnostima su vitamini, karotenoidi i polifenoli. Dva vitamina koja pokazuju najbolje antioksidacijsko djelovanje su vitamin C i vitamin E. Vitamin C je hidrofilni antioksidans koji u svojoj strukturi ima četiri -OH skupine koje može donirati vodikom ili oksidiranom sustavu. Vitamin E je lipofilni antioksidans koji sadrži tokoferolsku skupinu koja pokazuje antioksidacijsku aktivnost. Predstavnici karotenoida koji pokazuju najveću antioksidacijsku aktivnost su β -karoten, ksantofili i likopen. β -karoten je provitamin vitamina A i smatra se jednim od najjačih prirodnih antioksidansa. Polifenoli su spojevi prirodno prisutni u biljnim organizmima. Skupine polifenola koje pokazuju antioksidacijske sposobnosti su flavonoidi, fenolne kiseline, antocijanini, tanini, izoflavoni, stilbeni i lignani (Rice-Evans i sur., 1997).

Antioksidansi, odnosno spojevi koji djeluju protiv slobodnih radikala i onemogućuju njihov negativni učinak na organizam, mogu se podijeliti na nekoliko načina ovisno o načinu djelovanja (neenzimski i enzimski), prema fizikalno-kemijskim svojstvima (lipofilni i hidrofilni), izvoru spoja (prirodni i sintetski) te načinu prisutnosti u organizmu (endogeni ili egzogeni) (Gupta, 2015). Neenzimski antioksidansi prekidaju lančane reakcije slobodnih radikala. U tu se skupinu ubrajaju vitamin C, vitamin E, biljni polifenoli, karotenoidi i glutation (GSH). GSH je prirodni antioksidans koji sadrži cistein, glicin i glutaminsku kiselinu i nalazi se u svakoj stanici našeg organizma. Sadrži sulfhidrilnu skupinu koja je donor elektrona u reakciji sa slobodnim radikalima i na taj način ih stabilizira dok se ona reducira u disulfidni oblik. Sintetizira se većinskim dijelom u jetri, ali može se unijeti i hranom. Enzimski antioksidansi razgrađuju i uklanjaju slobodne radikale tako što ih u višestupanjskom procesu pretvaraju u vodikov peroksid, a zatim i u vodu pomoću kofaktora kao što su željezo, cink, bakar i mangan. Ta se vrsta antioksidansa proizvodi u našem tijelu i to su: katalaza, superoksid dismutaza,

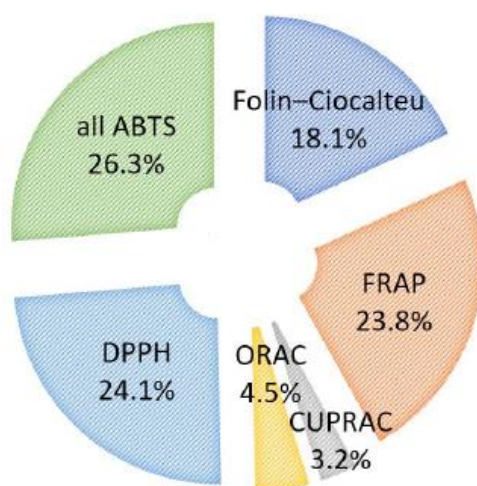
glutation peroksidaza i glutation reduktaza. Antioksidansi se mogu podijeliti i na one topljive u lipidima (lipofilni) i one topljive u vodi (hidrofilni). Skupini lipofilnih antioksidansa pripadaju vitamin E, vitamin A, karotenoidi, lipoična kiselina. Oni se primarno nalaze u staničnoj membrani. Štite stanične membrane od lipidne peroksidacije. Lipidna peroksidacija je proces u kojem reakcijom slobodnog radikala i polinezasićene masne kiseline nastaje lipoperoksil slobodni radikal koji svojim djelovanjem može započeti lančanu reakciju sa štetnim posljedicama u membranskoj strukturi. Hidrofilni antioksidansi su vitamin C, polifenoli, glutation i prisutni su u vodenim tjelesnim tekućinama, krvi te u i oko stanica. Također, antioksidansi se mogu podijeliti na prirodne i umjetne. Većina umjetnih, odnosno sintetičkih antioksidansa je fenolnog tipa. Razlike u njihovim antioksidacijskim aktivnostima povezane su s njihovim kemijskim strukturama koje također utječu na njihova fizikalno-kemijska svojstva kao što su termostabilnost, hlapljivost i topivost. Prirodni antioksidansi prisutni su ponajprije u voću, povrću, a kao razni ekstrakti ili čisti spojevi koriste se kao dodaci prehrani. Njima pripadaju askorbinska kiselina, fenolne kiseline, α -tokoferol, flavonoidi, lignani, kumarini, fenolni polimeri i dr. U današnje vrijeme sve je veći interes za prirodnim antioksidansima koji se intenzivno istražuju. Nadalje, prema načinu unosa u organizam razlikujemo endogeno proizvedene antioksidanse koji kataliziraju uklanjanje slobodnih radikala u organizmu te egzogene antioksidanse koje unosimo hranom i dodacima prehrani poput fenolnih kiselina, karotenoida i vitamina. Djelovanje tih spojeva iz prehrambenih biljnih izvora može povećati razinu zaštitnih antioksidansa u tijelu. Na kraju, još je jedna moguća podjela antioksidansa na osnovne, odnosno one koji sprječavaju lančane reakcije oksidacije i sekundarne ili preventivne koji usporavaju brzinu oksidacije.

2.2. Slobodni radikali

Slobodni radikali su vrlo reaktivni spojevi koji u vanjskoj elektronskoj ljusci imaju jedan ili više nesparenih elektrona. Nastaju homolitičkim cijepanjem kovalentne veze i svoju reaktivnost duguju upravo tim nesparenim elektronima. Svojim djelovanjem mogu oštetiti stanice u ljudskom organizmu zbog oksidacije koja može rezultirati razgradnjom stanične membrane, oštećenjem membranskih proteina i mutacijama u DNK. Takvo djelovanje slobodnih radikala povezuje se sa starenjem i razvojem mnogih bolesti poput ateroskleroze, koronarne srčane bolesti, raka, oštećenja kože, dijabetesa (Gupta, 2015). Slobodni radikali skupljaju se u staničnoj membrani pa su lipidi u

2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Određivanje antioksidacijske aktivnosti spojeva može se provoditi kemijskim metodama te *in vitro* metodom sa stanicama. Kemijska ispitivanja ne odražavaju fiziološku aktivnost spoja, jer se tu ne uzima u obzir apsorpcija i metabolizam antioksidanata koja se odvija u živom organizmu. Kemijske metode za ispitivanje antioksidacijskog kapaciteta su: ORAC, ABTS, FRAP, DPPH, DMDP, TRAP, PSC, PFRAP, CUPRAC, CERAC, HORAC, testovi za izbjeljivanje i test inhibicije lipidne peroksidacije. Budući da spoj koji pokazuje dobra antioksidacijska svojstva u kemijskim ispitivanjima ne mora nužno biti i biološki aktivan poželjno je koristiti *in vitro* metodu u kojoj se primjenjuju kulture stanica. *In vitro* metoda u kojoj se primjenjuje kultura stanica, tzv. test staničnog antioksidativnog kapaciteta (CAA, eng. *cellular antioxidant activity*) daje bolji uvid u stvarnu antioksidacijsku sposobnost ispitivanog spoja jer se antioksidacijsko djelovanje određuje u prisutnosti stanica (Bender i Graziano, 2015). Metode za mjerenje antioksidacijske aktivnosti danas se vrlo često koriste u istraživanjima antioksidativnog djelovanja raznih tvari, od nosintetiziranih spojeva, spojeva izoliranih iz većinom biljnog materijala do raznih biljnih ekstrakata, a prikaz najcitiranijih metoda u 2018.g. dan je na slici 2.

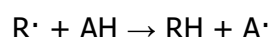


Slika 2. Prikaz najcitiranijih metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka u 2018. godini (Ilyasov i sur., 2020).

2.3.1. Mehanizmi ispitivanja antioksidacijskog djelovanja

Većina ispitivanja antioksidacijskog kapaciteta mogu se podijeliti u analize ispitivanja vodika (HAT, eng. *hydrogen atom transfer*) i ispitivanja na bazi prijenosa elektrona (ET, eng. *electron transfer*) (Gupta, 2015). Analize zasnovane na HAT i ET principu namijenjene su mjerenju sposobnosti tvari da uklanja radikal ili oksidant.

HAT analiza mjeri sposobnost antioksidansa da deaktiviraju slobodne radikale donacijom vodikovog atoma što se može prikazati reakcijom:



Dobiveni radikal $A\cdot$ nastao reakcijom slobodnog radikala i antioksidansa stabilizira se rezonancijom. Fluorescentna proba i antioksidansi reagiraju s radikalom (najčešće peroksilnim radikalom) i antioksidacijska aktivnost određuje se iz konkurencijske kinetike mjerenjem raspada fluorescentne probe u odsutnosti i prisutnosti antioksidansa što se mjeri spektrofluorometrijski.

Analiza zasnovana na ET-u podrazumijeva reakciju antioksidansa s fluorescentnom ili obojenom probom umjesto radikala i bazira se na redoks reakciji:

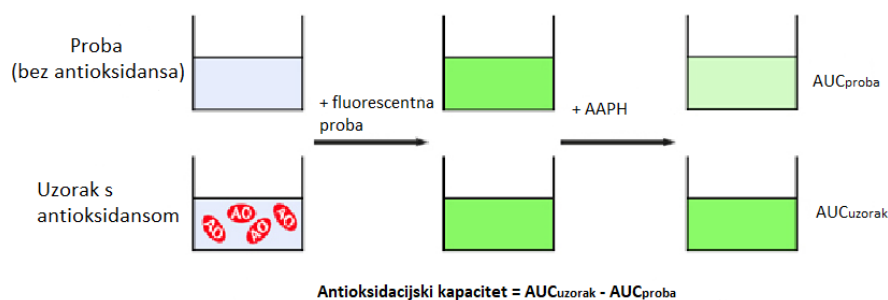


Temelji se na spektrofotometrijskom testu koji mjeri sposobnost antioksidansa da prijenosom elektrona reducira oksidans čime se mijenja intenzitet boje kad je smanjena njegova količina. Stupanj promjene boje povezan je s koncentracijom antioksidansa u uzorku.

2.3.2. Kemijske metode za određivanje antioksidacijskog djelovanja

2.3.2.1. ORAC metoda

ORAC (eng. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) test pokazuje kapacitet apsorpcije radikalnih kisika. Jedna je od standardiziranih metoda za određivanje antioksidativnog kapaciteta spojeva za koje se zna ili pretpostavlja antioksidativna aktivnost. Temelji se na antioksidacijskoj sposobnosti spoja da inhibira oksidativnu razgradnju fluorescentne probe. Kao fluorescentna proba najčešće se koristi fluorescein. Radikali uzrokuju degradaciju fluorescentne probe što rezultira gubitkom fluorescencije. Smanjivanje fluorescencije mjeri se optički, a antioksidativno mjerenje prati se kao gubitak fluorescencije u prisutnosti antioksidansa, budući da se antioksidansi suprotstavljaju toj reakciji. Analiza mjeri gubitak fluorescencije fluoresceina tijekom vremena pri 37 °C zbog stvaranja peroksil radikala nastalog raspadom AAPH, odnosno 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorida. AAPH kemijski je spoj koji se koristi kao generator slobodnih radikala. Peroksilni radikal može oksidirati fluorescein i na taj način nastaje produkt koji ne fluoresceira. Antioksidansi suzbijaju tu reakciju mehanizmom prijenosa atoma vodika i na taj način inhibiraju oksidativnu degradaciju fluoresceinskog signala. Signal fluorescencije mjeri se tijekom 30 minuta pobuđenjem na 485 nm i emisijom na 538 nm (Gupta, 2015). Koncentracija antioksidansa u ispitivanom uzorku proporcionalna je intenzitetu fluorescencije tijekom ispitivanja i procjenjuje se usporedbom neto površine ispod krivulje s koncentracijom poznatog antioksidansa, Trolox-a. Trolox je vodotopljivi analog vitamina E i služi kao pozitivna kontrola koja inhibira raspad fluoresceina na način ovisan o dozi. Različite koncentracije Trolox-a koriste se kako bi se napravila baždarna krivulja standarda s kojom se uspoređuju dobiveni rezultati. Potrebno je napraviti i slijepu probu koja umjesto uzorka antioksidansa sadrži pufer. Na kraju ispitivanja antioksidacijski kapacitet antioksidansa dobiva se oduzimanjem vrijednosti slijepe probe od vrijednosti dobivene za ispitivani uzorak antioksidansa (Slika 3). U prvotnom ORAC testu korišten je fluorescentni protein β -fikoeritrin koji je kasnije zamijenjen fluoresceinom zbog njegove nedosljednosti, osjetljivosti na svjetlo i problema s vezanjem polifenola (Gupta, 2015).



Slika 3. Shematski prikaz ORAC metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta.

Glavna prednost navedene ORAC metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta je što se mjerenje odvija pri 37 °C, odnosno pri fiziološkim uvjetima, stoga se smatra da ta kemijska metoda može najbolje predvidjeti antioksidacijsko djelovanje ispitivanog spoja *in vivo*, odnosno u organizmu.

2.3.2.2. TRAP metoda

TRAP (eng. *Total Peroxyl Radical trapping antioxidant Parameter*) metodom mjeri se sposobnost antioksidansa u onemogućavanju reakcije između peroksilnog radikala i fluorescentne probe. Koristi R-fikoeritrin (R-PR) kao fluorescentnu probu. Napredak reakcije R-fikoeritrina s AAPH prati se fluorometrijski, pobuđivanjem na 495 nm i emisijom na 575 nm. R-PR je fluorescentna boja izvorno je izolirana iz crvenih algi *Gracilaria Sp.* (Gupta, 2015). TRAP vrijednosti izračunavaju se iz duljine kašnjenja lag faze u prisutnosti antioksidansa u odnosu na Trolox. Vremenski interval indukcije reakcije (lag faza) produžuje se djelovanjem preventivnih antioksidansa koji usporavaju brzinu oksidacije ili djelovanjem antioksidansa koji sprječavaju lančane reakcije.

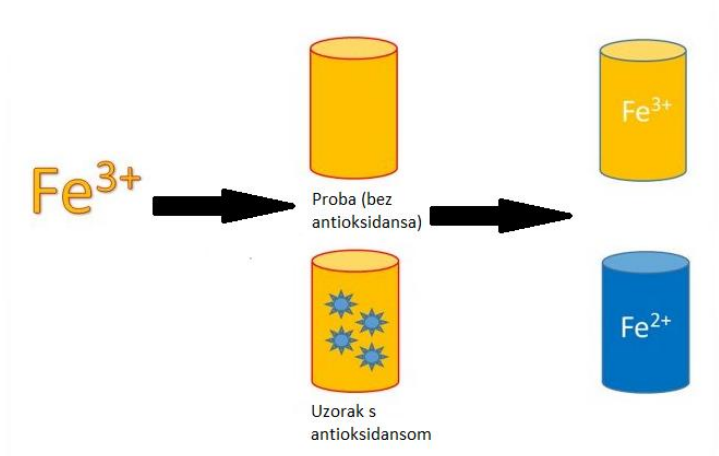
2.3.2.3. PSC metoda

PSC (eng. *peroxyl radical scavenging capacity*) metoda temelji se na stupnju inhibicije oksidacije diklorofluorosceina antioksidansima koji uklanjaju peroksilne radikale koji su nastali termičkom razgradnjom AAPH-a. PSC analiza je točna, precizna i ponovljiva

metoda i daje rezultate usporedive s onima sličnih testova. PSC test može se koristiti za analizu hidrofilnih i lipofilnih antioksidansa te ekstrakata hrane.

2.3.2.4. FRAP metoda

FRAP (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) testom mjeri se antioksidacijski potencijal uzorka na principu redukcije kompleksa željeza (III) s 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazinom (Fe^{3+} - TPTZ) u kompleks Fe^{2+} - TPTZ pomoću antioksidansa prisutnih u ispitivanim uzorcima (Slika 4). Reakcija se odvija pri pH 3,6. Nakon redukcije Fe^{3+} -TPTZ kompleksa stvara se plavo obojeni kompleks koji se očitava spektrofotometrijski pri 593 nm. Promjena apsorpcije izravno je povezana s kombiniranom ili „ukupnom“ smanjenom snagom antioksidansa koji doniraju elektrone u reakcijskoj smjesi. Kao referentna otopina koristi se otopina željezovog sulfata. Nedostatak ove metode je to što će svaka tvar, bez obzira na njenu antioksidacijsku sposobnost, koja ima niži redoks potencijal od potencijala (Fe^{3+} - TPTZ/ Fe^{2+} - TPTZ) dovesti do redukcije tog kompleksa i na taj način rezultirati netočnim rezultatima analize.

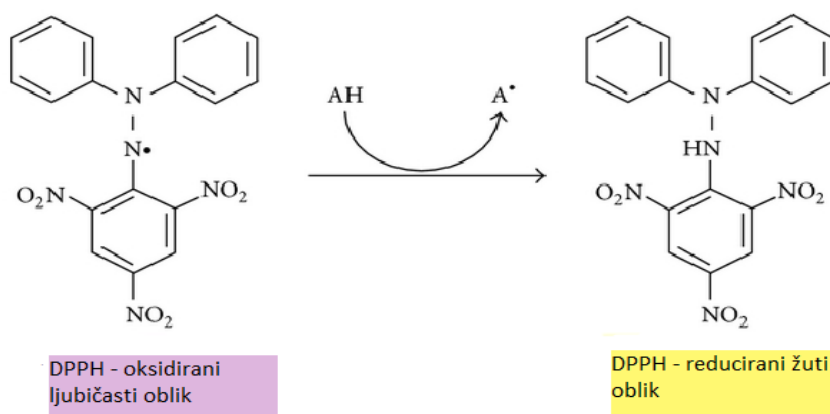


Slika 4. Shematski prikaz FRAP metode određivanja antioksidacijskog kapaciteta.

2.3.2.5. DPPH metoda

DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) je stabilan, ljubičasto obojen dušikov radikal. Svoju stabilnost duguje svojstvu delokalizacije slobodnog elektrona zbog kojeg molekula ne dimerizira. Djelovanjem antioksidansa DPPH radikal reducira se u DPPH spoj blijedožute boje. Antioksidativni kapacitet ispitivanog uzorka izračunava se na temelju

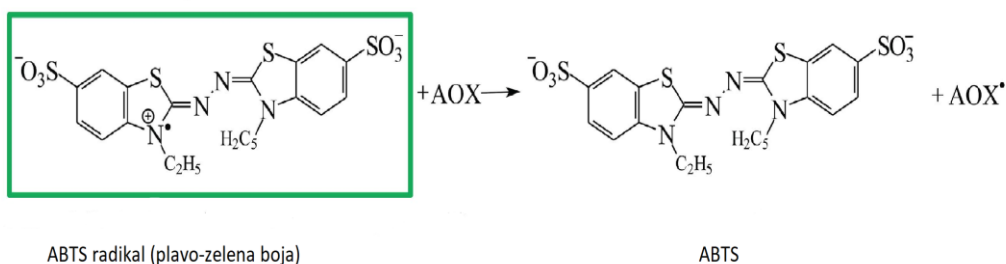
postotka obezbojenja DPPH radikala. Sposobnost antioksidansa da reduciraju DPPH radikal prati se mjerenjem promjene apsorbancije na 517 nm.



Slika 5. Reakcija DPPH radikala s antioksidansom (Gupta, 2015).

2.3.2.6. ABTS metoda

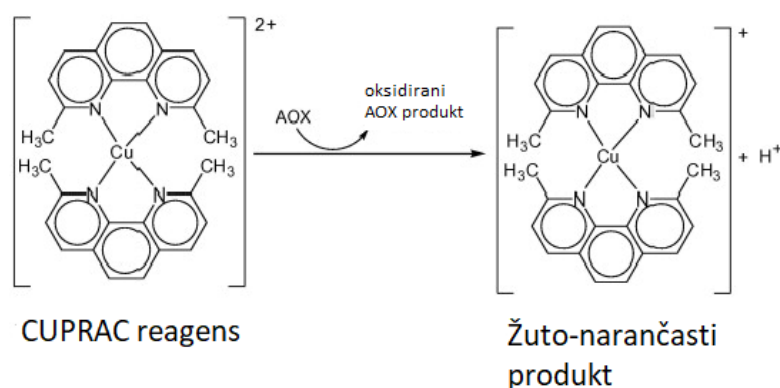
ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) je spoj koji enzim peroksidaza katalizira do radikal-kationa. Reaktivnost raznih ispitanih antioksidansa uspoređuje se s reakcijom Troloxa koji je vodotopljiv analog vitamina E. Zbog toga se ova metoda često naziva ispitivanjem Trolox ekvivalentne antioksidacijske sposobnosti, odnosno TEAC (eng. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*). Razlika između inicijalnog TEAC testa i sadašnjeg, poboljšanog je u inicijatoru radikala. Prije se koristio metmioglobin, a sad se koristi kalijev persulfat (Ilyasov i sur., 2020). $ABTS^{\cdot+}$ najčešće se generira dan prije provođenja reakcije miješanjem kalijevog persulfata i ABTS-a. Kalijev persulfat oksidira ABTS i nastaje $ABTS^{\cdot+}$ što se može primijetiti promjenom boje iz bezbojne u plavo-zelenu. ABTS radikal-kation reaktivan je prema velikom broju antioksidansa, među kojima su vitamin C, fenolne kiseline i tioli i primjenjiv je i za lipofilne i hidrofilne spojeve. Apsorbira svjetlost pri 734 nm. Tijekom kemijske reakcije ABTS radikal-kation pretvara se u bezbojni neutralni oblik (Slika 6). Nedostatak ove metode je to što ABTS radikal nije prirodno prisutan u biološkim sustavima i po svojoj strukturi i reaktivnosti nije sličan onim radikalima koji mogu biti prisutni u organizmu.



Slika 6. Reakcija ABTS radikala s antioksidansom (Gupta, 2015).

2.3.2.7. CUPRAC metoda

CUPRAC (eng. *cupric ion reducing antioxidant capacity*) metoda temelji se na redoks reakciji CUPRAC reagensa (bakar (II) neokuproin, Cu(II) – Nc) i antioksidansa (Slika 7). Produkt te reakcije je Cu (I) – Nc kelat kojemu se mjeri apsorbancija na 450 nm nakon 30 minuta provođenja reakcije (Gupta, 2015). Ova metoda je povoljnija u odnosu na druge metode zasnovane na ET-u jer je radni pH za ovu analizu fiziološki pH 7, za razliku od kiselog pH korištenog u FRAP metodi ili alkalnog pH korištenog u Folinovoj metodi. CUPRAC test primjenjiv je na hidrofilne i lipofilne antioksidanse, što je još jedna njegova prednost u odnosu na druge testove. Također, ima selektivno djelovanje na antioksidativne spojeve bez utjecaja na šećere i limunsku kiselinu koji su obično prisutni u namirnicama. Ova metoda je jednostavno i široko primjenjiva za ispitivanje sposobnosti antioksidansa kao što su flavonoidi, tioli, vitamin C, vitamin E, fenolne kiseline, hidroksicinaminske kiseline i sintetički antioksidansi (Apak i sur., 2007). CUPRAC reagens ne sadrži niti jedan radikal u reagensu pa je stoga neosjetljiv na niz fizikalnih parametara poput temperature, pH, sunčeve svjetlosti i vlage.



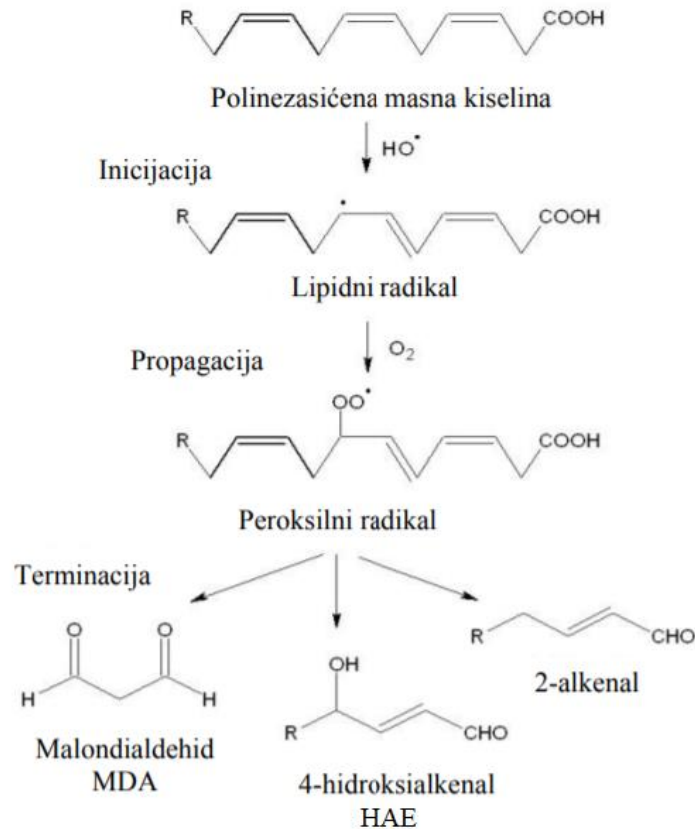
Slika 7. Reakcija CUPRAC reagensa s antioksidansom (Gupta, 2015).

2.3.2.8. CERAC metoda

CERAC metoda temeljena je na redukciji cerijeveg iona Ce^{4+} pri čemu dolazi do selektivne oksidacije antioksidativnih spojeva poput kvercetina, galne kiseline, askorbinske kiseline, ali ne i limunske kiseline i reducirajućih šećera. Temelji se na reakciji prijenosa elektrona između iona Ce^{4+} i antioksidansa u optimiziranom kiselom sulfatnom mediju te određivanju nastalih Ce^{3+} iona fluorometrijskom metodom. Intenzitet fluorescencije povezan je s antioksidacijskom snagom ispitivanog uzorka. Krivulja titracije predstavlja intenzitet signala u odnosu na koncentraciju antioksidansa. Metoda je ponovljiva i pokazuje dobru povezanost s referentnim metodama kao što su ABTS metoda i CUPRAC test (Ozyurt i sur., 2011).

2.3.2.9. Test inhibicije lipidne peroksidacije (LPO)

Lipidna peroksidacije (LPO) je niz reakcija koje rezultiraju staničnim oštećenjem u biljaka i životinja. Slobodni radikali „uzimaju“ elektron lipidima u staničnim membranama, što uzrokuje njeno oštećenje. Lipidna peroksidacija najčešće pogađa polinezasićene masne kiseline i odvija se u tri faze: inicijacija, propagacija i terminacija (Slika 8).



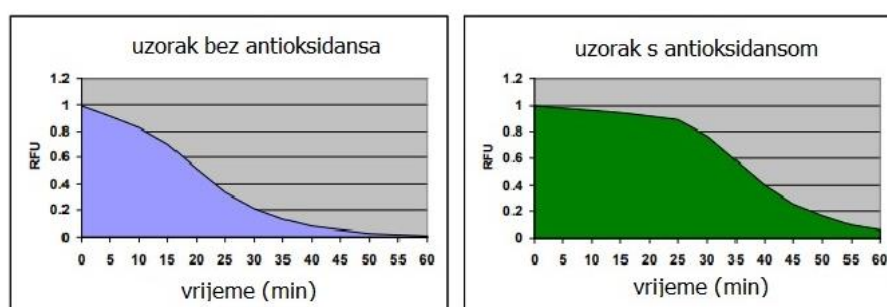
Slika 8. Mehanizam lipidne peroksidacije.

Test inhibicije lipidne peroksidacije koristi se kao pokazatelj oksidativnog stresa u stanicama i tkivima. Lipidni peroksidi su nestabilni spojevi i razgrađuju se pri čemu tvore složen niz spojeva uključujući reaktivne karbonilne spojeve. Polinezasićeni peroksidi masnih kiselina stvaraju malondialdehid (MDA) i 4-hidroksialkenal (HAE) nakon razgradnje, a mjerenje MDA i HAE korišteno je kao pokazatelj peroksidacije lipida. MDA je toksičan produkt lipidne peroksidacije i dovodi do oštećenja DNA i stanične membrane čime doprinosi nastajanju mutacija. Analiza se temelji na reakciji kromogenog reagensa *N*-metil-2-fenilindola s MDA i HAE na 45 °C. Jedna molekula MDA ili HAE reagira s 2 molekule *N*-metil-2-fenilindola čime se dobiva stabilni produkt karbocijaninske boje s maksimalnom apsorbancijom na 586 nm.

2.3.2.10. HORAC metoda

Hidroksilni radikal nastaje Co^{2+} posredovanom Fentonovom reakcijom. Krivulja raspadanja fluorescencije prati se u odsutnosti i prisutnosti antioksidansa što je indeks

sposobnosti prevencije hidroksilnih radikala. Kod HORAC metode (eng. *hydroxyl radical averting capacity*) kao standard koristi se galna kiselina, a aktivnost se izražava kao ekvivalent galne kiseline. Na grafičkom prikazu (Slika 9) prikazana je promjena fluorescencije u vremenu u odsutnosti i prisutnosti antioksidansa. Antioksidansi blokiraju oksidaciju fluoresceina posredovanu hidroksilnim radikalima sve dok se ne iscrpi sva antioksidativna aktivnost u uzorku, nakon čega hidroksilni radikali reagiraju i smanjuju fluorescenciju fluoresceina. Područje ispod krivulje koristi se za kvantificiranje ukupne antioksidativne aktivnosti naspram hidroksilnih radikala i uspoređuje se sa standardnom krivuljom dobivenom upotrebom različitih koncentracija galne kiseline.



Slika 9. Prikaz principa HORAC metode.

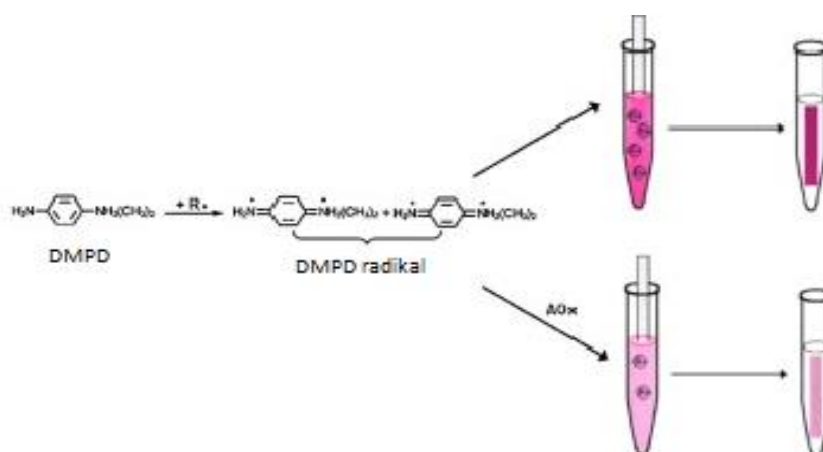
2.3.2.11. PFRAP metoda

PFRAP (eng. *Potassium ferricyanide reducing power assay*) metoda temelji se na redukciji željeza Fe^{3+} u željezo Fe^{2+} što se postiže u prisutnosti antioksidansa. Tvari koje imaju potencijal redukcije reagiraju s kalijevim ferocijanidom formirajući kalijev ferocijanid koji dalje reagira s FeCl_3 i tvori intenzivan plavi kompleks koji ima maksimalnu apsorbanciju na 700 nm. Količina formiranog kompleksa izravno je proporcionalna sa smanjenom antioksidativnom snagom ispitivanog uzorka.

2.3.2.12. DMPD metoda

DMPD metoda koristi se za mjerenje antioksidacijske aktivnosti u uzorcima hrane. Ljubičasta boja dugovječnog DMPD (*N,N*-dimetil-p-fenilendiamin) radikalnog kationa nastaje reakcijom između DMPD-a i kalijevog persulfata i nakon toga se smanjuje u

prisustvu vodika kojeg donira antioksidans (Slika 10). Određivanje se vrši pri pH 5,25 pomoću 0,1 M acetatnog pufera. Ova metoda ima prednost u odnosu na metodu u kojoj su ioni željeza uključeni u stvaranje radikalnog kationa koji bi Fentonovom reakcijom mogao izazvati negativna odstupanja u antioksidacijskoj aktivnosti prehrambenih ekstrakata. Također, ova metoda primjenjiva je i na lipofilne i hidrofilne antioksidanse te je brza, jeftina i ponovljiva.



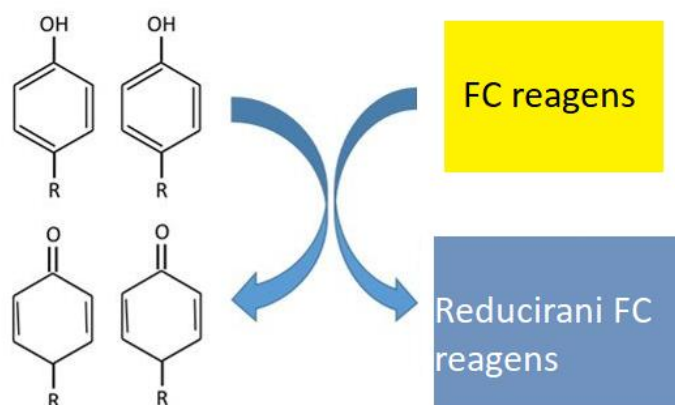
Slika 10. Shematski prikaz reakcije DMPD radikala.

2.3.2.13. Testovi za izbjeljivanje

Postoje dva različita testa za izbjeljivanje; β -karotenski test za izbjeljivanje i Crocin test za izbjeljivanje, a oba se temelje na HAT mehanizmu. Kod β -karotenskog testa za izbjeljivanje, β -karoten gubi svoju žutu boju u reakciji sa slobodnim radikalima koji su nastali oksidacijom linolenske kiseline. Uzorak koji sadrži antioksidans dodaje se u reakcijsku smjesu i uzrokuje smanjenje obezbojenja β -karotena. Mjeri se smanjenje brzine raspada β -karotena i ta promjena prati se spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije pri 470 nm u intervalima od 10 minuta (Gupta, 2015). Princip Crocin testa za izbjeljivanje isti je kao kod β -karotenskog testa samo se prati smanjenje obezbojenja krocina. Krocina se koristi često umjesto β -karotena, jer do obezbojenja β -karotena može doći zbog različitih utjecaja što može raditi probleme pri interpretaciji rezultata. Krocina nije komercijalno dostupan spoj nego se mora ekstrahirati iz šafrana.

2.3.2.14. Ukupni fenolni test Folin-Ciocalteu reagensom

Ova metoda koristi se za mjerenje udjela fenola u različitim vrstama namirnica. Fosfomolibdenska i fosfovolframova kiselina, od kojih se sastoji Folin-Ciocalteu reagens, u reakciji s fenolima reduciraju se u plavo obojene okside (Slika 11). Intenzitet nastalog obojenja proporcionalan je koncentraciji fenolnih komponenata u uzorku i mjeri se spektrofotometrijski. Produkti reakcije metalnih oksida imaju plavu boju koja pokazuje široku apsorpciju s maksimumom pri 765 nm. Ova metoda provodi se isključivo u vodenom mediju pa nije prikladna za lipofilne antioksidanse.



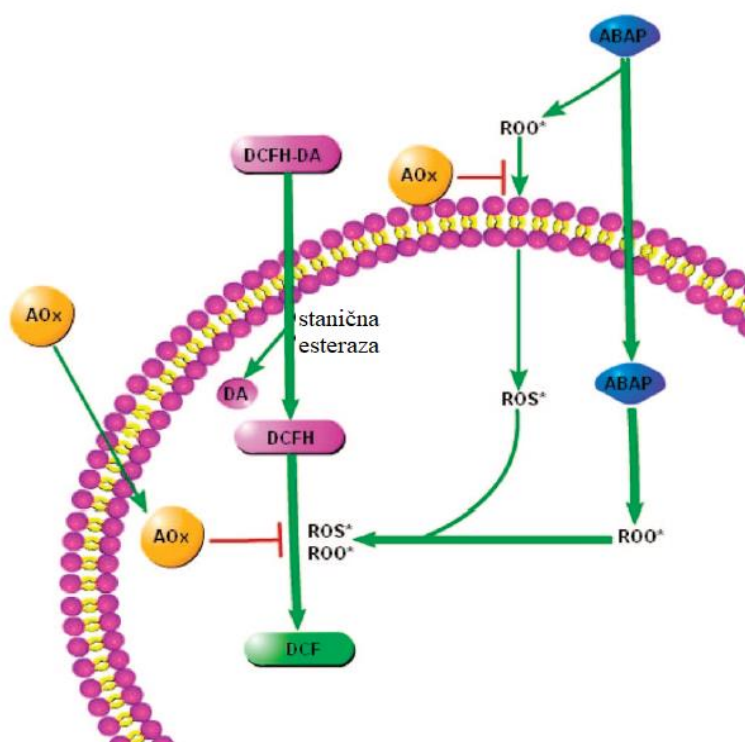
Slika 11. Redukcija Folin – Ciocalteu reagensa.

2.3.3. Test staničnog antioksidativnog kapaciteta

Kod metoda temeljenih na raznim kemijskim reakcijama poput ORAC, TRAP, ABTS i drugih, sposobnost predviđanja *in vivo* aktivnosti ispitivanih spojeva kao potencijalnih antioksidansa upitna je iz niza razloga. Neke od navedenih metoda izvode se pri pH i temperaturi drugačijima od fizioloških uvjeta, a nijedna od tih metoda ne uzima u obzir bioraspoloživost, unos i metabolizam antioksidativnih spojeva u samom organizmu. Protokoli kemijskih testova za određivanje antioksidacijske aktivnosti često ne uključuju odgovarajuće biološke supstrate koje treba zaštititi, relevantne vrste oksidanata na koje se nailazi ili razdiobu spojeva između vodene i lipidne faze. Biološki sustavi složeniji su od korištenja jednostavnih kemijskih smjesa, a antioksidansi mogu djelovati putem više različitih mehanizama. Test staničnog antioksidativnog kapaciteta (CAA, eng. *cellular antioxidant activity assay*) služi za procjenu antioksidacijske

sposobnosti odabranog spoja u staničnoj sredini. Aktivnost antioksidativnih spojeva mjeri se unutar ljudskih stanica. Ovom metodom u obzir se uzimaju aspekti biorasploživosti, staničnog unosa, distribucije i metabolizma antioksidansa unutar stanica. U odnosu na ostale metode, model stanične antioksidacijske aktivnosti bolje opisuje složenost bioloških sustava i važan je u procjeni hrane, dodataka prehrani i fitokemikalija koje imaju potencijalnu antioksidativnu aktivnost. Daje jasniju sliku o tome kako antioksidanti djeluju u živoj stanici (*in vivo*) u usporedbi s kemijskim metodama „u epruveti“ (*in vitro*). CAA metoda je skuplja od *in vitro* metoda i nije prikladna za početnu procjenu antioksidansa u hrani i prehrambenim dodacima. Kao modelne stanice za određivanje oksidativnog stresa mogu se koristiti stanice jetre jer su one najvažnije mjesto za metabolizam ksenobiotika, a koriste se često za procjenu kemoprotetivnog učinka dijetalnih spojeva. Ljudska HepG2, diferencirana stanična linija izolirana iz karcinoma jetre, koristi se kao pouzdan model u takvim ispitivanjima (Wolfe i Liu, 2007). U metodi se koristi peroksilni radikal koji je najčešći slobodni radikal u ljudskom tijelu i fluorescentna proba za mjerenje sposobnosti antioksidativnih spojeva da spriječe oksidaciju. Pasivnom difuzijom molekule stresa i prekursor probe prolaze kroz staničnu membranu te se unutar stanice prekursor proba oksidira u fluorescentni spoj. Antioksidansi koji se apsorbiraju unutar stanice mogu spriječiti tu reakciju oksidacije, što rezultira smanjenjem stanične fluorescencije. Kao fluorescentni spoj najčešće se koristi DCFH-DA (2',7'-diklorofluorescin diacetat) koji se u prisutnosti reaktivnih kisikovih vrsta oksidira u DCF. Velik broj ROS-a u stanju je oksidirati DCFH-DA do fluorescentnog DCF-a (H_2O_2 , peroksininitrit $ONOO^-$, dušikov oksid NO^\bullet , peroksilni radikali, superoksid, hidroksilni radikali) što ga čini vrlo dobrim spojem za mjerenje oksidativnog stresa u stanicama. Oksidacija DCFH-DA u DCF koristi se kao pokazatelj oksidativnog stresa i njegovog suzbijanja dodatkom fitokemikalija i biljnih ekstrakata u staničnim kulturama. Koncentracija fluorescentnog spoja DCF-a može se mjeriti fluorescentnim čitačem ploča. Za generiranje peroksilnih radikala koristi se ABAP (azobis (amidinopropan) dihidroksiklorid). ABAP nije fiziološki relevantan spoj, ali su peroksilni radikali, koji nastaju njegovim raspadom glavni tip ROS-a *in vivo* stoga je on dobro sredstvo za ispitivanje oštećenja membrane i drugih bioloških molekula uzrokovanih peroksilnim radikalima i za proučavanje inhibicije ovih učinaka dodatkom antioksidansa ili spojeva za koje se pretpostavlja antioksidativno djelovanje. Kad se uzorak, poput ekstrakta voća ili povrća koji sadrži antioksidanse, doda u analizu, oni reagiraju s peroksilnim radikalima sprječavajući ih da oksidiraju DCFH-DA te ne nastaje fluorescentni DCF. Zbog toga dolazi do smanjenja stanične fluorescencije u usporedbi

s kontrolnim stanicama što ukazuje na antioksidacijsku sposobnost spojeva. Na slici 12 prikazan je princip CAA testa pri čemu DCFH-DA dodan na stanice difundira u stanicu gdje djelovanjem staničnih esteraza nastaje DCFH. Stanicama se također dodaje i ABAP, koji također difundira u stanice, gdje se spontano razgrađuje i tvori peroksilne radikale. Nastali peroksilni radikali oksidiraju DCFH u fluorescentni DCF. Ispitivani spoj, kojim je također stanica tretirana, ako ima antioksidativno djelovanje sprječava tu reakciju oksidacije DCFH u DCF što rezultira smanjenjem stanične fluorescencije (Wolfe i Liu, 2007).



Slika 12. Princip testa staničnog antioksidativnog kapaciteta (Wolfe i Liu, 2007).

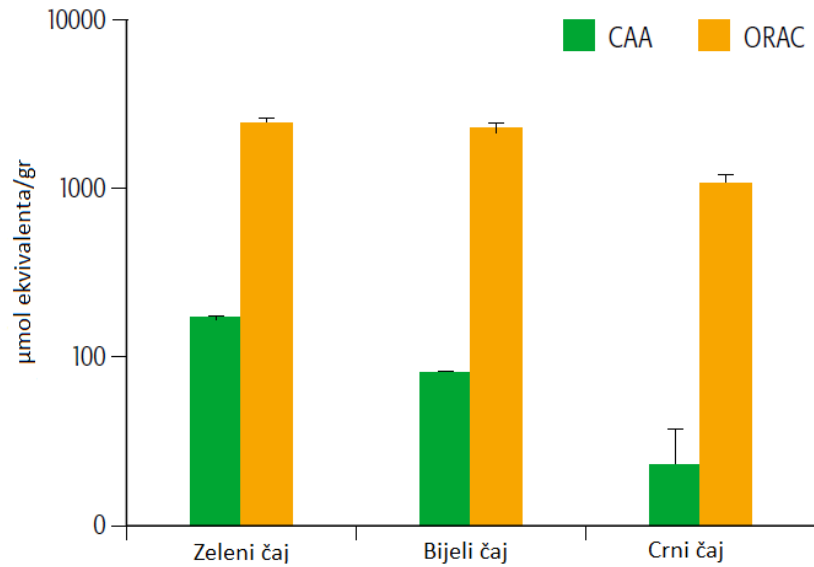
U istraživanju koje su proveli Cecilia Bender i Sara Graziano (2015) ispitivano je antioksidacijsko djelovanje spojeva u vodenim ekstraktima iz komercijalno dostupnih listova čaja *Camelia sinensis* (zeleni, crni i bijeli čajevi). Infuzije čaja karakterizirane su ukupnim sadržajem flavonola koristeći spektrofotometrijsku metodu, a njihova antioksidacijska aktivnost određivana je pomoću tri različite metode: ORAC metoda PSC test i CAA metoda. Budući da se *C. sinensis* čajevi tretiraju na različite načine

tijekom procesa proizvodnje i formulacije, razlike u njihovom proizvodnom procesu mogu utjecati na njihovu biološku aktivnost. Također, svaka vrsta čaja, crni, zeleni ili bijeli, različita je s obzirom na sastav i koncentraciju molekula koje posjeduju antioksidacijsko djelovanje. Zeleni i bijeli čajevi su nefermentirana roba koja je proizvedena sušenjem na zraku i uparavanjem svježe ubranih listova, dok se crni čaj proizvodi fermentacijom nakon žetve prije sušenja i uparavanja. Katehini su skupina prirodnih polifenola koji se nalaze u nefermentiranim čajevima, zeleni i bijeli čajevi, dok se tijekom postupka fermentacije crnog čaja katehini oksidiraju i dimeriziraju u teaflavine, koji također imaju snažnu antioksidacijsku sposobnost. U ovom istraživanju procijenjena je antioksidacijska sposobnost spomenutih čajeva u *in vitro* i *in vivo* uvjetima. Glavni cilj bio je procijeniti njihovu biološku antioksidacijsku sposobnost određenu *in vitro* na ljudskim stanicama, procjena bioraspoloživosti i predviđanje njihove *in vivo* aktivnosti.

Najveću antioksidacijsku aktivnost prema ORAC metodi pokazao je zeleni čaj, a slijede ga bijeli pa crni čaj koji je pokazao najmanju antioksidacijsku aktivnost ovim mjerenjem. Prema PSC metodi bijeli čaj je najbolji antioksidans, zatim crni pa zeleni čaj. *In vitro* antioksidacijska aktivnost *C. sinensis* čajeva ispitana je CAA testom na humanim stanicama keratinocita, odnosno HaCat staničnoj liniji. Zeleni čaj pokazao je najveću CAA vrijednost, odnosno antioksidacijsku aktivnost. Na drugom mjestu bio je bijeli čaj, a na trećem mjestu crni čaj, što je isto slijedu jačine antioksidacijske aktivnosti određene kemijskom ORAC metodom. Uvidom u tablicu 1. vidljivo je da dobiveni rezultati pokazuju značajne razlike između korištenih kemijskih metoda. Nedosljednost u rezultatima mogu se povezati s razlikom u reakcijskim mehanizmima korištenih metoda, različitim reaktantima i standardima te načinu izračuna.

Tablica 1. Prikaz rezultata istraživanja antioksidacijske aktivnosti *C. sinensis* infuzija (Bender i Graziano, 2015)

UZORAK	PSC	ORAC	CAA
Zeleni čaj	76.7 ± 3.6	2412.0 ± 168	170.4 ± 5.2
Bijeli čaj	168.9 ± 27	2242.0 ± 207	81.0 ± 2.0
Crni čaj	79.9 ± 3.1	1064.3 ± 127	22.8 ± 1.5



Slika 13. Usporedba dobivenih vrijednosti ORAC i CAA testa (Bender i Graziano, 2015).

Analiza rezultata pokazala je pozitivnu korelaciju između ORAC i CAA metode, ali ne i između ORAC i CAA metode. Stoga je nužno za određivanje antioksidacijskog djelovanja ispitivanih tvari koristiti više različitih kemijskih metoda, koje se razlikuju po principu metode te svakako potvrditi antioksidacijski kapacitet i *in vitro* testom sa stanicama.

3. ZAKLJUČAK

Velik je broj dostupnih kemijskih testova za određivanje antioksidacijske aktivnosti raznih spojeva, ali još uvijek postoji određeno nesuglasje između pojmova antioksidans i biološki aktivan antioksidans. Hrana, dodaci prehrani i spojevi koji *in vitro* analizama antioksidativnih sposobnosti pokazuju dobre rezultate, ne znače nužno da će posjedovati i stvarnu biološku aktivnost u organizmu. Antioksidansi mogu neutralizirati djelovanje slobodnih radikala u *in vitro* uvjetima, no sposobnost predviđanja *in vivo* učinaka na temelju *in vitro* ispitivanja nije u potpunosti dokazana i standardizirana. Kao što je i vidljivo u nizu istraživanja postoje značajne razlike u dobivenim rezultatima ovisno o odabranoj kemijskoj metodi određivanja antioksidacijskog djelovanja. Tijekom prvobitnog odabira i analize, kemijske metode su korisne za odabir onih tvari ili biljnih ekstrakata koje sadrže veliku količinu antioksidativnih molekula, no te metode nisu mjerodavne za predviđanje njihove biološke aktivnosti. Da bi se učinkovitost antioksidativnih spojeva mogla procijeniti na najbolji način, potrebno je razmotriti sustav kojim se mogu predvidjeti metaboličke reakcije bitne za oksidativno stanje organizma te uzima u obzir i sinergizam s drugim molekulama prisutnim u ljudskom tijelu. Kao dobra metoda za procjenu antioksidacijskih aktivnosti različitih spojeva smatra se upotreba staničnih kultura stoga test staničnog antioksidativnog kapaciteta predstavlja korak naprijed u razvoju metode kojom će se moći točnije procijeniti biološka aktivnost antioksidansa i njihov utjecaj u ljudskom organizmu.

4. LITERATURA

Adom K. K., Liu R. H. (2005) Rapid Peroxyl Radical Scavenging Capacity (PSC) Assay for Assessing both Hydrophilic and Lipophilic Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(17): 6572–6580.

Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Çelik S., Bektaşoğlu, B., Özyurt D. (2007) Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules* **12**(7): 1496–1547.

Bender C., Graziano S. (2015) Evaluation of the antioxidant activity of foods in human cells. *Nutrafoods* **14**(2): 79–85.

Benzie I. F. F., Devaki M. (2017) The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: concepts, procedures, limitations and applications. *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity* 77–106.

Cao G., Sofic E., Prior R. L. (1997) Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. *Free Radical Biology and Medicine* **22**(5): 749–760.

Craft B. D., Kerrihard A. L., Amarowicz R., Pegg R. B. (2012) Phenol-Based Antioxidants and the In Vitro Methods Used for Their Assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **11**(2): 148–173.

Fang Y. Z., Yang S., Wu G. (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* **18**(10): 872–879.

Gupta D. (2015) Methods for determination of antioxidant capacity: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **6**:546-566.

Huang D., Ou B., Prior R. L. (2005) The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(6): 1841–1856.

Ilyasov I. R., Beloborodov V. L., Selivanova I. A., Terekhov R. P. (2020) ABTS/PP Decolorization Assay of Antioxidant Capacity Reaction Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**(3): 1131.

Ozyurt D., Demirata B., Apak R. (2011) Determination of Total Antioxidant Capacity by a New Spectrofluorometric Method Based on Ce(IV) Reduction: Ce(III) Fluorescence Probe for CERAC Assay. *Journal of Fluorescence* **21**(6): 2069–2076.

Prior R. L., Wu X., Schaich K. (2005) Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(10): 4290–4302.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* **26**(9-10): 1231–1237.

Rice-Evans C., Miller N., Paganga G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* **2**(4): 152–159.

Schlesier K., Harwat M., Böhm V., Bitsch R. (2002) Assessment of Antioxidant Activity by Using Different In Vitro Methods. *Free Radical Research* **36**(2): 177–187.

Shahidi F., Zhong Y. (2015) Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods* **18**: 757–781.

Wolfe K. L., Liu R. H. (2007) Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods, and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**(22): 8896–8907.