Antioksidacijske metode: metoda ORAC (engl. Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Mišković, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:244976

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

ANTIOKSIDACIJSKE METODE: METODA ORAC

(engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

ZAVRŠNI RAD

ANA MIŠKOVIĆ

Matični broj: 1412

Split, rujan 2016.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

STRUČNI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE

SMJER: PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

ANTIOKSIDACIJSKE METODE: METODA ORAC

(engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

ZAVRŠNI RAD

ANA MIŠKOVIĆ

Matični broj: 1412

Split, rujan 2016.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

PROFFESIONAL STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

COURSE: FOOD TECHNOLOGY

ANTIOXIDANT METHODS: ORAC METHOD

(*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

BACHELOR THESIS

ANA MIŠKOVIĆ

Parent number: 1412

Split, September 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Stručni studij kemijske tehnologije; smjer Prehrambena tehnologija

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Tema rada je prihvaćena na 4. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta
Mentor: Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić

ANTIOKSIDACIJSKE METODE: METODA ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

Ana Mišković, 1412

Sažetak:
Zbog brojnosti i kemijske raznolikosti molekula antioksidansa, različitih mehanizama njihova djelovanja, kao i ciljanih molekula na koje se želi ispitati njihov utjecaj, do danas je razvijen veliki broj antioksidacijskih metoda. Kako se niti jedna od postojećih metoda nije pokazala prikladnom da u potpunosti reflektira antioksidacijski kapacitet i svojstva uzorka, uobičajeno je da se u istraživanjima koristi nekoliko metoda koje se temelje na različitim reakcijskim mehanizmima. Ipak, veliki broj metoda i njihove modifikacije često dovode do nepravilne interpretacije rezultata i njihove otežane rezultata pa se javlja potreba za standardiziranom metodom koja bi omogućila jednoznačno mjerenje antioksidacijskog kapaciteta uzoraka. ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) metoda je općeprihvaćena standardizirana antioksidacijska metoda. Prema mehanizmu reakcije koji se odvija kod ORAC metode ona spada u antioksidacijske metode koje se temelje na prijenosu atoma vodika. Rezultati, odnosno dobivene ORAC vrijednosti, uobičajeno se izražavaju preko Troloks ekvivalenta, u jedinicama μM TE/g ili μM TE/L uzorka, što znatno olakšava usporedbu rezultata različitih istraživanja.

Ključne riječi: ORAC metoda, antioksidacijska aktivnost, Troloks, fluorescencija

Rad sadrži: 34 stranice, 12 slika, 4 tablice, 34 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Dr.sc. Mario Nikola Mužek - predsjednik
2. Dr.sc. Franko Burčul - član
3. Doc.dr.sc. Ivana Generalić Mekinić - član-mentor

Datum obrane: 27. rujna 2016.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Proffesional study of Chemical Technology; Course: Food Technology

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food Technology
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 4.
Mentor: Assistant professor Ivana Generalić Mekinić

ANTIOXIDANT METHODS: ORAC METHOD (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

Ana Mišković, 1412

Abstract:
Due to the abundance and chemical diversity of antioxidant molecules, their different mechanisms of action, as well as the final target molecules, a large number of antioxidant methods have been developed. As one antioxidant method can not describe the antioxidant properties and total antioxidant capacity of the sample, multiple-method approach, using methods based on different reaction mechanisms, is usually performed. However, a great number of methods and their modifications often lead to an incorrect interpretation of the results and caused problems in their comparison. Therefore, there is a need for a standardized method that would allow an unambiguous determination of antioxidant capacity of the samples. ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) assay is widely accepted and standardized antioxidant method. The mechanism of the reaction that takes place in the ORAC method is hydrogen atom transfer. The obtained results, or so called ORAC values, are usually expressed as Trolox equivalents, in μM TE/g or μM TE/L, what greatly allows the comparison of results from different studies.

Keywords: ORAC assay, antioxidant activity, Trolox, fluorescence

Thesis contains: 34 pages, 12 figures, 4 tables, 34 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Mario Nikola Mužek, PhD - chair person
2. Franko Burčul, PhD - member
3. Ivana Generalić Mekinić, PhD, assistant prof - supervisor

Defence date: September 27th 2016.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Završni rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Ivane Generalić Mekinić, u razdoblju od ožujka do rujna 2016. godine.

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2014-09-6897.

ZAHVALA

Od srca se zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Ivani Generalić Mekinić na posvećenom vremenu, ukazanom povjerenju i velikoj pomoći pri izradu ovog završnog rada, te na potpunom razumijevanju, strpljenju i mnogim korisnim savjetima.

Zahvaljujem se i svojoj obitelji, prijateljima i kolegama na podršci.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak ovog završnog rada je bio postaviti i optimizirati jednu od najkorištenijih metoda ispitivanja antioksidacijskih svojstava različitih uzoraka, metodu ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*), na uređaju Synergy HTX S1LFA Multi-Mode Reader (BioTek Instruments Inc., Winooski, Vermont, USA).

SAŽETAK

Zbog brojnosti i kemijske raznolikosti molekula antioksidansa, različitih mehanizama njihova djelovanja, kao i ciljanih molekula na koje se želi ispitati njihov utjecaj, do danas je razvijen veliki broj antioksidacijskih metoda. Kako se niti jedna od postojećih metoda nije pokazala prikladnom da u potpunosti reflektira antioksidacijski kapacitet i svojstva uzorka, uobičajeno je da se u istraživanjima koristi nekoliko metoda koje se temelje na različitim reakcijskim mehanizmima. Ipak, veliki broj metoda i njihove modifikacije često dovode do nepravilne interpretacije rezultata i njihove otežane rezultata pa se javlja potreba za standardiziranom metodom koja bi omogućila jednoznačno mjerenje antioksidacijskog kapaciteta uzoraka. ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) metoda je općeprihvaćena standardizirana antioksidacijska metoda. Prema mehanizmu reakcije koji se odvija kod ORAC metode ona spada u antioksidacijske metode koje se temelje na prijenosu atoma vodika. Rezultati, odnosno dobivene ORAC vrijednosti, uobičajeno se izražavaju preko Troloks ekvivalenta, u jedinicama μM TE/g ili μM TE/L uzorka, što znatno olakšava usporedbu rezultata različitih istraživanja.

Ključne riječi: ORAC, antioksidacijska aktivnost, troloks, fluorescencija

SUMMARY

Due to the abundance and chemical diversity of antioxidant molecules, their different mechanisms of action, as well as the final target molecules, a large number of antioxidant methods have been developed. As one antioxidant method can not describe the antioxidant properties and total antioxidant capacity of the sample, multiple-method approach, using methods based on different reaction mechanisms, is usually performed. However, a great number of methods and their modifications often lead to an incorrect interpretation of the results and caused problems in their comparison. Therefore, there is a need for a standardized method that would allow an unambiguous determination of antioxidant capacity of the samples. ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) assay is widely accepted and standardized antioxidant method. The mechanism of the reaction that takes place in the ORAC method is hydrogen atom transfer. The obtained results, or so called ORAC values, are usually expressed as Trolox equivalents, in μM TE/g or μM TE/L, what greatly allows the comparison of results from different studies.

Keywords: ORAC, antioxidant activity, Trolox, fluorescence

SADRŽAJ

UVOD **1**

1. OPĆI DIO **2**

1.1. SLOBODNI RADIKALI **2**

1.1.1. Reaktivni oblici kisika **3**

1.1.2. Reaktivni oblici dušika **4**

1.2. OKSIDACIJSKI STRES I ANTIOKSIDACIJSKA OBRANA . . **5**

1.3. ANTIOKSIDANSI **6**

1.4. ANTIOKSIDACIJSKE METODE **8**

1.4.1. Metode temeljene na prijenosu elektrona (ET metode) . . **9**

1.4.2. Metode temeljene na prijenosu atoma vodika (HAT metode) . **14**

1.4.3. Ostale metode **17**

1.5. ORAC METODA **19**

1.5.1. Primjena i važnost ORAC metode **21**

2. EKSPERIMENTALNI DIO **24**

2.1. KEMIKALIJE I UREĐAJI **24**

2.2. ORAC METODA **25**

3. REZULTATI I RASPRAVA **27**

4. ZAKLJUČAK **31**

5. LITERATURA **32**

UVOD

Slobodni radikal je bilo koji atom, molekula ili dio molekule, koji u vanjskoj ljusci ima jedan ili više nesparenih elektrona. Zbog nepopunjene elektronske konfiguracije zadnje ljuske, slobodni radikali su vrlo reaktivni kemijski oblici, koji imaju sposobnost oksidirati biološke molekule, od malih molekula, do lipida, proteina i DNA. Smatra se da upravo na ovaj način, reakcijama radikala, dolazi do razvoja karcinoma i ostalih kroničnih procesa u ljudskom organizmu. Antioksidansi su kemijski raznovrsna skupina molekula, koja može spriječiti ili usporiti oksidativnu štetu nastalu djelovanjem slobodnih radikala pa se često nazivaju i 'čistačima' slobodnih radikala. Antioksidasi nastaju u stanicama ili se u organizam unose hranom ili putem dodataka prehrani.

Ne postoji univerzalna metoda za ispitivanje antioksidacijskog kapaciteta. Za ispitivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka najčešće se koristi više metoda koje se temelje na različitim reakcijskim mehanizmima, i to na prijenosu elektrona, takozvane ET (engl. *Electron Transfer*) metode, te one koje se temelje na prijenosu atoma vodika, HAT (engl. *Hydrogen Atom Transfer*) metode.

U ovom završnom radu je posebna pozornost posvećena jednoj od najčešće korištenih antioksidacijskih metoda - ORAC metodi (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*). ORAC metoda prema mehanizmu spada u HAT skupinu, a mjeri se inhibicija peroksil radikala koji nastaje uslijed raspadanja azo-spoja, 2,2'-azobis(2-amidinoproionamid)-dihidroklorid) (AAPH), pri stalnoj brzini na 37˚C.

1. OPĆI DIO

1.1. SLOBODNI RADIKALI

Slobodnim radikalom se smatra svaka kemijska vrsta, bilo da je to atom, molekula ili dio molekule, koja u vanjskoj ljusci ima jedan ili više nesparenih elektrona (*1*,*2*). Nespareni elektron sam zauzima atomsku ili molekulsku orbitalu (stoji sam u nekoj od posljednjih orbitala). Najjednostavniji primjer slobodnog radikala je atom vodika, koji ima samo jedan nespareni elektron, međutim, u slobodne radikale ubrajamo i prijelazne metale zbog njihove elektronske konfiguracije.

Slobodni radikal je nestabilna čestica, koja je zbog težnje da popuni valentnu orbitalu, spari nesparen elektron i postigne stabilnu elektronsku konfiguraciju, vrlo reaktivna. Osnova kemije radikala je u tome što su reakcije radikala uglavnom lančane i reakcije jednog radikala potiču stvaranje drugog tj. nestabilni radikali reagiraju sa stabilnim molekulama "oduzimajući" im elektrone (*3*).

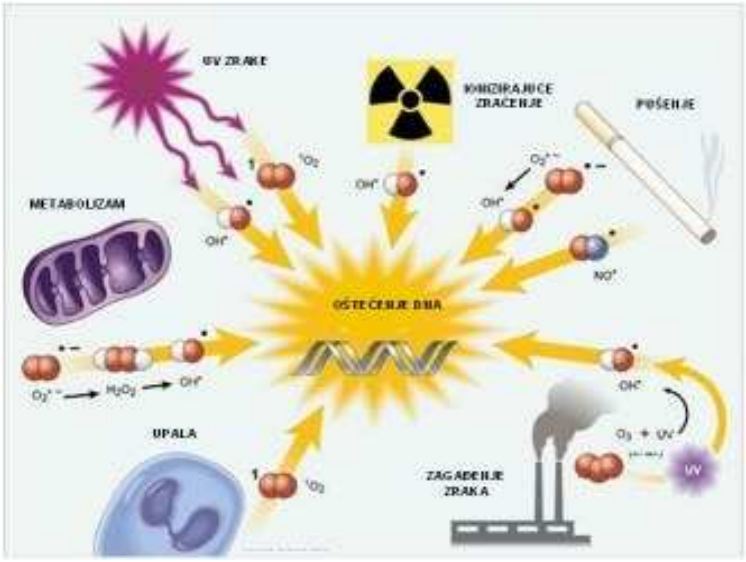
Uslijed velike reaktivnosti radikal ima sposobnost oksidirati biološke molekule, i to male molekule, lipide, proteine i DNA pa se smatra da na taj način dolazi do razvoja karcinoma i ostalih kroničnih procesa u ljudskom organizmu (*4*-*6*). U našem organizmu, tijekom normalnog funkcioniranja kao produkt različitih metabolizama, nastaju slobodni radikali, a pojedini imaju i važne fiziološke zadaće. Tako je važno naglasiti da slobodni radikali nisu samo štetni, već su često i nužni za normalno funkcioniranje organizma (*5*,*7*).

Izvori nastanka slobodnih radikala mogu biti ***endogeni*** i ***egzogeni.***

Endogeni: fiziološki i patofiziološki: oksidativne fosforilacije, aktivacija imunosnih stanica, koagulacija, mentalni stres, infekcija, proces starenja, patološka stanja, itd.

Egzogeni: zagađenje zraka ili vode, dim cigarete, alkohol, metali, neki lijekovi, zračenje, industrijska otapala, itd.

Od bioloških radikala najvažniji su ***reaktivni oblici kisika*** i ***reaktivni oblici dušika***.



Slika 1. Nastajanje slobodnih radikala (*8*)

1.1.1. Reaktivni oblici kisika (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS)

Najvažniji radikalni i neradikalni derivati kisika prikazani su u tablici 1, i opisani u daljnjem tekstu (*6*):

Tablica 1. Reaktivni oblici kisika (*4,7*)

Radikalni oblici	**Neradikalni oblici**
Hidroksilni, OH^-	Vodikov peroksid, H_2O_2
Superoksidni, $O_2^{\cdot -}$	Hipokloritna kiselina, HOCl
Peroksilni, RO_2^-	Ozon, O_3
Alkoksilni, RO^-	Singletni kisik, $^1\Delta gO_2$
Hidroperoksilni, HO_2^-	Peroksinitrit, $ONOO^-$

- ***Hidroksil radikal (OH·)*** je najreaktivniji radikal kisika koji je uglavnom odgovoran za oštećenja DNA. Najpoznatija reakcija nastajanja hidroksilnog radikala je Haber-Weissova reakcija u kojoj reagiraju molekula H_2O_2 i $O_2^{\cdot -}$, a u prisustvu iona metala (željeza ili bakra) ista se znatno ubrzava i poznata je pod nazivom Fentonova reakcija.

Mehanizam nastanka hidroksilnog radikala je prikazan jednadžbama:

$H_2O_2 + O_2\cdot^- \rightarrow \cdot OH + OH^- + O_2$ (Haber-Weissova reakcija)

$Fe^{3+} + O_2\cdot^- \rightarrow Fe^{2+} + O_2$

$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \cdot OH + OH^- + Fe^{3+}$ (Fentonova reakcija)

- ***Superoksid anion radikal ($O_2\cdot^-$)*** je najčešći i najvažniji kisikov radikal koji nastaje tijekom transporta elektrona u respiracijskom lancu (metabolizam), kada se molekuli kisika u osnovnom stanju doda jedan elektron.
- ***Peroksil ($RO_2\cdot$)*** i ***alkoksil ($RO\cdot$) radikali*** su jaki oksidansi koji nastaju razgradnjom organskih peroksida djelovanjem topline, izlaganjem UV svjetlu ili uslijed prisutnosti prijelaznih metala.
- ***Vodikov peroksid (H_2O_2)*** spada u slabo reaktivne radikale jer je slabi oksidans. Ipak, ioni željeza ili bakra kataliziraju njegovu razgradnju do reaktivnijeg hidroksil radikala.
- ***Hipokloritna kiselina (HOCl)*** je reaktivno slaba kiselina, ali je jako dobar oksidans.
- ***Singletni kisik ($^1\Delta gO_2$)*** je neradikalni oblik kisika koji obično nastaje reakcijom vodikovog peroksida i hipokloritne kiseline te u foto-osjetljivim reakcijama.

1.1.2. Reaktivni oblici dušika (engl. *Reactive Nitrogen Species*, RNS)

Od reaktivnih dušikovih oblika najvažniji su ***dušikovi oksidi*** koji u stanicama najčešće nastaju djelovanjem enzima (*6,7*):

- ***Dušikov(II) oksid ($NO\cdot$)*** sudjeluje u stvaranju jakih oksidansa - peroksinitrata te u reakciji s kisikom tvori reaktivniji dušikov(IV) oksid.
- ***Dušikov(IV) oksid ($NO_2\cdot$)***

Pri visokim koncentracijama slobodni radikali i njihovi derivati postaju štetni za organizam, jer oštećuju glavne stanične dijelove; lipide, proteine i DNA, a tim oksidativnim oštećenjima mijenjaju se fizikalno-kemijska svojstva, što ima posljedice na staničnoj razini (tablica 2) (*6,9*).

Tablica 2. Molekularne i stanične posljedice reakcije fizioloških molekula i slobodnih radikala (*9*)

Vrsta molekule	**Promjene**	**Stanična posljedica**
Lipidi	Lipidna peroksilacija	perforacija membrana, povećana propusnost smrt stanice nakupljanje peroksidiranih lipida u postupku starenja
Proteini	Karbonilacija Križno vezivanje aminokiselina	ubrzan katabolizam proteina snižena enzimska aktivnost
DNA	Mutacije	promijenjen genski sadržaj gubitak heterozigotnosti

1.2. OKSIDACIJSKI STRES I ANTIOKSIDACIJSKA OBRANA

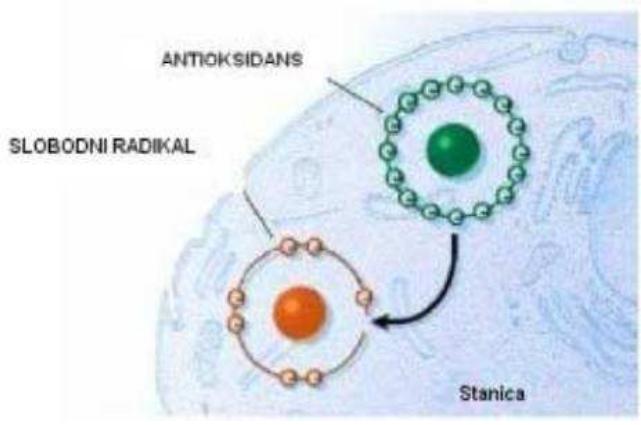
Oksidacijski stres je definiran kao stanje prekomjernog stvaranja slobodnih radikala, pri čemu dolazi do gubitka ravnoteže između stvaranja radikala i mogućnosti stanice da iste razgradi, što rezultira promjenama vezanim uz oštećenje stanica (*10*). Jednostavnije, kaže se da dolazi do poremećaja ravnoteže između prooksidansa i antioksidansa u korist prooksidansa (*11*). Prooksidans je tvar koja uzrokuje razna oksidacijska oštećenja dok su antioksidansi tvari koje uklanjaju prooksidanse stvarajući produkte koji nisu toksični i ne uzrokuju oštećenja (*12*). U stanju oksidacijskog stresa ravnoteža je pomaknuta prema oksidaciji odnosno prekomjernom stvaranju radikala koje često može nastati ukoliko je smanjena antioksidacijska zaštita organizma. Porast radikala u organizmu rezultira oštećenjem staničnih struktura, a u konačnici i apoptozom (staničnom smrti) (*7*). Smatra se da je upravo oksidacijski stres uzrok nastanka različitih oboljenja kao što su bolesti kardiovaskularnog, probavnog, imunološkog sustava te središnjeg živčanog sustava (Parkinsonova bolest, Alzheimerova demencija) (*13*). Oksidacijski stres nije moguće spriječiti, jer se sposobnost stvaranja antioksidansa kao obrambenog mehanizma stanice, starenjem smanjuje.

Stanična antioksidacijska obrana može biti ***endogenog*** i ***prehrambenog podrijetla***. Obrambeni sustav stanice čine (*7*):

- **Proteini** koji kontroliraju dostupnost pojedinih prooksidanasa (iona željeza, bakra i hem),
- **Enzimatski antioksidansi** koji prevode biološke radikale u slabije reaktivne oblike, npr. H_2O_2 se prevodi u vodu i O_2 djelovanjem katalaze,
- **Tvari male molekulske mase** kao što su glutation, bilirubin, α-tokoferol, mokraćna kiselina i slično.

1.3. ANTIOKSIDANSI

Antioksidansi su kemijski vrlo raznovrsna skupina spojeva, od jednostavnih molekula do složenih kompleksa, koje prisutne u niskim koncentracijama u usporedbi s oksidacijskim supstratom, značajno usporavaju, odgađaju ili sprječavaju njegovu oksidaciju (*14,15*). Prema tome, uloga antioksidansa je neutralizacija slobodnih radikala na način da im antioksidansi doniraju svoj elektron i tako ih stabiliziraju (slika 2). Antioksidansi nastaju u stanici ili se u organizam unose hranom ili putem dodataka prehrani, a njihovo djelovanje se očituje u tome da onemogućavaju stvaranje novih slobodnih radikala, uništavaju već stvorene radikale (engl. *scavengers* - 'hvatači') ili popravljaju oštećenja nastala djelovanjem radikala.



Slika 2. Djelovanje antioksidansa na slobodni radikal (*16*)

Podjela antioksidansa (*7,15*)

Prema mehanizmu djelovanja:

1. Zaustavljači lančanih reakcija
2. Razlagači peroksida
3. Inaktivatori (kelatori) metalnih iona
4. 'Hvatači' kiska

Prema djelovanju tijekom lančanih reakcija radikala:

1. Preventivni antioksidansi - sprječavaju stvaranje slobodnih radikala
2. Enzimski antioksidansi – sprječavaju lančane reakcije radikala
3. 'Hvatači slobodnih radikala' – reagiraju s nastalim radikalima te ih stabiliziraju

Prema podrijetlu:

1. Prirodni antioksidansi:
    a) vitamin C (askorbinska kiselina)
    b) vitamin E (tokoferol)
    c) karotenoidi
    d) flavonoidi
2. Sintetski antioksidansi
    a) BHA (butil hidroksianisol)
    b) BHT (butil hidroksitoluen)
    c) PG (propil galat).

1.4. ANTIOKSIDACIJSKE METODE

U Orlandu (Florida, SAD) 2004. godine, održan je međunarodni znanstveni skup pod nazivom "*The First International Congress on Antioxidant Methods*". Zbog postojanja velikog broja antioksidacijskih metoda, cilj skupa je bio izdvojiti jednu univerzalnu metodu za testiranje antioksidacijske učinkovitosti uzoraka, što bi olakšalo daljnja istraživanja i usporedbe dobivenih rezultata u različitim studijama. Međutim, zbog raznolikosti antioksidansa te različitih mehanizama njihova djelovanja, niti jedna metoda se nije pokazala dovoljno prikladnom. Stoga se još uvijek za ispitivanje antioksidacijske aktivnosti najčešće primjenjuje više metoda koje se temelje na različitim mehanizmima (*7,17,18*).

Ovisno o mehanizmima reakcija koji se odvijaju između antioksidansa i slobodnih radikala, antioksidacijske metode se dijele na (*6,7,17,19,20*):

1. **Metode temeljene na prijenosu elektrona (engl. *Electron Transfer*, ET)**
2. **Metode temeljene na prijenosu vodika (engl. *Hydrogen Atom Transfer*, HAT)**
3. **Ostale metode**

Najčešće korištene metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti su (*6,7,20*):

ET metode:

- FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*)
- CUPRAC (engl. *Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*)
- ABTS (prema radikalu 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazoline-6-sulfonska kiselina))
- FC (Folin-Ciocalteu metoda)

HAT metode:

- ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*)
- DPPH (prema radikalu 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil)
- TRAP (engl. *Total Radical Trapping Antioxidant Parameter*)
- *β*-karoten (metoda koja se temelji na izbjeljivanju *β*-karotena)
- SASA (engl. *Scavenging of Superoxide Radical Formation by Alkaline*)

Ostale metode:

- TOSC (engl. *Total Oxidant Scavenging Capacity*)
- BR (inhibicija Briggs-Rauscher oscilacijske reakcije)
- Kelatiranje (sposobnost stvaranja kelata s ionima željeza/bakra)
- CL (kemiluminiscencija)
- PCL (fotokemiluminiscencija)

1.4.1. Metode temeljene na prijenosu elektrona (ET metode)

ET metode mjere redukcijsku sposobnost antioksidansa, a baziraju se na redoks reakciji (*17*,*19*):

Oksidans + e^- (iz antioksidansa) $\rightarrow$ reducirani oksidans + oksidirani antioksidans

Kod ET metoda antioksidans (AH) reakcijom prijenosa jednog elektrona reducira neku tvar što se može prikazati reakcijama (*7*,*17*):

$$X^{\bullet} + AH \rightarrow X^- + AH^{\bullet +}$$

$$AH^{\bullet +} \xrightarrow{H_2O} A^{\bullet} + H_3O^+$$

$$X^- + H_3O^+ \rightarrow XH + H_2O$$

$$M(III) + AH \rightarrow AH^+ + M(II)$$

Kod ET metoda uslijed reakcije oksidansa, dolazi do promjene intenziteta njegova obojenja koji je direktno proporcionalan koncentraciji dodanog antioksidansa, a grafički rezultat njihove ovisnosti je linearan pravac (*7*).

a) FRAP metoda (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*)

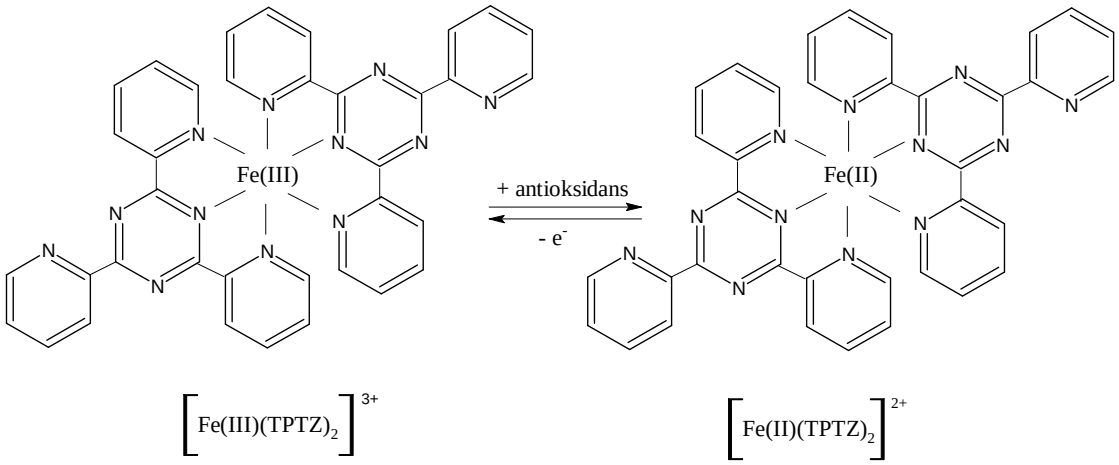
FRAP metoda je metoda izmjene jednog elektrona kojom se mjeri sposobnost redukcije. Kod ove metode u prisutnosti antioksidansa dolazi do redukcije žuto obojenog kompleksa Fe(III)-TPTZ u plavo obojeni kompleks Fe(II)-TPTZ, što se prati pri valnoj duljini 593 nm nakon 4 minute od dodatka antioksidansa u reakcijsku smjesu (*7,15,21*).

Prednosti:

FRAP metoda je vrlo jednostavna, brza i jeftina te ne zahtjeva posebnu opremu (*22,23*).

Nedostatci:

FRAP reakcija nije specifična tako da svaki spoj s pogodnim redoks potencijalom dovodi do redukcije Fe^{III}-TPTZ kompleksa. Također, poznato je da se i sam Fe(II) ponaša kao prooksidans, i u reakcijama s H_2O_2 može stvoriti štetni hidroksilni radikal. Redukcijska aktivnost pojedinih antioksidansa nije završena nakon 4 minutnih mjerenja, tako da konačni rezultat značajno ovisi o reakcijskom vremenu koje se prati (*15,19*). FRAP metoda ne mjeri antioksidacijsku aktivnost koja se temelji na *gašenju* molekula radikala (HAT mehanizam) (*22,24*).



Slika 3. FRAP reakcija (*19*)

b) ABTS metoda (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazoline-6-sulfonska kiselina)

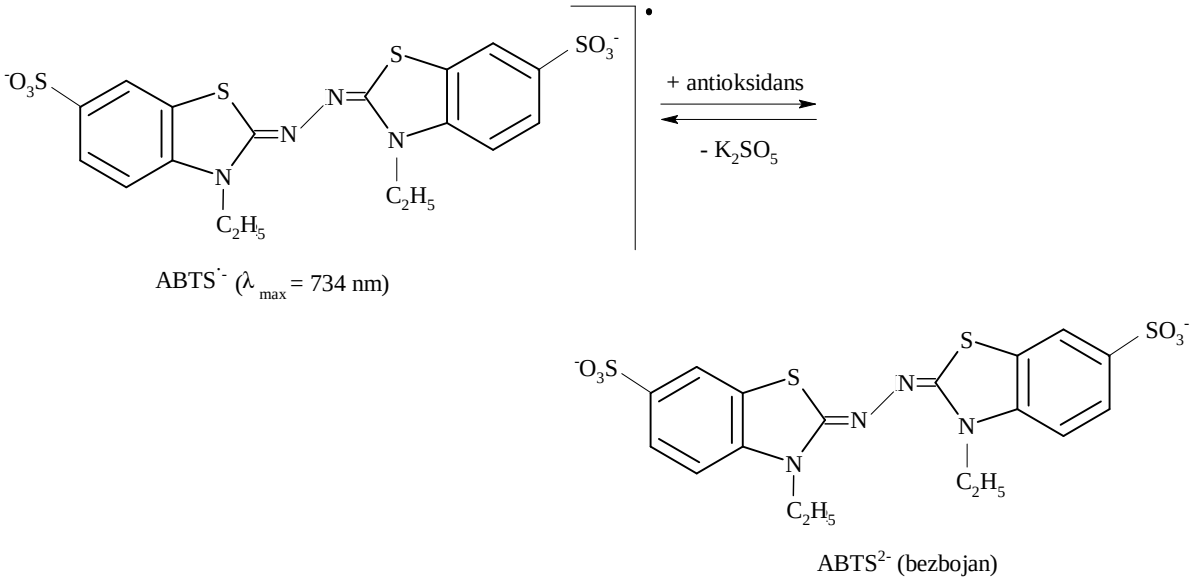
ABTS metoda se u literaturi naziva i TEAC metoda (*engl. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), a njen mehanizam je sličan mehanizmu DPPH metode. Kod ABTS metode se koristi plavo-zeleno obojeni radikal 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazoline-6-sulfonske kiseline $ABTS^{2-}$) koji također dodatkom antioksidansa blijedi što se prati pri valnoj duljini od 734 nm tijekom 6 minuta (*7,15,19*).

Prednosti:

$ABTS^{\cdot+}$ je topljiv i u vodi i organskim otapalima. Na medij ne utječe ionska jakost, tako da se antioksidacijska sposobnost može mjeriti i kod hidrofilnih i lipofilnih uzoraka te pri različitim pH vrijednostima (*22,23*).

Nedostatci:

$ABTS^{\cdot+}$ inhibira oksidacijski proces pa pojedine reakcije mogu potrajati jako dugo dok se ne postigne krajnja točka (*22*).



Slika 4. Reakcija $ABTS^{\cdot+}$ radikala (*19*)

c) Folin-Ciocalteu (FC) metoda

FC metoda se temelji na reakcijama koje dovode do nastanka obojenih spojeva, a čija se apsorbancija mjeri pri valnoj duljini od 765 nm (*18*,*20*). FC reagens u alkalnom mediju oksidira fenolne spjeve, pri čemu se prisutne kiseline u reagensu reduciraju u okside koji su plavo obojeni. FC metoda se češće koristi za određivanje sadržaja fenolnih spojeva u uzorcima, nego li za ispitivanje njihove antioksidacijske aktivnosti (*15*,*22*,*23*).

Reakcija koja se događa kod Folin-Ciocalteu metode je sljedeća ():

$$\text{Mo(VI) (žuto)} + e^- \text{ (iz molekule antioksidansa)} \rightarrow \text{Mo(V) (plavo)}$$

Prednosti:

Folin-Ciocalteu metoda je jednostavna i ponovljiva. Korištenjem ove metode vrlo često se dobiva izvrsna linearna korelacija između sadržaja ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti uzoraka (*21*).

Nedostatci:

Probleme kod interpretacije rezultata uzrokuje što se rezultati u različitim istraživanjima izražavaju preko različitih standarda, iako je najučestalije da se iskazuju preko galne kiseline. Konačne vrijednosti apsorbancije su obično proporcionalne broju reaktivnih fenolnih skupina koje spojevi sadrže pa tako ovise o samoj strukturi testirane molekule. Folin-Ciocalteu reagens nije specifičan samo za fenole pa ga tako mogu reducirati i ostale grupe spojeva (*22*,*23*).

d) CUPRAC metoda (engl. *Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*)

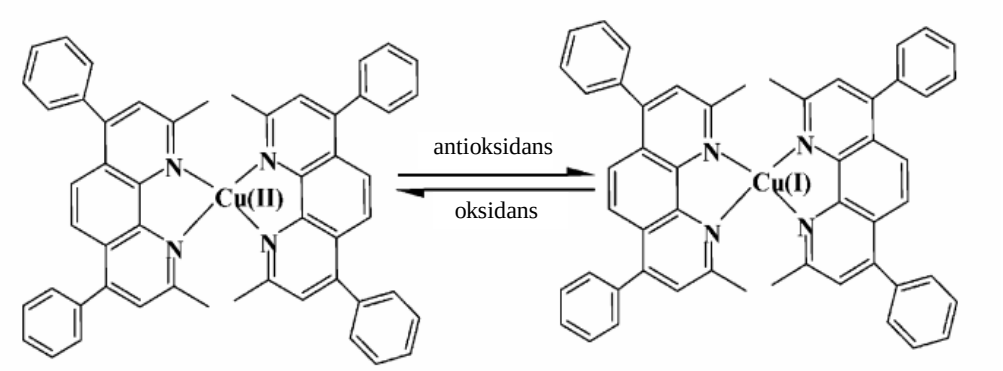
CUPRAC metoda je vrlo jednostavna i slična metodi FRAP, samo što kod ove metode dolazi do redukcije Cu^{2+} iona pri pH=7 što uzrokuje bržu kinetiku reakcije. Mjerenja kod ove metode se izvode pri valnoj duljini 450 nm nakon 30 minuta (*15*).

Prednosti:

Reagensi kod CUPRAC metode su vrlo stabilni te selektivni zbog nižeg redoks potencijala nego li je isti kod sustava Fe(III)/Fe(II) u FRAP metodi. Također, metoda nije osjetljiva na čimbenike kao što su zrak, svjetlo, tip otapala, pH, a pogodna je za određivanje antioksidacijske aktivnosti hidrofilnih i hidrofobnih uzoraka (*21*). Rezultati dobiveni CUPRAC metodom su usporedivi s TEAC vrijednostima, dok su FRAP vrijednosti nešto niže. Također, kod CUPRAC metode reakcija se odvija kod pH=7, za razliku od kiselog medija kod FRAP metode ili lužnatog kod Folin-Ciocalteu metode (*22*).

Nedostaci:

Kod ove metode također se zbog različitih brzina reakcije pojedinih antioksidansa, postavlja pitanje određivanja konačne točke mjerenja (*22*).



Slika 5. Mehanizam redukcije Cu(II) u Cu(I) (*19*)

1.4.2. Metode temeljene na prijenosu atoma vodika (HAT metode)

Metode koje se temelje na HAT mehanizmu mjere sposobnost antioksidansa da 'hvata' slobodne radikale donirajući im vodikov atom. HAT metode se uglavnom temelje na praćenju kinetike reakcija. U HAT reakciji, molekula slobodnog radikala se gasi reakcijom prijenosa atoma vodika pri čemu nastaje radikal antioksidansa koji je manje reaktivan (*7*):

$$R\cdot + AH \rightarrow RH + A\cdot$$

$$A\cdot + A\cdot \rightarrow AA$$

$$A\cdot + R\cdot \rightarrow RA$$

U reakciji antioksidansa i slobodnog radikala, ET i HAT metode se mogu odvijati paralelno, no koja od njih će dominirati ovisi o strukturi, topljivosti i svojstvima molekule antioksidansa te pH vrijednosti (*7,17*).

a) TRAP metoda (engl. *Total Radical Trapping Antioxidant Parameter*)

TRAP metoda se temelji na mjerenju potrošnje kisika tijekom kontrolirane oksidacije lipida peroksidnim radikalom dobivenim termičkim raspadom AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropan)hidroklorid) (*24*). Nakon dodatka AAPH i lipida (najčešće linoleinske kiseline) u uzorak, oksidacija lipida prati se pomoću kisikove elektrode. U prisutnosti antioksidansa oksidacija je inhibirana i mjeri se indukcijski period, u kojem se kisik ne troši, a čije je trajanje proporcionalno količini antioksidansa u uzorku (*21*). Valne duljine na kojima se prate reakcije su 495 nm i 575 nm.

Prednosti:

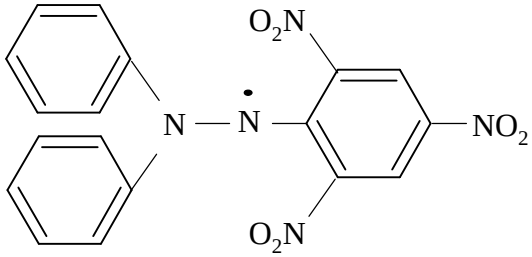
TRAP metoda se temelji na pokretanju peroksidacije lipida stvaranjem vodotopljivog peroksil radikala, ali postoje i modifikacije metode za testiranje lipofilnih antioksidansa (*22*). TRAP metoda je pogodna i za određivanje antioksidacijske aktivnosti *in vivo* u serumu ili plazmi jer mjeri i aktivnost neenzimskih antioksidansa kao što su glutation, askorbinska kiselina, itd. (*21*).

Nedostatci:

TRAP metoda je relativno složena i dugotrajna te zahtjeva visok stupanj stručnosti i iskustva. Također, znatan problem predstavlja velik broj finalnih točaka mjerenja koje otežavaju usporedbu rezultata analize te nestabilnost odaziva kisikove elektrode tijekom mjerenja (*21*).

b) DPPH metoda (2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil)

DPPH metoda je jedna od najpoznatijih metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti. DPPH radikal je stabilan dušikov radikal čija je otopina tamno ljubičaste boje, a dodatkom antioksidansa ili bilo kojeg spoja koji posjeduje slabu X-H kemijsku vezu, otopina blijedi jer se slobodni radikal reducira u svijetlo-žuti difenilpikrilhidrazin. Napredovanje reakcije prati se spektrofotometrom pri 517 nm, a kao konačna točka mjerenja se obično uzima vrijednost izmjerena nakon 60 minuta (*15*,*19*,*23*).



Slika 6. DPPH radikal (*19*)

Prednosti:

DPPH metoda je jednostavna i brza, a za mjerenje je potreban samo UV-VIS spektrofotometar (*22*). Rezultati se najčešće izražavaju kao IC_{50} vrijednosti, odnosno koncentracija antioksidansa potrebna da se inicijalna koncentracija radikala smanji za 50 %, što znatno olakšava usporedbu rezultata. Osim toga, antioksidacijska aktivnost često se prati tijekom vremena (kinetika reakcije) (*15*).

Nedostatci:

DPPH radikal je topljiv samo u organskim otapalima (osobito u alkoholu), dok u vodi nije topljiv. Također na vrijednosti apsorbancije utjecaj mogu imati svjetlo, kisik i druge vrste otapala (*15,22*). Reakcijska kinetika između antioksidansa i DPPH radikala nije linearna s koncentracijom radikala, a novija istraživanja čak govore da mehanizam reakcije kod DPPH metode nije "čisti" HAT mehanizam, što ovu metodu izbacuje s liste antiradikalnih metoda (*19*).

c) *β*-karoten metoda

Metodom izbjeljivanja *β*-karotena mjeri se inhibicija proizvodnje organskih spojeva i tvorba konjugiranih dien-hidroperoksida u višefaznom vodenom sustavu stabilne emulzije *β*-karotena i linoleinske kiseline (*25*).

Do oksidacije *β*-karotena dolazi tijekom reakcije slobodnih radikala s lipidnim radikalima koji nastaju oksidacijom linoleinske kiseline, prilikom čega pucaju dvostruke veze u molekuli *β*-karotena, autooksidacija *β*-karotena postiže se pri 50˚C. Blijeđenje karotenoida se može znatno usporiti dodatkom antioksidansa, a antioksidacijska aktivnost je mjera njegove sposobnosti da inhibira oksidaciju što se prati pri 470 nm u kroz vremenski period od 60 min ili 120 min (*7,15,23*).

Prednosti:

Kinetički pristup u mjerenju omogućava određivanje sposobnosti antioksidansa da inhibira oksidaciju i omogućava precizniju procjenu antioksidacijske učinkovitosti uzoraka (*22*). Također, ovom metodom je moguće pratiti i prooksidativnu aktivnost uzoraka (*23*).

Nedostatci:

Iako se kod ove metode kao medij koristi *β*-karoten, njegova promjena boje na 470 nm se može postići i više puta, tako da interpretacija rezultata može biti teža. Da se to izbjegne, u posljednje vrijeme sve češće se koristi reagens krocin, prirodni spoj s izrazito jakom apsorbancijom u vidljivom području, koji se izbjeljuje selektivno samo pod 'napadom' peroksil radikala (*22,23*).

d) SASA metoda

Kod superoksid radikal ne-enzimatske metode (SASA) fenazin-metosulfat se reducira djelovanjem nikotinamid adenin dinukleotida, a superoksid radikal nastaje reakcijom s kisikom (*26*). Nastali superoksid radikal reducira žuto obojen tetrazolij nitroplavo, pri čemu nastaje plavi spoj nazvan formazan. Nastanak formazana inhibira svaka dodana molekula koja je sposobna reagirati s $O_2^{\cdot -}$, a antioksidacijska aktivnost se temelji na reakciji antioksidansa sa superoksid radikalom (*4*,*7*).

1.4.3. OSTALE METODE

Neke antioksidacijske metode, koje se učestalo koriste za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka, ne mogu se svrstati prema mehanizmu niti u HAT niti u ET, jer se kod njih paralelno odvijaju oba reakcijska mehanizma, ili pak niti jedan. U takve metode spadaju npr. Briggs-Rauscher metoda i kelatiranje (*7*).

a) Briggs-Rauscher (BR) metoda

BR metoda se zasniva na zaustavljanju lančanih reakcija unutar oscilacijskog sustava uslijed dodatka antioksidansa. Briggs-Rauscher oscilirajuće reakcije odvijaju se u nizu međusobno povezanih reakcija, a specifične su zbog naizmjenične promjene boje otopine, od bezbojne, preko žute do tamno plave. Po dodatku antioksidansa u reakcijsku smjesu, oscilacije se ublažavaju uslijed reakcije antioksidansa s hidroperoksil radikalom ($HOO^{\cdot}$) koji nastaje u BR sustavu (*27*). Vrijeme prekida oscilacijskih reakcija naziva se vremenom inhibicije i ono je proporcionalno količini i svojstvima antioksidansa (*7*).

b) Kelatiranje

Kelatiranje (kelacija) je proces kojim se uklanjaju teški metali, dok su kelati agensi koji ih na sebe vežu. Kod ove metode antioksidacija se mjeri u vidu sposobnosti stvaranja kompleksa između kelatirajućeg sredstva (ferozina ili spojeva iz analiziranog uzorka) i metalnih iona (Fe^{2+}). Ferozin (kelatirajuće sredstvo) stvara kompleks s Fe^{2+} prisutnim u sustavu pri čemu nastaje crveno obojenje, međutim ukoliko metalne ione veže antioksidans nastanak kompleksa između Fe^{2+} i ferozina je onemogućen pa je time intenzitet crvenog obojenja slabiji (*7*).

Tablica 3. Pregled značajki pojedinih antioksidacijskih metoda (*17*,*21*)

Metoda	**Jednostavnost**	**Potrebitost instrumenata**	**Biološki značaj**	**Mehanizam**	**Trajanje**
ORAC	++	+	+++	HAT	++
FRAP	+++	+++	_ _	ET	_ _
DPPH	+	+	_	HAT	+
ABTS	+	+	+	ET	+
FC	+++	_	_	ET	+
CUPRAC	+++	+++	_ _ _	ET	+
TRAP	_ _	_ _	+++	HAT	+++
β-karoten	_ _	_ _	++	HAT	++

U svojoj studiji, Prior i sur. 2013. godine (*17*) u konačnici nakon pregleda, isticanja prednosti i mana različitih antioksidacijskih metoda, zaključuju kako niti jedna antioksidacijska metoda ne može u potpunosti reflektirati "ukupni antioksidacijski kapacitet uzoraka" koji treba biti rezultat djelovanja i lipofilnih i hidrofilnih spojeva te uključivati oba mehanizma reakcije, HAT i ET. Ipak, između svih istaknutih metoda, autori smatraju da se tri metode trebaju standardizirati i koristiti za određivanje antioksidacijske aktivnosti, i to Folin-Ciocalteu metoda, ABTS te ORAC metoda. ORAC metoda se zbog biološki važnog mehanizma i činjenice da se njome može mjeriti antioksidacijska aktivnost i lipofilnih i hidrofilnih spojeva smatra najpogodnijom te je stoga i predmet istraživanja u ovom radu.

1.5. ORAC METODA

ORAC metoda (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) je antioksidacijska metoda iz skupine HAT metoda, kojom se mjeri inhibicija AAPH peroksil radikala, pri čemu je izvor radikala, najčešće, azo-spoj AAPH (2,2'-azobis(2-amidinoproionamid)-dihidroklorid) koji se pri 37˚C raspada stalnom brzinom stvarajući peroksil radikale (*18*). Ova metoda je klasičan primjer antioksidacijske aktivnosti sprječavanjem lančanih reakcija radikala (*6,17,24,29*).

Kod ORAC metode antioksidansi (AH) doniraju proton peroksilnom radikalu te ga na taj način neutraliziraju. Nastali radikal reagira s fluoresceinom pri čemu nastaje nefluorescentni produkt i dolazi do pada fluorescencije. Valne duljine pri kojima se mjerenja provode su 485 nm i 520 nm (*6,18,24,29*).

$$R{-}N{=}N{-}R(AAPH) + 2O_2 \rightarrow N_2 + 2\ ROO^{\bullet}$$

$$2HOO^{\bullet} + \text{Fluorescein} \rightarrow HOO^{\bullet} + \text{oksidirani uzorak}$$

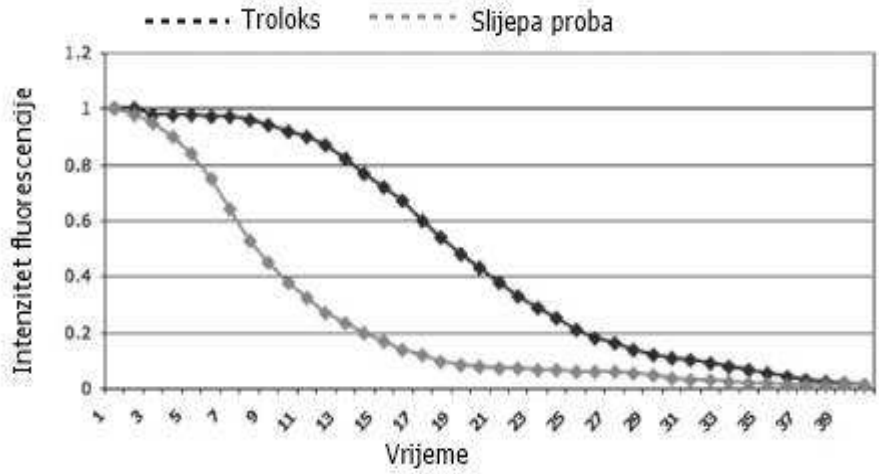
$$HOO^{\bullet} + AH \rightarrow HOOH + A^{\bullet}$$

$$HOO^{\bullet} + A^{\bullet} \rightarrow HOOA$$

U nedostatku inhibitora, nastali slobodni radikali će brzo "ugasiti" flourescenciju medija. Prateći vrijeme potrebno da dođe do pada fluorescencije, sa i bez dodatka uzorka, određuje se njegova antioksidacijska aktivnost (*29*). Što je veća razlika u brzinama reakcija između flourescentne probe i peroksilnog radikala, te reakcije peroksilnog radikala i antioksidansa u korist ove druge reakcije, to je antioksidacijska aktivnost uzorka bolja (*17,25*). Na početku reakcije je koncentracija antioksidansa velika te je druga reakcija brža, međutim kako se antioksidans troši reakcija flourescentne probe i radikala se ubrzava pa se tako ubrzava i stvaranje nefluorescentnog produkta.

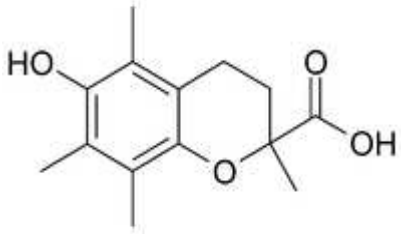
Kod ORAC metode antioksidacijski kapacitet se izražava preko ukupne površine ispod krivulje pada relativnog intenziteta fluorescencije (%) ovisno o vremenu (min) (engl. *Area Under the Curve,* AUC), tj. kao razlika površine ispod krivulja za uzorak i slijepu probu (slika 7) (*15,17,18,28*).

Slika 7 prikazuje pad intenziteta flourecencije kod ORAC metode, sa i bez dodatka antioksidansa (Troloksa). Troloks (engl. *Trolox*) je sintetski antioksidans koji se u testu koristi kao standardna otopina. Troloks (*6- hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina*) je antioksidans poput vitamina E i koristi se u više bioloških ili biokemijskih testova za mjerenje oksidacijskog stresa. Iz razlike površina ispod jedne i druge krivulje, a preko jednadžbe pravca dobivene ispitivanjem različitih koncentracija standarda, dobije se ORAC vrijednost uzorka.



Slika 7. ORAC antioksidacijski kapacitet ispitivanog uzorka (*28*)

ORAC vrijednosti najčešće se izražavaju preko Troloks ekvivalenta u jedinicama μM TE/g uzorka ili μM TE/L uzorka (*15*,*28*), a za izradu baždarnog pravca se obično testiraju otopine Troloksa različitih koncentracija.



Slika 8. Troloks (*6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina*) (*30*)

Prednosti:

- jednostavna, automatizirana i standardizirana metoda
- visoka ponovljivost rezultata mjerenja
- mjeri točno određenu kemijsku reakciju
- ima definirani kemijski mehanizam i peroksil radikal finalnu točku mjerenja
- koristi biološki važan radikal
- odvija se u području fiziološkog pH
- moguća su ispitivanja hidrofilnih i lipofilnih antioksidansa
- ima mogućnost adaptacije na druge izvore radikala
- jedina metoda koja kombinira stupanj i trajanje inhibicije oksidacije u jednu vrijednost
- mjeri i antioksidacijski kapacitet bioloških uzoraka kao npr. krvne plazme i seruma.

Nedostaci:

- potrebe za uređajem sa sposobnošću mjerenja fluourescencije (spektrofluorimetar)
- duljina mjerenja (1 h i 30 min) se kompenzira s velikim brojem uzorka koji se istovremeno mjere
- potrebno je termostatiranje prilikom analize (37°C).

1.5.1. Primjena i važnost ORAC metode

ORAC metodom se najčešće mjere antioksidacijska svojstva fenolnih spojeva, međutim koristi se i za ispitivanje aktivnosti neflavonoidnih molekula poput vitamina C i E (*31*). Richard Prior u svom izvješću 2015. godine (*31*) navodi studije koje pružaju znanstvene dokaze o zdravstvenoj dobrobiti hrane koja sadrži visoki udio antioksidansa, premda ti pozitivni učinci ne moraju biti nužno rezultat antioksidacijskih mehanizama.

Podaci iz različitih istraživanja pokazali su da konzumacija hrane s visokim udjelom antioksidansa, poput voća bogatog polifenolima, povećava antioksidacijski kapacitet krvi te konzumiranje takvih obroka zajedno s hranom bogatom mastima ili ugljikohidratima, koja je prooksidativna, može biti protuteža njenim negativnim učincima.

Upravo se ORAC metoda učestalo koristi u istraživanju antioksidacijskog učinka različitih namirnica te se vrijednosti dobivene ovim testom međusobno uspoređuju i nalaze u tzv. ORAC bazi podataka. Prehrambena industrija je prihvatila ORAC metodu u toj mjeri da su mnogi proizvođači počeli isticati ORAC vrijednosti na svojim proizvodima. Bez tih podataka ne bi bile moguće iscrpne epidemiološke studije o odnosu unosa antioksidansa hranom i tijeka različitih bolesti.

Također je važno istaknuti kako se rezultati različitih studija mogu međusobno uspoređivati, samo ako se (znanstveno) naglasi radi li se o svježoj, suhoj hrani ili sokovima. Također, proces proizvodnje i prerade hrane utječe na promjenu njenog antioksidacijskog kapaciteta, stoga se na proizvodu smije naznačiti isključivo ORAC vrijednost za krajnji proizvod (*31*). Cao i sur. (*32*) su 1996. godine predočili rezultate za ORAC vrijednosti izražene na težinu svježeg ploda povrća i u njima je vidljivo da češnjak ima najveću ORAC vrijednost, a slijede ga kelj, špinat, prokulica, brokula, repa, crvena paprika, luk, kukuruz, patlidžan, cvjetača, krumpir, kupus, list zelene salate, mrkva, itd. Ou i sur. (*33*) su 2002. godine proveli opsežnu studiju antioksidacijske aktivnosti različitih uzoraka voća i povrća osušenih smrzavanjem, ukupno njih 927, metodama FRAP i ORAC i rezultati studije bili su sljedeći:

- ORAC poredak: zelena paprika > špinat > ljubičasti luk > brokula > repa > cvjetača > crvena paprika > bijeli luk > grah > rajčica > bijeli kupus > mrkva > grašak;
- FRAP poredak: crvena paprika > zelena paprika > repa > špinat > cvjetača > rajčica > brokula > bijeli kupus > ljubičasti luk > mrkva > grah > bijeli luk > grašak.

Dobiveni rezultati se međusobno razlikuju prvenstveno zbog različitih mehanizama kod korištenih metoda, ali pored toga ovise i o brojnim drugim čimbenicima kao što su sorta, zemljopisno podrijetlo namirnica, vrijeme berbe, itd.

Prema dobivenim rezultatima Ou i sur. (*33*) su zaključili da su zelena paprika, špinat, ljubičasti luk, brokula, repa i cvjetača vodeći izvori antioksidansa koji izuzetno učinkovito inhibiraju peroksil radikal. Wu i sur. (*34*) su 2004. godine testirali 100 različitih namirnica, a vrlo visoke ORAC vrijednosti, između 2000 i 14000 μmol TE, su dobivene za sve vrste bobičastog voća, crveni grah, jabuku, orah, trešnju, crne šljive, crveni krumpir, crni grah, kruške, lješnjake, naranče, grožđice, smokve, avokado, brokulu, crveni kupus, pistacia i crveno grožđe.

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. KEMIKALIJE I UREĐAJI

Kemikalije:

- Natrijev-fosfat-dihidrat,
- Dinatrijev hidrogenfosfat,
- Flourescein 3',6'-dihidroksi spiro[izobenzofuran-1(3H),9'-[9H] kstanten]-3-on
- 2,2'- azobis(2-metilpropionamidin) dihidroklorid granularni, 97 %,
- Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka.

Uređaji:

- Analitička Vaga Kern Model ALS 120-4, Kingston, Ujedinjeno Kraljevstvo,
- Mikrotitarski čitač pločica, Synergy HTX Multi-Mode Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA).

Programski paketi:

- GEN 5 – programski paket za čitanje i fotografiranje mikrotitarskih pločica (BioTek, Winooski, Vermont, USA).

2.2. ORAC METODA

Ovom metodom se određuje antioksidacijski kapacitet uzorka praćenjem inhibicije djelovanja slobodnog peroksil radikala koji nastaje raspadanjem 2,2-azobis(2-metilpropionamid)-dihidroklorida (AAPH) na fluorescentni spoj fluorescein (*18*).

Reagensi:

a) Fosfatni pufer, pH 7, c = 0,2 M

Odvaže se 6,242 g natrijevog fosfata dihidrata ($NaH_2PO_4 \times 2H_2O$) i otopi u 200 mL destilirane vode, te se u istoj količini vode otopi i 5,687 g dinatrijevog hidrogenfosfata (Na_2HPO_4). U novoj tikvici od 200 mL se pomiješa 61 mL 0,2 M otopine Na_2HPO_4 i 39 mL 0,2 M otopine $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$ te se ista nadopuni destiliranom vodom do oznake.

b) Fosfatni pufer, pH 7, c = 0,075 M

U odmjernu tikvicu od 100 mL se doda 37,5 mL 0,2 M otopine fosfatnog pufera te se ista nadopuni destiliranom vodom do oznake. Svaki dan je potrebno pripraviti svježu otopinu.

c) Fluorescein

Otopina 1: Otopi se 15 mg fluoresceina u 100 mL 0,075 M fosfatnog pufera

Otopina 2: Od otopine 1 se uzme 100 µL te se nadopuni s 10 mL 0,075 M fosfatnog pufera.

Otopina 3: Od otopine 2 se uzme 50 µL te se nadopuni s 50 mL M fosfatnog pufera.

Svaki dan se pripravljaju svježa razrjeđenja otopina flouresceina!

d) AAPH

Otopi se 0,207 g AAPH u 5 mL 0,075 M fosfatnog pufera.

Svaki dan se priprema svježi reagens!

e) Otopina standarda - Troloksa

Početna ("stock") otopina Troloksa, početne koncentracije 0,5 mM se pripravi otapanjem 6,26 mg troloksa u 50 mL 0,075 M fosfatnog pufera. Iz pripremljene 0,5 mM otopine troloksa pripremi se 6 razrjeđenja (6,25-100 µM).

Postupak određivanja:

Mjerenja se provode spektrofluorimetom pri λ_{eks} = 485 nm i λ_{em} = 520 nm. Uređaj prije mjerenja treba termostatirati na temperaturu 37˚C kako bi brzina stvaranja radikala bila konstantna.

Postupak određivanja je modificiran u odnosu na postupak opisan u doktoratu Bursać-Kovačević (*18*), tako da su volumeni prilagođeni mjerenjima u mikrotitarskim pločicama. U poru mikrotitarske pločice se doda 225 µL fluoresceina i 37,5 µL uzorka (0,075 M fosfatnog pufera za slijepu probu ili otopine standarda Troloksa za izradu baždarnog pravca). Tako pripremljene otopine se termostatiraju 30 minuta pri 37˚C. Nakon tih pola sata dodaje se 3,75 µL AAPH te se svake minute mjeri promjena intenziteta fluorescencije.

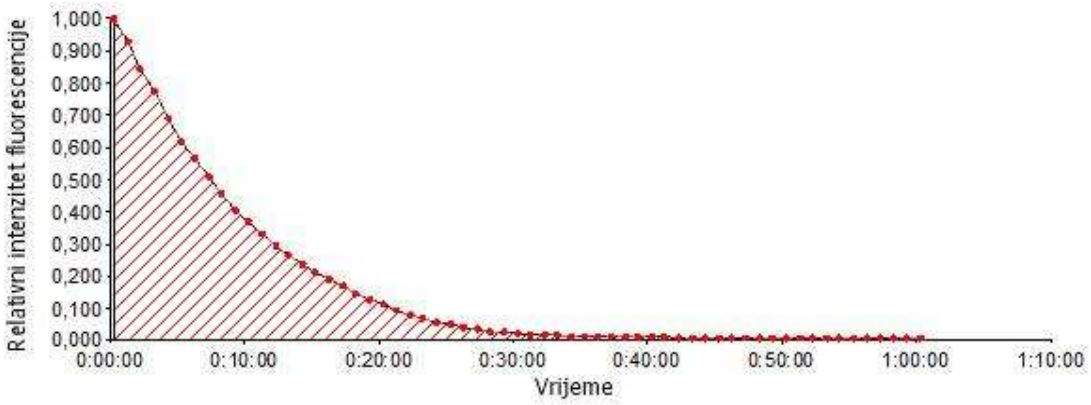
Izrada baždarnog pravca:

Za izradu baždarnog pravca ispituju se otopine Troloksa različitih koncentracija, od 0-25 µM.

3. REZULTATI I RASPRAVA

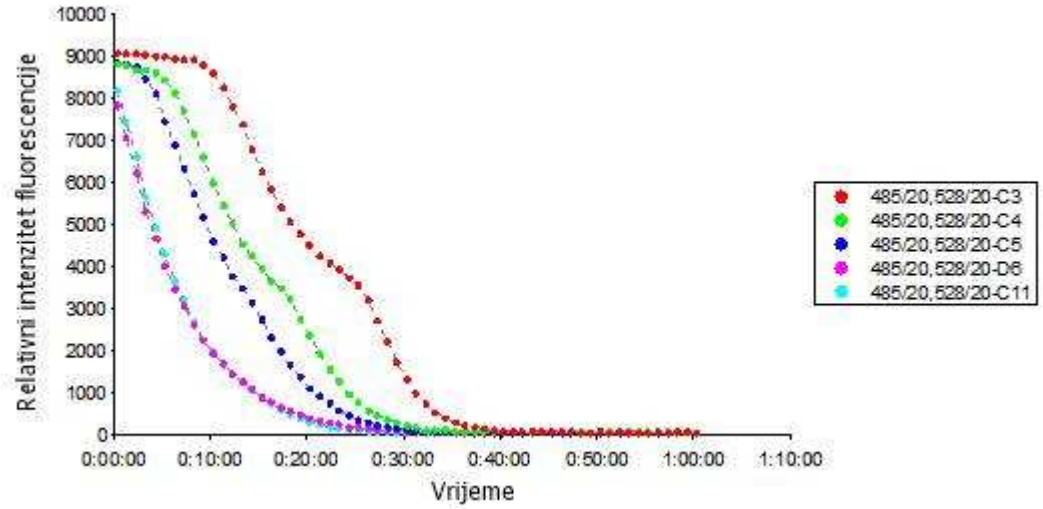
Zadatak ovog završnog rada bio je postaviti i optimizirati metodu ORAC na uređaju mikrotitarskom čitaču pločica Synergy HTX Multi-Mode Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA).

Metoda ORAC se zasniva na sposobnosti antioksidansa da neutralizira aktivnost peroksilnog radikala donirajući mu proton. Nastali peroksil radikal reagira sa fluoresceinom pri čemu nastaje nefluorescentni produkt, a navedena reakcija uzrokuje pad fluorescencije reakcijske smjese što se može kvantificirati korištenjem spektrofluorimetra. Antioksidacijska aktivnost uzorka se kod ORAC metode izražava preko površine koju "zatvara" krivulja pada relativnog intenziteta fluorescencije u vremenu, odnosno iz razlike ukupne površine koju daje krivulja za uzorak (otopinu standarda) i one koju daje slijepa proba. Izgled krivulje za slijepu probu vidljiv je na slici 9.



Slika 9. Prikaz pada vrijednosti intenziteta fluorescencije za slijepu probu

Rezultati antioksidacijske aktivnosti uzoraka određeni metodom ORAC se najčešće izražavaju preko Troloks ekvivalenata u jedinicama, u μM TE uzorka, pa je stoga i u ovom radu kao standard korišten Troloks. Baždarni pravac je izrađen testiranjem otopina standarda različitih koncentracija (6,25-25 μM). Mjerenja su se provodila tijekom 1 sata tako da se vrijednost fluorescencije bilježila svake minute. Na slici 10. vidljive su promjene vrijednosti relativnog intenziteta fluorescencije (RFU) odnosno njihov pad za otopine troloksa različitih koncentracija (6,25-25 μM) tijekom 60 minuta.

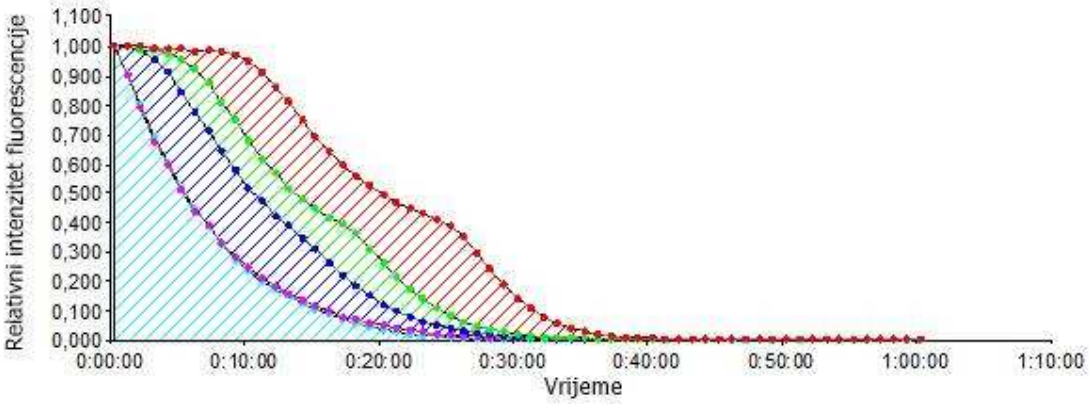


crveno- 25 µM, zeleno -12,5 µM, modro-6,25 µM, plavo- 0 µM, ljubičasto- slijepa proba

Slika 10. Prikaz promjene nenormaliziranih vrijednosti intenziteta fluorescencije za otopine standarda (Troloksa) različitih koncentracija

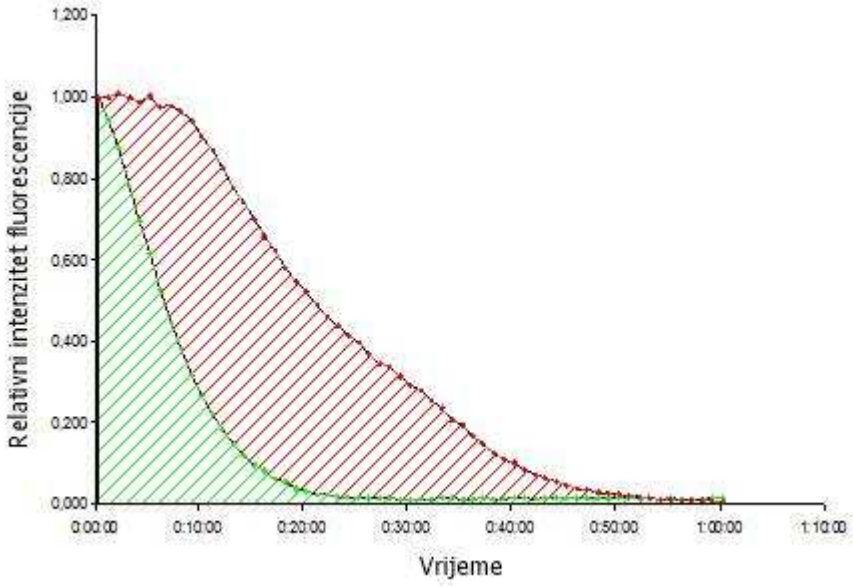
Na slici 10 su prikazani direktno očitani rezultati za pojedine otopine, međutim u svrhu njihove međusobne usporedbe vrlo ih je važno normalizirati, odnosno matematičkim modelima svesti na istu početnu točku mjerenja, odnosno istu početnu vrijednost fluorescencije. Programski paket korišten za obradu rezultata ima opciju automatskog normaliziranja što značajno olakšava manipulaciju rezultatima i interpretaciju istih. Na slici 10 je prikazan graf dobiven nakon normalizacije na kojem je jasno vidljivo da su kod svih mjerenja početne vrijednosti fluorescencije svedene na istu vrijednost koja je iznosila 1,0.

Također, sa slike 11 se jasno može vidjeti da je pad fluorescencije najznačajniji kod slijepe probe koja ne sadrži antioksidanse (ljubičasta krivulja), dok je on sve blaži kako raste koncentracija Troloksa (antioksidansa) u otopinama standarda što je i očekivano. Upravo iz ovih krivulja programski paket direktno računa razliku površine koju krivulja otopine standarda zatvara s osi x i ove koju zatvara krivulja slijepe probe. Slika 11 jasno prikazuje princip računanja vrijednosti ORAC, odnosno razliku u površinama (prostor između krivulja) za otopinu standarda i slijepu probu koja je iscrtkana crveno.



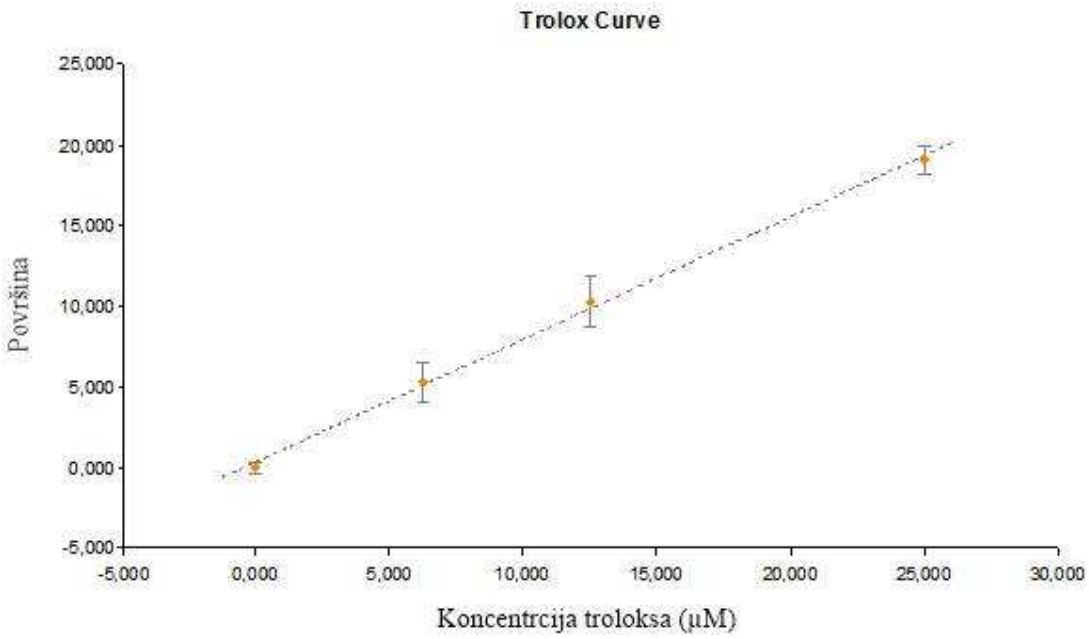
crveno- 25 µM, zeleno -12,5 µM, modro-6,25 µM, plavo- 0 µM, ljubičasto- slijepa proba

Slika 11. Prikaz površina ispod krivulja za normalizirane vrijednosti otopina standarda (Troloksa) različitih koncentracija



Slika 12. Primjer izgleda normaliziranih rezultata korištenih za računanje površine između krivulje dobivene za otopinu standarda Troloksa (c = 25 µM, crvena krivulja) i slijepu probu (zelena krivulja)

Iz izračunatih vrijednosti površina između krivulja za uzorke (standarde) i slijepu probu konstruira se graf linearne ovisnosti izmjerene (izračunate) površine (y-os) o koncentraciji otopine standarda (x-os). Izradom umjerenog pravca omogućeno je izražavanje rezultata za ostale spojeve, smjese te nepoznate uzorke preko jedinica Troloks ekvivalenata TE (obično u μM TE/g uzorka ili μM TE/L uzorka).



Slika 13. Baždarni pravac za ORAC metodu za otopine standarda (Troloksa)

4. ZAKLJUČAK

U ovom radu uspješno je postavljena i optimizirana metoda ORAC na mikrotitarskom čitaču pločica. Dobivena jednadžba baždarnog pravca za otopine Troloksa različitih koncentracija omogućuje određivanje antioksidacijskog kapaciteta nepoznatih uzoraka i izražavanje dobivenih rezultata preko univerzalnog standarda, što omogućuje međusobnu usporedbu istih.

5. LITERATURA

1. Ghodbane S, Lahbib A, Sakly M, Abdelmelek A. Bioeffects of static magnetic fields: Oxidative stress, genotixic effects, and cancer studies. BiokMed Res Int. 2013;602987:1-12.

2. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J Agric Food Chem. 2005;53:4290-4302.

3. Gutteridge JMC, Halliwell B. Antioxidants in nutrition, health, and disease. Oxford University Press, New York, USA. 1996.

4. Halliwell B, Gutteridge, JMC. Free Radicals in Biol and Med, Third Edition, Oxford University Press, New York. 1999;105:22-60,617:225-246.

5. Lacković Z. Farmokološki antioksidansi. Oksidativni stres i djelotvornost antioksidansa. Priručnik Sveučilište u Zagrebu Medicinski fakultet i Hrvatsko društvo farmakologa, Medicinska naklada, Zagreb. 2001, 85-104.

6. Prior RL. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. J Func Foods. 2015;18:797–810.

7. Generalić I. Fenolni profil, antioksidacijski i antimikrobni potencijal odabranoga ljekovitoga bilja mediteranskoga podneblja [doktorska disertacija], Zagreb, Hrvatska: Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2011 (na hrvatskom jeziku).

8. http://www.zzjzpgz.hr/nzl/27/vitamini.htm (pristupljeno: 16. kolovoza 2016.)

9. Gamulin S, Marušić M, Kovač Z. Patofiziologija Zagreb, Medicinska naklada. 2005;187-193;408-410.

10. URL: http://www.belupo.com/Default.aspx?sid=4763 (pristupljeno: 16. kolovoza 2016.)

11. Čakarić D. Primjena cikličke voltametrije u određivanju antioksidativne aktivnosti bioloških uzoraka [završni rad], Zagreb, Hrvatska: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, 2009 (na hrvatskom jeziku).

12. Segundo M, Magalheas L, Reis S. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. Anal Chim Acta. 2007;613:1-19.

13. Vrhovac B, Francetić I Jakšić B, Labar B, Vucelić B. Interna medicina, Zagreb, Ljevak. 2003;584-589;408-409.

14. URL: http://www.belupo.hr/Default.aspx?sid=4763 (pristupljeno: 16. kolovoza 2016.)

15. Amorati R, Valgimigli L. Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. Free Rad Res. 2015;49:633-649.

16. URL: http://mediko.sveznadar.info/20Lijekovi/20Vitamini/Radikali.html (pristupljeno: 16. kolovoza 2016.)

17. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J Agric Food Chem. 2005;53:4290-4302.

18. Bursać-Kovačević D. Utjecaj sorte, uzgoja i prerade na stabilnost polifenolnih spojeva i antioksidacijski kapacitet jagode [doktorska disertacija], Zagreb, Hrvatska: Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2010 (na hrvatskom jeziku)

19. Huang D, Ou B, Prior R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. J Agric Food Chem. 2005;53:1841-1856.

20. Badarinath AV, Mallikarjuna RA, Sudhana Chetty CM, Ramkanth S, Rajan TVS, Gnanaprakash K. A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlatinos and considerations. Int J PharmTech Res. 2010;2:1276-1285.

21. Benzie IFF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods in Enzimology, Academic Press. 1999;299:15-27.

22. Karadag A, Ozcelik B, Saner S. Review of methods to determine antioxidant capacities. Food Anal Met. 2009;2:41-60.

23. Ndhlala AR, Moyo M, Van Staden J. Review of natural antioxidants: Fascinating or mythical biomolecules? Molecules. 2010;15:6905-6930.

24. Apak R, Gűçlű K, Demitra B, Őzyűrek H, Esin Çelik S, Be ktaşoğlu, Berker KI, Őzyurt D. Review: Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assasy. Molecules, 2007;12:1496-1547.

25. Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandom R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. Food and Bioprod Process. 2010;89:217-233.

26. Ribeiro B, Valentão P, Baptista P, Seabra RM, Andrade P.B. Phenolic compounds, organic acids profiles and antioxidative properties of beefsteak fungus (*Fistulina hepatica*). 2007;45:1805-1813

27. Cervellati R, Höner K, Furrow SP, Neddens C, Costa S. The Briggs-Rauscher as a test to measure the activity of antioxidants. Helv Chim Acta. 2001;84:3533-3547.

28. Garrett AR, Murray BK, Robison RA, O' Neill KL. Review: Measuring antioxidant capacity using the ORAC and TOSC assays. Methods Mol Biol. 2010;594:251-62.

29. Cronin JR. Review: The Biochemistry of Alternative Medicine: Comparing Antioxidant Values with the ORAC Method. Alternative and Complementary Therapies. 2004;10:167-170.

30. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Trolox (pristupljeno: 17. kolovoza 2016.)

31. Prior RL. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. J Func Foods. 2015;18:797-810.

32. Cao S, Sofic M, Prior RL. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. J Agric Food Chem. 1996;44:3426-3431.

33. Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan J, Deemer EK, Prior RL, Huang D. Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. J Agric Food Chem. 2002;50:2772-2777.

34. Wu X, Gu L, Holden J, Haytowitz D, Gebhardt SE, Beecher G, Prior RL. Factors in the development of a database of food total antioxidant capacity using lipophilic and hydrophilic oxygen radical absorbance capacity ($ORAC_{FL}$): a preliminary study of 28 foods. J Food Compos Anal. 2004;17:407-422.