

# Metode mjerenja antioksidativne aktivnosti

---

**Pregiban, Kristina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2017**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:182:381594>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2020-11-01**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Kristina Pregiban

Metode mjerenja antioksidativne aktivnosti

Završni rad

Mentor: Milan Sak-Bosnar

Osijek, 2017.

## Sažetak

Antioksidansi su spojevi koji pokazuju veliku aktivnost u sprječavanju štetnog djelovanja slobodnih radikala. Za mjerenje antioksidativne aktivnosti spojeva služe nam različite metode među koje ubrajamo spektrometrijske, elektrokemijske i kromatografske metode. Kao ostale metode opisane su biosenzorska metoda, fluorimetrija i elektronska spinska rezonancija. U spektrometrijskim metodama, antioksidans donira vodik radikalnu ili radikalskom kationu, te na taj način reagira s njim. U ovom radu objašnjene su DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)), FRAP (ferric reducing antioxidant power), ORAC (oxygen radical absorption capacity), HORAC (hydroxyl radical averting capacity), TRAP (total peroxy radical trapping antioxidant parameter), PERAP (potassium ferricyanide reducing power) i CUPRAC (cupric reducing antioxidant power) (2,2-difenil-1-pikihidrazil) spektrometrijske metode. Elektrokemijske metode se temelje na mjerenju intenziteta struje i potencijala radne elektrode. Ciklička voltometrija, amperometrija i biamperometrija opisane su kao najznačajnije elektrokemijske metode. Kromatografske metode temelje se na razdvajanju spojeva između stacionarne i mobilne faze iz smjese spojeva, nakon čega se antioksidativni kapacitet spojeva određuje spektrofotometrijskom metodom. U ovom radu objašnjene su plinska i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). Biosenzori se primjenjuju za određivanje antioksidansa u čijem istraživanju je uključeno praćenje superoksidnog radikala, dušikovog oksida, glutationa, urične kiseline, askorbinske kiseline ili fenolnih spojeva, a za mjerenje ukupne antioksidativne aktivnosti koriste se DNA biosenzori. Fluorometrija je metoda koja se temelji na fluorescenciji, a antioksidativni kapacitet spojeva se određuje mjerenjem fluorescencijskog i emisijskog spektra pomoću spektrofotometra. Elektronska spinska rezonancija je metoda koja se koristi za proučavanje slobodnih radikala i paramagnetskih metala u kemijskim i biološkim tkivima.

**Ključne riječi:** antioksidansi, antioksidativna aktivnost, spektrometrijske metode, elektrokemijske metode, kromatografske metode, biosenzori, fluorimetrija, ESR

## Abstract

Antioxidants are compounds that show great activity in preventing the harmful effects of free radicals. To measure the antioxidant activity of the compounds, different methods are used, which are spectrometric, electrochemical and chromatographic ones. As other methods, the biosensor method, fluorimetry and electron spin resonance are described. In spectrometric methods, the antioxidant donates hydrogen to the radical or radical cation and thus react with it. This paper explains DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)), FRAP (ferric reducing antioxidant power), ORAC (oxygen radical absorption capacity), HORAC (hydroxyl radical averting capacity), TRAP (total peroxy radical trapping antioxidant parameter), PERAP (potassium ferricyanide reducing power) and CUPRAC (cupric reducing antioxidant power) spectrometric methods. Electrochemical methods are based on measuring the intensity of the current and the potential of the working electrode. Cyclic voltammetry, amperometry and biamperometry are described as the most important electrochemical methods. Chromatographic methods are based on the separation of the compounds between the stationary and the mobile phase from the mixture of compounds, after which the antioxidant capacity of the compounds is determined by spectrophotometric method. This paper describes high-resolution gas and liquid chromatography (HPLC). Biosensors are used to determine the antioxidants in which a superoxide radical, nitrogen oxide, glutathione, uric acid, ascorbic acid or phenolic compounds is monitored, and DNA biosensors are used to measure total antioxidant activity. Fluorimetry is a method based on fluorescence, and the antioxidant capacity of the compounds is determined by measuring the fluorescence and emission spectra by spectrophotometers. Electron spin resonance is a method used to study free radicals and paramagnetic metals in chemical and biological tissues.

**Keywords:** antioxidants, antioxidant activity, spectrometric methods, electrochemical methods, chromatographic methods, biosensors, fluorimetry, ESR

## Sadržaj

1. UVOD .....	5
2. ANTIOKSIDANSI.....	7
3. TESTOVI KOJI SE BAZIRAJU NA PRIJENOSU VODIKA I JEDNOG ELEKTRONA (HAT I SET) .....	8
4. MJERENJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI.....	9
5. SPEKTROMETRIJSKE METODE.....	11
5.1. DPPH metoda.....	11
5.2. ABTS metoda.....	13
5.3. ORAC metoda .....	14
5.4. HORAC test .....	15
5.5. FRAP metoda.....	15
5.6. TRAP metoda.....	17
5.7. PFRAP metoda.....	17
5.8. CUPRAC metoda .....	17
6. ELEKTROKEMIJSKE METODE.....	18
6.1. Ciklička voltametrija.....	18
6.2. Amperometrijska metoda .....	20
6.3. Biamperometrijska metoda .....	20
7. KROMATOGRAFSKE METODE.....	22
7.1. Plinska kromatografija .....	22
7.2. HPLC (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti) metoda .....	22
8. OSTALE METODE.....	24
8.1. Biosenzorske metode.....	24
8.2. Fluorimetrija.....	25
8.3. Elektronska spinska rezonancije (ESR) .....	26
9. TOČNOST MJERENJA NAVEDENIH METODA .....	27
10. ZAKLJUČAK .....	28
11. LITERATURA.....	29

## 1. UVOD

Zadatak završnog rada je opisati metode mjerenja antioksidativne aktivnosti. U drugom poglavlju je objašnjeno da su antioksidansi spojevi koji sprječavaju ili usporavaju procese oksidacije koje se događaju zbog utjecaja atmosferskog kisika ili reaktivnih kisikovih spojeva. Stabiliziraju polimerne produkte u proizvodnji petrokemijskih, prehrambenih, kozmetičkih i farmaceutskih proizvoda. Također, brane organizam od bolesti koje su povezane ili su nastale zbog napada slobodnih radikala. Endogeni spojevi su antioksidansi koji brane organizam, a to su enzimi poput superoksidne dismutaze, katalaze, glutation peroksidaze ili spojeva koji nisu enzimi poput urične kiseline, metalotioneina i albumina. Endogeni spojevi ne osiguravaju strogu kontrolu i potpunu zaštitu organizma od djelovanja slobodnih radikala. Zbog toga se u organizam moraju unositi egzogeni spojevi poput prirodnih dodataka ili farmaceutskih proizvoda. Najvažniji egzogeni spojevi su vitamin E,  $\beta$ -karoten, vitamin C, mineral Se, vitamin D itd. Egzogene spojeve možemo naći u prirodnim proizvodima, ali se također mogu i sintetički proizvesti kao npr. butilhidroksianizol, butilhidroksitoluen itd.

U trećem poglavlju objašnjeno je kako antioksidansi reagiraju s radikalima i kojim mehanizmom. Postoje dva osnovna mehanizma koji se baziraju na prijenosu vodika ili elektrona. Opisane metode u ovom radu koriste jedan ili oba mehanizma. U četvrtom poglavlju dan je detaljni pregled metoda opisanih u završnom radu.

U petom poglavlju opisane su spektrometrijske metode koje se temelje na reakciji radikala, radikalnog kationa ili kompleksa sa donatorom vodika. Među spektrometrijske metode ubraja se DPPH, ABTS, FRAP, PFRAP, CUPRAC, ORAC, HORAC i TRAP metode. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) je stabilni slobodni radikal jer se slobodni elektroni u molekuli delokaliziraju na cijelu molekulu što dovodi do njegove veće stabilnosti. Metoda se temelji na reakciji antioksidansa s DPPH $\cdot$  koji pokazuje apsorbanciju na 517 nm. Njihovom reakcijom dolazi do gubitka ljubičaste boje radikala. Gubitkom elektrona dušika u molekuli ABTS (2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) nastaje radikalni kation (ABTS $\cdot^+$ ) koji je zelene boje s maksimum apsorbancije na 734 nm. Metoda se temelji na reakciji antioksidansa s organskim radikalnim kationom pri čemu dolazi do gubitka zelene boje radikala što se vidi mjerenjem apsorbancije otopine. FRAP metoda se zasniva na reakciji kompleksa željeza – TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-tirazin) s antioksidansom pri čemu dolazi do redukcije navedenog kompleksa. Vezanjem Fe $^{2+}$  na ligand nastaje vrlo intenzivna plava boja. Apsorbancija se može mjeriti testiranjem reduciranog željeza

dobivenog nakon reakcije antioksidansa s kompleksom. ORAC test je metoda koja mjeri antioksidativnu aktivnost u reakciji s peroksidnim radikalom iz 2,2- azobis-(2-amidin-propan) dihidroklorida na 37°C. U HORAC metodi se mjeri kapacitet aktivnosti antioksidansa u uvjetima poput Fenton reakcija. U TRAP metodi se mjeri kapacitet antioksidansa u reakciji uklanjanja radikala dobivenog AAPH razgradnjom. PFRAP metoda zasniva se na porastu apsorbancije koja je povezana s reducirajućom sposobnosti antioksidansa. U CUPRAC metodi dolazi do reakcije standardnih antioksidansa ili ekstrakta s  $\text{CuSO}_4$  i neokuproinom

U šestom poglavlju opisane su elektrokemijske metode koje se temelje na mjerenju intenziteta struje. Najviše se koriste ciklička voltometrija i biamperometrija. Ciklička voltometrija se koristi za određivanje kapaciteta antioksidansa male molekulske mase u krvnoj plazmi, tkivnim homogenatima i biljnim ekstraktima. Potencijal radne elektrode linearno se mijenja od početne do konačne vrijednosti, te se bilježi određeni intenzitet. Biamperometrija se zasniva na reakciji antioksidansa s oksidiranim oblikom određenog redoks para.

U sedmom poglavlju opisane su kromatografske metode koje se često koriste za odvajanje antioksidansa, nakon čega se određuje aktivnost antioksidansa. Kromatografske metode koriste se prije elektrokemijske i spektroskopske procjene kapaciteta antioksidansa. Najčešće se koriste plinska i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.

U osmom poglavlju opisane su ostale metode među koje ubrajamo biosenzorske, fluorometriju i elektronsku spinsku rezonanciju (ESR). Biosenzori se koriste za mjerenje stanja antioksidansa, a uključuju praćenje superoksidnih radikala, dušikovog oksida, glutationa, urične kiseline, askorbinske kiseline i fenolnih spojeva. Za određivanje fenolnih spojeva u uljima koristi se fluorometrija koja se temelji na fluorescenciji. ESR je metoda koja se još naziva i elektronska paramagnetska rezonancijska spektroskopija, a koristi se za proučavanje slobodnih radikala i paramagnetskih metala u kemijskim i biološkim tkivima.

U devetom poglavlju objašnjena je točnost navedenih metoda, dok je u desetom poglavlju dan cjelokupni zaključak završnog rada.

## 2. ANTIOKSIDANSI

Antioksidansi su spojevi koji usporavaju i sprječavaju oksidaciju drugih molekula. Tijekom oksidacije dolazi do prijenosa elektrona ili vodika s tvari na oksidacijsko sredstvo. U oksidacijskim reakcijama mogu nastati slobodni radikali koji tada započinju lančanu reakciju u stanici i tako prouzrokuju štetu ili smrt stanice. Antioksidansi sprječavaju te lančane reakcije uklanjanjem intermedijera slobodnog radikala i usporavaju druge oksidacijske procese. Kao reducirajući agensi se koriste tioli, polifenoli ili askorbinska kiselina. Antioksidansi su objašnjeni na više načina kao npr. tvari koje u malim količinama usporavaju oksidaciju tvari koje lako oksidiraju ili kao svaka tvar koja prisutna u manjoj koncentraciji u odnosu na oksidiranu tvar sprječava njezinu oksidaciju. U znanosti o hrani, antioksidansi su objašnjeni kao tvari koje su u hrani prisutne u manjoj koncentraciji u odnosu na oksidirani supstrat i značajno smanjuju ili sprječavaju štetne učinke reaktivnih slobodnih radikala poput dušikovih i kisikovih radikala. Antioksidansi su zaslužni za obranu organizma od patogenih bolesti uzrokovanih slobodnim radikalima. Antioksidansi biljnog podrijetla su uključeni u sprječavanju bolesti uzrokovanih oksidacijskim stresom poput zloćudnih tumora, ateroskleroze, Alzheimirove bolesti ili Parkinsonove bolesti.

Antioksidanse možemo podijeliti u različite kategorije. U prvoj kategoriji antioksidanse dijelimo na primarne i sekundarne. Primarni antioksidansi prekidaju lančanu reakciju tako da reagiraju s lipidnim radikalom i stvaraju stabilni produkt. U ovu grupu spadaju: fenoli, vitamini, minerali, flavonoidi, karotenoidi, likopeni, diterpeni, češnjak, kumin i njihovi derivati. Sekundarni antioksidansi su fenolni spojevi koji mijenjaju funkciju vezanog slobodnog radikala i na taj način zaustavljaju lančanu reakciju. Tu spadaju: butilirani hidroksianisol (BHA), butilirani hidroksitoluen (BHT) i propil galat (PG). U drugoj kategoriji antioksidanse dijelimo na neenzimske i enzimске. Neki od njih su endogeno proizvedeni što uključuje kofaktore enzima i enzime male molekulske mase. Mnogi neenzimski antioksidansi su dobiveni iz hrane od kojih najviše ima polifenola. Polifenoli sadrže flavonoide i fenolnu kiselinu. Ova grupa uključuje i vitamine, minerale, organosulfurale i karotenoide. Važno je napomenuti da postoji velika razlika između antioksidativne i antiradikalne aktivnosti. Antioksidativnu aktivnost karakterizira sposobnost antioksidansa da uspori oksidaciju tvari. Antiradikalnu aktivnost karakterizira sposobnost antioksidansa da reagira sa slobodnim radikalom i na taj način spriječi lančanu reakciju. Mnogo analitičkih metoda rezultira neprimjerenom primjeni i interpretaciji testa.



Niz in-vitro kemijskih metoda se koristi za određivanje antioksidativne aktivnosti različitih tvari. Reakcije oksidacije slobodnim radikalom odvijaju se u tri koraka: inicijacija, terminacija i propagacija. Inicijacija započinje djelovanjem svjetla, topline ili ionizirajućeg zračenja. U inicijaciji započinje stvaranje reaktivnog alkilnog radikala koji u reakciji s kisikom daje lipidni peroksidni radikal. U propagaciji peroksidni radikali započinju lančanu reakciju gdje mogu dalje oksidirati lipid stvarajući lipidne hidroperokside koji se dalje razgrađuju na druge spojeve. Terminacijom završava lančana reakcija, jer reakcijom dvaju radikala nastaje ne radikalski spoj (Antolovich, Prenzler, Patsalides, McDonalds, Robards, 2002).

Prema načinu djelovanja antioksidanse dijelimo u dvije skupine: SET (Single Electron Transfer) i HAT (Hydrogen-Atom Transfer).

### 3. TESTOVI KOJI SE BAZIRAJU NA PRIJENOSU VODIKA I JEDNOG ELEKTRONA (HAT I SET)

Testovi bazirani na HAT-u mjere sposobnost kojom se antioksidans veže na slobodne radikale doniranjem vodikovog atoma. Reakcija koja se događa između fenola i radikala je:  $ROO\cdot + AH/ArOH \rightarrow ROOH + A\cdot/ArO\cdot$ . Ariloksi radikal dobiven reakcijom fenola s peroksidnim radikalom je rezonancijski stabiliziran. ArOH i AH su molekule koje sadrže fenolne antioksidanse i doniraju ih u reakciji s peroksidnim radikalom, da bi se spriječila njegova reakcija s biomolekulom. Da bi prekinuo oksidaciju fenolni antioksidans mora reagirati brže od biomolekule sa slobodnim radikalom. U fluorescencijskim metodama fluorescentna proba i antioksidans reagiraju sa slobodnim radikalom. Antioksidativna aktivnost se može odrediti iz brzine natjecanja fluorescentne probe i antioksidansa s radikalom mjerenjem fluorescencijskog raspada krivulje uzorka u prisutnosti i odsutnosti antioksidansa i integriranjem površine ispod krivulja, te nalaženjem razlika između njih. U SET mehanizmu dolazi do reakcije između antioksidansa i obojene sonde (oksidirani agens) ili fluorescenta umjesto sa peroksidnim radikalom. Spektrometrijske SET metode temelje se na mjerenju sposobnosti kojom antioksidans reducira oksidans, pri čemu mijenja početnu boju. Stupanj promjene boje ovisi o koncentraciji antioksidansa u uzorku.

#### 4. MJERENJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

Metode mjerenja antioksidativne aktivnosti mogu se podijeliti u tri kategorije: spektrometrijske, elektrokemijske i kromatografske metode. ABTS, DPPH, ORAC i FRAP su spektrometrijske metode kod kojih se rezultati podudaraju kad se mjerenja antioksidativne aktivnosti provode u metanolnim ekstraktima. DPPH metoda temelji se na mjerenju (pomoću spektrofotometra) sposobnosti redukcije 2,2- difenilpikrilhidrazil radikala pomoću antioksidansa. ABTS metoda se koristi za mjerenje sposobnosti vezanja flavonoida i fenola s radikalom. Pomoću ORAC metode određuje se sadržaj antioksidansa u voću i povrću. FRAP metoda je prikladna metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti u voćnim ekstraktima zbog svoje brze izvedbe i povezanosti s fenolima i askorbinskom kiselinom. Pomoću askorbinske kiseline ili fenola se također može odrediti antioksidativna aktivnost u metanolnim ekstraktima jer su oni povezani sa svim metodama. Jednostavna, brza i jeftina je metoda koja ne zahtjeva specijaliziranu opremu. CUPRAC metoda se temelji na redukciji Cu(II) u Cu(I) pomoću neokuproina. TRAP metoda je također spektrometrijska metoda koja se koristi za mjerenje antioksidativnog kapaciteta u plazmi ili serumu, jer mjeri aktivnost neenzimskih antioksidansa poput askorbinske kiseline i glutaciona. U HORAC metodi antioksidans se veže na OH radikale dobivene iz Co(II) kompleksa baziranog na Fenton sustavu. Vrijednosti dobivene ORAC, TRAP i HORAC metodom su povezane sa sadržajem fenola. Neke metode koje koriste on-line HPLC-DPPH su korisne za detekciju antioksidativne aktivnosti zbog jednostavnog rukovanja i svoje visoke osjetljivosti. Ciklička voltometrija je vrsta potenciodinamičkih elektrokemijskih mjerenja kod koje se bilježi intenzitet struje, a potencijal radne elektrode pokazuje linearnu ovisnost od početne do završne točke. Amperometrijska metoda uključuje mjerenje intenziteta struje između radne i referentne elektrode na nepromjenljivoj vrijednosti potencijala. Biamperometrijska metoda bazirana je na mjerenju struje koja putuje između dvije identične radne elektrode polarizirane na malu razliku potencijala i uronjene u otopinu koja sadrži reverzibilni redoks par. Od kromatografskih metoda koriste se plinska kromatografija i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti. Plinska kromatografija (GC) je metoda koja se koristi za odvajanje i analiziranje spojeva iz smjese. Odvajanje se događa između tekuće stacionarne faze i plinske mobilne faze. HPLC metoda se koristi za razdvajanje spojeva iz smjese, ali za razliku od plinske kromatografije, odvajanje se događa između čvrste stacionarne faze i tekuće mobilne faze pri visokoj brzini protoka i tlaku mobilne faze. Tablica 4. donosi pregled najvažnijih metoda.

Tablica 4. Metode mjerenja antioksidativne aktivnosti

Vrsta metode	Princip rada	Određivanje završne točke
<b><i>Spektrometrija</i></b>		
DPPH	Reakcija antioksidansa s organskim radikalom	Kolorimetrija
ABTS	Reakcija antioksidansa s organskim kationskim radikalom	Kolorimetrija
CUPRAC	Redukcija Cu(II) u Cu(I) pomoću antioksidansa	Kolorimetrija
FRAP	Reakcija antioksidansa s Fe(III) kompleksom	Kolorimetrija
PFRAP	Reakcija kalijeva fericijanida s antioksidastom i Fe <sup>2+</sup>	Kolorimetrija
ORAC	Reakcija antioksidansa s peroksidnim radikalom	Gubitak fluorescencije fluorescina
HORAC	Vežanje antioksidansa na OH radikale dobivene iz Co(II) (Fenton reakcija)	Gubitak fluorescencije fluorescina
TRAP	Izbacivanje luminol-derivirane radikale pomoću antioksidansa	Kemiluminiscencijski signal
<b><i>Elektrokemijske metode</i></b>		
Ciklička voltometrija	Potencijal radne elektrode pokazuje linearnost od početne do konačne vrijednosti, zabilježen je trenutni intenzitet struje	Mjerenje intenziteta katodnog/anodnog pika
Amperometrija	Potencijal radne elektrode je na fiksnoj vrijednosti u odnosu na referentnu elektrodu	Mjerenje intenziteta struje
Biamperometrija	Reakcija analita s oksidiranim oblikom redoks para	Mjerenje struje između dvije identične radne elektrode
<b><i>Kromatografija</i></b>		
GC	Odvajanje spojeva iz smjese između stacionarne faze i plinovite mobilne faze	Detekcija toplinske vodljivosti
HPLC	Odvajanje spojeva iz smjese između čvrste stacionarne i mobilne faze pri visokoj brzini protoka i tlaku mobilne faze	UV-VIS detekcija, fluorescencija, masena spektrometrija ili elektrokemijska detekcija

## 5. SPEKTROMETRIJSKE METODE

Spektrometrijske metode temelje se na reakciji radikala, radikalnog kationa ili kompleksa s molekulom antioksidansa koja donira atom vodika.

### 5.1. DPPH metoda

Metoda je koja pruža prvi pristup u procjeni antioksidativne aktivnosti spojeva prisutnih u ekstraktima ili drugim biološkim izvorima. U ovoj metodi mjeri se apsorbancija otopine spoja određene antioksidativne aktivnosti nakon reakcije s DPPH radikalom. Metoda je razvijena 1958. godine kada je Blois određivao antioksidativnu aktivnost korištenjem DPPH radikala, a temelji se na sposobnosti uklanjanja radikala antioksidansom. Antioksidans donira vodik dušiku koji sadrži jedan nespareni elektron odgovarajućeg hidrazina. DPPH radikal je stabilni radikal zbog delokalizacije elektrona preko cijele molekule, pa on ne dimerizira kao ostali slobodni radikali. Delokalizacija uzrokuje ljubičastu boju s apsorbancijom na 520 nm u otopini etanola. Tijekom reakcije DPPH radikala sa spojem koji može donirati vodikov atom, dolazi do gubitka ljubičaste boje. Nađeno je da DPPH• s antioksidansom reagira prema HAT mehanizmu (1):

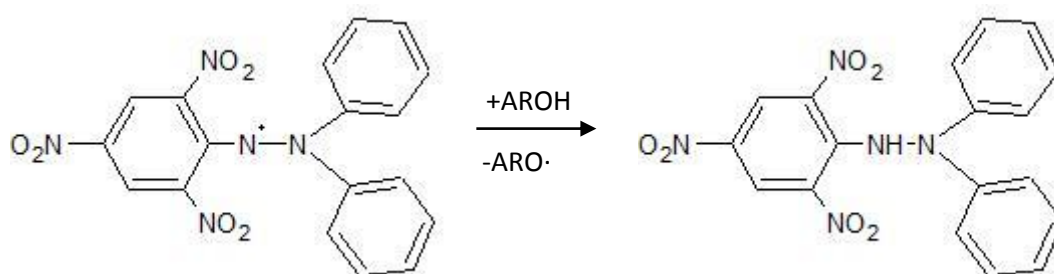


gdje je DPPH(H) reducirani oblik, a ArO• slobodni radikal koji ulazi u daljnju reakciju čime kontrolira ukupnu stehiometriju. Njihova reakcija u obliku strukturnih formula prikazana je na slici 5.1. DPPH• može reagirati s fenolnim spojem i putem SET mehanizma (2):



Medij u kojem se odvija reakcija, veličina, polarnost i kiselost fenolnih hidroksilnih skupina određuju hoće li se reakcija odvijati SET ili HAT mehanizmom. DPPH metoda jednostvna je, brza i široko primjenjivana metoda za mjerenje antioksidativne sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala i doniranja vodikovih atoma, te antioksidativne aktivnosti hrane (Shalaby, Shanab, 2013). Također se primjenjuje za mjerenje antioksidativne aktivnosti u složenim biološkim sustavima, voćnim i povrtnim sokovima i drugim tvarima. Metoda se izvodi u otopini metanola jer se time olakšava ekstrakcija antioksidativnih spojeva iz uzorka.

Prednost metode je da DPPH reagira s cijelim antioksidansom, a dovoljno vremena omogućuje da DPPH reagira sporo i kod slabih antioksidansa. Može se koristiti za ispitivanje hidrofilnih i lipofilnih antioksidansa, te u organskim i vodenim otapalima. Učinkovitost antioksidansa mjeri se na sobnoj temperaturi da se izbjegne njegova razgradnja. Ograničena je zbog interakcije DPPH s drugim radikalima, a krivulja odziva vremena do stacionarnog stanja nije linearna s različitim omjerima antioksidansa. Apsorbancija DPPH u metanolu i acetonu se smanjuje pod utjecajem svjetla. Ne koristi se za mjerenje antioksidativne aktivnosti krvne plazme, jer se u alkoholnom mediju talože proteini.



Slika 5.1. Reakcija DPPH radikala s antioksidansom ArOH prikazana strukturnim formulama

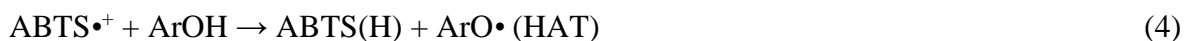
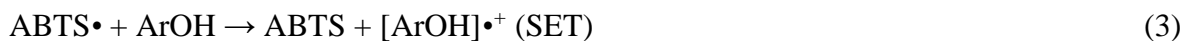
DPPH• reagira s različitim spojevima poput aromatskih aminokiselina, glutationa, askorbinske kiseline itd. Reakcijski mehanizam između antioksidansa i DPPH• ovisi o strukturnoj konformaciji antioksidansa (Bondet, Brand-Williams, Berset, 1997).

Za većinu spojeva koji su testirani, reakcije su sporije i mehanizmi kompliciraniji. Kako bi bolje razumjeli mehanizme koji uključuju reakciju DPPH• i antioksidansa potrebno je načiniti vjerojatnije kinetičke modele. U istraživanjima se kao standardna otopina uzima Trolox. Uzorak i Trolox reagiraju s DPPH u otopini vode/metanola četiri sata na 35 °C u posudi na rotacijskoj miješalici, a promjena apsorbancije se mjeri na 517 nm (Prakash, Rigelhof, Miller, 2017). Količina uzorka koja smanjuje apsorbanciju DPPH otopine za 50 % uzeta je kao završna točka mjerenja antioksidativne aktivnosti. Ta je promjena povezana s promjenom dobivenom pomoću Troloxa, a antioksidativna aktivnost je izražena u mikromolima Troloxa po 100 grama uzorka.

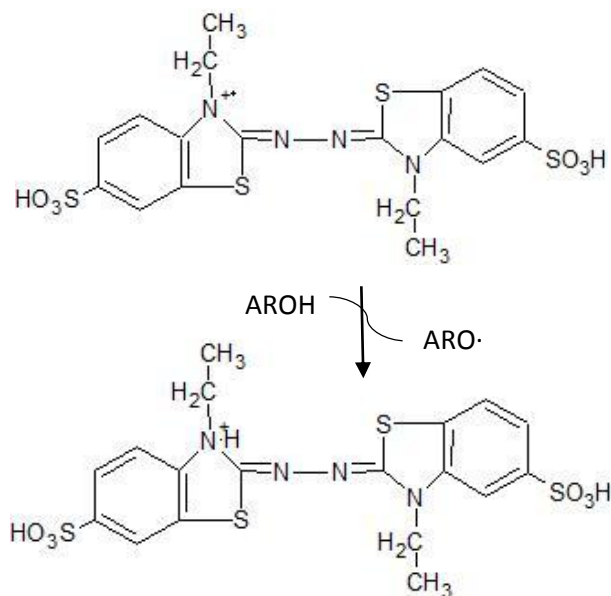
## 5.2. ABTS metoda

Koristi se za određivanje sposobnosti uklanjanja radikala pomoću flavonoida i fenola. ABTS metoda je bolji izbor od DPPH, jer je osjetljivija. Primjenjuje se kod različitih pH vrijednosti dok se DPPH metoda primjenjuje samo kod kiselih odnosno niskih pH vrijednosti. Zbog toga se primjenjuje i kod istraživanja utjecaja pH na antioksidativnu aktivnost. Također, ABTS je topljiv u organskim i vodenim otapalima pa se primjenjuje za testiranje antioksidativne aktivnosti uzoraka u različitom mediju. Još jedna prednost ABTS metode je da ABTS reagira brzo s uzorkom u vodenim otopinama pufera i postigne stacionarno stanje unutar 30 minuta, dok se kod DPPH metode uspostavlja približno stacionarno stanje tek nakon 8 sati.

ABTS metoda otkrivena je 1993. godine kad se mjerila antioksidativna aktivnost u plazmi odraslih ljudi i djece. ABTS može reagirati putem SET i HAT mehanizmu prema (3) i (4):



Reakcija ABTS radikala s antioksidansom prikazana je strukturnim formulama na slici 5.2. Spektrofotometar s diodom se koristi za mjerenje gubitka zelene boje u reakciji ABTS radikala s antioksidansom.



Slika 5.2. Reakcija ABTS radikala s antioksidansom ArOH prikazana strukturnim formulama

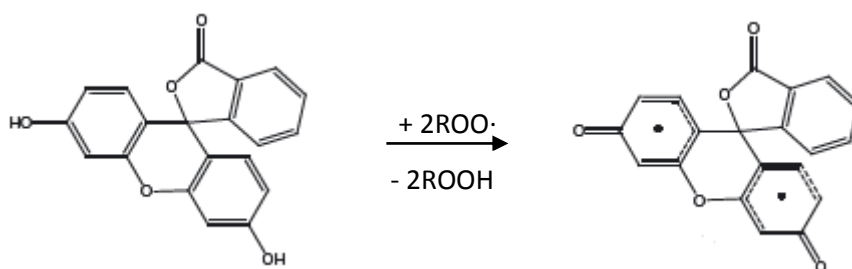
Reakcijom antioksidansa s ABTS radikalom dolazi do redukcije ABTS radikala u stabilan ABTS spoj. ABTS radikal nije pronađen u ljudskom tijelu. Ova spektrofotometrijska metoda koja se temelji na reakciji kationskog radikala i antioksidansa primjenjuje se za određivanje sadržaja antioksidansa u ekstraktima guave, voća i povrća, bezalkoholnim i alkoholnim pićima, te čaju i kavi. Istraživanjem je pokazano da je standardna krivulja linearna u području između 25 i 600 $\mu$ M Troloxa. Vrijednosti antioksidativnog kapaciteta u ekstraktu guave iznosile su između 22,3  $\pm$  0,9 i 37,9  $\pm$  3,4  $\mu$ M/masi. Antioksidativna aktivnost bezalkoholnih pića određena pomoću ABTS metode je imala vrijednost 0,09 mM Troloxa/litri Cole i 3,30 mM Troloxa/litri soka od grejpa. Sadržaj polifenola u čaju borovnice kretao se je od 85 mg/L do 385 mg/L (Kopjar, Knežević, Piližota, 2013).

### 5.3. ORAC metoda

Dodatkom generatora slobodnog radikala kao azo-inicijatora fluorescentnoj molekuli (B-fikoeritrin ili R-fikoeritrin) i zagrijavanjem smjese, azo-inicijator proizvodi peroksilne radikale koji oštećuju fluorescentnu molekulu što rezultira gubitkom fluorescencije. Reakcija se odvija prema (5):



a predloženi mehanizam prikazan je strukturnim formulama na slici 5.3. Bilježi se krivulja intenziteta fluorescencije u vremenu, a površina ispod krivulje sa i bez antioksidansa uspoređuje se sa standardnom krivuljom dobivenom korištenjem antioksidansa ( $\pm$ ) -6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Moharram, Youssef, 2014). Svaki antioksidans prisutan u reakcijskoj smjesi reagira s peroksilnim radikalom putem HAT mehanizma i usporava smanjenje fluorescentnog signala. Pad fluorescencije zabilježen je na 515 nm.



Slika 5.3. Predloženi mehanizam ORAC metode

ORAC metoda se koristi za određivanje antioksidativnog kapaciteta u voću i povrću. Fenolni i polifenolni spojevi se kvantificiraju korištenjem Folin reagensa. Vinson i dr. su mjerili kolorimetrijski fenole u voću i povrću koristeći Folin-Ciocalteu reagens. Antioksidativni kapacitet u voću i povrću odredili su inhibicijom niske gustoće oksidacije lipoproteina u otopini bakrovih iona. Antioksidativna aktivnost metanolnog ekstrakta guave određena je ORAC metodom. Standardna krivulja pokazala je linearnost između 0 i 50 mM Troloxa. Dobiveni rezultati bili su između  $18,2 \pm 2,3$  i  $25,5 \pm 1,6$   $\mu\text{M TE/ masi}$ .

ORAC metoda je jedina metoda koja koristi reakciju slobodnih radikala do završetka i AUC (mjerjenje područja ispod krivulje) tehniku za kvantifikaciju. Na taj način kombinira postotak inhibicije i duljinu vremena inhibicije akcije slobodnog radikala antioksidansom.

#### 5.4. HORAC test

Tehnika je, koja se oslanja na mjerenju metal-kelirajuće aktivnosti antioksidansa u uvjetima poput Fenton reakcije. U ovoj metodi koristi se kompleks Co(II) kojim se procjenjuje antioksidativna aktivnost protiv stvaranja hidroksilnih radikala. Zajedno s uzorkom koji se analizira, inkubiran je fluorescein i zatim je dodana Fenton smjesa kojom se generira hidroksilni radikal. Očitana je početna fluorescencija i svake minute nakon miješanja. U istraživanju su otopine galne kiseline korištene za izradu standardne krivulje.

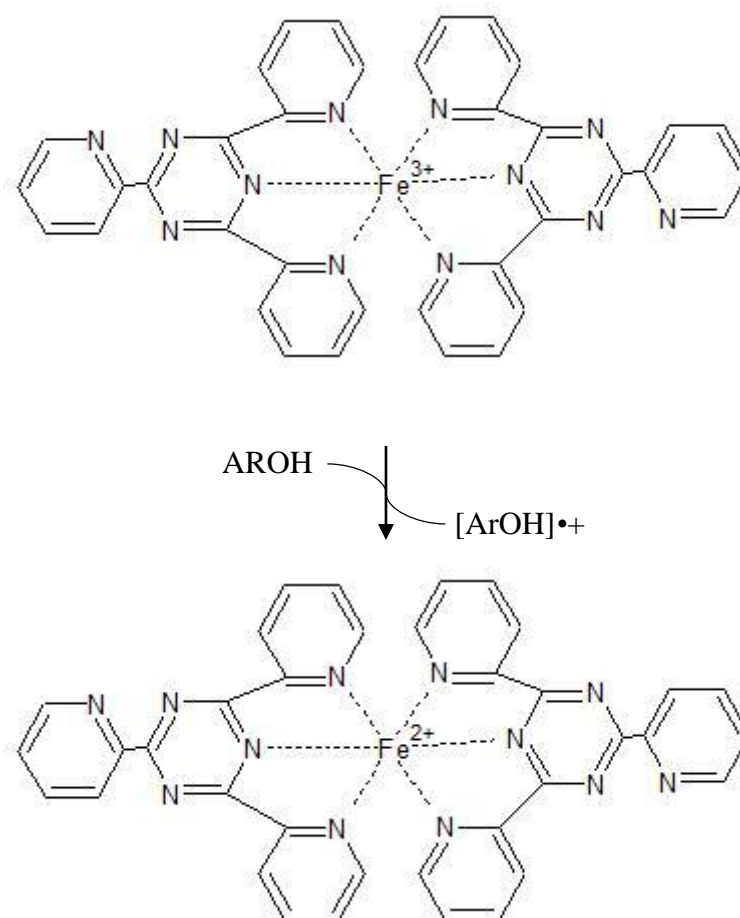
#### 5.5. FRAP metoda

Strain i Benzie su otkrili metodu za mjerenje snage krvne plazme da reducira željezo (Craft, Kerrihard, Amarowicz, Pegg, 2012). Ta se metoda kasnije koristila za mjerenje reducirajuće snage antioksidansa u biljnim ekstraktima. Ova metoda se temelji na redukciji  $\text{Fe}^{3+}$  iona - TPTZ (željezo(III)-2,4,6- tri(2-piridil)-s-tirazin) u  $\text{Fe}^{2+}$  - TPTZ s antioksidansom putem SET mehanizma. Rezultat te reakcije je intenzivno plava boja otopine s apsorbancijom na 550 nm. Redukcija se prati mjerenjem apsorpcije na 593 nm pomoću spektrofotometra s nizom dioda (Moharram, Youssef, 2014). Slika 5.5. prikazuje reakciju redukcije željeza(III) u željezo(II). Reakcija se odvija prema (6):





Reakcija se može dogoditi s antioksidansom s redoks potencijalom manjim od 0,7V. Redukcijska snaga antioksidansa je čini se povezana s konjugacijom fenola i brojem hidroksilnih skupina. Apsorbancija se može mjeriti testom koji mjeri količinu reduciranog željeza i povezati s količinom antioksidansa. Kao standardni antioksidansi koriste se Trolox ili askorbinska kiselina. Rezultati FRAP metode su različiti s obzirom na vrijeme analize i medij u kojim se odvija reakcija. Reakcija se mora izvoditi u niskom pH da bi se održala topljivost željeza, ali se time smanjuje redoks potencijal sustava i IP reaktanta. Oksidansi koji se koriste u FRAP metodi ne uzrokuju direktno štetu nukleinskih kiselina, lipida i proteina, već dobiveni  $\text{Fe}^{2+}$  može reagirati s  $\text{H}_2\text{O}_2$  i proizvesti OH radikal koji uzrokuje veću štetu. Antioksidativna aktivnost bijelog i žutog mesa nektarine je mjerena FRAP metodom. Dobivene vrijednosti bile su između 14,4 i 104,5 mg askorbinske kiseline po 100 g nektarine.



Slika 5.5. Reakcija koja se događa FRAP metodom prikazana strukturnim formulama

## 5.6. TRAP metoda

Metoda je koja koristi luminiscencijski spektrometar za mjerenje smanjenja fluorescencije R-fikoeritrina tijekom kontrolirane reakcije peroksidacije stvaranjem peroksilnih radikala topljivih u vodi. Osjetljiva je na sve poznate antioksidanse, ali je relativno složena i dugotrajna za izvođenje, te zahtijeva visoku stručnost i iskustvo. U istraživanjima su vrijednosti izračunate iz vremena trajanja tijekom kojeg je uzorak prekinuo kemiluminiscencijski signal zbog prisutnosti antioksidansa i uspoređene s vrijednostima dobivenim Troloxom. Kemiluminiscencijski signal se pokreće proizvodnjom luminol izvedenog radikala koji je rezultat termičke razgradnje AAPH-a.

## 5.7. PFRAP metoda

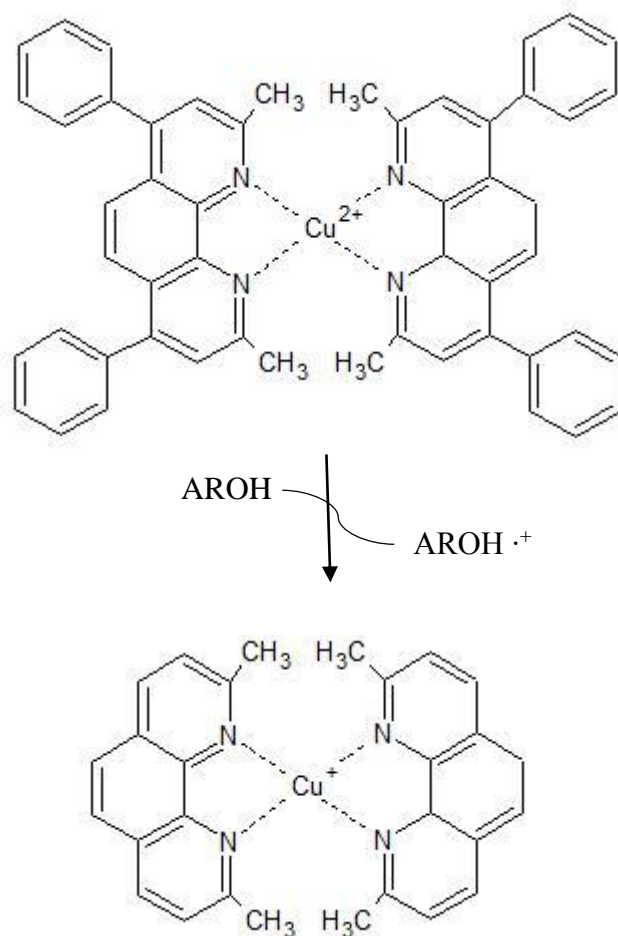
Temelji se na povećanju apsorbanije koje je povezano s reducirajućom sposobnosti antioksidansa/ekstrakta antioksidansa. Spojevi s antioksidativnim kapacitetom reagiraju s kalijevim ferocijanidom i tvore kalijev ferocijanid. Zatim on reagira sa željezovim trikloridom i daje plavo obojeni kompleks željezo ferocijanid s maksimumom apsorbanije na 700 nm.

## 5.8. CUPRAC metoda

CUPRAC metoda temelji se na redukciji Cu(II) u Cu(I) u reakciji antioksidansa s neokuproinom, bakrovim kompleksom (bis(neokuproin)bakar(II) kationom [Cu(II)-Nc]). Ovaj kompleks je jednostavan i primjenjuje se za hidrofilne i lipofilne antioksidanse Nakon 30 minuta mjeri se apsorbanija produkta CUPRAC kromofora (Cu(I)- neokuproin (Nc) kelata) na 450 nm. Reakcija se odvija prema (7):



Ta reakcija prikazana je strukturnim formulama na slici 5.8. Metoda se primjenjivala za istraživanje jabučnih sokova u Turskoj. Najprije se mjerila antioksidativna aktivnost prisutnih standarda poput askorbinske kiseline, galične kiseline, procijanidina B2, katehina, epikatehina, klorogenične kiseline, kafeinske kiseline i dr., a kao referentna otopina se koristio Trolox. Rezultati su bili izraženi u mg Troloxa/litri ekstrakta.



Slika 5.8. CUPRAC reakcija: redukcija bakra(II) u bakar(I)

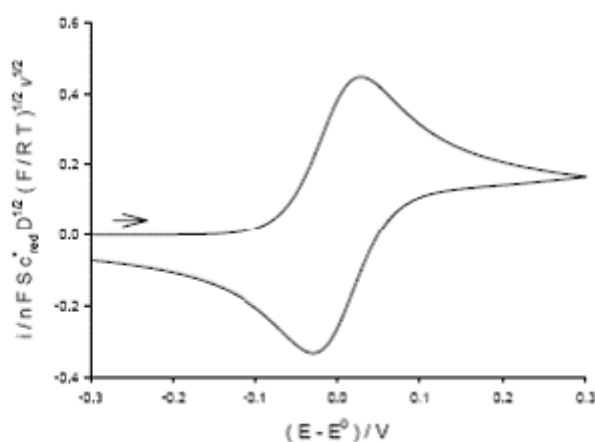
## 6. ELEKTROKEMIJSKE METODE

Elektrokemijske metode također se primjenjuju za određivanje sadržaja i kapaciteta antioksidansa. Najčešće korištene metode su ciklička voltometrija i biamperometrija.

### 6.1. Ciklička voltometrija

Vrsta je potenciodinamičkih elektrokemijskih mjerenja. Tijekom eksperimenta cikličke voltetrije potencijal radne elektrode mijenja se linearno s vremenom. Signal pobude prvo se mijenja linearno kod odgovarajućeg intenziteta struje, a kad se dosegne vrijednost izabranog potencijala, mijenja se smjer promjene potencijala. Promjena se može dogoditi više puta tijekom jednog eksperimenta. U signalu odziva nastaje anodni pik koji ovisi o potencijalu pri kojem se događa promjena smjera potencijala.

Cikličkim voltamogramom na slici 6.1. prikazan je omjer visine polaznog i povratnog vala, kao i razlika potencijala pikova anodnog i katodnog vala. Parametri dobiveni iz cikličkog voltamograma su intenziteti anodnih i katodnih pikova  $I_a$ ,  $I_c$ , potencijal oksidacije anode ( $E_a$ ) i potencijal oksidacije katode ( $E_c$ ) (Pisoschi, Negulescu, 2011). U reverzibilnom sustavu, vrijednosti intenziteta anodnih i katodnih pikova su jednaki. U slučaju ireverzibilnog sustava samo je jedan pik bilo anodni ili katodni prikazan na voltamogramu. Ciklička voltometrija je prikladna metoda za mjerenje kapaciteta antioksidansa krvne plazme, tkivnih homogenata i biljnih ekstrakata.



Slika 6.1. Odziv signala cikličkog voltamograma

*Izvor: PowerPoint prezentacija na temu: Elektroanalitičke metode*

U istraživanjima je kapacitet antioksidansa u suhim biljnim ekstraktima određen cikličkom voltametrijom uz primjenu staklaste ugljikove radne elektrode. Suhi ekstrakti zelenog čaja, crnog čaja, kave i ružmarina su analizirani na test ukupnog antioksidativnog kapaciteta. Antioksidativni kapacitet triju ekstrakata iz svake matrice je određen iz anodnog područja cikličkog voltamograma. Rezultati su pokazali da dva ekstrakta ne sadrže uvijek najveći sadržaj pojedinih antioksidansa. Rezultati cikličke voltetrije određivanja antioksidativnog kapaciteta u proizvodima heljde pokazali su dobru korelaciju s podacima dobivenim spektrofotometrijom. Za procjenu antioksidativnog kapaciteta analiziranih ekstrakata heljde koristio se ciklički voltamogram, a ukupni naboj ispod krivulje dobivene mjerenjem struje u anodnom području bio je povezan s podacima dobivenim spektrofotometrijskim metodom pomoću  $ABTS^{\bullet+}$  i DPPH. Promjene antioksidativnog kapaciteta u heljdi i njezinim proizvodima nastale su zbog promjena sastava flavonoida.

## 6.2. Amperometrijska metoda

Amperometrijska metoda se temelji na mjerenju intenziteta struje koja putuje između radne i referentne elektrode pri konstantnom potencijalu. Struja nastaje zbog oksidacije ili redukcije elektroaktivnog analita, a mjeri se kao funkcija koncentracije elektroaktivne vrste. Vrijednost potencijala održana je na vrijednostima u odnosu na referentnu elektrodu. Amperometrijsko određivanje antioksidativne aktivnosti se temelji na redukciji 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila (DPPH) i staklaste ugljikove elektrode. U istraživanjima se svi eksperimenti izvode u elektrokemijskoj ćeliji s tri elektrode na 140 mV i  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2 \mid 3\text{M KCl}$  koristeći otopinu etanola (40%) i 0,033M KCl u 0,033M fosfatnom puferu kod pH 7,4 (Pisoschi, Negulescu, 2011). Linearni raspon Troloxa u 100  $\mu\text{M}$  DPPH otopini etanola je do 30  $\mu\text{M}$  s granicom detekcije od 0,05  $\mu\text{M}$ . Ova metoda se primjenjuje za procjenu antioksidativne aktivnosti nekih čistih spojeva antioksidansa topljivih u vodi ili etanolu i nekoliko uzoraka čaja, vina ili nekih drugih pića. Rezultati dobiveni pomoću amperometrijske metode izraženi u ekvivalentima Troloxa su povezani s rezultatima dobivenima pomoću klasične spektrometrijske metode.

## 6.3. Biamperometrijska metoda

Temelji se na mjerenju struje koja putuje između dvije identične radne elektrode polarizirane na malu razliku potencijala i uronjene u otopinu koja sadrži reverzibilni redoks par. Indirektna biamperometrijska mjerenja temelji se na reakciji analita s redoks parom. Njihova selektivnost ovisi o specifičnosti reakcije koja uključuje oksidirani i reducirani oblik redoks para i analita. Redoks parovi koji se najviše koriste u biamperometrijskim mjerenjima su  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{I}_2/\text{I}^-$ ,  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ . Česti redoks par koji se koristi u biamperometrijskim istraživanjima je DPPH•/DPPH. Antioksidansi reagiraju s DPPH• i stvaraju DPPH, a intenzitet rezultatne struje je proporcionalan preostaloj koncentraciji DPPH• nakon njegove reakcije s analitom. Kao radne elektrode se koriste dvije identične Pt ili staklaste ugljikove elektrode, gdje se redukcija DPPH• radikala i oksidacija DPPH događa prema reakcijama (8) i (9):



Redukcija DPPH• koja se događa na elektrodi 1 daje katodnu struju, dok oksidacija DPPH na elektrodi 2 daje anodnu struju. U biamperometriji prati se parametar razlike potencijala između dvije identične radne elektrode. Vrijednosti potencijala dvije elektrode ne kontroliraju se u odnosu na referentnu elektrodu. Biamperometrijski odziv detektora je linearan s obzirom na sadržaj redoks para prisutnog u manjoj koncentraciji. DPPH• je manje koncentracije u odnosu na DPPH. Svaki dodatak antioksidansa u otopinu koji sadrži redoks par DPPH•/DPPH smanjuje koncentraciju oksidiranog oblika, a povećava koncentraciju reduciranog oblika. Struja koja nastaje je proporcionalna koncentraciji antioksidansa, a zbog niže koncentracije DPPH u smjesi struja na katodi je ograničena. DPPH•/DPPH metoda primjenjuje se za određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta u voćnim sokovima, čaju, vinu i kavi.

Redoks par koji se koristi za određivanje antioksidativnog sadržaja u biamperometrijskim metodama je i ABTS•<sup>+</sup>/ABTS. Kationski radikal ABTS se proizvodi enzimski pomoću enzima peroksidaze u protočnom reaktoru cjevastog oblika. U bioreaktoru su testirana različite koncentracije imobiliziranog enzima, ABTS-a i vodikovog peroksida. Za biamperometrijsko određivanje kao elektrokemijski senzori korištene su mikroelektrode. Rezultati antioksidativne aktivnosti su određeni pomoću Troloxa koji se u ovoj metodi koristi kao standard. Osjetljivost elektrode je od 0,3 nA/μM Troloxa, a krivulja je linearna između 20 do 500 μM Troloxa (Pisoschi, Negulescu, 2011). Analizirani su uzorci poput sokova, čaja i vina. ABTS radikal također se može proizvesti pomoću dva enzima korištenjem glukoza oksidaze i peroksidaze. Linearnost detektora je testirana u području od 20μM-2000μM, a osjetljivost je dobivena pri 0,165 nA/μM otopina Troloxa. Elektrode načinjene od zlata se koriste za biamperometrijsko određivanje antioksidativne aktivnosti u alkoholnim pićima.

## 7. KROMATOGRFSKE METODE

Kromatografske metode se koriste prije elektrokemijskih i spektrofotometrijskih metoda za određivanje i odvajanje antioksidansa iz smjese. Najčešće se koriste plinska i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.

### 7.1. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (GC) je vrsta kromatografije koja se koristi za odvajanje i analiziranje spojeva koji isparavaju, ali se ne raspadaju. Razdvajanje spojeva iz smjese se provodi između tekuće stacionarne faze i plinske mobilne faze. Kao mobilna faza se obično koristi inertni plin poput helija ili nereaktivni plin poput dušika. Kao stacionarna faza se koristi inertni čvrsti nosač na koji je nanesen mikroskopski sloj tekućine ili polimera. Plinska kromatografija je korisna zbog usporedbe vremena retencije. Najčešći detektori koji se koriste u plinskoj kromatografiji tijekom analiziranja antioksidansa su plameno-ionizacijski detektor i detektor toplinske vodljivosti.

U istraživanjima antioksidativnog kapaciteta ulja kurkume koristila se plinska kromatografija. Ulje kao i njegove frakcije su analizirane plinskom kromatografijom pomoću plameno-ionizacijskog detektora i kombinacijom plinske kromatografije i masene spektrometrije. Na antioksidativnu aktivnost su ispitane pomoću fosfomolibdenske metode i korištenjem sustava karoten-linoleata. Kvantitativni antioksidativni kapacitet ulja kurkume i njegovih frakcija je određen spektrofotometrijskom metodom i pomoću fosfomolibdenske metode koja se temelji na redukciji Mo (VI) u Mo (V) i stvaranjem zelenog fosfata/Mo (V) kompleksa koji pokazuje maksimum apsorbancije na 695 nm (Pisoschi, Negulescu, 2011). Metoda koja koristi model karoten-linoleat se temelji na kontinuiranom mjerenju optičke gustoće sve dok boja  $\beta$ -karotena nestane. Za slijepu probu se koristi butilirani hidroksianisol (BHA).

### 7.2. HPLC (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti) metoda

HPLC metoda koristi različite vrste stacionarne faze, pumpu koja potiskuje mobilnu fazu i analit kroz stupac i detektor koji mjeri vrijeme zadržavanja analita. Detektor također pruža i UV/VIS spektroskopske podatke vezane uz analit. Pomicanjem pumpe nastaje veći tlak zbog čega je potiskivanje mobilne faze i analita kroz gusto pakirani stupac brže.

Zbog čestica manjih veličina stupac je gušće pakiran. Zbog toga je odvajanje spojeva iz smjese bolje na stupovima kraće dužine i osigurava veću brzinu. Normalna faza HPLC-a sadrži polarnu i nepolarnu stacionarnu fazu, nevodenu mobilnu fazu i učinkovita je za odvajanje lako topljivih analita u nepolarnim otapalima. Reverzna faza HPLC-a sadrži umjereno polarnu mobilnu fazu, te nepolarnu i vodenu stacionarnu fazu. Kao stacionarna faza se najčešće upotrebljava silika gel koji je tretiran s  $\text{RMe}_2\text{SiCl}$ , gdje je R ravnolančana alkilna skupina poput  $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$  ili  $\text{C}_8\text{H}_{17}$ . U toj stacionarnoj fazi molekule koje su manje polarne se zadržavaju duže vrijeme u stupcu, a molekule veće polarnosti se eluiraju brže.

Koristeći HPLC sustav s postkolonskom on-line detekcijom koja se temelji na 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina radikal određena je antioksidativna aktivnost u kavi. Kad se uzorak odvoji iz kave na HPLC stupcu, nastali eluat se nanosi na PDA (photodiode array) detektor i zatim pomiješa sa stabiliziranom otopinom ABTS radikalnog kationa. Nakon toga se nanosi na detektor koji mjeri apsorbanciju na 720 nm. Otopina ABTS kationa je žarko plave boje i njezina plava boja se gubi kad god se gubi radikal iz otopine, a negativni pik na HPLC vrpici upravo je rezultat gubitka te boje. Da bi se dobila ukupna antioksidativna aktivnost izvedena pomoću HPLC-a tijekom mjerenja su dodani antioksidansi individualnih HPLC pikova. Ukupni antioksidativni kapacitet zelene kave određen on-line HPLC sustavom bio je  $760 \pm 2,5 \mu\text{mol Troloxa/l}$  i  $984 \pm 25,8 \mu\text{mol Troloxa/l}$  za prženu kavu. HPLC metoda koja se temelji na detekciji fluorescencije razvijena je za određivanje propil galata, nordihidrogvajaretinske kiseline, butiliranog hidroksianisola, terc-butilhidrokinona i oktil galata u jestivim uljima i hrani. HPLC odvajanje je izvedeno na  $\text{C}_{18}$  stupcu, a kao mobilna faza se koristila 5% otopina octene kiseline-acetonitril-metanol. Rezultati mjerenja su dobiveni pomoću fluorescencijskog detektora u kojem su pikovi uzorka određeni uspoređivanjem spektra fluorescencije sa spektrom dobivenim tijekom analize standardnog antioksidansa. Koeficijenti varijacije bili su od 0,7-7,2%. Pomoću HPLC vezane na elektrokemijsku detekciju (HPLC-ED) određena je antioksidativna aktivnost ekstrakata kora odraslih i biljka sadnica.

EICD elektrokemijski detektor se sastoji od Ag/AgCl referentne, staklaste ugljikove radne elektrode i elektrode načinjene od platine. Odvajanje analita se provodi na Gemini  $\text{C}_{18}$  stupcu pomoću izokratičnog načina i smjese acetonitril/voda koja sadrži octenu kiselinu kao mobilnu fazu. Iz procjene područja pikova u odnosu na primijenjeni potencijal i Ag/AgCl elektrode dobiven je optimalni potencijal standarda prikazan na hidrodinamičkom voltamogramu.



## 8. OSTALE METODE

### 8.1. Biosenzorske metode

U biosenzorskim metodama najčešće se koriste enzimi oksidoreduktaze zbog njihovog svojstva prijenosa elektrona tijekom katalize. Oksidoreduktaze su stabilni enzimi koji za svoju aktivnost ne trebaju kofaktore ili koenzime. Biosenzori se primjenjuju za određivanje antioksidansa u čijem istraživanju je uključeno praćenje superoksidnog radikala, dušikovog oksida, glutationa, urične kiseline, askorbinske kiseline ili fenolnih spojeva. Za mjerenje ukupne antioksidativne aktivnosti koriste se DNA biosenzori. Metoda se temelji na reakciji DNA lanca s hidroksilnim radikalima na površini elektrode, gdje dolazi do oštećenja molekule DNA. OH radikali su dobiveni tijekom Fenton reakcije, nakon čega u smjesi ostaje netaknuti adenin, koji se naknadno elektrokemijski oksidira kako bi se dobio oksidacijski produkt koji je sposoban katalizirati oksidaciju NADH. U reakciji antioksidansa s hidroksilnim radikalima nastaje sve više neoksidiranih molekula adenina čime se povećava elektrokatalitička struja NADH-a koja se mjeri diferencijalnom pulsnom voltametrijom. Ako se kao antioksidans uzima askorbinska kiselina, tada je moguće odrediti oko 50 nM askorbinske kiseline. Glavni nositelji antioksidansa u biljkama su fenoli i njegovi spojevi.

Za određivanje fenolnih spojeva koriste se amperometrijski biosenzori koji se temelje na enzimima poput tirozinaze, laksaze i peroksidaze. Imobiliziranjem polifenol oksidaze (PPO) u provodljive kopolimere pripremljene elektropolimerizacijom pirola s tiofen kaptiranim politetrahidrofuranom nastaju biosenzori za istraživanje i određivanje ukupnog sadržaja fenola i fenolnih spojeva. Tirozinaze su enzimi koji djeluju na hidroksilne skupine fenolnih spojeva. Zbog toga se mjerenjem aktivnosti enzimskih elektroda određuje ukupna količina hidroksilnih skupina. Enzimske elektrode se primjenjuju npr. kod istraživanja vina. Dobiveni rezultati prikazuju se u ekvivalentima galne kiseline u mg/ml. Biosenzor baziran na amperometrijskoj peroksidazi hrena koristi se za određivanje polifenola u ekstraktima biljaka. Dobiveni rezultati biosenzorskog određivanja antioksidativnog kapaciteta u vinima podudaraju se s onim rezultatima dobivenim spektrofotometrijom.

## 8.2. Fluorimetrija

Fluorescencija je emisija svjetla, kojeg emitira tvar koja je apsorbirala svjetlo ili drugo elektromagnetsko zračenje različite valne duljine. Emisija fluorescencije događa se kad elektron u molekuli prijeđe u svoje osnovno stanje emisijom fotona svjetlosti nakon što je nekom vrstom energije pobuđen u više kvantno stanje. Test fluorescencije se koristi za određivanje sadržaja antioksidansa. Fluorescencijska spektroskopija se primjenjuje za određivanje spojeva fenola u uljima. Metoda koja se temelji na fluorescenciji je predložena za kvantifikaciju koncentracije antioksidansa butilhidroksianizola (BHA) i tert-butilhidrokinona (TBHQ) u bio dizelu proizvedenom iz suncokretovog i sojinog ulja. Spektrofluorimetar bilježi fluorescencijski i emisijski spektar otopina na sobnoj temperaturi. Emisijski spektri dobiveni su na oko 310 nm, a fluorescencijski od 320 do 800 nm. Uzorci bio dizela bez BHA i TBHQ pokazuju fluorescencijsku vrpcu na oko 420 nm što se pripisuje tokoferolima, svojstvenim biljnim uljima koji se koriste u proizvodnji bio dizela. Dodatak BHA i/ili TBHQ odgovara fluorescencijskoj vrpici na oko 330 nm. Potvrđeno je da intenzitet fluorescencije oko 330 nm raste linearno kao funkcija koncentracije antioksidansa s koeficijentom korelacije oko 1, bez obzira na izvor ulja i antioksidansa. Fluorometrijske metode određivanja askorbinske kiseline su bazirane na reakciji dehidroaskorbinske kiseline s o-fenilendiaminom. Ova tehnika zahtjeva strogu kontrolu pH jer intenzitet fluorescencije ovisi o pH vrijednosti.

Fluorescencija je otkrivena da bi se ispitalo kako lateralna organizacija sterola membrane utječe na potenciju antioksidansa. Ova informacija se koristila za procjenu mogućih štetnih učinaka antioksidansa topljivih u lipidima. Dobiveni podaci ukazuju na to da je askorbil-palmitat učinkovitiji od drugih antioksidansa topljivih u vodi, što je procijenjeno pomoću vremena zaostajanja. To može lako narušiti sterolnu lateralnu organizaciju umetanjem u membranske dvosloje, što može djelovati štetno na stanicu. Još je jedan fluorescencijski test koji mjeri brzinu i opseg sterolne oksidacije u lipidnim dvoslojima. Dehidroergosterol (DHE) je fluorescentni analog sterola koji se koristi kao proba i u isto vrijeme kao komponenta membrane. Test se također može izvoditi na dvoslojima koji sadrže smjesu sterola, uključujući DHE i nefluorescentne sterole poput kolesterola i ergosterola. Intenzitet fluorescencije DHE-a se smanjuje oksidacijom pa brzina, opseg slobodnog radikala i enzimom inducirane oksidacije sterola mogu biti mjereni kao funkcija temperature i sastava membrane.

### 8.3. Elektronska spinska rezonancije (ESR)

ESR je metoda koja se još naziva i elektronska paramagnetska rezonancijska spektroskopija, a koristi se za proučavanje slobodnih radikala i paramagnetskih metala u kemijskim i biološkim tkivima (Davies, Gilbert, 1994). Mnoge vrste slobodnih radikala su reaktivne i kratkog su polživota, a njihove koncentracije u prirodnim sustavima se ne mogu direktno odrediti ESR spektroskopijom. Kako bi se riješio taj problem koristi se kemijska reakcija hvatanja spina. Pomoću nitrozo i nitro spojeva slobodni radikali se mogu pomoću spektralnog hiperfinskog razdvajanja prevesti u stabilne nitroksidne radikale tzv. adukte. Hiperfinsko razdvajanje odražava strukturu i prirodu tih radikala. Budući da je ESR spektroskopski signal direktno povezan s koncentracijom spinskog adukta, može se odrediti intezitet nastajanja slobodnih radikala. Duljina pika u spektru je proporcionalna broju molekula radikalnog adukta u sustavu. ESR spektri određenog spinskog adukta imaju jedinstvene spektre koje ovise o specifičnom hvatanju spinova i uhvaćenom slobodnom radikalu. Zbog toga je ESR specifična i osjetljiva metoda za određivanje prisutnosti određenih vrsta slobodnih radikala.

Madson i drugi koristili su ESR tehniku za procjenu antioksidativne aktivnosti u ekstraktima različitih začina. Istraživali su utjecaj vodenih ekstrakata kadulje, origana, ružmarina, zimskog i ljetnog vrtnog čubara, ljekovitog sipana i mažurana na nastajanje i transformaciju hidroksilnih radikala koji su nastali Fenton reakcijom i uhvaćeni u 5,5-dimetil-1-pirolin- N-oksid (DMPO) (Cadenas, Packer, 2002). Najveću antioksidativnu aktivnost pokazao je origano jer sadrži lipofilne i hidrofilne spojeve poput fenola i terpena. Noda i drugi dokazali su korištenjem ESR spektroskopije i metodama hvatanja spina (korištenjem DMPO-a) da u vodi topljivi ekstrakti ginka i zelenog čaja pokazuju izrazitu aktivnost uklanjanja hidroksilnih radikala. Zbog te sposobnosti ginko se široko koristi kod liječenja poremećaja vezanih uz dob. ESR metoda korištena je i da bi se procijenila sposobnost doniranja vodika (antioksidansa) zelenog i crnog čaja Fremyovom i galvanoksilnom radikalu u organskim i vodenim otopinama. Gardner i ostali procjenjivali su sposobnost reduciranja radikala u vodenoj fazi dodatkom 3 ml čaja i jednakog volumena 1mM Fremyove otopine. Antioksidativna aktivnost u organskim otopinama procijenjena je redukcijom 0,5 mM etanolne otopine galvanoksilnog radikala pomoću ekstrakata čaja. Rezultati su pokazali da zeleni čaj bolje uklanja slobodne radikale od crnog čaja. Ipak, količina reduciranog Fremyovog radikala je bila manja od količine galvanoksilnog radikala.

## 9. TOČNOST MJERENJA NAVEDENIH METODA

Niti jedna metoda ne određuje u potpunosti antioksidativnu aktivnost određenog uzorka. Da bi se odredila ukupna aktivnost antioksidansa, ona mora odražavati i lipofilnu i hidrofilnu aktivnost, a fiziološka aktivnost mora diferencirati prijenos vodikovog atoma i elektrona. Da bi se potpuno odredila antioksidativna aktivnost potrebni su testovi koji mjere aktivnost antioksidansa protiv reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta. Do danas su razvijeni različiti testovi za mjerenje antioksidativne aktivnosti od kojih svaki djeluje na određen način i ima svoj specifičan cilj unutar matrice. Svaki test ima svoje prednosti i nedostatke. Ne postoji metoda koja pruža nedvosmislene rezultate, a najbolji učinak pruža primjena različitih metoda. Ukupni sadržaj fenola u začinu linearan je s antioksidativnom aktivnošću uklanjanja kisika, ali ta se linearnost nije pokazala korištenjem elektronske spinske rezonancije. Eksperimentalno je dokazano da istraživani ekstrakti sadrže komponente s najmanje dva različita mehanizma djelovanja antioksidansa. Ciz i suradnici su istraživali usporedbu antioksidativnih svojstava u različitim vrstama povrća. Antioksidativnu aktivnost istraživali su ORAC, TRAP i HORAC metodama. Dobivene vrijednosti pokazale su dobru korelaciju sa sadržajem polifenola. Pronađeno je da je ORAC metoda najosjetljivija metoda za mjerenje antioksidativne aktivnosti u cijepanju lanaca. Iako je dokazano da navedene metode pokazuju dobru povezanost, preporuča se korištenje više metoda za razumijevanje načela antioksidativnih svojstava uzoraka. Također, u Kini se istraživao antioksidativni kapacitet i glavni sastojak reducirajućih tvari u konzumiranom voću i povrću. Istraživanje je pokazalo da voće i povrće sadrže snažne antioksidanse, te su zbog toga vrlo važni u prehrani. Istraživanje se provodilo pomoću DPPH, FRAP, ABTS i TRP metode. Ukupni sadržaj polifenola pokazao je veću korelaciju s antioksidativnim kapacitetom prilikom korištenja FRAP i TRP metode nego prilikom DPPH i ABTS metode. Antioksidativni kapacitet u voću i povrću povećavaju fenoli i flavonoidi, a ne vitamin C.

## 10. ZAKLJUČAK

Metode se biraju ovisno o prirodi uzorka, a usporedba vrijedi samo na istim tipovima uzoraka. Prednosti analitičkih metoda odnose se na složenost potrebnih alata, jednostavnost primijenjenih procedura, trajanje analize, biološku relevantnost i izvedbu metode (osjetljivost, preciznost, točnost, granica detekcije). Određivanja antioksidativne aktivnosti koja se temelje na fotometrijskim mjerenjima (DPPH, ABTS, FRAP) su brza i jednostavna i trebaju samo UV/VIS spektrofotometar za izvođenje, što objašnjava njihovu široku upotrebu u provjeravanju antioksidansa. Većina metoda se može brzo automatizirati i neke se mogu primijeniti in vivo (npr. ABTS). Ipak, analitički signal je ponekad teško izmjeriti i ne računa se za sve antioksidanse. FRAP metoda ne mjeri tiolne antioksidanse kao što je glutation. Za DPPH se smatralo da se ne temelji na kompetitivnoj reakciji, jer je ujedno i slobodni radikal i oksidans. Interpretacija je komplicirana kada testirani spojevi imaju spektar koji preklapa DPPH• na 515 nm. FRAP metoda je karakterizirana brзом kinetikom s činjenicom da nije uvijek točna. Neki polifenoli reagiraju sporije i zahtijevaju duže reakcijsko vrijeme za detekciju, npr. 30 min. Bakar ima prednosti u odnosu na željezo u antioksidativnom testu, u kojem se sve klase antioksidansa, uključujući tirole detektiraju s malom interferencijom u odnosu na reaktivne radikale, a reakcijske kinetike bakra su brže nego u slučaju željeza. CUPRAC test završi u minuti za askorbinsku kiselinu, uričnu kiselinu, galnu kiselinu i kvercetin, ali zahtjeva 30-60 minuta za kompleksnije spojeve. ORAC metoda temelji se na reakcijama osjetljivim na temperaturu i stoga je kod njene primjene bitna kontrola temperature. S obzirom na složenost analitičkih instrumenata, spektrometrijske metode su najjednostavnije, iza kojih slijede voltametrijske i kromatografske metode. Voltometrija nudi niske granice detekcije. Zahtjeva malu pripremu uzorka i daje nam prednost brze analize. Zbog niske cijene opreme kao i jednostavnosti postupka, voltometrija pruža atraktivnu alternativu titrimetrijskih i instrumentalnih metoda, posebno u kontroli hrane. Ne zahtijeva skupu opremu i kvalificirano osoblje poput kromatografije, niti je dugotrajna i mukotrpa kao spomenuta instrumentalna tehnika.

## 11. LITERATURA

- Antolovich M., Prenzler P. D., Patsalides E., McDonald S. & Robards K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *The Royal Society of Chemistry*, 127, 183-198.
- Bondet V., Brand-Williams W. & Berset C. (1997). Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH• Free Radical Method. *Academic Press Limited*, 30, 609-615.
- Cadenas E., Packer L. (2002). *Handbook of Antioxidants* (2nd ed.). New York: Eastern Hemisphere Distribution.
- 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, 149-173.
- Davies M. J., Gilbert B. C., (1994). *Electron Spin Resonance*. (1st ed.). New York: Royal Society of Chemistry (Chapter 2).
- Kopjar M., Knežević I., Piližota V. (2013.) Sadržaj polifenola, antocijana i antioksidativna aktivnost voćnih čajeva. *Hrana u zdravlju i bolesti*, 2(2), 42-49.
- Moharram H. A., Youssef M. M. (2014). Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. *Food Science and Technology*, 11, 31-42.
- Pisoschi A. M., Negulescu G.P. (2011). Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, 1, 1-10.
- Prakash A., Rigelhof F. & Miller E. (2017). Antioxidant Activity. *Medallion Labs*.
- Shalaby E. A., Shanab S.M.M. (2013). Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7(10), 529-538.