

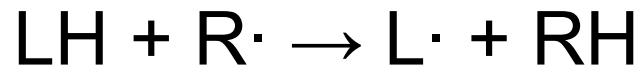
Stanovení antioxidační aktivity



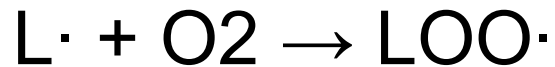
Mechanismus účinku antioxidantů

Radikálové reakce

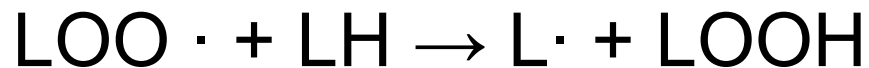
- Iniciace



- Propagace



peroxylový radikál



peroxid

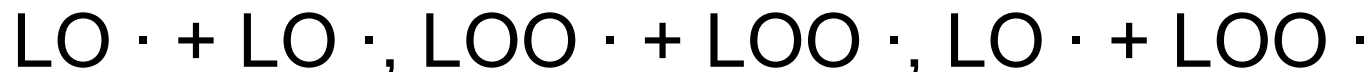
- Řetězení



alkoxylový radikál



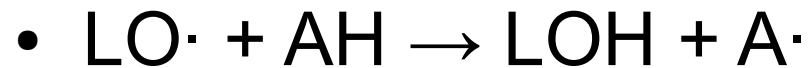
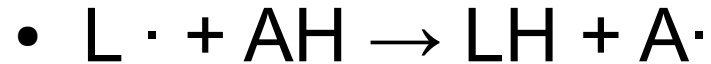
- Terminace



Mechanismus účinku antioxidantů

Radikálové reakce

- Primární antioxidanty - AH



Způsoby detekce

Spektrometrie

Elektrochemická
detekce

Chromatografie

Stanovení antioxidační aktivity

Spektrometrie - kolorimetrie

- DPPH· Organický radikál
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
- ABTS⁺· Organický radikál
2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
- FRAP Reakce s Fe^(III)
Ferric reducing ability
- CUPRAC Cu(II) → Cu(I)
Cupric reducing antioxidant power

Stanovení antioxidační aktivity

Spektrometrie – Fluorescence, chemiluminiscence

- ORAC Peroxylový radikál
- HORAC Hydroxylový radikál
- TRAP Luminol

Stanovení antioxidační aktivity

Chromatografie

- GC Plynová chromatografie
- HPLC Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- HPLC + Postkolonová derivatizace

Stanovení antioxidační aktivity

Elektrochemické stanovení

- Cyklická voltammetrie
- Amperometrie
- Biamperometrie

Spektrometrie

Reader



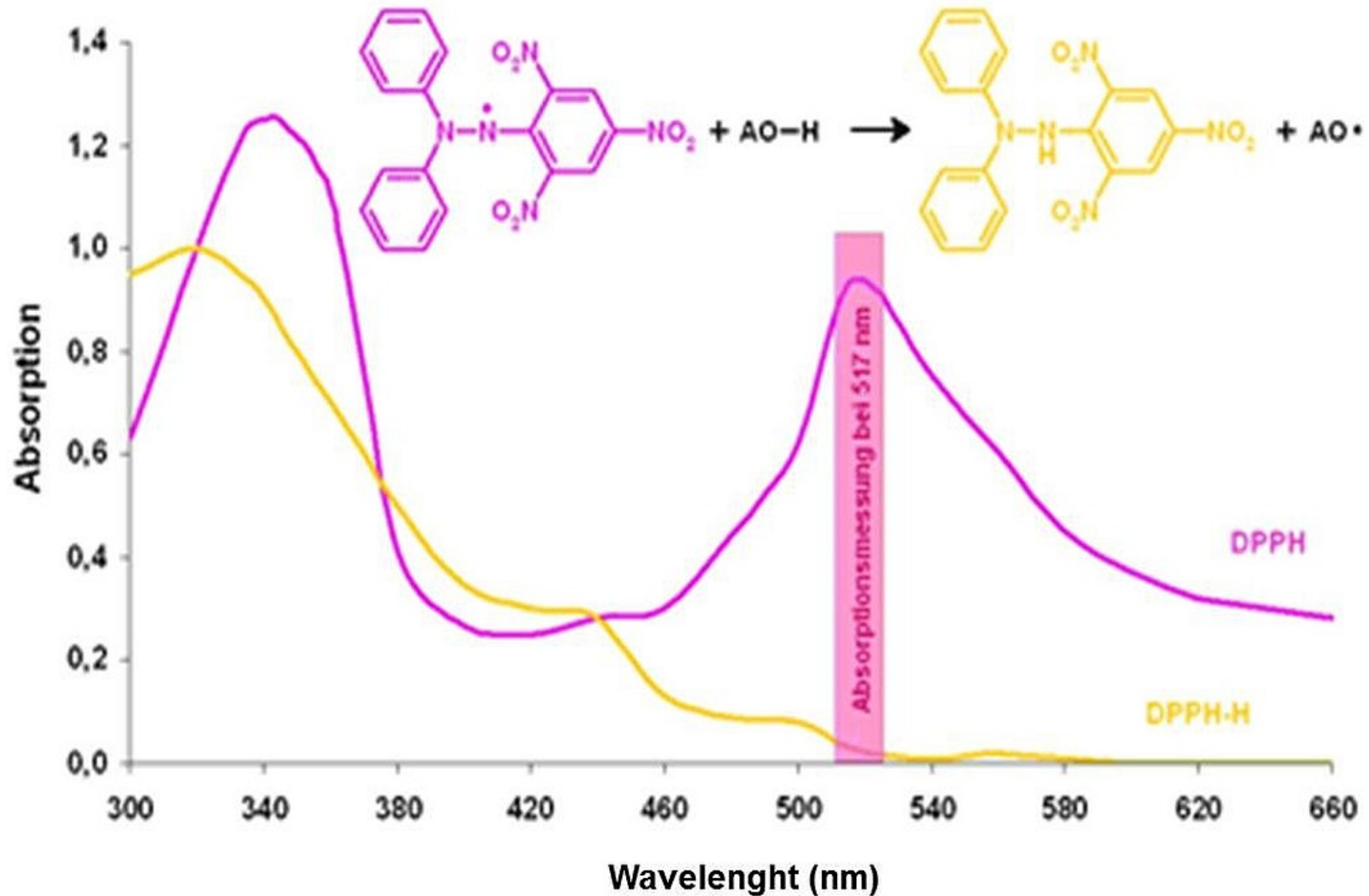
Spektrometrie

DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

- Stabilní radikál v důsledku delokalizace elektronu přes celou molekulu
- Nedimerizuje
- Delokalizace způsobuje fialové zbarvení
- Reakce s donory vodíku → žluté zbarvení
- Standard Trolox

Spektrometrie

DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl



Spektrometrie

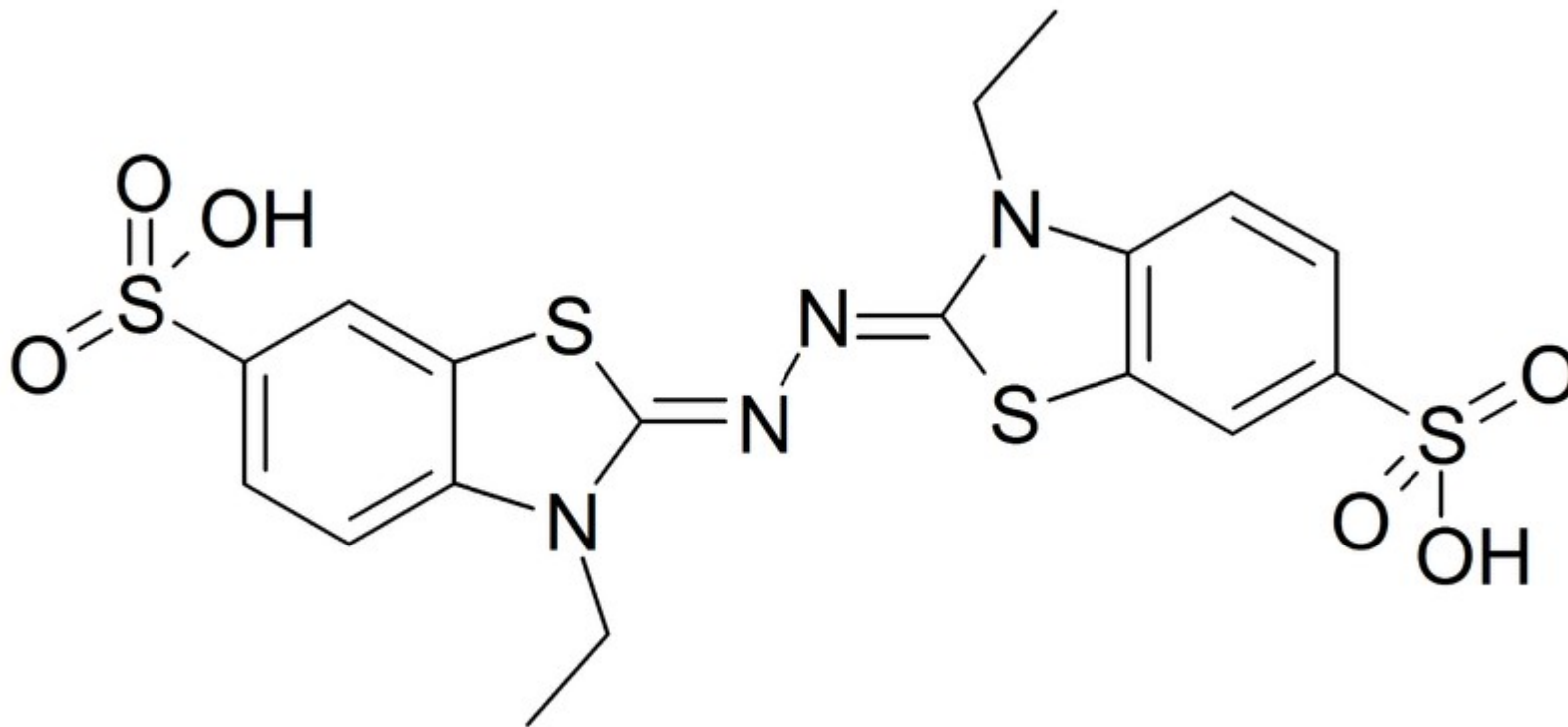
ABTS

- ABTS - (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid))
- Radikál generován ztrátou elektronu
- Oxidace peroxodisíranem sodným nebo oxidem manganičitým
- Zelené zbarvení
- Standard Trolox

Spektrometrie

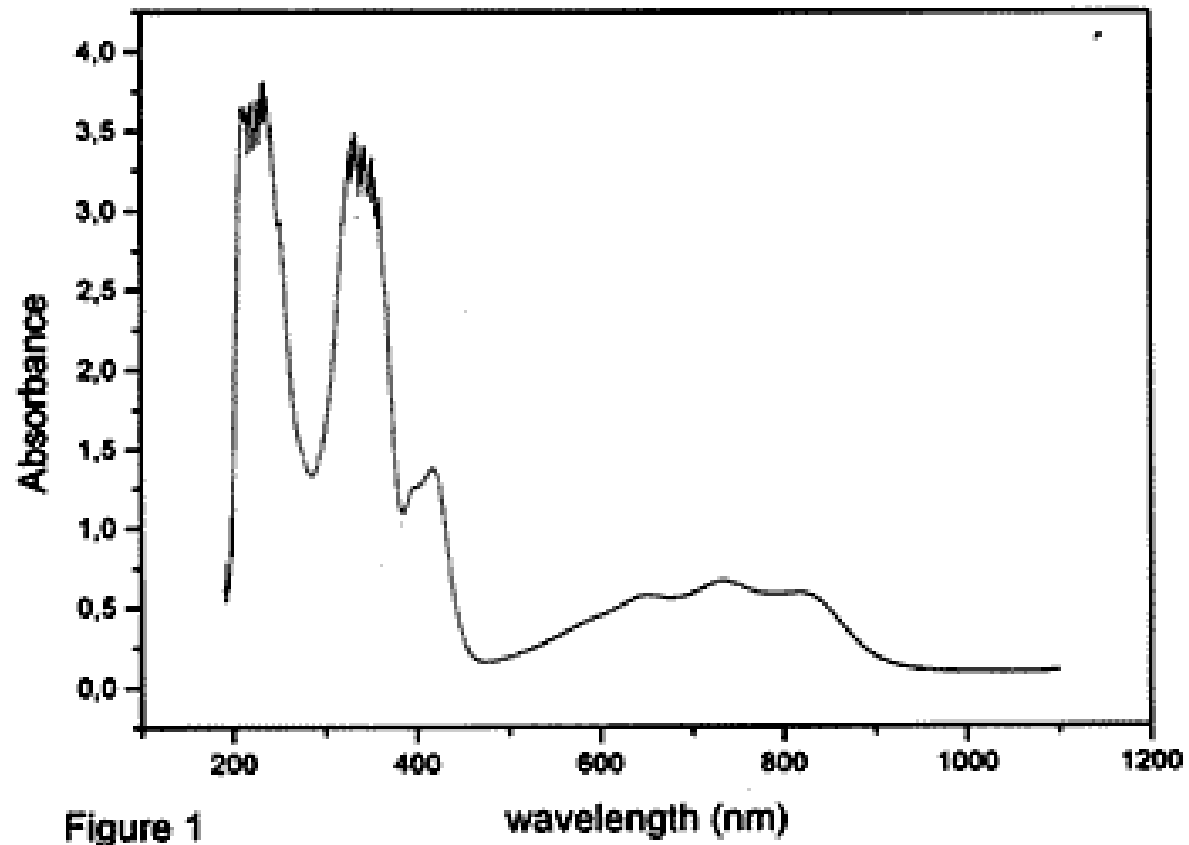
ABTS

ABTS - (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonová kyselina))



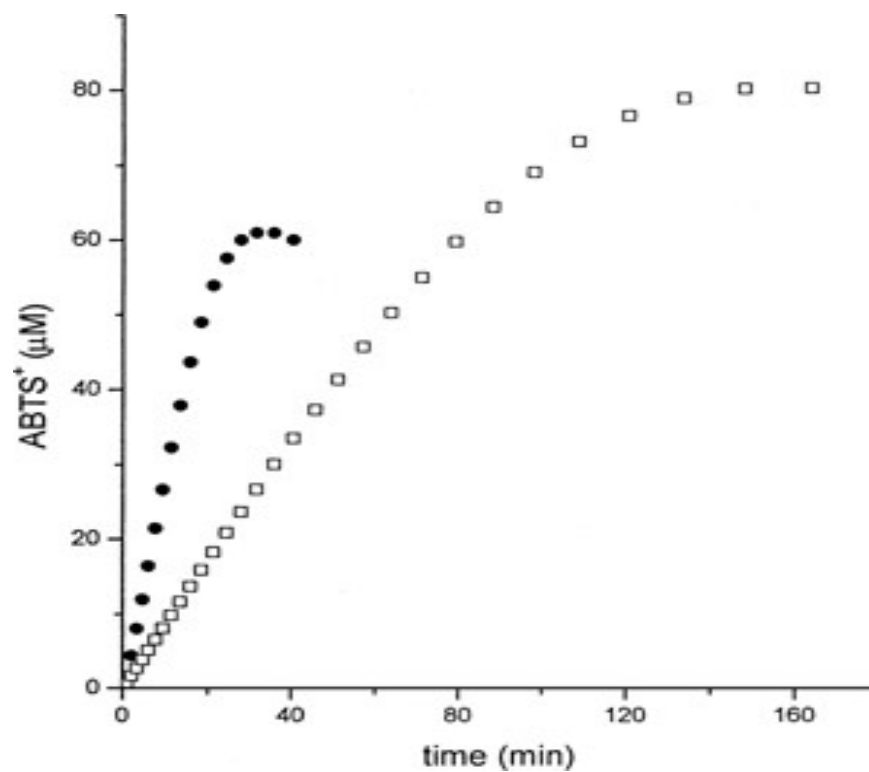
Spektrometrie

ABTS - spektrum



Spektrometrie

ABTS – průběh generování radikálu



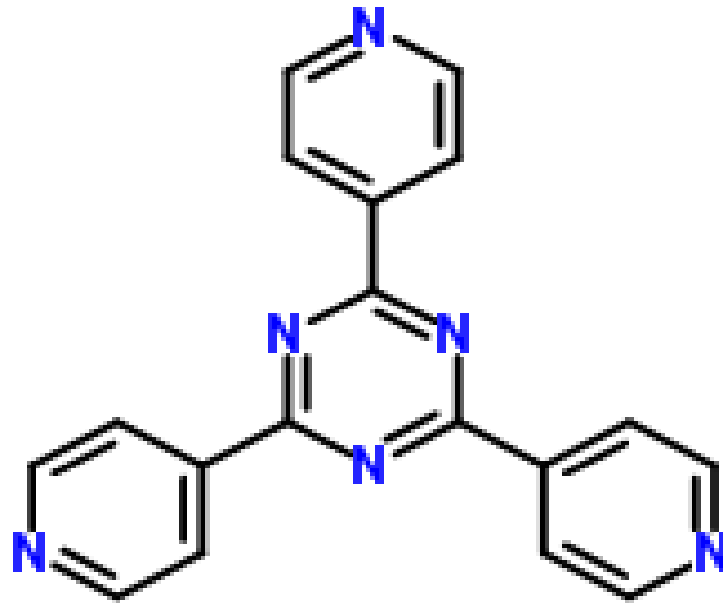
Spektrometrie

FRAP

- Ferric reducing antioxidant power
- Fe(III) \rightarrow Fe(II) komplex
- Ligand 2,4,6-tri(2-pyridyl)- 1,3,5-triazine
- Fe(II) komplex - námořní modrá
- Standard Trolox nebo askorbová kyselina

Spektrometrie

FRAP – ligand 2,4,6-tri(2-pyridyl)- 1,3,5-triazin



Spektrometrie

PFRAP

- Potassium ferricyanide reducing power
- Atioxidat reaguje s ferrikyanidem draselným → ferrokyanid draselný
- Následná reakce s FeCl_3 → ferrokyanid železitý modrý komplex

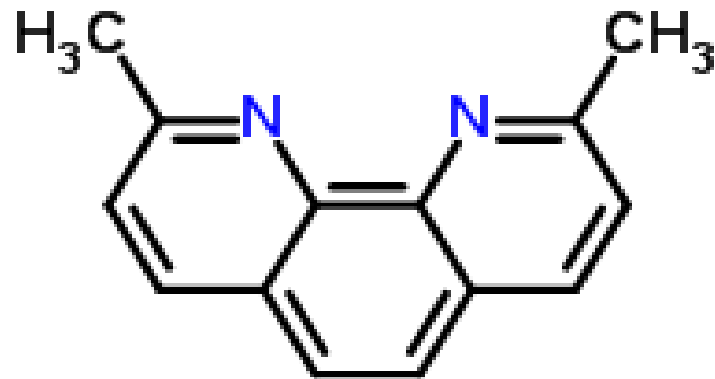
Spektrometrie

CUPRAC

- Cupric reducing antioxidant power
- $\text{Cu(II)} \rightarrow \text{Cu(I)}$
- CuSO_4 a neocuproine
- Absorbance v 450nm
- Standard Trolox

Spektrometrie

CUPRAC – neocuproine



Spektrometrie

Stanovení antioxidantních enzymů

- **Superoxiddizmutáza**
sledování úbytku superoxidu spektrofotometricky
245-250nm
- **Glutathion peroxidáza**
spektrofotometrie měření spotřeby NADPH při
redukci GSSH
- **Kataláza**
sledování úbytku H₂O₂ spektrofotometricky
240nm

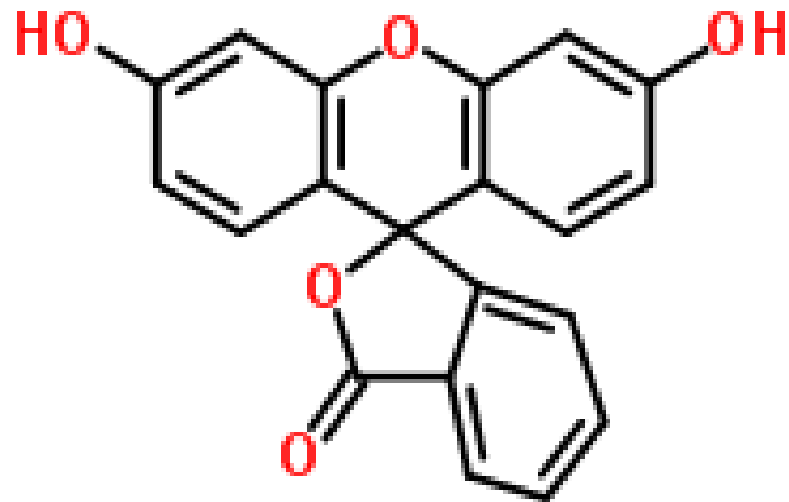
Spektrometrie

Fluorimetrie

- Fluorescence je emise světla látkou, která absorbovala elektromagnetickou vlnu jiné vlnové délky
- Emitované světlo má obvykle delší vlnovou délku
- Fluorescence - elektron v molekule přechází do stavu s nižší energií

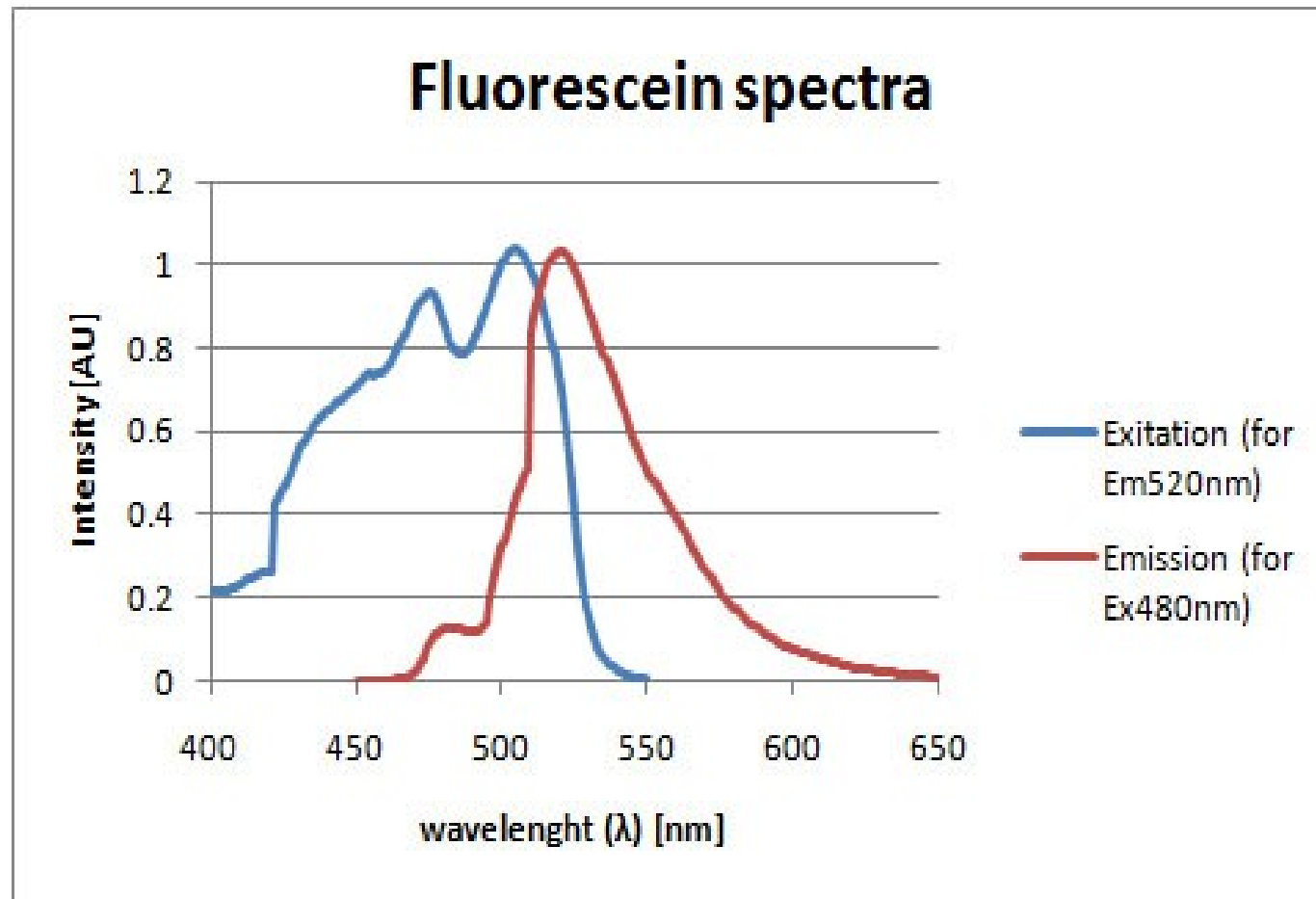
Spektrometrie

Fluorescein



Spektrometrie

Fluorescein



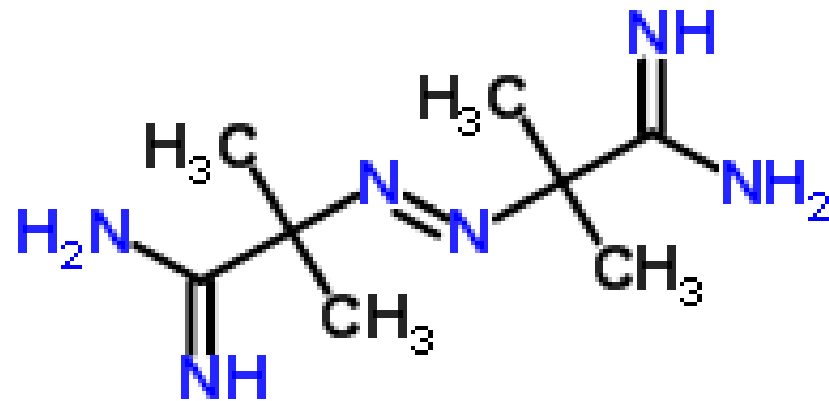
Spektrometrie

ORAC

- Oxygen radical absorption capacity
- Indukovaný peroxylový radikál pomocí AAPH
2,2'-azobis-(2-amidino-propane) dihydrochloride
- Fluorescein - fluorescenční indikátor
- Ztráta fluorescece – indikuje stupeň rozkladu v
důsledku reakce s radikálem
- Standard Trolox

Spektrometrie

AAPH – 2,2'-azobis-(2-amidino-propane) dihydrochlorid



Spektrometrie

HORAC

- Hydroxyl radical averting capacity
- Stanovuje schopnost antioxidantů chelatovat kovové ionty
- Co(II) komplex – protekce proti hydroxylovému radikálu – Reakce Fentonova typu
- Fluorescein – indikátor
- Standard - Gallová kyselina

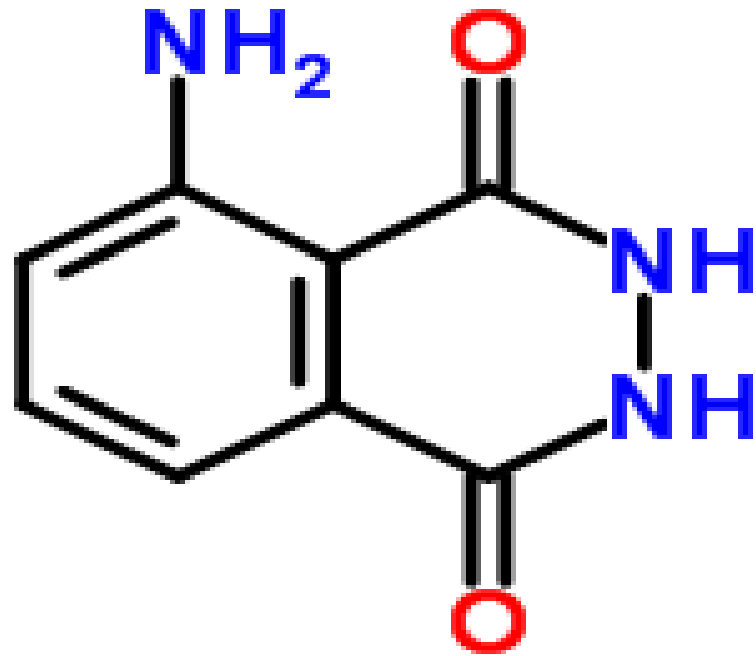
Spektrometrie

TRAP

- Total peroxy radical trapping antioxidant parameter
- Chemiluminisence (CL) - luminol
- CL – luminol - radikál generovaný AAPH
2,2'-azobis-(2-amidino-propane) dihydrochlorid
- Doba zhášení CL signálu

Spektrometrie

Luminol



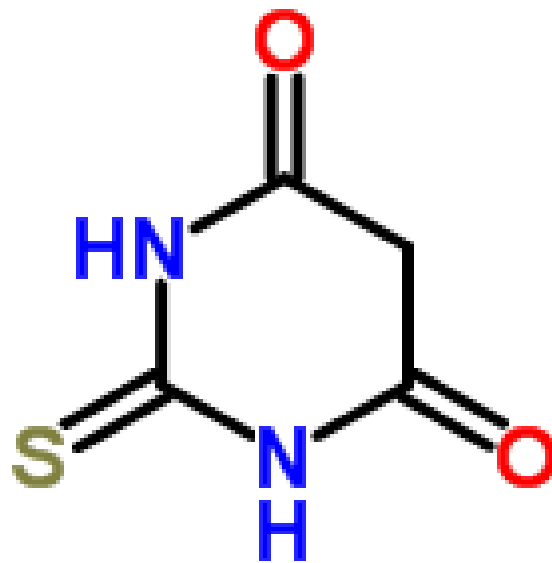
Spektrometrie

The lipid peroxidation inhibition assay

- Reakce Fentonova typu (Co(II) + H₂O₂), indukující lipoperoxidaci
- Linolenová kyselina – modelový substrát
- Malondialdehyd MDA – konečný produkt lipoperoxidace
- Thoibarbiturová kyselina s MDA dává fluoreskující produkty

Spektrometrie

Thiobarbiturová kyselina



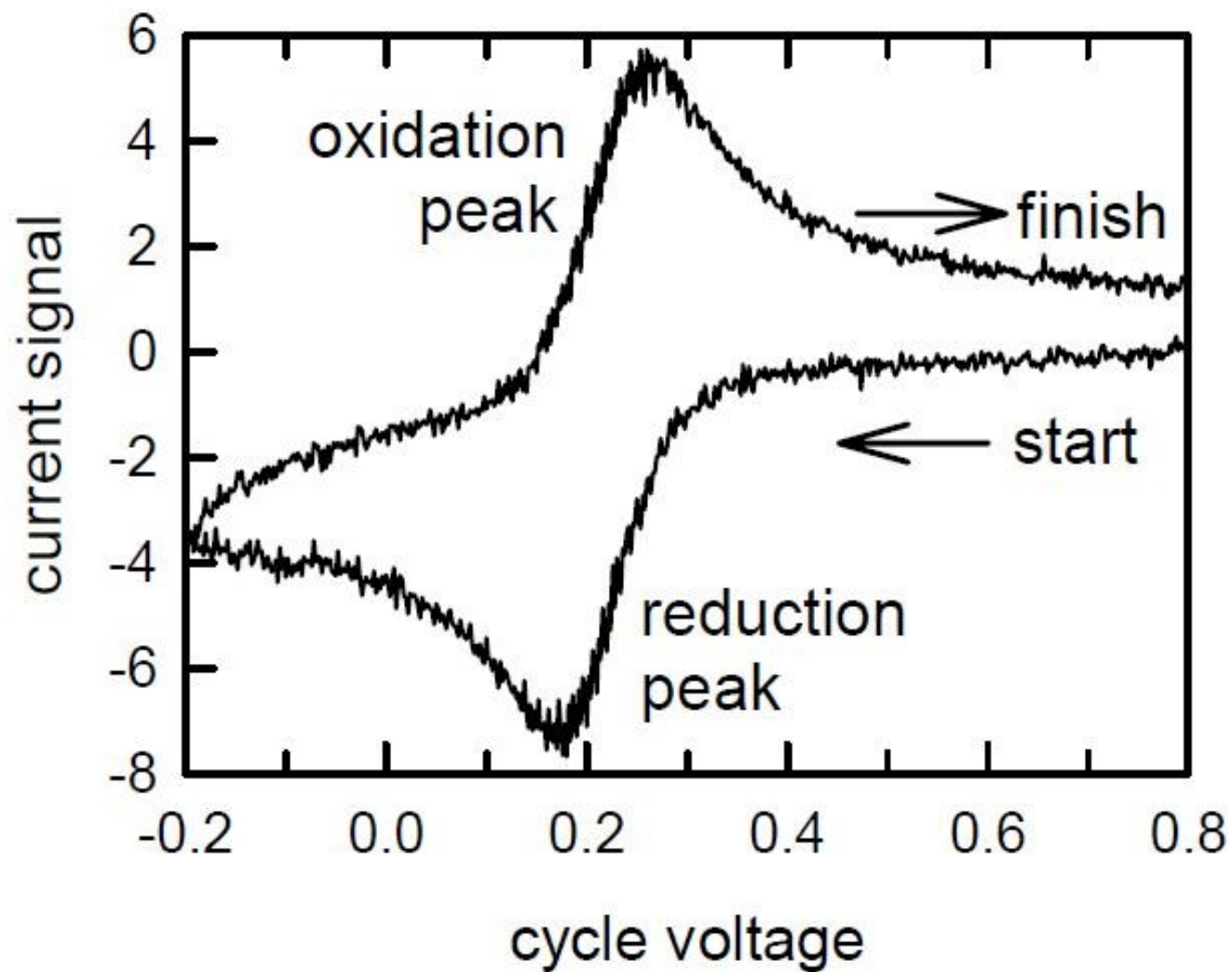
Elektrochemické stanovení

Cyklická voltammetrie

- Potenciodynamické měření
- Potenciál na pracovní elektrodě se mění lineárně
- Poté se napětí mění zpět

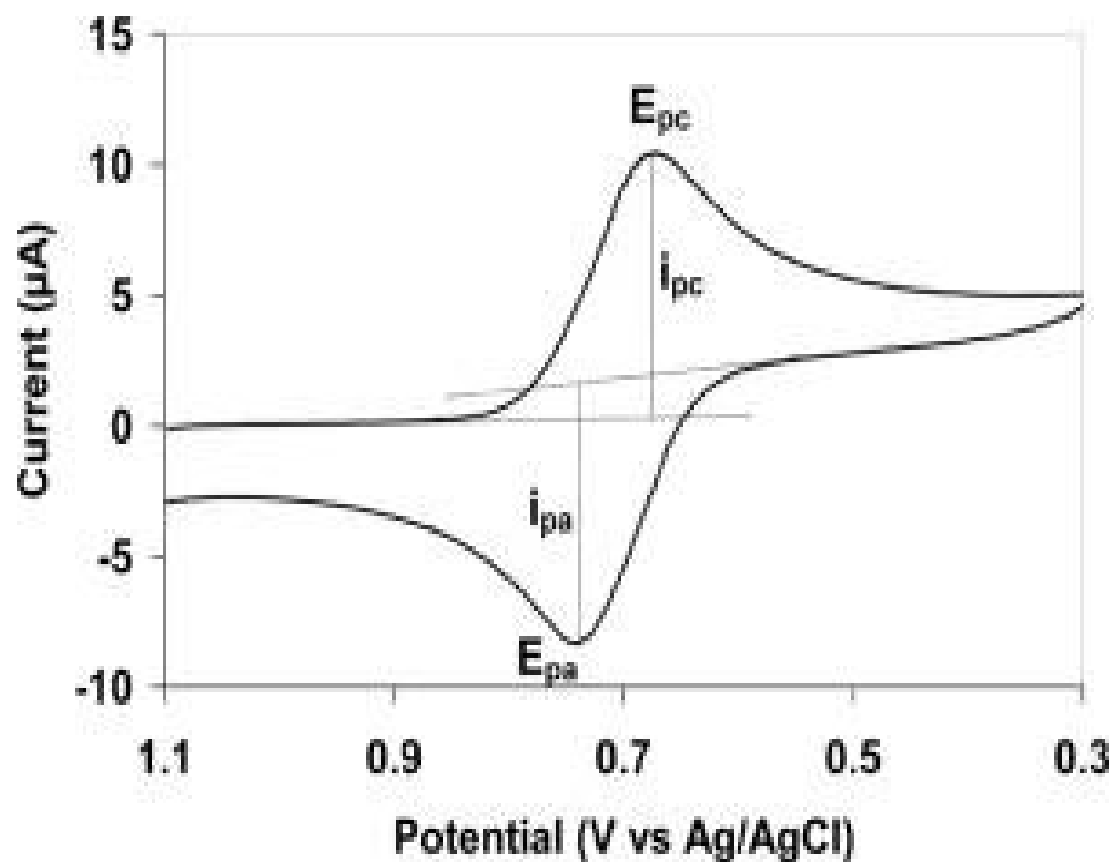
Elektrochemické stanovení

Cyklická voltammetrie



Elektrochemické stanovení

Cyklická voltammetrie



Elektrochemické stanovení

Cyklická voltammetrie – důležité údaje

- Intenzity katodových a anodových proudů I_a , I_c
- Anodový redoxní potenciál (E_a)
- Katodový redoxní potenciál (E_c)
- Plocha vlny signálu anody (S)
- Standard kyselina askorbová

Elektrochemické stanovení

Ampérometrie

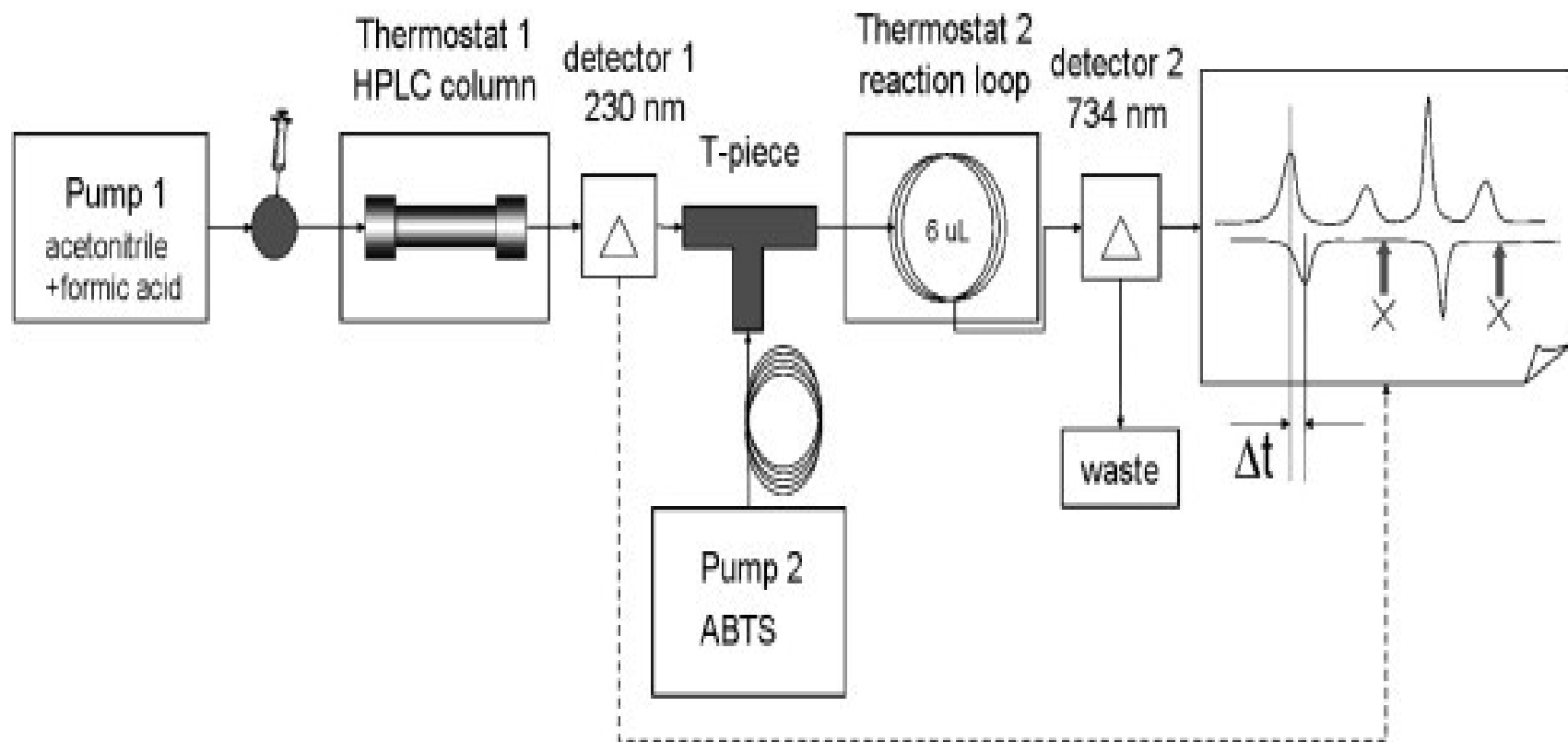
- Měření intenzity proudu mezi pracovní a referenční elektrodou
- Konstantní napěťový potenciál
- Proud protéká v závislosti a redoxních reakcích v analytu
- Redukce 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
- (DPPH•) na skleněné elektrodě

- Separace na reverzní fázi
- Postkolonová derivatizace ABTS, DPPH
- UV/VIS detekce (DAD)
- Antioxidační aktivita komplexních směsí
- Použitelné pro GSH, tokoferol, askorbát
- Standard trolox, gallová kyselina

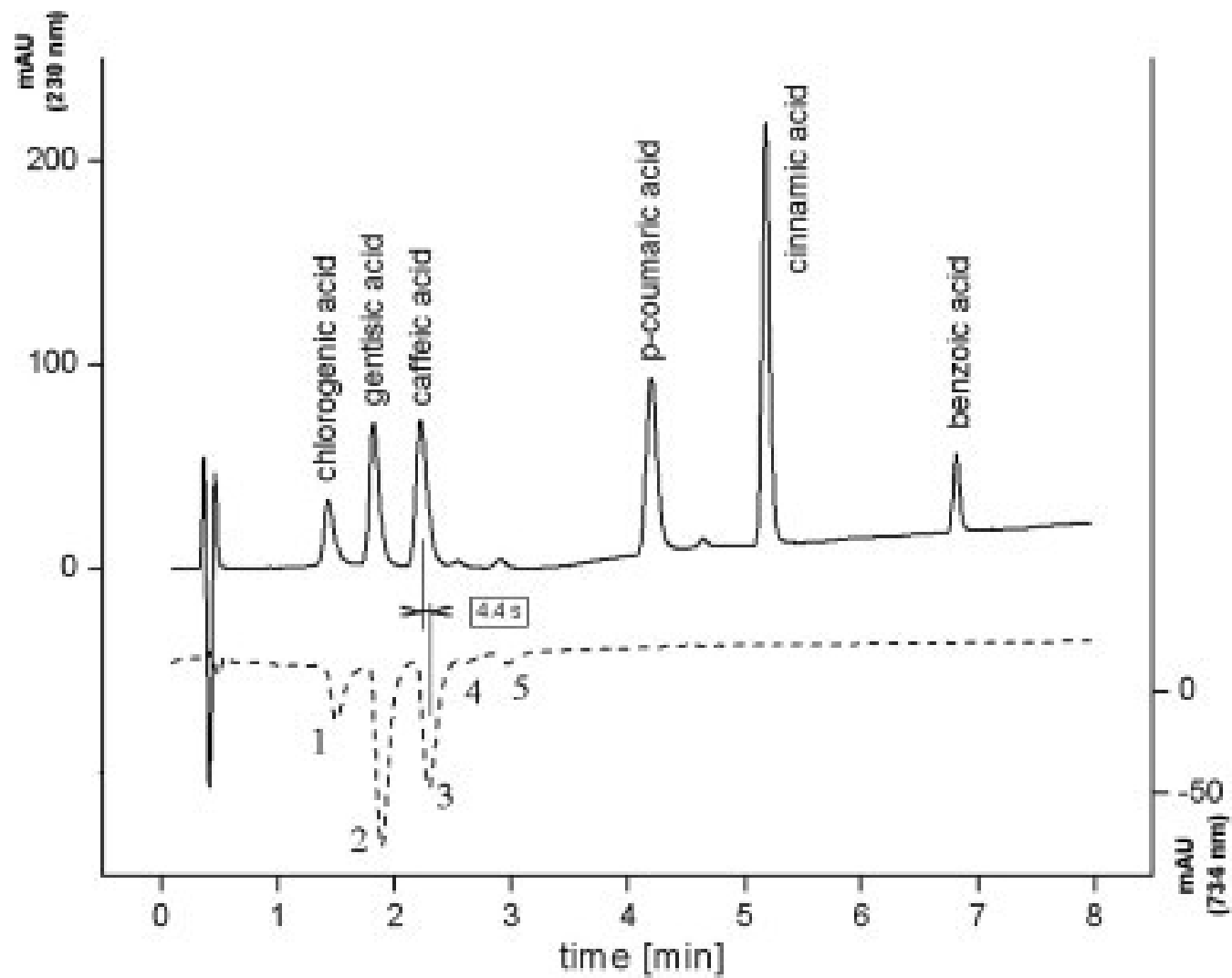
HPLC



HPLC



HPLC



Děkuji

