

Assessing antioxidant activity

Citation for published version (APA):

Arts, M. J. T. J. (2007). *Assessing antioxidant activity*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20070531ma>

Document status and date:

Published: 01/01/2007

DOI:

[10.26481/dis.20070531ma](https://doi.org/10.26481/dis.20070531ma)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Samenvatting

Samenvatting

Antioxidanten spelen een belangrijke rol in tal van biochemische processen, variërend van het ontstaan van ziekten tot het verouderen van voedingsmiddelen. Om deze rol accuraat te kunnen evalueren, dient de activiteit van de antioxidant op de juiste manier gekarakteriseerd te worden. In dit proefschrift wordt onderzoek naar enkele factoren die de effectiviteit van antioxidant bepalen, beschreven.

In de **hoofdstukken 3-5** wordt de bijdrage van de reactieproducten behandeld, in de **hoofdstukken 6 en 7** wordt de invloed van de matrix op de antioxidant capaciteit beschreven en in **hoofdstuk 8** wordt nagegaan of effectiviteit van antioxidant ook afhankelijk is van het type radiaal.

In **hoofdstuk 3** is het Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay, een veelvuldig toegepaste methode om de capaciteit van antioxidant te bepalen, kritisch bekeken. De focus ligt op de toepasbaarheid van het assay in het karakteriseren van de antioxidant effectiviteit. In dit assay reageert een antioxidant met een relatief stabiel radicaal, het ABTS[•]. Gedurende deze reactie wordt het groen/blauwe ABTS[•] in het kleurloze ABTS omgezet door de antioxidant, welke zelf hierbij geoxideerd wordt. De hoeveelheid ABTS[•] die door een bepaalde hoeveelheid antioxidant wordt weggevangen, geeft de TEAC.

De bruikbaarheid van het TEAC assay wordt getest door de resultaten van dit assay te vergelijken met die van andere *in vitro* screeningsassays. Hiervoor worden de verbindingen catechol, resorcinol en hydroquinon, die qua structuur op elkaar lijken, gebruikt. Resorcinol heeft van de geteste verbindingen de laagste activiteit in zowel het inhiberen van lipide peroxidatie als in het wegvangen van superoxide radicalen en peroxinitriet. Daarentegen blijkt resorcinol de hoogste TEAC te hebben. Een vergelijkbare discrepantie tussen de resultaten van deze assays met het TEAC assay wordt ook gezien bij qua structuur meer complexe antioxidant, zoals bij de flavonoïden. Een relatief hoge TEAC zou verklaard kunnen worden door het vermogen van producten, gevormd tijdens het TEAC assay uit deze antioxidant, om ook ABTS[•] weg te vangen. Een voorbeeld hiervan is het reactieproduct van resorcinol dat ook een antioxidant capaciteit bezit. De TEAC van resorcinol is dus in feite de TEAC van resorcinol plus de TEAC van resorcinol's reactieproduct(en). De gerapporteerde TEAC van resorcinol is derhalve een overschatting van de eigenlijke TEAC van resorcinol zelf. De reactieproducten van andere antioxidant (zoals catechol en

hydroquinon) reageren niet met het ABTS[•] en dragen derhalve niet bij aan de gevonden TEAC.

Dat de TEAC niet altijd toe te schrijven is aan de antioxidant capaciteit van één enkele structuur, wordt ook aangetoond in **hoofdstuk 4**. In dit hoofdstuk wordt de vorming en bijdrage van reactieproducten van de antioxidanten trolox en chrysine in het TEAC assay gekwantificeerd. HPLC analyse laat bij chrysine de vorming van een reactieproduct zien dat in staat is om met ABTS[•] te reageren. Uit nadere analyse blijkt dat het product relatief snel reageert en dat het een hogere TEAC heeft dan de moederverbinding chrysine. Daarentegen reageert het reactieproduct van trolox, het trolox quinon, niet met het ABTS[•].

De experimenten beschreven in **hoofdstuk 3 en 4** tonen aan dat de TEAC de antioxidant capaciteit van de moederverbinding plus de mogelijke antioxidant capaciteit van de reactieproducten vertegenwoordigt. De mogelijke bijdrage van meer dan één verbinding aan de TEAC belemmert de toepassing van dit assay voor het vergelijken van antioxidanten en voor het maken van structuur activiteits relaties (SARs). Het fundament van een SAR is dat de activiteit gekoppeld kan worden aan één enkele en goed gedefinieerde moleculaire structuur. Niettemin zijn talloze op TEAC gebaseerde SARs opgesteld. Nauwgezette analyse van deze SARs, zoals heeft plaatsgevonden in **hoofdstuk 3**, laat inderdaad diverse tegenstrijdigheden zien tussen de in deze SAR voorspelde waarde en de daadwerkelijke gevonden activiteit van antioxidanten.

Naast de bijdrage van reactieproducten is een andere belangrijke tekortkoming van het TEAC assay de tijdsduur waarbinnen de antioxidant met het ABTS[•] kan reageren. Deze is relatief kort waardoor de reactie tussen antioxidanten en ABTS[•] niet volledig is voltooid binnen de tijdsduur van de meting. Dit leidt tot een onderschatting van de TEAC van deze verbindingen. Bovendien zijn de condities waaronder de TEAC bepaling in diverse protocollen plaats vindt variabel. Deze zwakke plekken verklaren grotendeels de verschillen in TEAC waarden, die in de literatuur gerapporteerd worden.

In **hoofdstuk 5** wordt een wijziging in het TEAC assay voorgesteld. In de nieuwe procedure dienen incubaties met verschillende concentraties ABTS[•] en een vaste concentratie antioxidant te worden uitgevoerd. De afname in ABTS[•] na 6 minuten wordt vervolgens uitgezet tegen de begin concentratie van ABTS[•] en gefit met behulp van een exponentiële functie. Extrapolatie van de fit naar een oneindige overmaat aan ABTS[•] resulteert

in de maximale concentratie ABTS* die weggevangen kan worden door de antioxidant in de gebruikte concentratie. Deze strategie kan gebruikt worden voor het bepalen van de werkelijke TEAC van antioxidanten, namelijk de totale antioxidant capaciteit. Dit is de som van de antioxidant capaciteit van de moederverbinding en de hieruit gevormde product(en).

De invloed van de matrix op het antioxidant effect wordt onderzocht in de experimenten beschreven in **hoofdstukken 6 en 7**. In **hoofdstuk 6** werden antioxidanten aan bloed plasma toegevoegd. De toename in TEAC van het bloed werd vergeleken met de TEAC van de antioxidant.

De resultaten leerden dat de TEAC van verscheidene flavonoïden en bloedplasma niet additief is, maar minder is dat de som van de afzonderlijke TEAC waarden (van het flavonoïd en het plasma). **Hoofdstuk 7** liet zien dat de TEAC van diverse componenten van groene en zwarte thee met α -, β -, en κ -caseïne lager was dan op basis van de afzonderlijke componenten verwacht zou worden. Deze maskering van antioxidant capaciteit bleek zowel afhankelijk van het gebruikte eiwit als van het flavonoïd en was deels te wijten aan interacties tussen de antioxidant en plasma eiwitten. De antioxidant capaciteit van sommige hydrofobe verbindingen, zoals bijvoorbeeld α -tocoferol bleek echter niet beïnvloed te worden door de interactie.

Met behulp van de experimenten weergegeven in **hoofdstuk 8** werd aangetoond dat in een glucoserijke omgeving, zoals het geval is in slecht gereguleerde Diabetes Mellitus (DM), hydroxyl radicalen snel worden omgezet in reactieve, van glucose-afgeleide, deeltjes (RGS). De bescherming tegen deze RGS blijkt duidelijk te verschillen van de bescherming tegen hydroxyl radicalen. Sommige "antioxidanten" die efficiënt beschermen tegen hydroxyl radicalen, vergroten de RGS productie zelfs, wat aangeeft dat deze antioxidanten gecontraïndiceerd zijn in de bescherming tegen oxidatieve stress in DM. De resultaten laten zien dat het effect van een antioxidant zeer sterk afhangt van het type radicaal.

In **hoofdstuk 9** werden markers zoals F₁-fytosteranen (PPF₁s), mono-hydroxy-vetzuren en veranderingen in antioxidant capaciteit tijdens het maischen bestudeerd voor het detecteren van oxidatieve schade aan vetzuren gedurende het brouwproces van bier. PPF₁s blijken toepasbaar te zijn om de mate van oxidatieve schade in het maische mengsel te monitoren. Ze zouden kunnen worden gebruikt als kwaliteits marker van het maische mengsel. Gevonden werd dat bij maischen verlagen van de

zuurstofspanning de oxidatieve schade vermindert en antioxidant capaciteit verhoogt. Dit betekent dat maischen bij voorkeur onder lage zuurstofspanning uitgevoerd dient te worden.

Perspectief

Een aantal factoren bepalen de activiteit van antioxidanten. Factoren die algemeen onderkend worden zijn de reactiesnelheid van de antioxidant met reactieve deeltjes en de toegevoegde hoeveelheid. Factoren waar geen of te weinig aandacht naar uitgaat zijn:

Reactieproducten. Zoals aangetoond in **hoofdstuk 3-5** kunnen reactieproducten ook antioxidant activiteit vertonen. Deze producten kunnen in grote mate bijdragen aan de totale antioxidant capaciteit en de bescherming. Daarentegen kunnen reactieproducten ook prooxidante of toxische effecten hebben, zoals beschreven in **hoofdstuk 2**.

De matrix. Maskering, veroorzaakt door de interactie van antioxidanten met andere bestanddelen van de matrix, kan resulteren in een lagere totale antioxidant capaciteit (**hoofdstuk 6-7**). Dit vermindert de effectiviteit van de antioxidanten. Een ander aspect is de lipofiliteit van antioxidanten. De lokale concentratie van antioxidanten in bijv. lipide membranen hangt primair af van de lipofiliteit van de verbinding. In lipide peroxidatie lijkt niet alleen de lipofiliteit maar ook het amfifiele karakter van de verbindingen een rol te spelen. De concentratie van een antioxidant precies op de plaats waar de antioxidant haar werking uitvoert in twee-fase systemen wordt over het algemeen slecht onderkend en begrepen. Dit bemoeilijkt een juiste vergelijking van verbindingen, omdat de activiteit direct gerelateerd is aan de concentratie op de plaats van werking (**hoofdstuk 2**).

Het type radicaal. Sommige efficiënte scavengers van hydroxyl radicalen laten slechts geringe protectie zien tegen reactieve, van glucose-afgeleide, deeltjes (RGS) (**hoofdstuk 8**). Dit geeft aan dat verschillende typen radicalen andere eisen stellen aan een antioxidant.

In toekomstig antioxidant-onderzoek zou meer aandacht geschonken moeten worden aan producten die uit de antioxidant worden gevormd, compartimentalisatie, de invloed van de matrix en aan het specifieke karakter van reactieve deeltjes waartegen beschermd moet worden.

Meer kennis omtrent deze aspecten zal tot een meer accurate karakterisering van de activiteit van antioxidanten leiden. Dit draagt er tevens toe bij dat het werkingsmechanisme van antioxidanten opgehelderd wordt. Dit vormt het fundament om tot een wetenschappelijk onderbouwde toepassing van antioxidanten te komen.