Određivanje totalnog antioksidativnog kapaciteta u biološkim uzorcima

Pavić, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:461512

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
ODJEL ZA KEMIJU
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ KEMIJA; ISTRAŽIVAČKI SMJER

MARIJA PAVIĆ

ODREĐIVANJE TOTALNOG ANTIOKSIDATIVNOG KAPACITETA U BIOLOŠKIM UZORCIMA

DIPLOMSKI RAD

OSIJEK 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
ODJEL ZA KEMIJU
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ KEMIJA; ISTRAŽIVAČKI SMJER

MARIJA PAVIĆ

ODREĐIVANJE TOTALNOG ANTIOKSIDATIVNOG KAPACITETA U BIOLOŠKIM UZORCIMA

DIPLOMSKI RAD

Mentor: doc.dr.sc. Aleksandar Sečenji

Neposredni voditelj: Tatjana Šafarik

OSIJEK 2019.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski sveučilišni studij Kemija; istraživački smjer
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija

ODREĐIVANJE TOTALNOG ANTIOKSIDATIVNOG KAPACITETA U BIOLOŠKIM UZORCIMA

Marija Pavić

Rad je izrađen na Odjelu za kemiju u Osijeku

Mentor: doc.dr.sc. Aleksandar Sečenji

Neposredni voditelj: Tatjana Šafarik

SAŽETAK

Antioksidansi su tvari koje štite stanice od oksidacijskog djelovanja slobodnih radikala i sprječavaju nastajanje oksidacijskog stresa koji je posljedica prekomjernog stvaranja reaktivnih spojeva kisika zbog poremećene ravnoteže oksidacijsko – redukcijskih procesa u biološkim organizmima. Analiza redukcijskog kapaciteta na bazi cerija (IV) predloženog naziva CERAC razvijena je za mjerenje ukupnog antioksidativnog kapaciteta (eng.*Total antioxidant capacity*, TAC). Maksimum apsorbancije od 320 nm Ce (IV) otopina tipičan je za nehidrolizirani i nereducirani Ce^{4+} ion. Pri određivanju TAC-a kao antioksidansi korišteni su askorbinska kiselina, galna kiselina i kvercetin te su konstruirane kalibracijske krivulje u rasponu koncentracije askorbinske kiseline od 2×10^{-5} do 8×10^{-5} mol/L, kvercetina od 2×10^{-6} do 8×10^{-6} mol/L i galne kiseline od 2×10^{-6} do 8×10^{-6} mol/L. Realni sustav bile su tablete pripravljene od brašna sjemenki crnog grožđa. Izmjereni podaci za uzorak uspoređeni su s kalibracijski krivuljama antioksidansa. Dobiveni rezultati iznosili su 1,52 mg kvercetina ekvivalenta u 1g tableta i 2,17 mg ekvivalenta galne kiseline u 1g tableta te se tako pokazalo dobro podudaranje s rezultatima TAC-a određenog Folin–Ciocalteu-ovim reagensom kao prihvaćenom metodom za određivanje TAC-a polifenolnih uzoraka.

Ključne riječi: antioksidansi/ antioksidativni kapacitet/ CERAC/ oksidativni stres
Diplomski rad obuhvaća: 43 stranica, 22 slike, 9 tablica, 3 grafa i 42 literaturna navoda
Jezik izvornika: hrvatski
Mentor: doc.dr.sc. Aleksandar Sečenji
Rad prihvaćen:
Stručno povjerenstvo:

1. doc. dr. sc. Olivera Galović
2. doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji
3. izv. prof. dr. sc. Mirela Samardžić
4. doc. dr. sc. Tomislav Balić, zamjenski član povjerenstva

Rad je pohranjen u knjižnici Odjela za kemiju, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD Diploma thesis

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Chemistry
Graduate University Study of Chemistry; Research Study
Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Chemistry

Total antioxidant capacity analysis in biological samples

Marija Pavić

Thesis completed at Department of Chemistry Osijek

Supervisor: Aleksandar Sečenji, Ph.D., assistant prof.
The immediate leader: Tatjana Šafarik

ABSTRACT

Antioxidans are substances that protect cells from oxidative impact of free radicals and they prevent oxidative stress which is result of excessively formation of reactiv oxygen species because of the disrupted balance of oxidation-reduction processes in biological organisms. Analysis of reduction capacity on the base of cerium (IV) proposed name CERAC has been developed to measure total antioxidant capacity. Maximume absorbance of 320 nm Ce (IV) solutions is typical for nonhydrolized and nonreductive Ce^{4+} ion. In determining of TAC as a antioxidans ascorbic acid, gallic acid and quercetin were used and then calibration curves were constructed, and in a range of concentration of ascorbic acid from 2×10^{-5} to 8×10^{-5} mol/L, quercetin from 2×10^{-6} to 8×10^{-6} mol/L and gallic acid from 2×10^{-6} to 8×10^{-6} mol/L. Real system were pills made of flour of black grape seeds. Mesured data for sample were compared to calibration curves of antioxidans. Recived results were 1,52 mg of quercetin equivalent in 1 g pill and 2,17 mg of equivalent gallic acid in 1 g pill so it is showed good matching to results of TAC that is determined by Folin-Ciocalteu reagens as a accepted method for TAC polyphenol samples determination.

Thesis includes: 43 pages, 22 figures, 9 tables, 3 graphs, 42 references
Original in: Croatian

Keywords: antioxidant/ antioxidant capacity/ CERAC/ oxidative stress

Thesis accepted:

Reviewers:

1. Olivera Galović, Ph.D., assistant prof.
2. Aleksandar Sečenji, Ph.D., assistant prof.
3. Mirela Samardžić, Ph.D., associate prof.
4. Tomislav Balić, Ph.D., assistant prof., alternate member of the committee

Thesis deposited in: Department of Chemistry Library, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru, doc. dr. sc. Aleksandru Sečenjiju koji mi je pomogao svojim stručnim savjetima i sugestijama tijekom pisanja i obrade podataka diplomskog rada. Također veliko hvala i asistentici Tatjani Šafarik na organizaciji i pomoći pri izvedbi diplomskog rada.

Posebnu zahvalu upućujem i svome dečku, Josipu, koji je prolazio sve trenutke studiranja zajedno sa mnom i vjerovao u mene. Hvala ti što si uvijek bio tu za mene.

Neopisivu zahvalnost za sve u životu želim izraziti svojoj obitelji, naročito roditeljima, koji su zaslužni za moj ostvareni uspjeh u školovanju i životu. Hvala Vam što ste mi omogućili studiranje, na riječima podrške i ohrabrenja.

Hvala i svim mojim dragim prijateljima koji su vjerovali u mene i pružali mi podršku svih ovih godina te s kojima sam prošla prekrasne trenutke koje ću pamtiti cijeli život.

Sadržaj

1.UVOD 1

2. ANTIOKSIDANSI 2

2.1. Enzimski antioksidansi 3

2.2. Neenzimski antioksidansi 4

2.3. Mehanizam djelovanja antioksidansa 8

2.3.1. Sinergisti **10**

3. OKSIDATIVNI STRES 11

3.1. Reaktivne vrste kisika (ROS) 12

4. ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET 14

4.1. Metode određivanja antioksidativnog kapaciteta 14

4.1.1. SET mehanizam **14**

4.1.2 HAT mehanizam **16**

5. EKSPERIMENTALNI DIO 17

5.1. Aparatura 17

5.2. Kemikalije 20

5.3. Priprema otopina 21

5.4. Standardizacija otopine cerijeva (IV) sulfata 22

5.5. Određivanje kalibracijskih krivulja antioksidansa 23

5.6. Određivanje TAC-a uzorka 26

5.6.1. Priprema uzorka **26**

5.6.2. Analiza uzorka **27**

6. REZULTATI 28

6.1. Standardizacija Ce (IV) sulfata 28

6.2. Kalibracijski pravci i spektri apsorbancije antioksidansa 29

6.2.1. Kalibracijski pravac i spektar apsorbancije askorbinske kiseline **31**

6.2.2. Kalibracijski pravac i spektar apsorbancije kvercetina **33**

6.2.3. Kalibracijski pravac i spektar apsorbancije galne kiseline **35**

6.3. Određivanje TAC-a tableta CERAC metodom 37

6.4. Kalkulacija ekvivalenta kvercetina 38

6.5. Kalkulacija ekvivalenta galne kiseline 39

7. ZAKLJUČAK 40

LITERATURA 41

1.UVOD

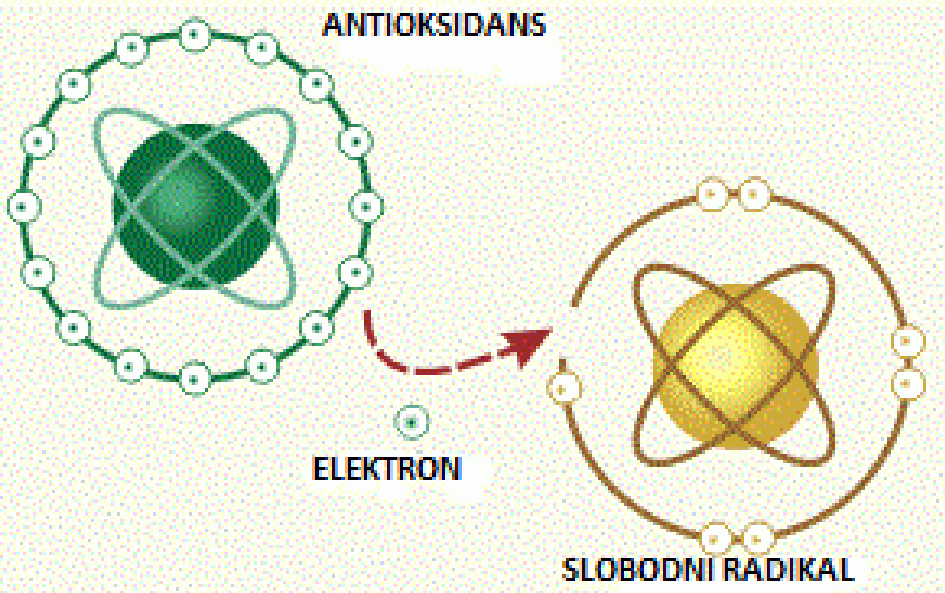
Antioksidansi su tvari koje štite stanicu od oksidacijskog djelovanja slobodnih radikala te sprječavaju i usporavaju nastajanje oksidacijskog stresa koji je posljedica prekomjernog stvaranja reaktivnih spojeva kisika zbog poremećaja u ravnoteži oksidacijsko – redukcijskih procesa u biološkim organizmima. Utjecaj oksidativnog stresa na organizam ovisi o vrsti oksidansa, sastavu i djelovanju različitih antioksidansa.

Antioksidativni kapacitet mjera je sposobnosti reduciranja i sprječavanja štetnih oksidativnih reakcija u hrani i organizmu [1]. S obzirom na kemijsku raznolikost antioksidansa te široki spektar njihovog međusobnog sinergističkog i antagonističkog djelovanja, teško je razdvojiti i kvantificirati antioksidanse iz složenih matriksa, stoga je njihova kombinirana akcija važnija informacija od individualnog djelovanja. Zbog nedostatka standardiziranih metoda određivanja, nema široko usvojenog prehrambenog indeksa za označavanje hrane i bioloških tekućina. Također, mjerenja antioksidansa nisu prilagođena standardnim protokolima u medicinskoj dijagnostici i tretmanu unatoč evidentnim dokazima o promjenama antioksidativnog kapaciteta uslijed određenih bolesti. Trenutno su dostupni brojni *in vitro* testovi koji se protežu od jednostavnih kemijskih testova u homogenim otopinama do kompleksnih metoda.

Metoda određivanja totalnog antioksidativnog kapaciteta ovog diplomskog rada je analiza redukcijskog kapaciteta na bazi cerija (IV) koja se naziva još i CERAC metoda. Ova jednostavna, jeftina i brza metoda lako se primjenjuje u skromno opremljenim konvencionalnim laboratorijima. Cilj je odrediti antioksidativni status tableta pripravljenih od brašna sjemenki crnog grožđa pomoću CERAC metode.

2. ANTIOKSIDANSI

Tvari koje štite stanice od oksidacijskog djelovanja slobodnih radikala i sprječavaju nastajanje oksidacijskog stresa su antioksidansi [2]. Antioksidansi trebaju uvijek biti prisutni u organizmu u koncentraciji koja omogućava uspješno uklanjanje radikala. Slika 1. prikazuje djelovanje antioksidansa na slobodni radikal.



Slika 1.Djelovanje antioksidansa na slobodne radikale [3]

Antioksidansi doniraju elektron slobodnim radikalima pa oni više nemaju potrebu napadati stanicu te se tako zaustavlja lančana reakcija oksidacije. Također, moraju lako i brzo dolaziti u sve dijelove organizma te biti u obliku koji se može brzo i učinkovito obnoviti.

Neki antioksidansi se mogu sintetizirati u stanicama, ali najčešće se u organizam unose hranom i pićem te u obliku vitaminskih i sličnih suplemenata.

Endogeni antioksidativni sustav obrane se sastoji od mreže enzimskih i neenzimskih molekula. Primarni antioksidativni enzimi poput katalaze, glutation peroksidaze i superoksid dismutaze kataliziraju kompleksnu kaskadu reakcija kako bi pretvorili reaktivne vrste u stabilnije molekule. Uz primarne, veliki broj sekundarnih enzima poput glutation reduktaze

i glukoza-6-fosfat dehidrogenaze rade u sinergizmu s neenzimskim antioksidansima formirajući redoks krug koji pruža kofaktore nužne za primarnu enzimsku funkciju [4].

Neenzimski antioksidansi se mogu podijeliti u dvije skupine: primarni ili antioksidansi koji prekidaju lanac (najčešće uklanjanjem ROS/RNS vrsta) i sekundarni ili preventivni (keliranjem prijelaznih metala).

Primarni antioksidansi prekidaju lančanu reakciju tako da reagiraju s lipidnim radikalom i stvaraju stabilni produkt. U primarne antioksidanse ubrajaju se: fenoli, vitamini, minerali, flavonoidi, karotenoidi, likopeni, diterpeni, kumin i njihovi derivati. Sekundarni antioksidansi fenolni su spojevi koji unuštavaju već stvorene slobodne radikale. U sekundarne antioksidanse ubrajaju se: butilirani hidroksianisol (BHA), butilirani hidroksitoluen (BHT) i propil galat (PG). Iduća podjela antioksidansa je na enzimske i neenzimske antioksidanse [4].

2.1. Enzimski antioksidansi

Uklanjanje slobodnih radikala iz svih stanica osnovni je zadatak enzimskih antioksidansa. Superoksid-dismutaze (SOD) su enzimi koji kataliziraju reakciju pretvorbe superoksidnog aniona u vodikov peroksid. U stanju oksidativnog stresa važna su dva tipa tog enzima: bakar-cink superoksid-dismutaze (Cu-Zn SOD) i mangan superoksid-dismutaze (MnSOD)[5].

Važnu ulogu ima glutation-peroksidaza (GPx) koji može biti u obliku ovisnom i neovisnom o selenu. Uloga joj je da inaktivira oksidanse, dajući svoj atom vodika nezasićenim spojevima. Kod sisavaca je poznato ukupno četiri tipa GPx-a koji imaju zadaću smanjivati razinu vodikova peroksida. Glutation je važan u održavanju ravnoteže unutar organizma jer mu je jedna od glavnih funkcija vraćanje vitamina važnih za organizam u aktivan oblik [5].

2.2. Neenzimski antioksidansi

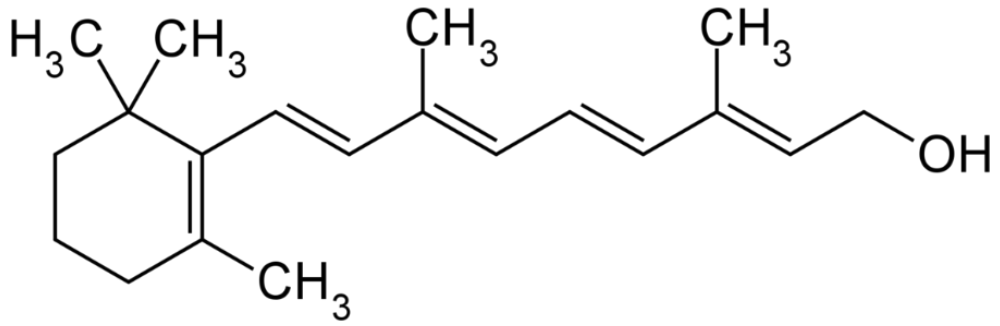
U neenzimske antioksidanse ubrajaju se metabolički antioksidansi i antioksidansi iz hrane[4]. Metabolički antioksidansi su produkti metaboličkih reakcija u tijelu, a oni su glutation, koenzim Q, lipoična kiselina. Antioksidansi iz hrane su spojevi koji se ne proizvode u organizmu te ih treba unositi u organizam. Tu se ubrajaju vitamin A, vitamin C, vitamin E, minerali selen i cink te resveratrol. Svi antioksidansi iz hrane pokazali su se vrlo uspješnim u detoksifikaciji organizma od ROS-a .

Glutation

Glutation je tripeptid koji se sastoji od tri aminokiseline (glutaminska kiselina, cistein i glicin) i jedan je od najvažnijih antioksidansa u organizmu. Nalazi se gotovo u svim stanicama i ima važnu ulogu u oksidoredukcijskim procesima kao prenosilac vodika. Služi kao glavni antioksidans toksičnih međuprodukata poput vodikovog peroksida (H_2O_2) i njemu sličnih produkata poput nascentnog (kemijski slobodnog radikala) kisika. Zadatak mu je deaktiviranje oksidansa tako da u reakciji svoj atom vodika daje nezasićenim spojevima.

Vitamin A

Vitamin A je primarni alkohol poliizoprenoidnog sastava. Pojavljuje se u tri osnovna oblika: alkohol retinol, aldehid retinal i retinojeva kiselina. Snažan je antioksidans koji doprinosi čovjekovom zdravlju te ima povoljan utjecaj na oči, rast, kosu i kožu. Ispunjava važne funkcije poput uklanjanja radikala te na taj način preventivno djeluje protiv nekih oblika raka i utječe na različite metaboličke procese. Struktura vitamina A prikazana je na slici 2.

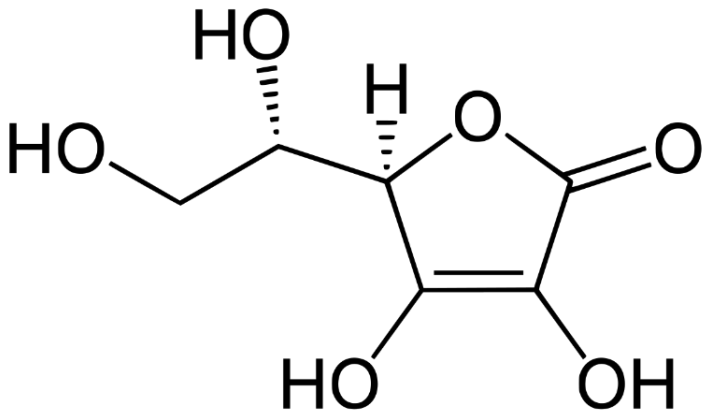


Slika 2. Struktura vitamina A [6]

Strukturu vitamina A čini cikloheksanski prsten na kojemu su tri metilne skupine i pobočni lanac s četiri dvostruke veze te primarnom hidroksidnom skupinom.

Vitamin C

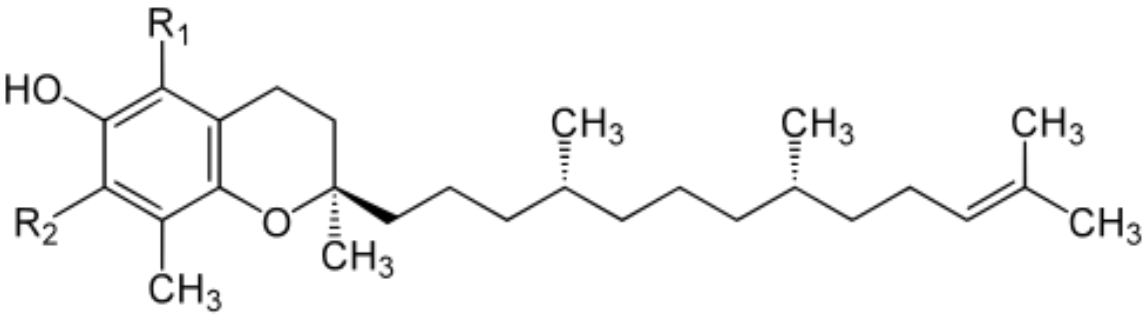
Vitamin C, L-askorbinska kiselina, ketolakton sa šest ugljikovih atoma (slika 3.) slične strukture kao glukoza, ima snažno antioksidativno djelovanje. Sudjeluje u izgradnji hemoglobina i crvenih krvnih zrnaca te poboljšava apsorpciju željeza. Vitamin C se povezuje s ublažavanjem simptoma prehlade i smanjivanjem koncentracije fibrinogena kod osoba koje imaju povećani rizik nastanka bolesti krvožilnog sustava.



Slika 3. Struktura vitamina C [7]

Vitamin E

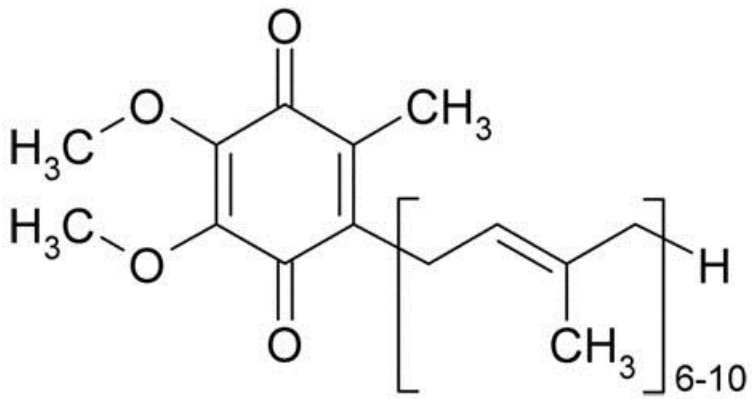
Vitamin E sastoji se od osam izomera, četiri tokoferola i četiri tokotrienola. Najvažniji od tokoferola je α-tokoferol, čija je strukta prikazana slikom 4., derivat kromana s izoprenoidnim pobočnim lancem, koji pokazuje značajnu biološku aktivnost. Vitamin E štiti od slobodnih radikala i djeluje kao antioksidans. Svojim oksidacijskim djelovanjem čuva nezasićene masti u tkivu, stjenke stanica i hormone.



Slika 4. Struktura α-tokoferola [8]

Koenzim Q10

Koenzim Q10 (ubikinon) vrlo je snažan antioksidans te je uklanjanjem slobodnih radikala uključen u proizvodnju energije u stanicama. Derivat je kinona i ima važnu ulogu u respiratornom lancu i drugim metabolizmima [9]. Na slici 5. prikazana je struktura koenzima Q 10.

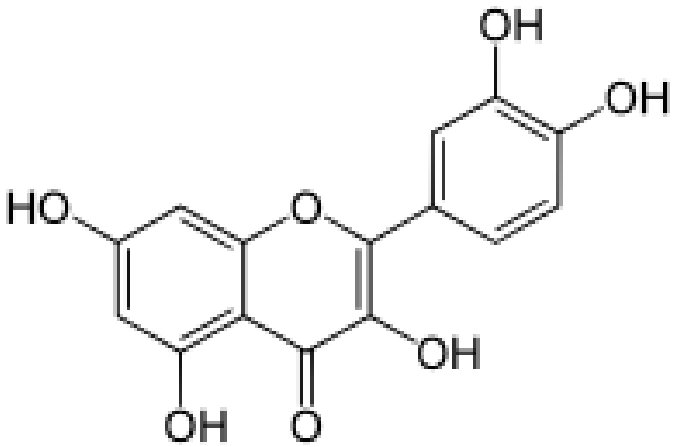


Slika 5. Strukturna formula koenzima Q10 [10]

Karakteristična kinonska struktura, koja je vezana za „rep" od šest do deset izoprenoidnih jedinica, omogućuje sprječavanje formiranja lipidnih radikala te ima sposobnost regeneracije vitamina E [8]. Koenzim Q10 omogućuje nastanak energije u stanicama srca, jetre, bubrega i gušterače te sposobnost obavljanja fizioloških zadaća ovisi o njegovoj dovoljnoj količini.

Flavonoidi

Flavonoidi su skupina spojeva: flavanola, anotcijanida, izoflavonoida, flavanona i flavona. Djeluju kao redukcijska sredstva (reduciraju α tokoferolne radikale), donori vodika, aktiviraju antioksidacijske enzime te povećavaju koncentraciju uričnе kiseline i drugih molekula male molekulske mase. Slika 6. prikazuje strukturu flavonoida koji su građeni od 15 ugljikovih atoma, sastoje se od dva aromatska prstena i kromanskog prstena.



Slika 6. Strukturna formula flavonoida [11]

2.3. Mehanizam djelovanja antioksidansa

Antioksidansi niske molekulske mase (eng. *Low Molecular Weight Antioxidants*, LMWA) su male molekule koje često infiltriraju stanice i akumuliraju se u specifičnim odjeljcima povezanim s oksidativnim oštećenjem [12]. U ljudskim tkivima dobivaju se iz različitih izvora. U stanici se sintetiziraju glutation, nikotinamid adenin dinukleotid (reducirani oblik) i karnozin, dok su mokraćna kiselina i bilirubin otpadni proizvodi staničnog metabolizma, a askorbinska kiselina i polifenoli se unose putem prehrane [12].

Višak slobodnih radikala može ubrzati proces starenja i povezan je s drugim patologijama kao što su moždani udar, dijabetes, reumatoidni artritis, Parkinsonova bolest, Alzheimerova bolest i rak. Reaktivne vrste kisika (eng. *Reactive Oxyhen Species*, ROS) čine vrste s jakom oksidacijskom tendencijom, bilo da su to radikali (superoksidni radikal, hidroksilni radikal) ili ne-radikali (ozon, vodikov peroksid).

Niz kemijskih i fizikalnih pojava mogu inicirati oksidaciju, koja se odvija kontinuirano u prisutnosti prikladnog supstrata, sve dok se ne pojavi blokirajući obrambeni mehanizam. Osnovne reakcije oksidacije putem lančane reakcije, posredovane slobodnim radikalima, su inicijacija, propagacija, grananje i terminacija te se pokreću djelovanjem vanjskog utjecaja kao što su toplina, svjetlo, ionizirajuće zračenje ili kemijska inicijacija koja uključuje metalne ione.

Inicijacija

$$LH + R\cdot \rightarrow L\cdot + RH \quad (1)$$

LH je molekula supstrata (lipid) koja reagira s R· kao inicijalnim oksidirajućim radikalom (jednadžba 1). Oksidacijom lipida nastaje visoko reaktivni alkilni radikal (L·) koji onda može brzo reagirati s kisikom da bi formirao lipidni peroksidni radikal (LOO·) (jednadžba 2).

Propagacija

$$L\cdot + O_2 \rightarrow LOO\cdot \quad (2)$$

$$LOO\cdot + LH \rightarrow L\cdot + LOOH \quad (3)$$

Peroksidni radikali mogu dalje oksidirati lipid (jednadžba 3), stvarajući lipidne hidroperokside (LOOH). Oni se razgrađuju na alkohole, aldehide, ketone, ugljikovodike i radikale, uključujući alkoksilni radikal (LO·) (jednadžba 4).

Grananje

$LOOH \rightarrow LO\cdot + HO\cdot$ (4)

$2LOOH \rightarrow LOO\cdot + LO\cdot + H_2O$ (5)

Razgradnja lipidnih hidroperoksida uključuje katalizu prijelaznim metalima u reakcijama poput onih koje uključuju vodikov peroksid, dajući lipidni peroksil i lipidne alkoksilne radikale (jednadžba 5).

Terminacija

Reakcije terminacije (jednadžbe 6, 7, 8) uključuju kombinaciju radikala radi stvaranja ne-radikalnih produkata:

$LOO\cdot + LOO\cdot \rightarrow LOOL + O_2$ (inertni produkt) (6)

$L\cdot + L\cdot \rightarrow L\text{-}L$ (7)

$L\cdot + LOO\cdot \rightarrow LOOL$ (8).

Primarni antioksidansi, AH, kada se nalaze u tragovima, mogu odgoditi inicijaciju reagirajući s lipidnim radikalom ili inhibiraju propagaciju reagirajući s peroksidnim ili alkoksilnim radikalima (jednadžbe 9, 10, 11) [12].

$L\cdot + AH \rightarrow LH + A\cdot$ (9)

$LOO\cdot + AH \rightarrow LOOH + A\cdot$ (10)

$LO\cdot + AH \rightarrow LOH + A\cdot$ (11)

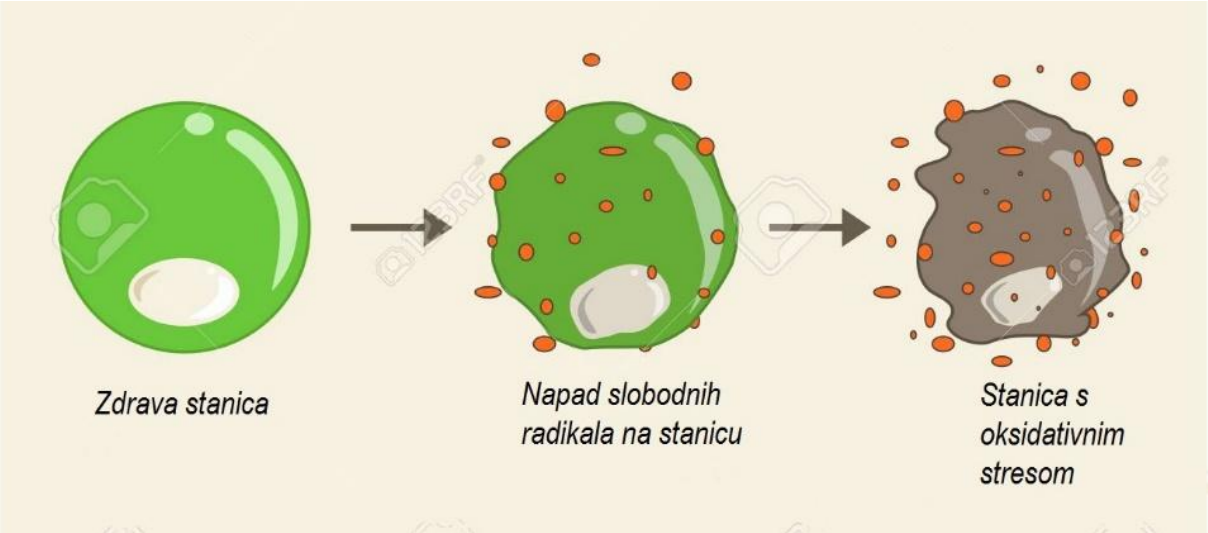
2.3.1. Sinergisti

Sinergisti su kemijski spojevi koji nemaju antioksidacijsko djelovanje, ali dodani uz neki antioksidans produžuju njegovo djelovanje (obično 1 do 3 puta) [13]. Sinergisti koji se najčešće koriste uz antioksidanse su: limunska kiselina, octena kiselina, monoizopropil citrat, askorbil palmitat i lecitin.

Sinergisti djeluju tako da vežu tragove metala (Cu, Fe, Ni,...), inaktiviraju ih i isključuju njihovo prooksidacijsko djelovanje te doniraju vodikov atom antioksidansu uslijed čega ga reduciraju i regeneriraju te na taj način produljuju vrijeme njegovog djelovanja.

3. OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres je posljedica prekomjernog stvaranja reaktivnih spojeva kisika zbog poremećene ravnoteže oksidacijsko – redukcijskih procesa u biološkim organizmima [14]. Utjecaj oksidativnog stresa na organizam ovisi o vrsti oksidansa, sastavu i djelovanju različitih antioksidansa, sposobnosti oporavka sustava te mjestu i intenzitetu njihovih stvaranja. Stvaranjem i povećanjem slobodnih radikala u velikoj mjeri nastaje oksidativni stres koji je uzrok mnogih bolesti (kardiovaskularne bolesti, karcinomi, dijabetes, kožne bolesti, autoimune bolesti,...)[14]. Slika 7. prikazuje kako slobodni radikali uzrokuju oksidativni stres u stanici.



Slika 7. Utjecaj slobodnih radikala na stanicu [15]

Posljedice oksidacijskog stresa najizraženije su kod ljudi starije životne dobi [16]. Jedna od definicija procesa starenja je progresivni pad fizioloških funkcija organizma nakon reproduktivne faze života. Postoje dvije glavne teorije koje opisuju proces starenja: teorija akumulacije oštećenja i genetska teorija. Teorija akumulacije oštećenja uključuje teoriju slobodnih radikala koja se temelji na činjenici da slučajni štetni učinci slobodnih radikala proizvedenih tijekom aerobnog metabolizma uzrokuju oštećenje DNA, lipida i proteina te se nakupljaju tijekom vremena [16]. Ravnoteža u metaboličkim procesima pomaknuta je u smjeru nastanka viška slobodnih radikala. To može biti uzrok starenja ljudskog organizma jer stariji organizmi imaju smanjenu mogućnost obrane od slobodnih radikala. Na taj način nastaje zatvoreni krug između procesa oksidacijskog stresa i starenja organizma kao uzroka i posljedice [14].

Slobodni radikali mogu se podijeliti u dvije skupine: endogeni i egzogeni slobodni radikali. U dvije velike skupine endogenih slobodnih radikala ubrajaju se reaktivne vrste kisika i reaktivne vrste dušika (eng. *reactive nitrogen species* – RNS). Egzogeni slobodni radikali se mogu unijeti hranom, na primjer neki pesticidi i lijekovi.

3.1. Reaktivne vrste kisika (ROS)

Reaktivne vrste kisika (ROS) su ioni ili vrlo male molekule koje uključuju ione kisika, slobodne radikale i perokside, anorganske ili organske. U reaktivne vrste kisika ubrajaju se:
- superoksid ($O_2^{\cdot -}$),
- vodikov peroksid (H_2O_2),
- hipokloritna kiselina (HOCl),
- hidroksilni radikal ($OH^{\cdot}$)

Superoksid ($O_2^{\cdot -}$) se u velikim količinama proizvede u reakciji s O_2 pri čemu elektron koji sudjeluje u reakciji nastaje u mitohondrijima. S obzirom da je $O_2^{\cdot -}$ prilično reaktivan spoj, zahtijeva određeni transportni sustav koji može proći kroz staničnu membranu proizvodeći daljnje štete.

Vodikov peroksid (H_2O_2) nastaje detoksifikacijom $O_2^{\cdot -}$ uz pomoć Cu, Zn–superoksid- dismutaze (SOD) u citosolu ili mangan superoksid-dismutaze (Mn-SOD) u mitohondrijima. H_2O_2 ima ulogu unutarstanične signalne molekule. Vodikov peroksid može prepraviti strukturu stanica i aktivirati transkripcijske faktore te se uklanja pomoću enzimskih antioksidansa.

Hipokloritna kiselina nastaje enzimatskom reakcijom H^+, Cl^- i H_2O_2 prikazanom jednadžbom 12 koja je katalizirana enzimom mijeloperoksidazom.

$$H^+ + Cl^- + H_2O_2 \rightarrow HOCl + H_2O \qquad (12)$$

Hidroksil radikal ($HO^{\cdot}$) je najreaktivniji slobodni radikal. Jednadžbom 13 prikazano je da može nastati iz superoksid aniona i vodikovog peroksida u prisutnosti iona bakra i željeza.

$$\cdot O^{-}_{2} + H_2O_2 \rightarrow \cdot OH + OH^{-} + O_2 \qquad (13)$$

Hidroksil radikal ima najveći elektronski redukcijski potencijal i napada sve biološke molekule u organizmu (proteine, lipide, polipeptide, DNK). Neka istraživanja zaključila su da izaziva mutacije razaranjem DNK te uzrokuje bolesti poput Alzheimerove, Parkinsonove i drugo [17, 18].

4. ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET

Antioksidativni kapacitet predstavlja mjeru sposobnosti reduciranja i zaustavljanja štetnih oksidativnih reakcija u hrani i u organizmu [1]. Mjerenje totalnog antioksidativnog kapaciteta (eng. *Total antioxidant capacity*, TAC) bioloških tekućina i hrane provodi se za dijagnozu i liječenje bolesti povezanih s oksidativnim stresom, kontrolu varijacija unutar ili između proizvoda te usporedbu hrane s obzirom na sadržaj antioksidansa. Novija literatura tvrdi da jedan indeks „totalnog antioksidativnog kapaciteta (TAC)“ za označavanje hrane neće biti dostatan zbog nedostatka standardnih kvantitativnih metoda te se stoga trebaju upotrijebiti brojne metode da bi se procijenila antioksidativna kvaliteta hrane [19]. U literaturi postoje brojne metode TAC mjerenja [1,31-39], no razvoj jednostavnih, brzih, jeftinih i raznovrsnih metoda analize je stalno u porastu.

4.1. Metode određivanja antioksidativnog kapaciteta

Danas je u literaturi dostupno mnogo metoda za mjerenje totalnog antioksidativnog kapaciteta. Međutim, glavni problem je nestandardiziranost tih metoda jer niti jedna metoda ne prikazuje mehanizme djelovanja svih slobodnih radikala i svih antioksidanasa koji su prisutni u kompleksnom sustavu kao što je organizam ili hrana. Također, jedan od nedostataka je i prisutnost drugih reducirajućih komponenti što može dovesti do pogrešaka u rezultatima. Upravo zbog toga je potrebno kombinirati više metoda kako bi se dobio profil aktivnosti svih prisutnih antioksidanasa. Dva osnovna mehanizma preko kojih antioksidansi mogu deaktivirati slobodne radikale su: SET mehanizam i HAT mehanizam [20].

4.1.1. SET mehanizam

Kod metoda koje rade na principu SET (eng. *single electron transfer*) mehanizma (prijenos elektrona) mjeri se sposobnost antioksidansa da donira elektron te tako reducira komponente (metale, karbonile i radikale). Metode su ovisne o otapalu i pH vrijednosti te su spore. U metodama baziranim na SET mehanizmu mjeri se postotak smanjenja koncentracije slobodnog radikala. Uslijed redoks reakcije, dolazi do promjene boje koja je u korelaciji s koncentracijom antioksidansa. Metode koje se koriste za mjerenje

antioksidativnog kapaciteta na principu SET mehanizma su: FRAP (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*), DPPH (*2,2-difenil-1-pikril-hidrazil*) i TEAC (eng. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) metoda [20].

4.1.1.1. CERAC metoda

Analiza redukcijskog kapaciteta na bazi cerija (IV) predloženog naziva CERAC razvijena je za mjerenje ukupnog antioksidativnog kapaciteta (eng. *Total antioxidant capacity*, TAC) hrane, u kojoj bi Ce (IV) selektivno oksidirao antioksidativne spojeve. TAC analiza na bazi Cerija (IV) je jednostavna, jeftina i brza metoda te se lako može primijeniti u skromno opremljenim konvencionalnim laboratorijima [21].

Maksimum apsorbancije od 320 nm Ce (IV) otopina tipičan je za nehidrolizirani i nereducirani Ce^{4+} ion te se ta valna duljina koristiti kao analitička valna duljina za analizu antioksidansa na bazi Ce (IV). Istovremena prisutnost H_2SO_4 i Na_2SO_4 predstavlja puferirajuće djelovanje i na kiselost i na redoks potencijal, stoga treba prilagoditi sastav H_2SO_4-Na_2SO_4 medija da bi se cerijev oksidans selektivno koristio za antioksidativne spojeve. U slučaju hidriranih Ce^{4+}- sulfatnih spojeva, i kiselost i koncentracija sulfata su važne za dobivanje nepromjenjive vrijednosti apsorbancije na 320 nm [21].

Za reakciju:

$$Ce^{4+} + e^- \rightleftarrows Ce^{3+} \quad (14)$$

sa standardnim redukcijskim potencijalom (E^0_{Ce}) od 1,44 V (u odnosu na standardnu vodikovu elektrodu *(*eng. *Standard hydrogen electrode*, *SHE*)) više oksidacijsko stanje cerija prvenstveno se stabilizira sa sulfatnom kompleksacijom. Prema Nernstovoj jednadžbi (jednadžba 15), stvarni redukcijski potencijal (E_{Ce}) povezan je sa standardnim potencijalom redukcije (E^0_{Ce}) u odnosu:

$$E_{Ce} = E^0_{Ce} + \left(\frac{RT}{F}\right)\ln\left(\frac{[Ce^{4+}]}{[Ce^{3+}]}\right). \quad (15)$$

Stoga, formiranje i hidroksi- i sulfatokompleksa Ce^{4+} (npr. $CeOH^{3+}$ odnosno $CeSO_4^{2+}$) smanjuje taj potencijal kako bi cerijev oksidans izgubio dio svoje oksidacijske moći. Teorijska podloga za fino ugađanje redoks-potencijala cerija leži u činjenici da formiranje hidroksi-i sulfato-kompleksa selektivno stabilizira višu valenciju cerija (tj. tetravalentnog cerija) smanjenjem relativne koncentracije slobodnih hidratiziranih Ce^{4+} iona, čime se pomiče reakcija polu-stanične ravnoteže cerija lijevo i smanjuje potencijal smanjenja (E_{Ce}). U manje kiselim medijima koji sadrže više sulfata, Ce (IV) ne bi bio snažan oksidans te bi oksidirali samo antioksidansi, a ne drugi organski spojevi. Optimalna kombinacija koncentracija sumporne kiseline i natrijevog sulfata potrebna je kako bi se potisnula Ce (IV) hidroliza i uzrokovala prevlast jednog hidratiziranog Ce (IV) – sulfat kompleksa s odgovarajućim redoks svojstvima [21]

4.1.2 HAT mehanizam

Metodama koje rade na principu HAT (eng. *hydrogen atom transfer*) mehanizma (prijenos vodikovog atoma) mjeri se sposobnost antioksidansa da reagira sa slobodnim radikalima donirajući vodikov atom. Generator slobodnih radikala oksidira probnu tvar, a antioksidans se s probnom tvari natječe za slobodne radikale. Metode koje se koriste za mjerenje antioksidativnog kapaciteta na principu HAT mehanizma su: ORAC (eng. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*), TRAP (eng. *Total Radical Trapping Antioxidant Parametar*) i metoda izbjeljivanja krocina (eng. *Crocin bleachng assay*) [20].

5. EKSPERIMENTALNI DIO

5.1. Aparatura

Za eksperimentalna mjerenja korišteni su:

- Digitalna analitička vaga (Kern ALS 220-4NM)



Slika 8. Digitalna analitička vaga (Kern ALS 220-4NM) [22]

- Spektrofotometar (Shimadzu UV 1900)



Slika 9. Spektrofotometar (Shimadzu UV 1900) [23]

- FT-IR spektrometar (Shimadzu FT-IR 8400S)



Slika 10. FT-IR spektrometar (Shimadzu FT-IR 8400S) [24]

- Ultrazvučna kupelj (Sonorex Super RK 100/H,Bandelin)



Slika 11. Ultrazvučna kupelj (Sonorex Super RK 100/H,Bandelin) [25]

- Laboratorijska centrifuga



Slika 12. Laboratorijska centrifuga [26]

- Laboratorijski sušionik



Slika 13. Laboratorijski sušionik [27]

5.2. Kemikalije

Za eksperimentalna mjerenje korištene kemikalije su:

Cerijev (IV) sulfat, $Ce(SO_4)_2$ x nH_2O, Carlo Erba, Francuska

Natrijev sulfat, bezvodni, Na_2SO_4, Gram-mol, Hrvatska

L(+)- askorbinska kiselina, $C_6H_8O_6$, T.T.T., Hrvatska

Kvercetin dihidrat 97 %, $C_{15}O_{10}H_7 \times 2H_2O$, Alfa Aesar, Njemačka

Galna kiselina, $C_7H_6O_5$, Alfa Aesar, Njemačka

Koncentrirana sumporna kiselina, H_2SO_4, Gram-mol, Hrvatska

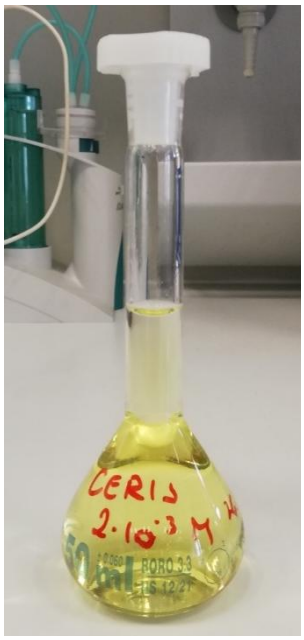
Etanol 98%, C_2H_5OH, BDH PROLABO, UK

Kalijev jodid 5%, KI, BDH PROLABO, UK

Natrijev tiosulfat, $Na_2S_2O_3$, T.T.T., Hrvatska

5.3. Priprema otopina

Otopina cerijeva (IV) sulfata (2×10^{-3} mol/L) pripremljena je otapanjem 0,0332 g cerijeva (IV) sulfata u 8,33 mL koncentrirane sumporne kiseline te je odmjerna tikvica od 50 mL nadopunjena vodom do oznake.



Slika 14. Otopina cerijeva (IV) sulfata [vlastita fotografija]

Pripremljena je otopina natrijevog sulfata koncentracije 1 mol/L.

Sumporna kiselina koncentracije 3 mol/L pripremljena je prema jednadžbi 16.

$$c_1V_1=c_2V_2$$

$$V(\text{konc. } H_2SO_4) = \frac{c(H_2SO_4)*V(\text{tikvica})}{c(konc.H_2SO_4)} = \frac{3\ mol/L*25\text{mL}}{18\ mol/L} = 4{,}17\ \text{mL} \qquad (16)$$

Pripremljene su otopine askorbinske kiseline, kvercetina i galne kiseline koncentracije 1×10^{-3} mol/L.

5.4. Standardizacija otopine cerijeva (IV) sulfata

Otopina cerija standardizirana je s 5%-tnom otopinom kalijevog jodida i natrijevim tiosulfatom koncentracije 0,05 mol/L uz škrob kao indikator. Reakcija se temelji na jednadžbi 17.

$$2\ Ce^{4+} + 2I^- \rightarrow 2\ Ce^{3+} + I_2$$
$$\underline{I_2 + 2S_2O_3^{2-} \rightarrow 2I^- + S_4O_6^{2-}}$$
$$Ce^{4+} + e^- \rightarrow Ce^{3+}$$
$$2I^- \rightarrow 2e^- + I_2 \qquad (17)$$

Prema redoks reakciji, vidljivo je da su množine Ce^{4+} i $S_2O_3^{2-}$ iste (jednadžba 18):

$$n\ (Ce^{4+}) = n\ (S_2O_3^{2-}) \qquad (18)$$

te se koncentracija cerijeva sulfata može izračunati prema jednadžbama 19 i 20:

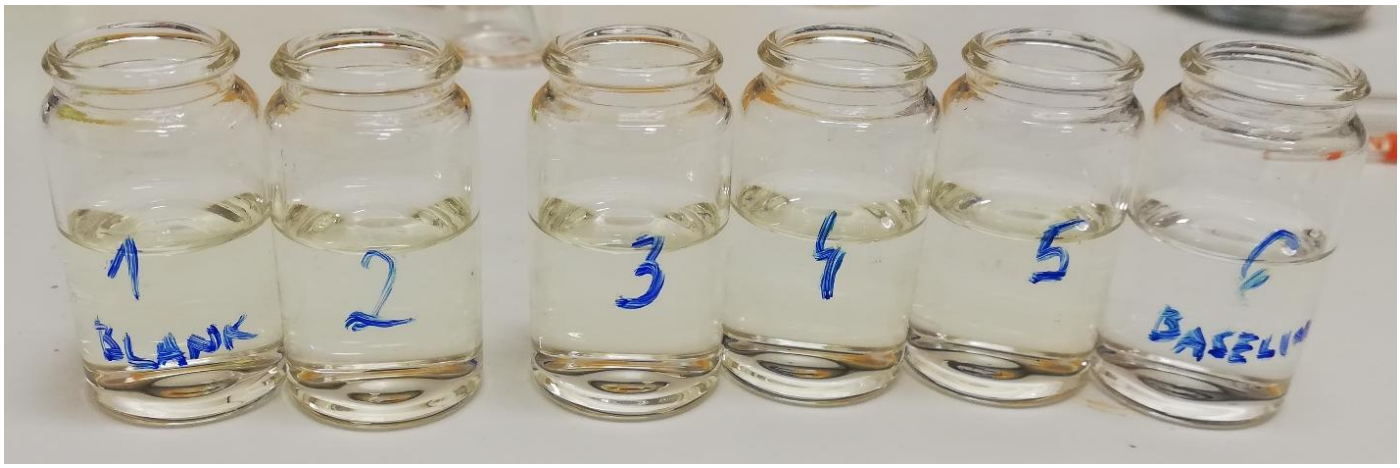
$$c_1V_1 = c_2V_2 \qquad (19)$$

$$c\ (Ce^{4+}) \times V\ (Ce^{4+}) = c\ (S_2O_3^{2-}) \times \bar{v}\ (S_2O_3^{2-})$$

$$c\ (Ce^{4+}) = [c\ (S_2O_3^{2-}) \times \bar{v}\ (S_2O_3^{2-})] / V\ (Ce^{4+}) \qquad (20).$$

5.5. Određivanje kalibracijskih krivulja antioksidansa

Za konstrukciju kalibracijskih krivulja pripravljene su otopine prema sastavu koji je naveden u tablicama 1, 2 i 3. Ionska jakost i pH vrijednost su podešene pomoću natrijeva sulfata i sumporne kiseline te su održavane jednakim (0,3 mol/L H_2SO_4 + 0,7 mol/L Na_2SO_4) u svim sustavima različitih antioksidansa. Nakon 30 minuta od priprave otopina izmjerena je apsorbancija na 320 nm.



Slika 15. Otopine za određivanje kalibracijske krivulje askorbinske kiseline [vlastita fotografija]

Kalibracijska krivulja je konstruirana u rasponu koncentracije askorbinkse kiseline od 2×10^{-5} do 8×10^{-5} mol/L, kvercetina od 2×10^{-6} do 8×10^{-6} mol/L i galne kiseline od 2×10^{-6} do 8×10^{-6} mol/L.

Tablica 1. Pripadne koncentracije (*c*) i volumeni (*V*) kemikalija za spektrofotometrijsko određivanje kalibracijske krivulje askorbinske kiseline

Oznaka	$V(H_2SO_4$ (3mol/L)) (mL)	$V(Ce(SO_4)_2)$ (mL)	$V(Na_2SO_4)$ (mL)	$V(H_2O)$ (mL)	$V_{Askorbinska\ kiselina}$ (mL)	V_{ukupno} (mL)	*C*((Askorbinska kiselina) × 10^{-5} *mol/L*
1	-	1	7	2	-	10	0
2	-	1	7	1,8	0,2	10	2
3	-	1	7	1,6	0,4	10	4
4	-	1	7	1,4	0,6	10	6
5	-	1	7	1,2	0,8	10	8
6	1	-	7	2	-	10	0

Tablica 2. Pripadne koncentracije (*c*) i volumeni (*V*) kemikalija za spektrofotometrijsko određivanje kalibracijske krivulje kvercetina

Oznaka	$V(H_2SO_4$ (3mol/L)) (mL)	$V(Ce(SO_4)_2)$ (mL)	$V(Na_2SO_4)$ (mL)	$V(H_2O)$ (mL)	$V_{Kvercetin}$ (mL)	V_{ukupno} (mL)	*C*((Kvercetin) × 10^{-6} *mol/L*
1	-	1	7	2	-	10	0
2	-	1	7	1,98	0,02	10	2
3	-	1	7	1,96	0,04	10	4
4	-	1	7	1,94	0,06	10	6
5	-	1	7	1,92	0,08	10	8
6	1	-	7	2	-	10	0

Tablica 3. Pripadne koncentracije (*c*) i volumeni (*V*) kemikalija za spektrofotometrijsko određivanje kalibracijske krivulje galne kiseline

Oznaka	***V*(H_2SO_4 (3mol/L)) (mL)**	***V*(Ce$(SO_4)_2$) (mL)**	***V*(Na_2SO_4) (mL)**	***V*(H_2O) (mL)**	$V_{Galnaa\ kiselina}$ **(mL)**	V_{ukupno} **(mL)**	***C*((Galna kiselina) $\times 10^{-6}$ *mol/L***
1	-	1	7	2	-	10	0
2	-	1	7	1,98	0,02	10	2
3	-	1	7	1,96	0,04	10	4
4	-	1	7	1,94	0,06	10	6
5	-	1	7	1,92	0,08	10	8
6	1	-	7	2	-	10	0

5.6. Određivanje TAC-a uzorka

5.6.1. Priprema uzorka

Realni sustav ovog istraživanja su tablete pripravljene od brašna sjemenki crnog grožđa. Tablete su usitnjene i homogenizirane, 400 mg uzorka je odvagano i otopljeno u 20 mL vode te stavljeno u ultrazvučnu kupelj na 15 minuta. Uzorak je centrifugiran 10 minuta na 5000 rpm, potom filtriran (slika 16) kroz 0,2 µm membranu celuloza acetata.



Slika 16. Filtracija uzorka kroz membranu 0,2 µm celuloza acetata [vlastita fotografija]

5.6.2. Analiza uzorka

Uzorci za analizu pripremljeni su prema tablici 4. Nakon 30 minuta od priprave uzoraka, izmjerena je apsorbancija na 320 nm.

Tablica 4. Pripadne koncentracije (*c*) i volumeni (*V*) kemikalija za spektrofotometrijsko određivanje uzorka

Oznaka	***V*(H_2SO_4 (3mol/L)) (mL)**	***V*($Ce(SO_4)_2$) (mL)**	***V*(Na_2SO_4) (mL)**	***V*(H_2O) (mL)**	V_{Uzorak} **(mL)**	V_{ukupno} **(mL)**
Otop. $Ce(SO_4)_2$	-	1	7	2	-	10
UZORAK 1	-	1	7	1,6	0,4	10
UZORAK 2	-	1	7	1,6	0,4	10
UZORAK 3	-	1	7	1,6	0,4	10
BAZNA LINIJA	1	-	7	2	-	10

6. REZULTATI

6.1. Standardizacija Ce (IV) sulfata

Rezultati standardizacije otopine cerija prikazani su tablicom 5.

Tablica 5. Volumen utrošenog natrijeva tiosulfata potreban za titraciju otopine Ce (IV) sulfata

BROJ TITRACIJE	***V($Na_2S_2O_3$) (mL)***
1. TITRACIJA (V_1)	0,45
2. TITRACIJA (V_2)	0,40
3. TITRACIJA (V_3)	0,40
Srednja vrijednost ($\bar{v}$)	0,416

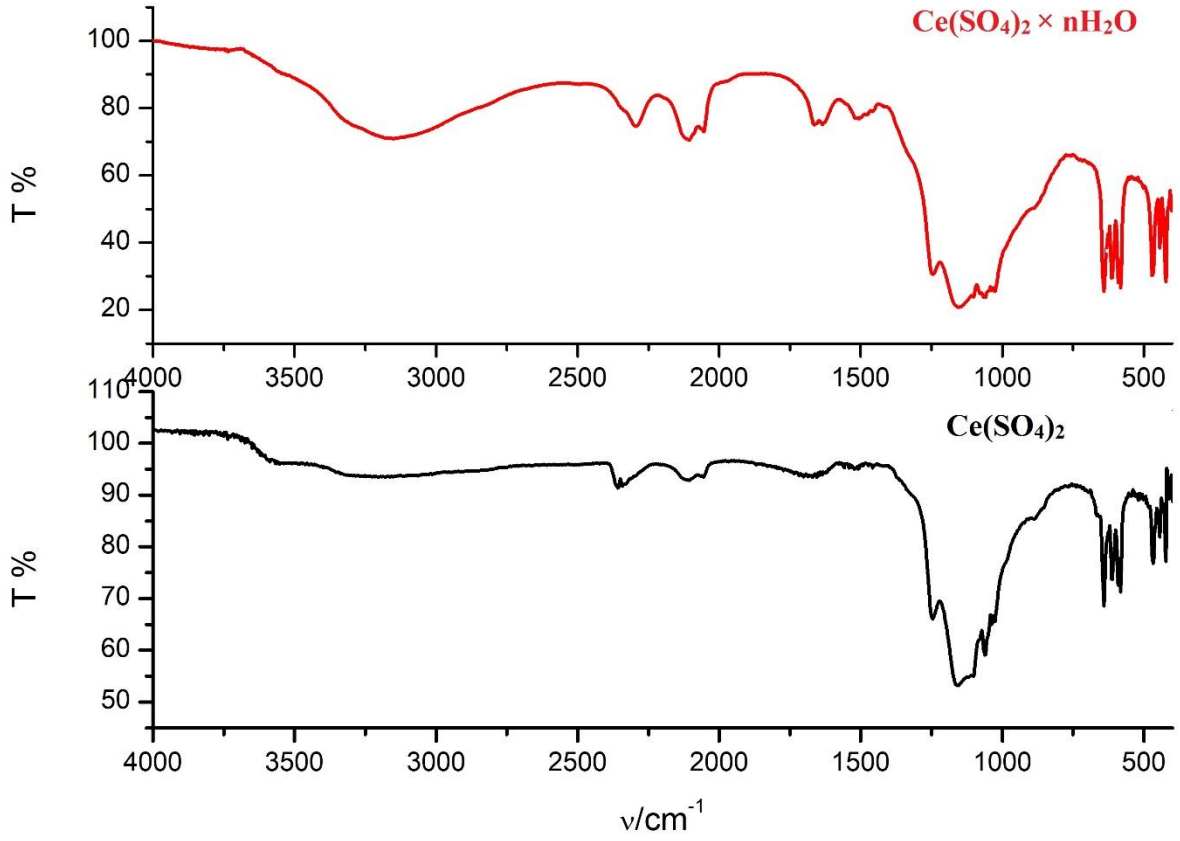
Prema jednadžbi 21 koncentracija otopine cerija iznosi:

$$c\,(Ce^{4+}) = \frac{0{,}05\text{mol/L} \times 0{,}416\ \text{mL}}{10\ \text{mL}}$$

$$c\,(Ce^{4+}) = 2{,}08\times10^{-3}\ \text{mol/L} \qquad (21).$$

6.2. Kalibracijski pravci i spektri apsorbancije antioksidansa

Snimljen je FT-IR spektar za $Ce(SO_4)_2 \times nH_2O$ čije su vrijednosti prikazane na slici 17. označene crvenom bojom.



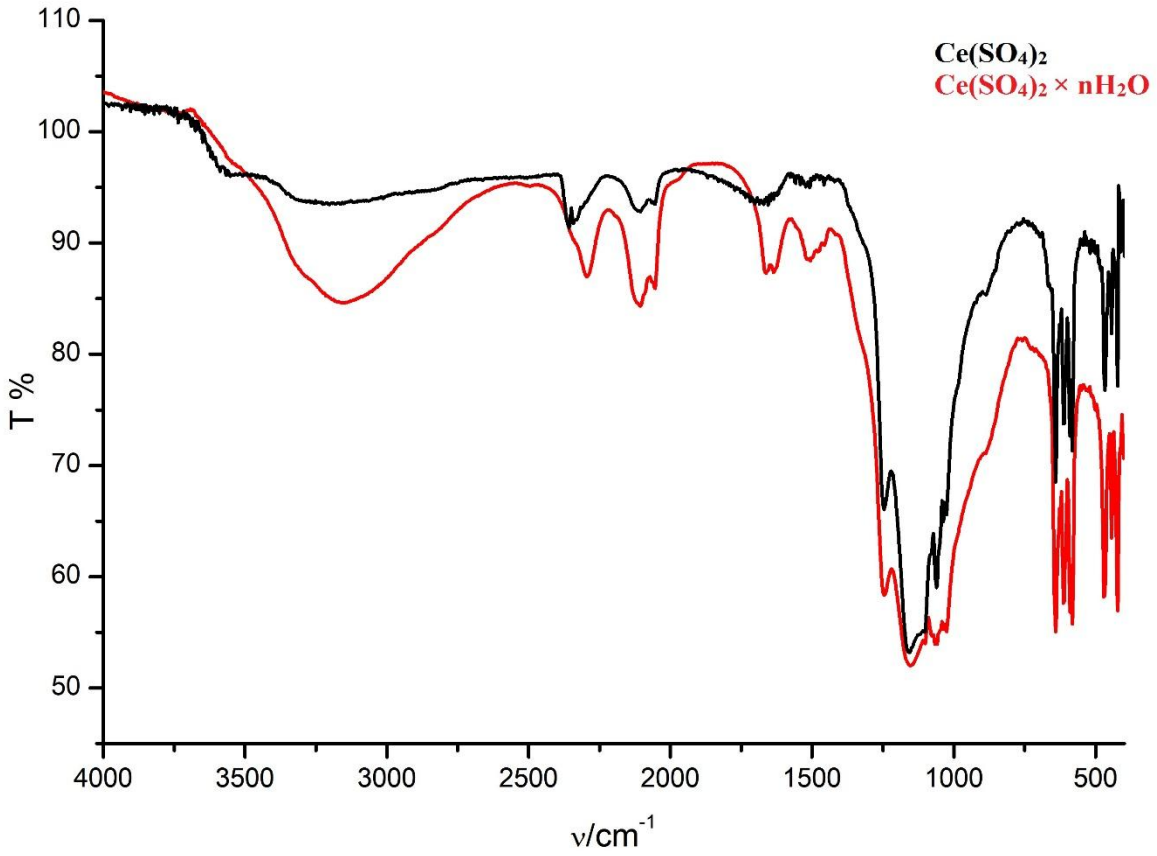
Slika 17. FT-IR spektar $Ce(SO_4)_2$ x nH_2O (crveno) i $Ce(SO_4)_2$ (crno)

U širokom pojasu s maksimumom na oko 3200 cm^{-1} vidljivo je istezanje hidroksidnih skupina, vrpca H_2O istezanja nalazi se na oko 1000 cm^{-1}. Izdužene linije u području od 600 do 700 cm^{-1} prikazuju istezanje sulfata.

Za sušenje $Ce(SO_4)_2 \times nH_2O$ odvagana je otprilike dvostruka masa $Ce(SO_4)_2$ x nH_2O (oko 0,06 g) od potrebne količine za pripravu otopine te je stavljena u sušionik na temperaturu od 150 °C kroz 24 sata. Kako bi provjerili je li voda uklonjena, napravljena je

FT-IR spektroskopska analiza cerijeva sulfata čiji je spektar prikazan na slici 17. označen crnom bojom.

Slikom 18. prikazani su spektri cerijeva sulfata prije i poslije sušenja.

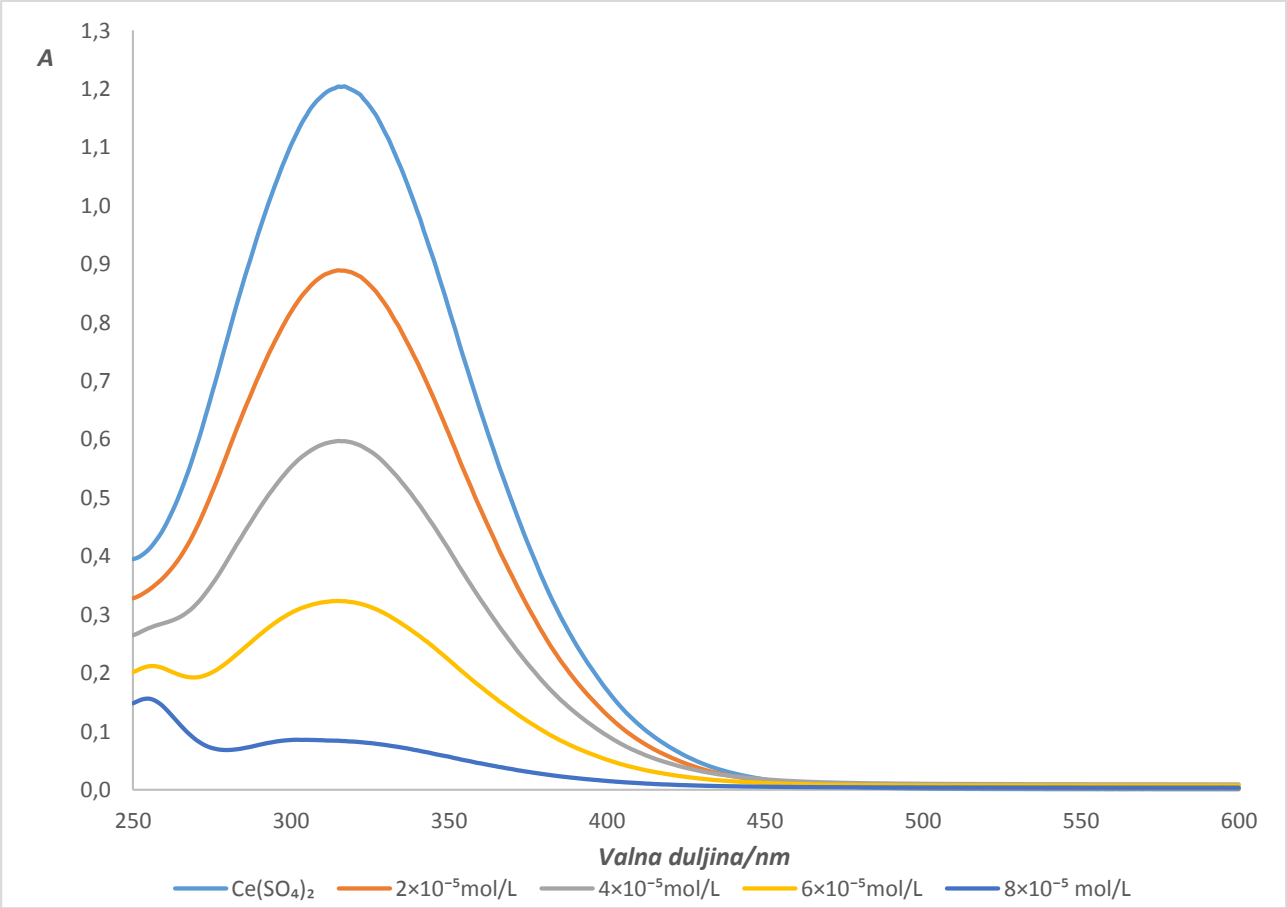


Slika 18. Usporedba FT-IR spektara $Ce(SO_4)_2$ x nH_2O (crveno) i $Ce(SO_4)_2$ (crno)

Prema slici 18. usporedbom FT-IR spektara prije i nakon sušenja vidljivo je da nema više istezanja hidoksidnih skupina u području s maksimumom na oko 3200 cm^{-1} i vode u području s maksimumom na oko 1000 cm^{-1}. Prema dobivenim rezultatima, prije svake sljedeće pripreme otopine Ce (IV) sulfata, $Ce(SO_4)_2 \times nH_2O$ je stavljen na sušenje na temperaturu od 150 °C kroz 24 sata.

6.2.1. Kalibracijski pravac i spektar apsorbancije askorbinske kiseline

Prvi antioksidans koji se određivao bila je askorbinska kiselina. Izmjereni podaci za askorbinsku kiselinu obrađeni su u programu Excel te su izmjereni spektri apsorbancije (slika 19.) za sve otopine istih oznaka kao u tablici 1.

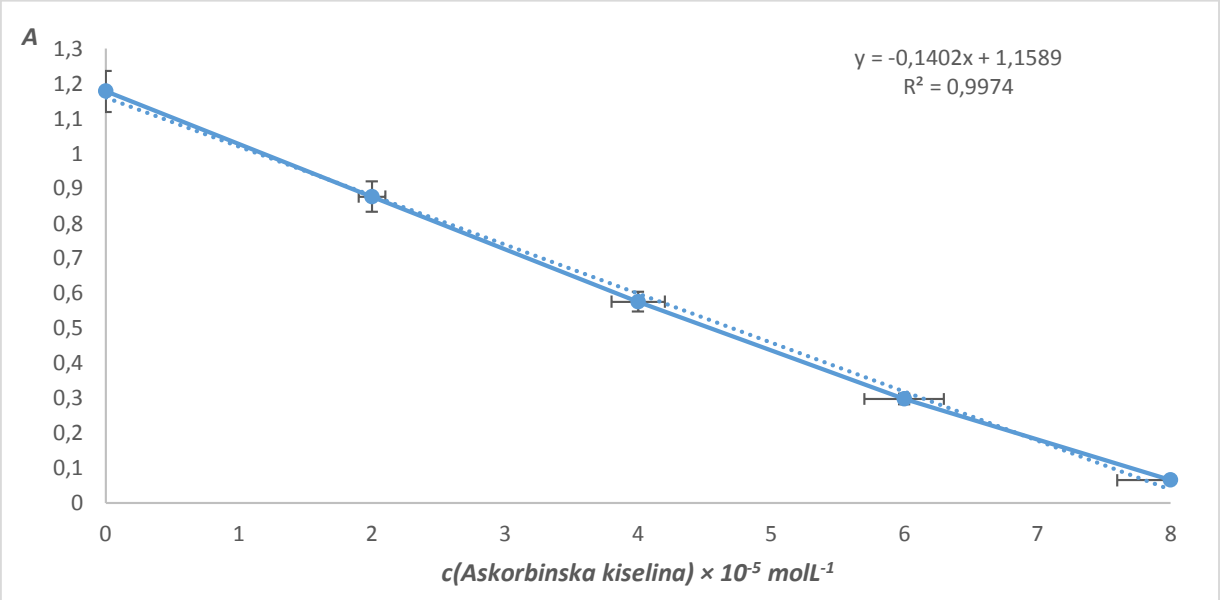


Slika 19. Spektri apsorbancije otopina Ce (IV)sulfata,natrijevog sulfata i askorbinske kiseline u rasponu koncentracija od 2×10^{-5} do 8×10^{-5} mol/L te vode

Očitane su apsorbancije na 320 nm za sva tri mjerenja te su upisani u tablicu 6. Izračunata je srednja vrijednost apsorbancije za pojedine koncentracije i standardna devijacija te je napravljen kalibracijski pravac (graf 1).

Tablica 6. Apsorbancija aksorbinske kiseline na 320 nm pri različitim koncentracijama

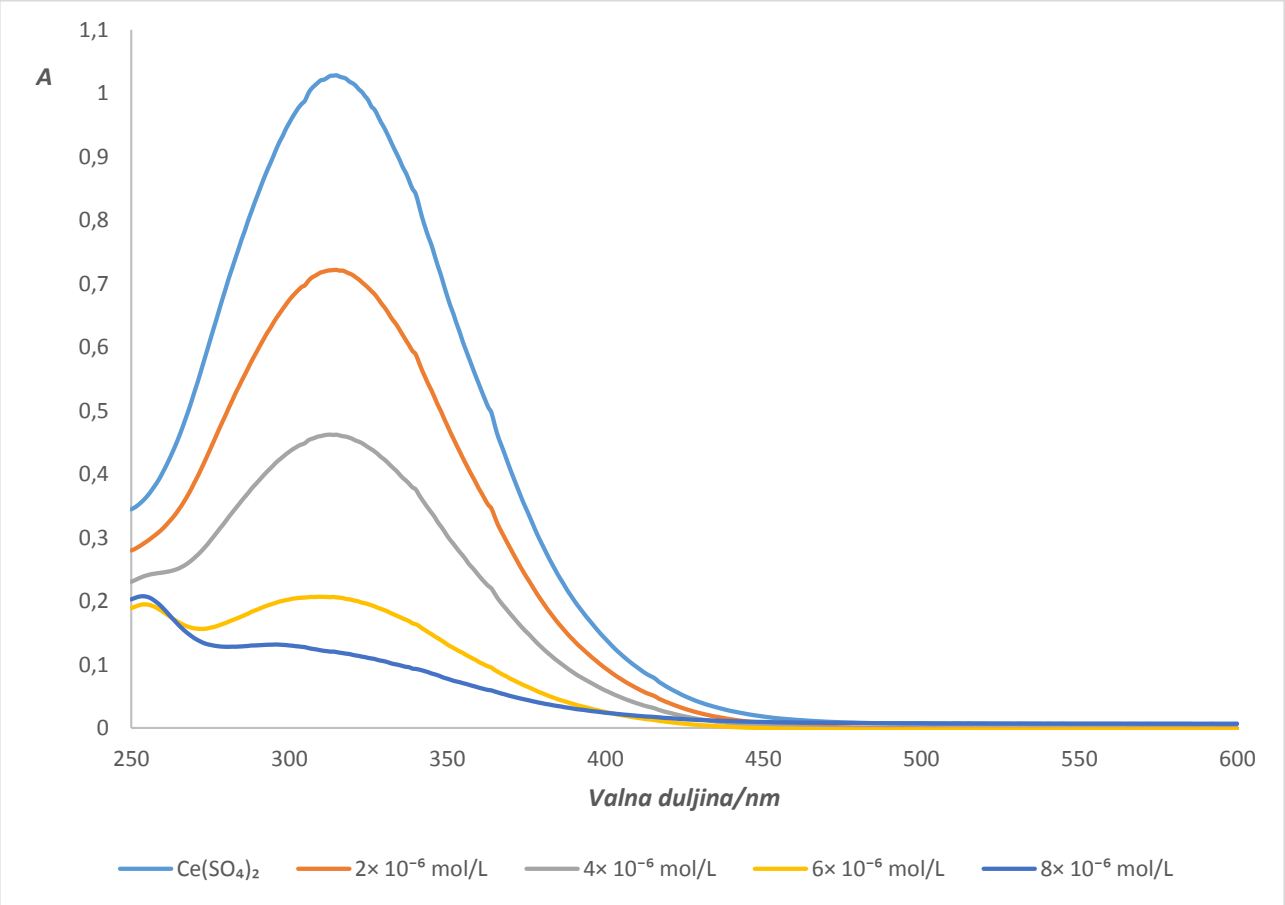
$c \times 10^{-5}$ mol/L	A (1.mjerenje)	A (2.mjerenje)	A (3.mjerenje)	$\bar{A}$	*Standardna devijacija*
0	1,1969	1,1584	1,1761	1,177133	0,015735
2	0,8835	0,8754	0,8695	0,876133	0,005739
4	0,5936	0,5596	0,5738	0,575667	0,013943
6	0,3187	0,2608	0,3118	0,2971	0,025822
8	0,0828	0,0457	0,0657	0,064733	0,015161



Graf 1. Kalibracijski pravac askorbinske kiseline

6.2.2. Kalibracijski pravac i spektar apsorbancije kvercetina

Drugi antioksidans koji se spektrofometrijski određivao bio je kvercetin. Napravljena su 3 mjerenja za otopine prikazane u tablici 2. Izmjereni podaci su obrađeni u Excelu te su izmjereni spektri apsorbancije (slika 20.) istih oznaka kao u tablici 2.

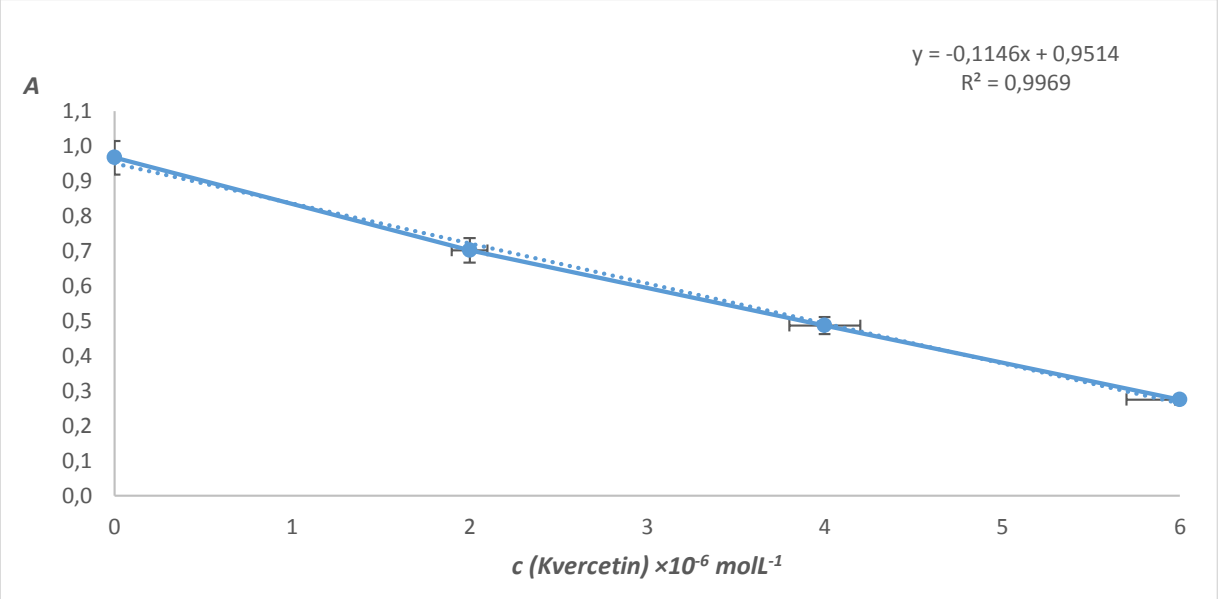


Slika 20. Spektri apsorbancije otopina Ce (IV)sulfata, natrijevog sulfata i kvercetina u rasponu koncentracija od 2×10^{-6} do 8×10^{-6} mol/L te vode

Očitane su apsorbancije na 320 nm za sva tri mjerenja te su upisane u tablicu 7. Prilikom računanja i izrade kalibracijskog pravca uočeno je da je pri mjerenju otopine $Ce(SO_4)_2$, Na_2SO_4, vode i kvercetina u najvećoj koncentraciji 8×10^{-6} mol/L došlo do slučajne pogreške te su dobiveni rezultati za tu otopinu zanemareni. Izračunata je srednja vrijednost apsorbancija za ostale koncentracije i standardna devijacija (tablica 7) te je napravljen kalibracijski pravac apsorbancije u ovisnosti o koncentraciji kvercetina u otopini (graf 2).

Tablica 7. Apsorbancija kvercetina na 320 nm pri različitim koncentracijama

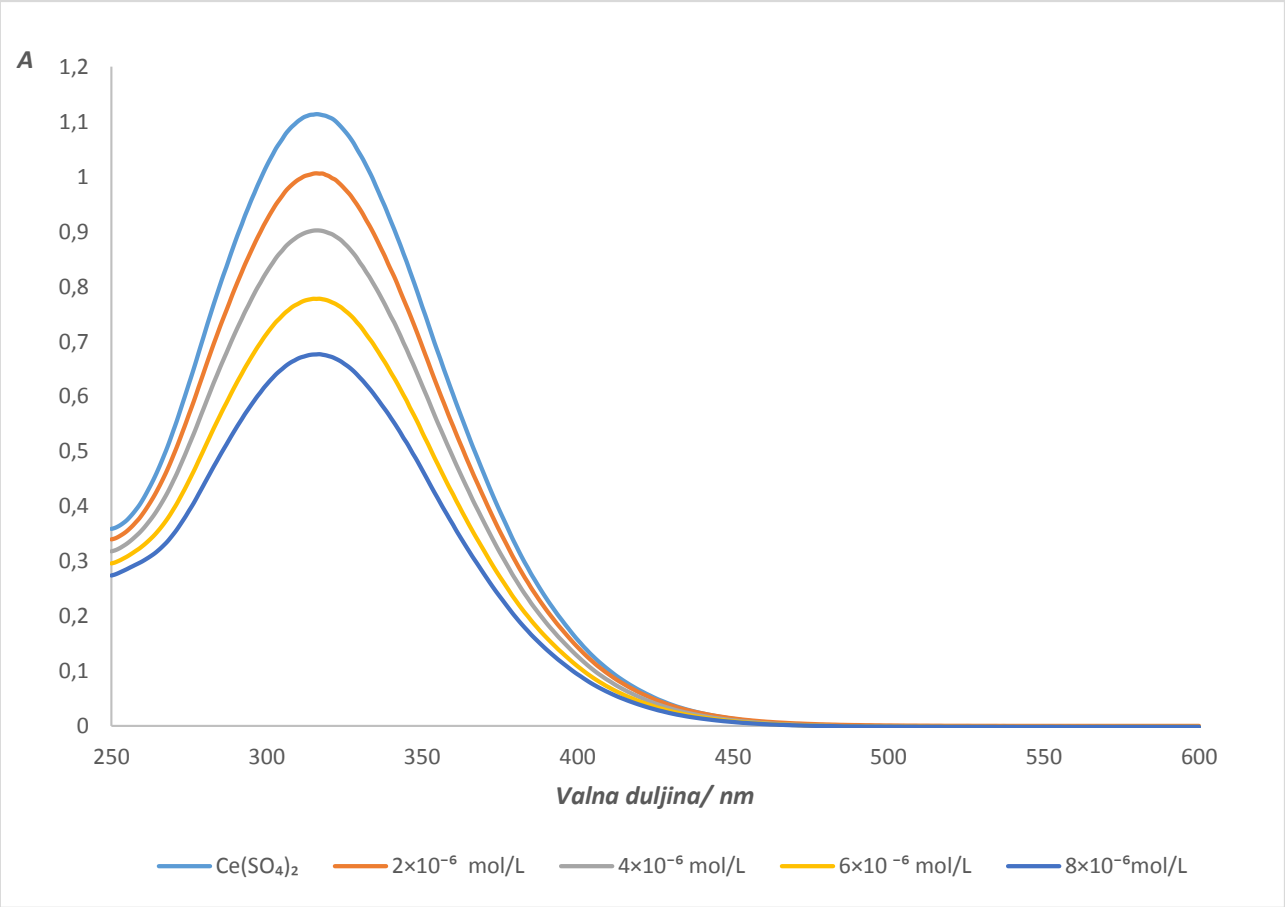
$c \times 10^{-6}$ mol/L	*A* (1.mjerenje)	*A* (2.mjerenje)	*A* (3.mjerenje)	$\bar{A}$	*Standardna devijacija*
0	0,9435	0,9984	0,9594	0,9671	0,023064692
2	0,7112	0,7136	0,6812	0,7020	0,014740421
4	0,5277	0,4551	0,4764	0,4864	0,030470642
6	0,325	0,2014	0,2986	0,2750	0,053147342



Graf 2. Kalibracijski pravac kvercetina

6.2.3. Kalibracijski pravac i spektar apsorbancije galne kiseline

Treći antioksidans bila je galna kiselina za koju su također bila napravljena 3 mjerenja i dobiveni podaci su obrađeni u Excelu te su izmjereni spektri apsorbancije (graf 5) za sve otopine istih oznaka kao u tablici 3.

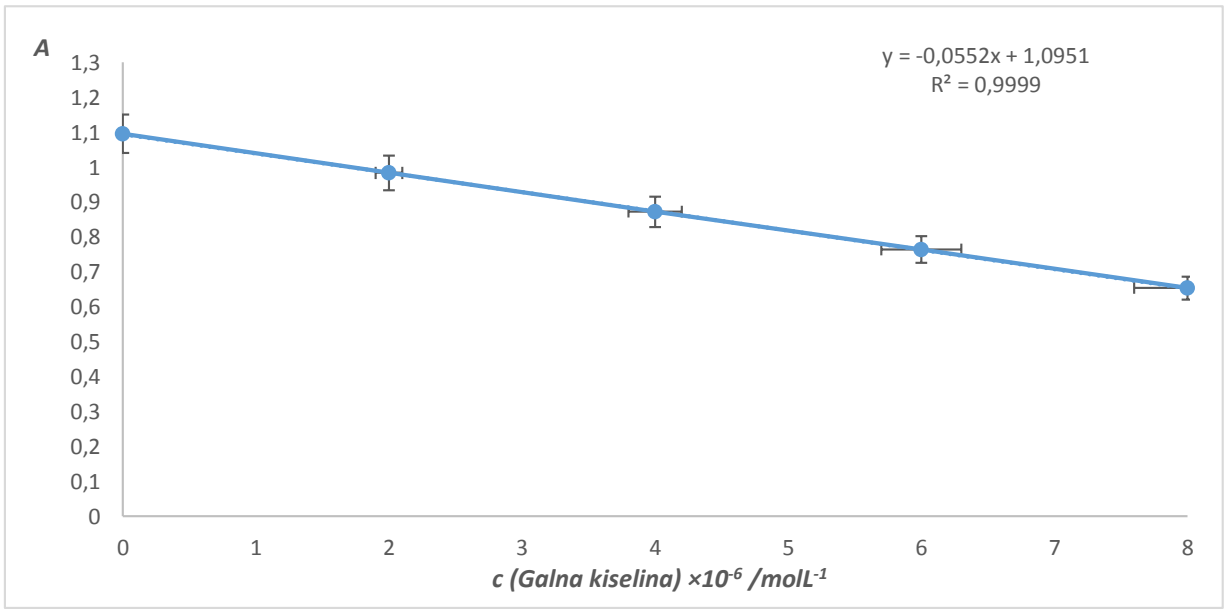


Slika 21. Spektri apsorbancije otopina Ce (IV)sulfata, natrijevog sulfata i galne kiseline u rasponu koncentracija od 2×10^{-6} do 8×10^{-6} mol/L te vode

Kao i kod prethodnih antioksidansa, očitane su apsorbancije na 320 nm za sva tri mjerenja te su upisane u tablicu 8. Izračunate su srednje vrijednosti apsorbancija za pojedine koncentracije i standardne devijacije te je napravljen kalibracijski pravac (graf 3).

Tablica 8. Apsorbancija galne kiseline na 320 nm pri različitim koncentracijama

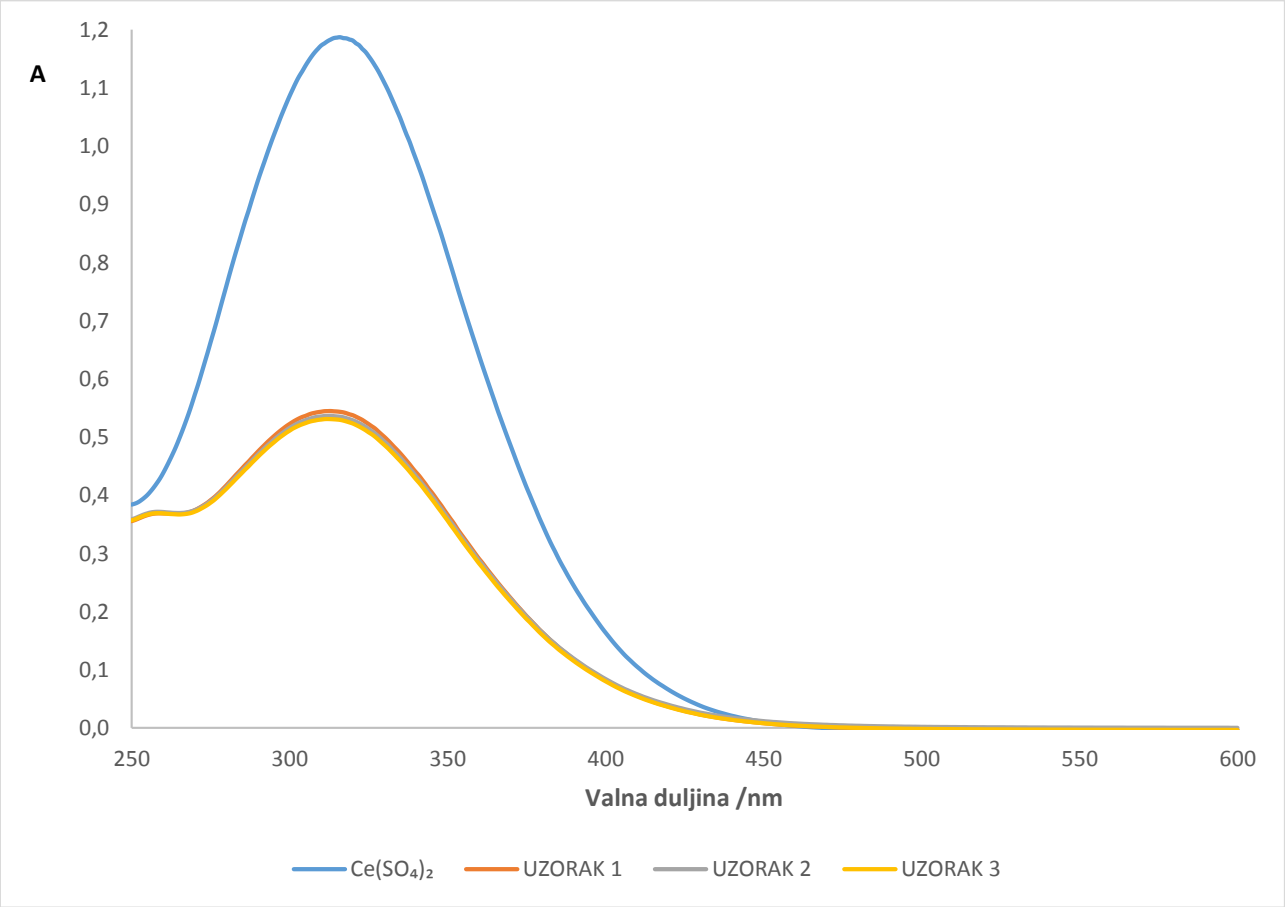
$c \times 10^{-6}$ mol/L	A (1.mjerenje)	A (2.mjerenje)	A (3.mjerenje)	$\bar{A}$	*Standardna devijacija*
0	1,108	1,1013	1,0802	1,0965	0,011846
2	1,0012	0,9986	0,9517	0,983833	0,022746
4	0,8971	0,8824	0,8386	0,8727	0,024848
6	0,7731	0,779	0,7415	0,764533	0,016464
8	0,6732	0,6506	0,6394	0,6544	0,014058



Graf 3. Kalibracijski pravac galne kiseline

6.3. Određivanje TAC-a tableta CERAC metodom

Prema opisanim postupcima pripreme i analize uzorka u poglavlju 5.6. izmjereni su podaci za 3 paralelna mjerenja te su obrađeni u Excelu i izmjereni su spektri apsorbancije za $Ce(SO_4)_2$ otopinu i uzorke označene kao u tablici 4.



Slika 22. Spektri apsorbancije otopine $Ce(SO_4)_2$ i uzoraka

Očitane su apsorbancije uzoraka na 320 nm za sva tri mjerenja te su upisane u tablicu 9. Izračunate su srednje vrijednosti apsorbancija za pojedine koncentracije i standardne devijacije.

Tablica 9. Apsorbancija uzoraka na 320 nm

A (1.mjerenje)	*A* (2.mjerenje)	*A* (3.mjerenje)	$\bar{A}$	*Standardna devijacija*
0,5370	0,5290	0,5232	0,5297	0,00566

6.4. Kalkulacija ekvivalenta kvercetina

Prema jednadžbi 22. pravca na grafu 4.:

$$y = -0{,}1146x + 0{,}9514 \quad (22)$$

i prosjeku apsorbancije uzorka (y) izračunatog u tablici 9., izračunata je koncentracija (x) ekvivalenta kvercetina:

$$0{,}5297 = -0{,}1146x + 0{,}9514 \quad (23).$$

$$x = 3{,}68$$

Prema jednadžbi 23 koncentracija ekvivalenta kvercetina iznosi $3{,}68\times10^{-6}$ mol/L te je moguće izračunati masu kvercetina u samom uzorku prema jednadžbi 24:

$$m\,(\text{kvercetin ekvivalent}) = n(\text{kvercetin ekvivalent}) \times M(\text{kvercetin}) \quad (24).$$

Množina tvari može se iskazati kao umnožak koncentracije i volumena te se tako može izračunati masa kvercetina prema jednadžbi 25:

$$m(\text{kvercetin ekvivalent}) = c(\text{kvercetin ekvivalent}) \times V(\text{otopine}) \times M(\text{kvercetin}) \quad (25).$$

$$m(\text{kvercetin ekvivalent}) = 3{,}68\times10^{-6}\ \text{mol/L} \times 0{,}01\ \text{L} \times 338{,}72\ \text{g/mol}$$

$$m(\text{kvercetin ekvivalent}) = 1{,}21\times10^{-5}\ \text{g}$$

Dobivena masa ekvivalenta kvercetina je podijeljena s masom tableta u otopini, koja je iznosila 0,008g, prema jednadžbi 26:

$$m(\text{kvercetin ekvivalent})/m\,(\text{uzorak}) = 1{,}21\times10^{-5}\ \text{g}/0{,}008\ \text{g} \quad (26)$$

te je dobiveni rezultat iznosio 0,00152 g kvercetina u 1 gramu tableta odnosno 1,52 mg kvercetina ekvivalenta u 1g tableta.

6.5. Kalkulacija ekvivalenta galne kiseline

Prema jednadžbi 27. pravca na grafu 6.:

$$y = -0{,}0552x + 1{,}0951 \quad (27)$$

i prosjeku apsorbancije uzorka (y) izračunatog u tablici 9., izračunata je koncentracija (x) ekvivalenta galne kiseline:

$$0{,}5297 = -0{,}0552x + 1{,}0951 \quad (28).$$

$$x = 10{,}24$$

Prema jednadžbi 29 koncentracija ekvivalenta galne kiseline iznosi $10{,}24\times10^{-6}$ mol/L te je moguće izračunati masu galne kiseline u samom uzorku prema jednadžbi 29:

$$m\,(\text{ekvivalent galne kis.}) = n(\text{ekvivalent galne kis.}) \times M\,(\text{galna kis.}) \quad (29).$$

Množina tvari može se iskazati kao umnožak koncentracije i volumena te se tako može izračunati masa ekvivalenta galne kiseline prema jednadžbi 30:

$$m\,(\text{ekvivalent galne kis.}) = c(\text{ekvivalent galne kis.})\times V(\text{otopine})\times M\,(\text{galna kis.}) \quad (30).$$

$$m(\text{ekvivalenta galne kiseline}) = 10{,}24\times10^{-6}\ \text{mol/L}\times 0{,}01\ \text{L}\times 170{,}12\ \text{g/mol}$$

$$m(\text{ekvivalenta galne kiseline}) = 1{,}7\times10^{-5}\ \text{g}$$

Dobivena masa ekvivalenta galne kiseline je podijeljena s masom tableta u otopini, koja je iznosila 0,008 g, prema jednadžbi 31:

$$m(\text{ekvivalenta galne kiseline})/m\,(\text{uzorak}) = 1{,}7\times10^{-5}\ \text{g}/0{,}008\ \text{g} \quad (31)$$

te je dobiveni rezultat iznosio 0,00217 g ekvivalenta galne kiseline u 1 gramu tableta odnosno 2,17 mg ekvivalenta galne kiseline u 1g tableta.

Proizvođač tableta od brašna sjemenki crnog grožđa je odredio totalni antioksidativni kapacitet uzorka Folin–Ciocalteu-ovim reagensom i iznosio je 1,5 mg/g ekvivalenta galne kiseline.

7. ZAKLJUČAK

CERAC je jednostavna, jeftina i brza metoda za određivanje TAC koja se lako primjenjuje u skromno opremljenim konvencionalnim laboratorijima. U ovom radu izvršena je optimalizacija CERAC metode za određivanje TAC-a u tabletama pripravljenih od brašna sjemenki crnog grožđa.

Po literaturnim podatcima glavni antioksidansi u uzorku su polifenoli s velikim udjelom kvercetina, galne kiseline i resveratrola. Istražana je reduktivna sposobnost u redukciji Ce (IV) standardnih antioksidanasa: askorbinske kiseline, galne kiseline i kvercetina. Određena je reduktivna sposobnost uzorka, iz kojeg je izračunat TAC uzorka i izražen u antioksidativnom kapacitetu ekvivalntnom antioksidativnom kapacitetu kvercetina i galne kiseline. TAC uzorka određen CERAC metodom pokazao je dobro podudaranje sa rezultatima TAC-a određenog Folin–Ciocalteu-ovim reagensom kao prihvaćenom metodom za određivanje TAC-a polifenolnih uzoraka.

LITERATURA

1. Vit, P., Rodrigez-Malaver, A., Rondon, C., Gonzalez, I., Di Bernardo, M., Garcia, M.: Bioactive indicators related to bioelements of eight unifloral honeys. Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutricion, 60 (2010) 405-410

2. Apak, R., Güçlü , K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu, B., Berker, K.I., Ozyurt, D., Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. Molecules, 19;12 (2007) 1496–1547

3. http://mediko.sveznadar.info/20Lijekovi/20Vitamini/Radikali.html (11.07.2019.)

4. Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S. & Robards, K., Methods for testing antioxidant activity. Analyst., 127 (2002), 183-198

5. Incalza, MA., D'Oria, R., Natalicchio, A., Perrini, S., Laviola, L., Giorgino, F., Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases, Vascul Pharmacol., 100 (2018) 1-19

6. https://bs.wikipedia.org/wiki/Vitamin_A (11.07.2019.)

7. https://hr.wikipedia.org/wiki/Vitamin_C (11.07.2019.)

8. https://s3.amazonaws.com/ww-article-cache-1/sl/Vitamin_E (11.07.2019.)

9. https://www.orthoknowledge.eu/coenzym-q10/ (20.07. 2019.)

10. https://newhealthcorp.com/coenzyme-q10-health-benefits-supplements-side-effects/ (11.07.2019.)

11. https://www.freelandtime.com/micoterapia/approfondimenti/i-flavonoidi.html (11.07.2019.)

12. Pisoschi, A. M., Negulescu, G. P., Methods for total antioxidant activity determination: A review, Biochem. & Anal. Biochem, 1 (2011) 1-10

13. Oštrić-Matijašević, B., Turkulov J: *Tehnologija ulja i masti*. Tehnološki fakultet, Novi Sad, 1980.

14. Puljak, A., Perko, G., Mihok, D., & Radašević, H. Antioksidansi i oligoelementi u starijih ljudi. Medix, 10;52 (2004) 98-102

15. https://www.123rf.com/photo_109162355_stock-vector-oxidative-stress-diagram-free-radicals-attacking-cell-vector-illustration-flat-design.html (18.07.2019.)

16. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J., Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int. J. Biochem. Cell B.*, 39 (2007) 44-84

17. Lee, J., Koo, N., Min, D. B.: Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3 (2004) 21-32

18. https://www.vasezdravlje.com/hrana-i-zdravlje/antioksidansi-u-prehrani-i-zdravlju (1.8.2019.)

19. Qu, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Deemer, E.K., Analysisof antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. J Agric Food Chem., 50;11 (2002) 3122-3128

20. Flanjak I: Antioksidativni kapacitet meda i promjene tijekom procesiranja i skladištenja. Doktorski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2012.

21. Ozyurt, D., Demirata, B., Apak, R. Modified cerium(IV)-based antioxidant capacity (CERAC) assay with selectivity over citric acid and simple sugars, Subtrop Plant Sci., 23 (2010) 282–288

22. https://www.conrad.hr/Analiti%E8ka-vaga-Kern-podru%E8je-mjerenja-%28maks.%29-220-g-o%E8itljivost-0.0001-g-strujno-napajanje,-vi%B9ebojna.htm?websale8=conrad-hr&pi=1551800 (18.07.2019.)

23. https://www.ssi.shimadzu.com/products/uv-vis-spectrophotometers/uv-1900.html (18. 07.2019.)

24. https://www.labx.com/item/shimadzu-8400s-ftir-400-to-4-000/4259290 (20.07.2019.)

25. https://sestar.irb.hr/instrumenti_show.php?ID=1196 (20.07.2019.)

26. https://www.geass.com/strumenti-vari-da-laboratorio/centrifughe/ (20.07.2019.)

27. https://docplayer.gr/90811648-Laboratorijska-oprema.html (20.07.2019.)

28. Kniewald, Z., Vitamini i hormoni: proizvodnja i primjena, Hrvatska sveučilišna naklada, Zagreb, 1993.

29. Ozyurt, D., Demirata, B., Apak, R., Determination of total antioxidant capacity by a new spectrophotometric method based on Ce(IV) reducing capacity measurement. Talanta 71 (2007) 1155–1165

30. Yang, B., Kotani, A., Aral, K., Kusu, F., Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials. Anal Sci, 17(2001), 599–604

31. Apak, R., Güçlü , K.Özyürek, M., Karademir, S.E., A Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols, vitamins C and E, using their cupric ionreducing capability in the presence of neocuproine: CUPRACmethod. J Agric Food Chem. 52 (2004) 7970–7981

32. Apak, R., Güçlü , K.Özyürek, M., M., Karademir, S.E., Altun, M., Total antioxidantcapacity assay of human serum using copper(II)-neocuproine as chromogenic oxidant: The CUPRAC method. Free Radic Res., 39 (2005) 949–961

33. Benzie, I.F.F., Szeto, Y.T., Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. J Agric Food Chem, 47 (1999) 633–636

34. Llesuy, S., Evelson, P., Campos, A.M., Lissi, E., Methodologies for evaluation of total antioxidant activities in complex mixtures: a critical review. Biol Res., 34 (2001) 51–73

35.Magalha˜es, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L.F.C., Automatic method for determination of total antioxidant capacity using 2.2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay. Analytica Chimica Acta 558 (2006) 310–318

36. Miller, N.J., Rice-Evans, C.A., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A., A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Clin Sci 84 (1993) 407–412

37. Prior, R.L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., Jacob, R., Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC)) of plasma and other biological and food samples. J Agric Food Chem, 51 (2003) 3273–3279

38. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med., 26 (1999) 1231–1237

39. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic Biol Med., 20 (1996) 933–956

40. Colucci, J., Montalvo, V., Hernandez, R., Poullet, C., Electrochemical oxidation potential of photocatalyst reducing agents. Electrochim. Acta., 44 (1999) 2507–2514.

41. Czappa, D.J., The Role of Acid in the Cerium(IV) Oxidation of Carbohydrates. PhD Thesis, The Institute of Paper Chemistry, Appleton, Wisconsin. 1974.

42. Blasco, A.J., Crevillen, A.G., Gonzalez, M.C., Escarpa, A., Direct electrochemical sensing and detection of natural antioxidants and antioxidant capacity in vitro systems. Electroanalysis 19 (2007) 2275–2286