Antioksidacijska aktivnost fenola: interakcija derivata hidroksicimetne kiseline

Vrdoljak, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:031184

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

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

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

ANTOIKSIDACIJSKA AKTIVNOST FENOLA: INTERAKCIJA DERIVATA HIDROKSICIMETNE KISELINE

ZAVRŠNI RAD

LUCIJA VRDOLJAK

Matični broj: 1451

Split, rujan 2017.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

STRUČNI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE

SMJER: PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

ANTOIKSIDACIJSKA AKTIVNOST FENOLA: INTERAKCIJA DERIVATA HIDROKSICIMETNE KISELINE

ZAVRŠNI RAD

LUCIJA VRDOLJAK

Matični broj: 1451

Split, rujan 2017.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

PROFFESIONAL STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

COURSE: FOOD TECHNOLOGY

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PHENOLICS: INTERACTION BETWEEN HYDROXYCINNAMIC ACID DERIVATIVES

BACHELOR THESIS

LUCIJA VRDOLJAK

Parent number: 1451

Split, September 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Tema rada je prihvaćena na 21. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta
Mentor: Dr. sc. Danijela Skroza, znan. sur.
Pomoć pri izradi: Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić

ANTOIKSIDACIJSKA AKTIVNOST FENOLA: INTERAKCIJA DERIVATA HIDROKSICIMETNE KISELINE

Lucija Vrdoljak, 1451

Sažetak:
Danas se fenoli, sve češće, smatraju možda najkorisnijim fitokemikalijama u hrani zahvaljujući izuzetno dobroj antioksidacijskoj aktivnosti. Pozitivni antioksidacijski učinci pojedinih fenolnih spojeva su dobro istraženi i razlike u njihovoj aktivnosti pripisivale su se razlikama u kemijskoj građi molekula.
Cilj ovog rada bio je odrediti antioksidacijsku aktivnost odabranih fenolnih kiselina iz podgrupe derivata cimetne kiseline (*p*-kumarinska, ferulinska, sinapinska, kava i ružmarinska kiselina), kao i njihovih ekvimolarnih smjesa dvije ili više kiselina, metodom određivanja redukcijske snage uzorka (engl. *Ferric Reducing/Antioxidant Power*, FRAP). U radu je također ispitano moguće interakcijsko (sinergijsko/ aditivno/ antagonističko) djelovanje između odabranih fenolnih kiselina.
Rezultati ovog istraživanja potvrđuju razlike u antioksidacijskoj aktivnosti između odabranih fenolnih kiselina, kao i njihovih ekvimolarnih smjesa. Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti da je najbolju antioksidacijsku aktivnost među testiranim derivatima hidroksicimetnih kiselina pokazala kava kiselina i njen ester ružmarinska kiselina, a najslabiju *p*-kumarinska kiselina. Najbolji i najjači sinergijski učinak potvrđen je pri najnižoj testiranoj koncentraciji smjese, dok je najveći broj smjesa pokazao sinergijski učinak pri najvećoj testiranoj koncentraciji.

Ključne riječi: fenolne kiseline, antioksidacijska aktivnost, FRAP, sinergija

Rad sadrži: 35 stranice, 9 slika, 10 tablica, 33 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Franko Burčul, znan. sur.
2. Dr. sc. Danijela Skroza, znan. sur.
3. Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić, viši znan. sur.

Datum obrane:

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

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

Scientific area:	Biotechnical sciences
Scientific field:	Food Technology
Thesis subject	was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session No. 21.
Mentor:	Ph. D. Danijela Skroza
Technical assistance:	Ph. D. Ivana Generalić Mekinić, Assistant Professor

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PHENOLICS: INTERACTION BETWEEN HYDROXYCINNAMIC ACID DERIVATIVES

Lucija Vrdoljak, 1451

Abstract:
Today phenols are increasingly considered to be the most useful phytochemicals in the food due to the extremely good antioxidant activity. Positive antioxidant effects of certain phenolic compounds are well explored and the differences in their activity were ascribed to the differences in their chemical structures. The aim of this study was to determine the antioxidant activity of the selected phenolic acids from the subgroup of cinnamic acid derivatives (*p*-coumariç, ferulic, synapic, caffeic and rosemarinic acid), as well as their equimolar mixtures with two or more acids, using the method of determining the reduction power of the sample (Ferric Reducing / Antioxidant Power, FRAP). A possible interaction (synergistic / additive / antagonistic) effects between the tested phenolic acids were also investigated. The results of this study confirm the differences in antioxidant activity between the tested phenolic acids as well as their equimolar mixtures. Based on the obtained results, it can be concluded that the caffeic acid along with its esther rosmarinic acid showed the best antioxidant activity among the selected cinnamic acid derivatives tested while *p*-coumaric acid showed the weakest activity. The best and strongest synergistic effect was confirmed at the lowest concentrations of the mixtures tested, while the highest number of mixtures showed a synergistic effect at the highest concentrations tested.

Keywords: phenolic acids, antioxidant activity, FRAP, synergy

Thesis contains: 35 pages, 9 figures, 10 tables, 33 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Ph. D. Franko Burčul, Assistant Professor
2. Ph. D. Ivana Generalić Mekinić, Assistant Professor
3. Ph. D. Danijela Skroza

Defence date:

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

Završni rad je izrađen u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom dr. sc. Danijele Skroza,znan. sur. u razdoblju od svibnja do rujna 2017. godine.

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

ZAHVALA

Veliko hvala mojoj mentorici dr. sc. Danijeli Skrozi na svim idejama, savjetima i pomoći koje je pružila tokom izrade ovog rada. Zahvaljujem se i doc. dr. sc. Ivani Generalić Mekinić koja mi je pomogla prilikom rada.

Hvala i svim prijateljima i prijateljicama, koji su uvijek bili uz mene. Posebno hvala ide mojoj obitelji koja je bila podrška u svakom trenutku i na svaki mogući način.

I na kraju, najveća zasluga za ono što sam postigla pripisujem svojim roditeljima, koji su uvijek bili tu, uz mene, bez obzira da li se radi o teškim ili sretnim trenutcima i bez kojih sve ovo što sam dosad postigla ne bi bilo moguće.

Veliko HVALA svima!

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak ovog završnog rada bio je:

- Pripraviti otopine odabranih fenolnih kiselina iz podgrupe derivata cimetne kiseline (*p*-kumarinska, ferulinska, sinapinska, kafeinska i ružmarinska kiselina) i ekvimolarnih smjesa dviju ili više fenolnih kiselina.

- Odrediti antioksidacijsku aktivnost odabranih fenolnih kiselina i njihovih ekvimolarnih fenolnih smjesa metodom određivanja redukcijske snage uzorka (engl. *Ferric Reducing/ Antioxidant Power*, FRAP)

- Ispitati moguće interakcijsko (sinergijsko/ aditivno/ antagonističko) djelovanje između testiranih fenolnih kiselina.

SAŽETAK

Danas se fenoli sve češće smatraju možda najkorisnijim fitokemikalijama u hrani zahvaljujući izuzetno dobroj antioksidacijskoj aktivnosti. Pozitivni antioksidacijski učinci pojedinih fenolnih spojeva su dobro istraženi i razlike u njihovoj aktivnosti prepisivale su se razlikama u kemijskoj građi molekula.

Cilj ovog rada bio je odrediti antioksidacijsku aktivnost odabranih fenolnih kiselina iz podgrupe derivata cimetne kiseline (*p*-kumarinska, ferulinska, sinapinska, kava i ružmarinska kiselina), kao i njihovih ekvimolarnih fenolnih smjesa dvije ili više kiselina, metodom određivanja redukcijske snage uzorka (engl. Ferric Reducing/Antioxidant Power, FRAP). U radu je također ispitano moguće interakcijsko (sinergijsko/ aditivno/ antagonističko) djelovanje između testiranih fenolnih kiselina.

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju razlike u antioksidacijskoj aktivnosti između testiranih fenolnih kiselina, kao i njihovih ekvimolarnih smjesa. Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti da je najbolju antioksidacijsku aktivnost među testiranim derivatima hidroksicimetnih kiselina pokazala kava kiselina i njen ester ružmarinska kiselina, a najslabiju *p*-kumarinska kiselina. Najbolji i najjači sinergijski učinak potvrđen je pri najnižoj testiranoj koncentraciji smjese, dok je najveći broj smjesa pokazao sinergijski učinak pri najvećoj testiranoj koncentraciji.

Ključne riječi: fenolne kiseline, antioksidacijska aktivnost, FRAP, sinergija

SUMMARY

Today phenols are increasingly considered to be the most useful phytochemicals in the food due to the extremely good antioxidant activity. Positive antioxidant effects of certain phenolic compounds are well explored and the differences in their activity were ascribed to the differences in their chemical structures.

The aim of this study was to determine the antioxidant activity of the selected phenolic acids from the subgroup of cinnamic acid derivatives (*p*-coumariç, ferulic, synapic, caffeic and rosemarinic acid), as well as their equimolar mixtures with two or more acids, using the method of determining the reduction power of the sample (Ferric Reducing / Antioxidant Power, FRAP). A possible interaction (synergistic / additive / antagonistic) effects between the tested phenolic acids were also investigated.

The results of this study confirm the differences in antioxidant activity between the tested phenolic acids as well as their equimolar mixtures. Based on the obtained results, it can be concluded that the caffeic acid along with its esther rosmarinic acid showed the best antioxidant activity among the selected cinnamic acid derivatives tested while *p*-coumaric acid showed the weakest activity. The best and strongest synergistic effect was confirmed at the lowest concentrations of the mixtures tested, while the highest number of mixtures showed a synergistic effect at the highest concentrations tested.

Keywords: phenolic acids, antioxidant activity, FRAP, synergy

SADRŽAJ

UVOD 1

1. OPĆI DIO.....3

1.1. Fenolni spojevi.....3

1.1.1. Fenolne kiseline.....4

1.1.1.1. Derivati hidroksicimetne kiseline.....5

1.1.2. Svojstva fenola i fenolnih kiselina.....7

1.2. Antioksidansi i slobodni radikali.....8

1.3. Interakcija fenola.....10

2. EKSPERIMENTALNI DIO.....11

2.1.1.Kemikalije.....11

2.1.1.1. Odabrani fenolni spojevi.....11

2.1.1.2. Kemikalije korištene za određivanje antioksidacijskih svojstava....12

2.2. Priprava fenolnih otopina.....12

2.2.1. Priprava otopina fenolnih kiselina i ekvimolarnih smjesa.....12

2.3. Metode određivanja antioksidacijskih svojstava.....14

2.3.1. FRAP metoda.....14

2.4. Interakcijsko djelovanje fenolnih spojeva.....16

2.4.1. Određivanje interakcijskog djelovanja.....16

3. REZULTATI.....17

3.1. Rezultati antioksidacijske aktivnosti derivata hidroksicimetne kiseline određene metodom FRAP.....17

3.2. Rezultati određivanja antioksidacijskih svojstava smjesa fenolnih kiselina određene metodom FRAP 19

3.3. Rezultati određivanja interakcijskog djelovanja fenolnih smjesa 25

4. RASPRAVA.....28

5. ZAKLJUČAK.....32

6. LITERATURA.....33

UVOD

Pojam "fitokemikalije" danas sve češće susrećemo u svakodnevnom životu. Nakon otkrića vitamina početkom prošlog stoljeća, danas se sve više pažnje pridaje nenutritivnim tvarima, fitokemikalijama, iz namirnica biljnog podrijetla. Ovi biološki aktivni spojevi se prirodno nalaze u biljkama, a odgovorni su za njihova organoleptička svojstva. Osim što voću i povrću daju boju, u ljudskom organizmu igraju nezamjenjivu ulogu što potvrđuju različite znanstvene studije koje su dokazale njihove brojne povoljne učinke na ljudsko zdravlje.

Do danas je identificirano na tisuće različitih fitokemikalija u različitim biljkama, a njihovo otkrivanje i istraživanje se i dalje nastavlja obzirom na bogatstvo i raznolikost biljnog svijeta. Fitokemikalije se mogu podijeliti na: karotenoide, fenole, alkaloide i spojeve koji sadrže dušik.[1] Iako se često spominju kao sekundarni produkti metabolizma biljaka, zahvaljujući izuzetno dobroj antioksidacijskoj aktivnosti, fenoli se danas sve češće smatraju najkorisnijim fitokemikalijama u hrani. Biljke ove spojeve prvenstveno proizvode i koriste u zaštiti ili obrani od bolesti, mikroorganizama ili okolišnih uvjeta, a brojni znanstvenici nastoje identificirati i objasniti moguće koristi tih istih spojeva, na ljudsko zdravlje, što je već odavno poznato u tradicionalnoj medicini.

Ono što fenole čini tako zanimljivima jesu njihovi mnogobrojni i različiti mehanizmi djelovanja u obrani od raznih oboljenja, a lista tih mehanizama svakim se danom povećava zahvaljujući novim otkrićima. Brojna ispitivanja su pokazala da fenoli imaju brojne pozitivne učinke,između kojih se ističu antimutageno, antiviralno, antibakterijsko[2], antialergijsko, antikancerogeno i druga djelovanja. [3]

Pozitivni antioksidacijski učinci pojedinih fenolnih spojeva su dobro istraženi i razlike u njihovoj aktivnosti prepisuju su se razlikama u kemijskoj građi molekula. Ispitivanja fenolnog profila biljnih ekstrakata ili samog biljnog materijala uglavnom bi izdvajala dominatni fenolni spoj kao glavnu komponentu zaslužnu za dobro antioksidacijsko svojstvo cijelog ekstrakta ili biljnog materijala.

Međutim, važno je istaknuti da se fenolni spojevi u biljkama ne pojavljuju kao individualni spojevi, već u smjesama. Iz tog razloga je važno poznavati djelovanje smjese fenola, a ne samo jednog dominantnog spoja.

Iako pojedini znanstvenici ukazuju na postojanje interakcijskog djelovanja između fenolnih spojeva u biljnim ekstraktima, vrlo je malo saznanja i dokaza o navedenoj teoriji. Na osnovu navedenog, u ovom radu se istraživala redukcijska snaga (korištenjem metode FRAP) odabranih fenolnih kiselina iz podgrupe derivata hidroksicimetne kiseline i njihovih ekvimolarnih smjesa.

1. OPĆI DIO

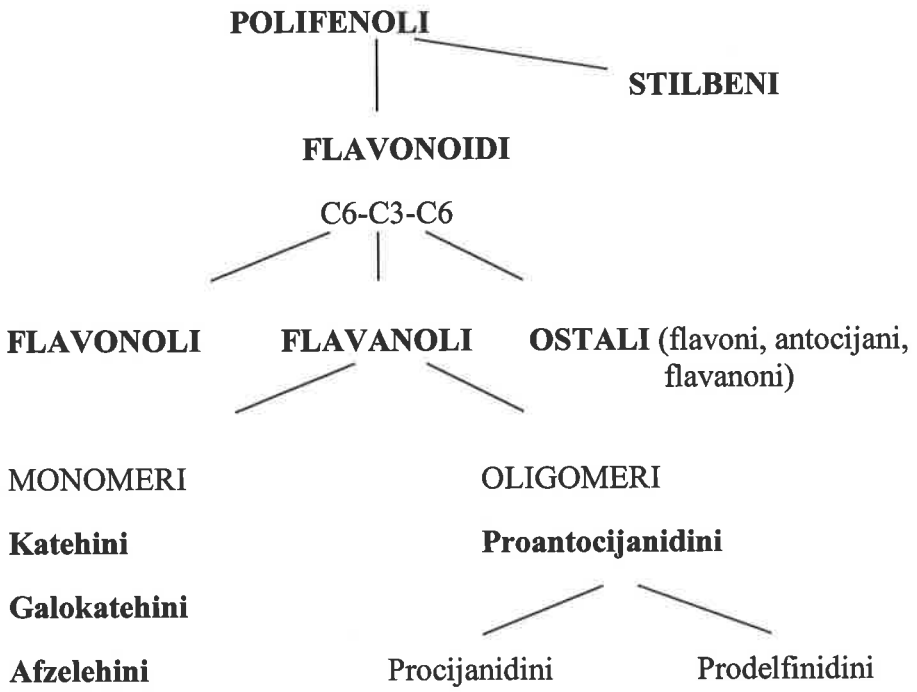
1. 1. Fenolni spojevi

Jednu od najbrojnijih i najraširenijih grupa spojeva u biljnom svijetu čine fenolni spojevi. Iako se fenolni spojevi, s kemijskog stajališta, uglavnom definiraju kao spojevi s fenolnim prstenom, na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina, oni su zapravo veoma raznolika skupina sekundarnih metabolita u koje ubrajamo jednostavne spojeve poput fenolnih kiselina, stilbena, polifenola, ali i velike polimerizirane spojeve kao što su kondezirani tanini.[4]

Jedna od najčešćih i najjednostavnija podjela fenolnih spojeva, koja se temelji na broju aromatskih jezgri u fenolnoj molekuli, jest podjela na ***monofenole*** (npr. fenolne kiseline i njihovi derivati, fenolni alkoholi itd.) i ***polifenole*** (npr. flavonoidi, stilbeni).[5, 6]

Monofenoli su spojevi koji imaju jedan benzenski prsten na koji je vezana najmanje jedna hidroksilna (–OH) skupina, dok polifenoli sadrže veći broj benzenskih prstena unutar jedne molekule.[5] Osim po svojoj kemijskoj strukturi razlikuju se i po kemijskim svojstvima.

Polifenoli su jedna od najbrojnijih skupina fenola, a s kemijskog stajališta možemo ih definirati kao spojeve koji sadrže veći broj fenolnih skupina unutar jedne molekule. U polifenole ubrajamo najistraživaniju podgrupu fenolnih spojeva *flavonoide* i ***stilbene***. Iako se dug niz godina istraživači bave strukturom i svojstvima flavonoida, posljednjih godina sve više pažnje se posvećuje stilbenima. Do danas je poznato preko 5000 različitih flavonoida, a obzirom na razlike u kemijskoj građi molekula dijele se na: flavone, flavonole, flavan-3-ole i antocijane (slika 1).[7]

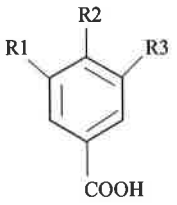


Slika 1. Podjela polifenola.[8]

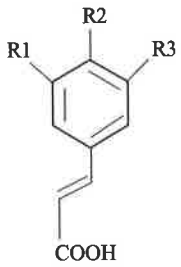
1.1.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su veoma česti spojevi u prirodi, a mogu se naći u različitim vrstama voća i različitim biljkama, te u različitim dijelovima biljka. Obično se dijele u dvije glavne skupine: ***derivati hidroksibenzojeve kiseline*** (C_6-C_1) i ***derivati hidroksicimetne kiseline*** (C_6-C_3). Osnovna razlika između ove dvije skupine je u položaju karboksilne grupe u odnosu na aromatsku jezgru (slika 2), dok se ostale razlike između pojedinih kiselina očituju se kroz stupanj hidroksilacije i/ili metoksilacije aromatskog prstena. Uglavnom su vezane za antocijane, šećere ili neke druge spojeve, a nalazimo ih i kao sastavni dio tanina.[5, 9]

(a)



(b)



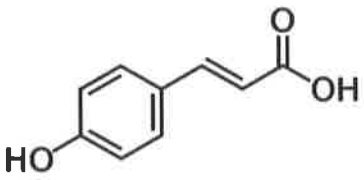
Slika 2. Osnovne kemijske strukture derivata benzojeve kiseline (a) derivata cimetne kiseline (b).[10]

U skupinu derivata hidroksibenzojeve kiseline ubrajamo: vanilinsku, siriginsku, galnu, protokatehinsku, *m*-hidroksibenzojevu, *p*-hidroksibenzojevu i gentisinsku kiselinu. Oni su obično prisutni u vezanom obliku i tipično su sastavni dio složenih struktura poput lignina i hidroliziranih tanina. [9]

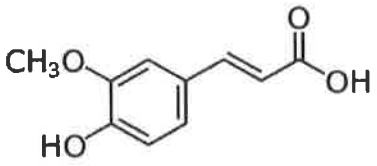
U derivate hidroksicimetne kiseline ubrajamo: *p*-kumarinsku, ferulinsku, sinapinsku i kava kiselinu. I ove kiseline su uglavnom prisutne u vezanom obliku, obično povezane sa strukturnim komponentama stanične stjenke, kao što su celuloza, lignin i proteini esterskim vezama.[11]

1.1.1.1. Derivati hidroksicimetne kiseline

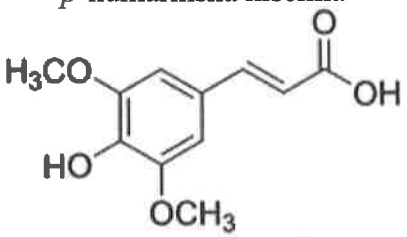
Hidroksicimetne kiseline i njihovi derivati (Slika 3.) značajna su skupina fenolnih spojeva prisutnih u voću. U prirodi rijetko dolaze u slobodnom obliku i uglavnom ih nalazimo u različitim konjugiranim oblicima te kao estere.[10]



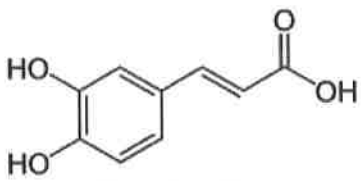
p-kumarinska kiselina



Ferulinska kiselina



Sinapinska kiselina

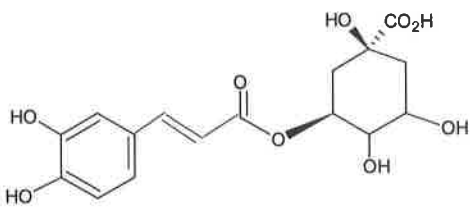


Kava kiselina

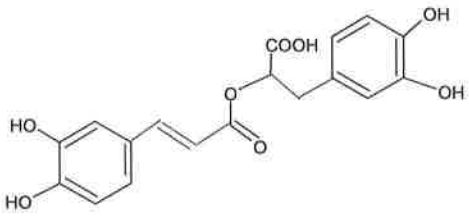
Slika3. Kemijske strukture predstavnika derivata cimetne kiseline.[12, 13, 14, 15]

Kava, ferulinska i *p*-kumarinska kiselina, uz još nekoliko predstavnika derivata benzojeve kiseline, prisutne su gotovo u svim biljkama.[6, 9] Od njih, u voću je najčešće prisutna kava kiselina, koja čini >75% udjela svih hidroksicimetnih kiselina nađenih u šljivama, jabukama, breskvama, borovnicama i rajčici.[10, 16]

Najzastupljenija u prirodi, među cimetnim kiselinama, je klorogenska kiselina (slika 4), ester kava kiseline.[6, 9] Drugi dobro poznati ester kava kiseline prisutan u brojnim biljnim vrstama je ružmarinska kiselina (slika 4).[17]



a)



b)

Slika 4. Strukture **a)** klorogenske i **b)** ružmarinske kiseline.[10]

1.1.2. Svojstva fenola i fenolnih kiselina

Fenolni spojevi su najvažniji u vodi topivi antioksidansi prisutni u biljkama i u hrani. Zahvaljujući svojoj specifičnoj građi. Ova grupa sekundarnih aromatskih metabolita posjeduje višestruko biološko djelovanje kao što je antioksidativna aktivnost i antimikrobna aktivnost.[2, 10, 18]

Fenolni spojevi mogu djelovati na različite načine[19], no najčešće djeluju kao ***kelatori metala*** (poput željeza i bakra) koji mogu spriječiti njihovo sudjelovanje u Fentonovim reakcijama i na taj način mogu generirati visoke koncentracije hidroksilnih radikala. Osim toga fenoli mogu ***razbijati lančane reakcije*** koje pokreću slobodni radikali, te ***usporiti ili ubrzati enzimsku aktivnost.*** Za sve ove aktivnosti i svojstva fenolnih spojeva zaslužna je njihova specifična kemijska građa, te broj i razmještaj raznih supstituenata u osnovnoj strukturi molekule. Najvažniji način djelovanja fenola kao antioksidansa je hvatanje slobodnih radikala prilikom čega dolazi do prekida lančanih reakcija slobodnih radikala.[2, 19]

Biološka aktivnost fenolnih kiselina ovisi o broju i položaju hidroksilnih skupina u molekuli.[2, 20] Upravo zbog hidroksilnih skupina i zbog nezasićenih dvostrukih veza, ove molekule su osjetljive su na oksidaciju, što ih čini dobrim antioksidansima. Antioksidacijska aktivnost fenolnih kiselina povećava se sa stupnjem hidroksilacije aromatskog fenilnog prstena, pa tako npr. derivati hidroksibenzojeve kiseline s hidroksilnim skupinama u *orto*- ili *para*-položaju u odnosu na karboksilnu skupinu, ne pokazuju antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s *meta*-hidroksibenzojevim kiselinama koje pokazuju. Također treba istaknuti i slučaj kada supstitucija na položajima 3,4,5 koja je prisutna kod galne kiseline rezultira visokom antioksidacijskom aktivnošću.[20]

Zahvaljujući dobrim antioksidacijskim i drugim svojstvima, fenolne kiseline imaju ključnu ulogu u prevenciji i/ili nastanku raznih oboljenja uzrokovanih djelovanjem slobodnih radikala (kardiovaskularne i respiratorne bolesti,dermatološka oboljenja i bolesti probavnog sustava).[2]

1.2. Antioksidansi i slobodni radikali

Kao i fitokemikalije, antioksidansi su sastojci koje nalazimo u hrani, ali za razliku od fitokemikalija nisu ograničeni samo na biljne namirnice. Izraz *antioksidans* opisuje tvari ili nutrijente u našoj hrani koji pomažu tijelu u oslobađanju od slobodnih radikala, a time sprječavaju i popravljaju štetu koju oni nanose.

Antioksidansi su molekule koje mogu donirati jedan elektron ili vodikov atom nekom reaktivnom, slobodnom radikalu. S ovom sposobnošću ovi spojevi neutraliziraju slobodne radikale i na taj način štite ljudski organizam, ali i usporavaju kvarenje hrane bogate lipidima koji su skloni procesima oksidacije.[2, 21]

Slobodni radikali su kemijski spojevi s jednim ili više nesparenih elektrona u vanjskoj elektronskoj ljusci i imaju vrlo veliku kemijsku reaktivnost.[21] Zbog toga se mogu brzo i nepredvidivo spajati s molekulama u blizini, kao npr. proteinom, lipidom, ugljikohidratom ili nukleinskom kiselinom, što dovodi do nastajanja novih spojeva, također sa svojstvima radikala te potencijalno do pokretanja novog niza neenzimskih lančanih reakcija. Najznačajniji slobodni radikali su reaktivni kisikovi i dušikovi spojevi.

U reaktivne oblike kisika (engl. *reactive oxygen species* – ROS) ubrajamo superoksidni, hidroksilni, peroksilni radikal, te reaktivni neradikalne derivate kisika kao što su vodikov peroksid, hipokloritna kiselina, singletni kisik. Reaktivni oblici dušika (engl. *reactive nitrogen species* – RNS) pak uključuju dušikov (II)-oksid i dušikov (IV)-oksid radikal, te spojeve i molekule kao peroksinitrit, nitrozilni kation i dr. [2, 21]

U organizmu zdravih i oboljelih osoba slobodni se radikali stvaraju stalno, kao produkti metabolizma, a neki od njih imaju i važne fiziološke funkcije. Obično ljudski organizam raspolaže izvrsnim prirodnim mehanizmima obrane, koji sudjeluju ili u prevenciji i prekidanju procesa oksidacije ili u obnavljanju oštećenih molekula, no kad iz različitih razloga (nedostatak prirodnih antioksidansa, egzogeni toksini, neispravne mutacije DNA, kronične bolesti, nagomilavanje oštećenih makromolekula, povećanje količine prooksidansa,itd.) obrambeni mehanizmi zataje i kada stanice, tkiva ili katkad cijeli organizam preplave slobodni radikali, nastaje patološko stanje koje nazivamo ***oksidacijski stres***.[21] Kao rezultat tog stresa javlja se oštećenje stanice, nove mutacije DNA, oksidacija lipidnih membrana, bolest, starenje i dr.

Iz ovakve definicije oksidacijskog stresa jasno je koliko je za čovjeka važno postojanje prirodne antiioksidacijske obrane. U prirodnom antioksidacijskome mehanizmu obrane osim enzima (superoksid-dismutaza, katalaza, glutation-peroksidaza, glutation-reduktaza), cisteina, cistamina ili glutationa sudjeluju i vitamini A, C i E, te beta karoten.[22] Prirodni izvor antioksidansa su uljarice, cjelovite žitarice, povrće, voće, lišće, korijen, začini i zeljaste biljke.[23] Obzirom na moguće različite mehanizme djelovanja antioksidansa u reakcijama sa slobodnim radikalima, postoje i različite metode za procjenu antioksidacijske aktivnosti. Najčešća podjela navedenih je na metode koje se temelje na prijenosu vodikovog atoma (engl. *Hydrogen Atom Transfer*- HAT) i metode temeljene na pojedinačnom elektronskom prijenosu (engl. *Single Electron Transfer*- SET). Metoda FRAP koja je korištena u ovom radu temeljena je na pojedinačnom prijenosu elektrona tj. spada u SETmetode.[2, 24]

Korelaciju između antioksidacijske aktivnosti i fenolnog sastava proučavali su različiti autori u raznim vrstama hrane i pića, uključujući vino i jagode, i na osnovu dobivenih rezultata zaključili da različite podgrupe fenolnih spojeva pridonose različitoj jačini konačnog antioksidacijskog učinka. S druge pak strane, antioksidacijsko djelovanje može se odrediti iz ukupne količine radikala koji su uklonjeni te prema brzini kojom se reakcije odvijaju.[26]

1.3. Interakcija fenola

Interakcija između fenolnih spojeva je dobro poznata kao i činjenica da ista može utjecati na promjenu ukupnog antioksidacijskog kapaciteta ispitivanog uzorka. Ono što je važno istaknuti jest teško predvidjeti antioksidacijsku aktivnost smjese i/ili uzorka na temelju sposobnosti pojedinačnih fenolnih antioksidansa.[27, 28] Na osnovu dosadašnjih istraživanja koja su provedena na velikom broju fenolnih spojeva, može se zaključiti da postoji međusobno djelovanje između flavonoida u smjesi, te da njihovo interakcijsko djelovanje može utjecati na ukupni antioksidacijski kapacitet smjese.[24]

Dokazana je također i interakcija između polifenola i makromolekula poput proteina, ugljikohidrata i lipida.[27, 29, 30] Pokazano je i da ove interakcije mogu utjecati na bioraspoloživost polifenola. Ono što je osobito zanimljivo je činjenica da interakcije između polifenola i lipida imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje zbog smanjenja adsorpcije masti u gastrointestinalnom traktu, te da ove interakcije mogu osigurati prolazak polifenola do nižih dijelova gastrointestinalnog trakta.[29]

Iako postoje radovi o pozitivnom združenom učinku nekih fenolnih spojeva, broj ispitanih kombinacija je jako mali, kao i vrste antioksidacijskih metoda kojima je ispitivanje provedeno. Studije također ističu veću antioksidacijsku aktivnost polifenola koji sadrže kateholnu skupinu (aromatski prsten s dvije hidroksilne skupine u *orto* položaju) u odnosu na polifenole jednostavnije fenolne građe.[2] Upravo iz tog razloga se javlja potreba za ispitivanjem većeg broja fenolnih spojeva iz različitih podgrupa i različitih strukturnih karakteristika.

2. EKSPERIMENTALNI DIO

U eksperimentalnom dijelu ovog rada korišteni su standardi odabranih fenolnih kiselina iz podgrupe hidroksicimetnih kiselina. Osnovne otopine fenolnih kiselina pripravljene su pri istim molarnim koncentracijama. Ovako pripravljene otopine korištene su za pripravu ekvimolarnih fenolnih smjesa. Sve otopine fenolnih kiselina, kao i njihovih ekvimolarnih smjesa do provođenja analize čuvane su u hladnjaku pri temperaturi +4°C.

Tablica 1. Odabrani derivati hiroksicimetne kiseline.

Fenolna kiselina	**Ime po IUPAC-u**
p-kumarinska	4-hidroksi cimetna kiselina
Kava	3,4-dihidroksi cimetna kiselina
Ferulinska	4-hidroksi-3-metoksi cimetna kiselina
Sinapinska	4-hidroksi-3,5-dimetoksi cimetna kiselina
Ružmarinska	(2R)-2-(2"E")-3-(3,4-dihidroksifenil)-1-okso-2-propeniloksi]-3-(3,4-dihidroksifenil) propionska kiselina

2.1.1. Kemikalije

2.1.1.1. Odabrani fenolni spojevi

- ružmarinska kiselina, $C_{18}H_{16}O_8$, Mr=360,31 g/mol, 97% čistoće (*Sigma-Aldrich Gmbh, Steinheim, Njemačka*);
- 4-hidroksicimetna kiselina, $C_9H_8O_3$, Mr=164,16 g/mol, 98% čistoće (*Sigma, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Njemačka*);
- kava kiselina, $C_9H_8O_4$, Mr=180,16 g/mol, ≥ 95% čistoće (*Sigma, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Njemačka*);
- 4-hidroksi-3-metoksicimetna kiselina, $C_{10}H_{10}O_4$, Mr=194,19 g/mol, ≥98% čistoće (*Fluka, Buchs, Njemačka*);

2.1.1.2. Kemikalije korištene za određivanje antioksidacijskih svojstava

- etanol p.a., C_2H_5OH (*Alkaloid AD-Skopje, Skopje, Makedonija*);
- željezo (III) klorid heksahidrat, $FeCl_3 \times 6H_2O$ (*Kemika, Zagreb, Hrvatska*);
- kloridna kiselina, 37 %, HCl (*Paureac, Barcelona, Španjolska*);
- natrijev acetat trihidrat, $CH_3COONa \times 3H_2O$ (*Alkaloid AD-Skopje, Skopje, Makedonija*);
- glacijalna octena kiselina, $C_2H_4O_2$ (*Alkaloid AD-Skopje, Skopje, Makedonija*);
- TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin), $C_{18}H_{12}N_6$ (*Fluka, Sigma-Aldrich, Njemačka*)

2.2. Priprava fenolnih otopina

2.2.1. Priprava otopina fenolnih kiselina i ekvimolarnih smjesa

Za testiranje antioksidacijskih svojstava, pripravljene su otopine svakog pojedinog fenolnog spoja u koncentraciji od 1000 μM. Pri pripravi početnih otopina uzeta je u obzir čistoća fenolnog spoja, a kao otapalo korišten je 80%-tni etanol. Osnovna otopina svakog pojedinog fenolnog spoja je, dodatkom određene količine otapala, razrijeđena do koncentracije 100, 500 i 1000 μM.

Za pripravu ekvimolarnih fenolnih smjesa korištene su osnovne otopine fenolnih spojeva, izvorne ili u odgovarajućem razrjeđenju. Fenolne smjese su pripravljene miješanjem jednakih volumena otopina (iste koncentracije) dvije ili više fenolnih kiselina iz podskupine derivata hidroksicimetne kiseline (tablica 2). Koncentracije testiranih smjesa fenolnih kiselina bile su 100, 500 i 1000 μM.

Tablica 2. Fenolni sastav testiranih smjesa.

Molarni omjer	Fenolne smjese	Oznaka
1:1	Sinapinska kiselina+Ružmarinska kiselina	SK+RK
	Kava kiselina+*p*-kumarinska kiselina	KK+*p*-KK
	Kava kiselina+Ferulinska kiselina	KK+FK
	Kava kiselina+sinapinska kiselina	KK+SK
	p-kumarinska kiselina+Ružmarinska kiselina	*p*-KK+RK
	p-kumarinska kiselina+Sinapinska kiselina	*p*-KK+SK
	Kava kiselina+Ružmarinska kiselina	KK+RK
	Ferulinska kiselina+Sinapinska kiselina	FK+SK
	Ferulinska kiselina+*p*-kumarinska kiselina	FK+*p*-KK
	Ferulinska kiselina+Ružmarinska kiselina	FK+RK
1:1:1	Kava kiselina+Ferulinska kiselina+*p*-kumarinska kiselina	KK+FK+*p*-KK
	Kava kiselina+Sinapinska kiselina+Ružmarinska kiselina	KK+SK+RK
	Kava kiselina+*p*-kumarinska kiselina+Sinapinska kiselina	KK+*p*-KK+SK
	Kava kiselina+Ferulinska kiselina+Ružmarinska kiselina	KK+FK+RK
	Kava kiselina+*p*-kumarinska kiselina+Ružmarinska kiselina	KK+*p*-KK+RK
	Kava kiselina+Ferulinska kiselina+Sinapinska kiselina	KK+FK+SK
	p-kumarinska kiselina+Sinapinska kiselina+Ružmarinska kiselina	*p*-KK+SK+RK
	p-kumarinska kiselina+Sinapinska kiselina+Ferulinska kiselina	*p*-KK+SK+FK
	p-kumarinska kiselina+Ružmarinska kiselina+Ferulinska kiselina	*p*-KK+RK+FK
	Ružmarinska kiselina+Ferulinska kiselina+Sinapinska kiselina	RK+FK+SK
1:1:1:1	Kava kiselina+*p*-kumarinska kiselina+Ferulinska kiselina+Sinapinska kiselina	KK+*p*-KK+FK+SK
	Kava kiselina+Ferulinska kiselina+Sinapinska kiselina+Ružmarinska kiselina	KK+FK+SK+RK
	Kava kiselina+*p*-kumarinska kiselina+Sinapinska kiselina+Ružmarinska kiselina	KK+*p*-KK+SK+RK
	p-kumarinska kiselina+Ferulinska kiselina+Sinapinska kiselina+Ružmarinska kiselina	*p*-KK+FK+SK+RK
	Kava kiselina+Ferulinska kiselina+*p*-kumarinska kiselina+Ružmarinska kiselina	KK+FK+*p*-KK+RK
1:1:1:1:1	Kava kiselina+*p*-kumarinska kiselina+Sinapinska kiselina+Ferulinska kiselina+Ružmarinska kiselina	KK+*p*-KK+ SK+FK+RK

2.3. Metode određivanja antioksidacijskih svojstava

2.3.1. FRAP metoda

Antioksidacijski kapacitet odabranih fenolnih kiselina i bnjihovih ekvimolarnih smjesa određen je metodom FRAP (engl. *Ferric Reducing/Antioxidant Power*). Izvornu metoda koju su razvili [31], a ista je u ovo radu modificirana kako bi se testiranje moglo izvoditi u mikrotitarskim pločicama (Micro test plates, PS, bez poklopca, nesterilne, Sarsted, Njemačka). U radu je korišten spektrofotometar Tecan Micro Plate Reader, model Sunrise (Tecan Group Ltd., Mannedorf, Švicarska)

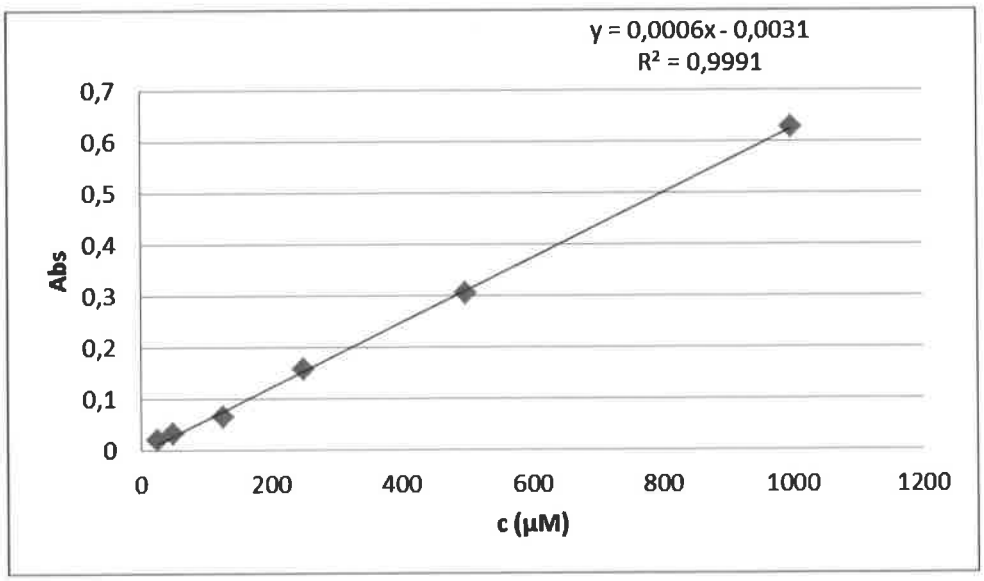
Osim za određivanja redukcijske snage plazme za koju je metoda i razvijena, danas se ova metoda često koristi kod ispitivanja antioksidacijskih svojstava biljnih ekstrakata, čistih spojeva ili njihovih smjesa.[24]

Reagensi:

- *acetatni pufer,* c ($C_2H_3NaO_2 \times 3H_2O$) = 300 mmol/L; pH 3,6: 3,1 g natrijevog acetata i 16 mL glacijalne octene kiseline se pomiješa s vodom do volumena 1 L
- *otopina klorovodične kiseline*, c (HCl) = 40 mmol/L: 400 mL 0,1 M klorovodične kiseline u odmjerenoj tikvici od 1 L razrijedi se destiliranom vodom do oznake;
- *otopina 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) u 40 mmol/L HCl,* c ($C_{18}H_{12}N_6$) = 10 mmol/L: 159,4 mg TPTZ se otopi u 50 mL 40 mmol/L otopine klorovodične kiseline;
- *otopina $FeCl_3$,* c (Fe^{3+}) = 20 mmol/L: 551,6 mg željezova (III) klorida se otopi u 100 mL destilirane vode;
- *FRAP reagens* se priprema miješanjem 25 mL acetatnog pufera, 2,5 ml otopine TPTZ reagensa i 2,5 ml otopine $FeCl_3$.

Postupak:

Svježe pripravljena otopina FRAP reagensa (300 μL) se pipetira u otvore mikrotitarske pločice, nakon čega se očita apsorbancija otopine pri 592 nm. U reagens se potom doda 10 μL uzorka (pojedine fenolne kiseline ili fenolne smjese) i prati se promjena apsorbancije nakon 4 min. Testirana je aktivnost fenolnih kiselina pri tri različite koncentracije: 100, 500 i 1000 μM. Promjena apsorbancije, izračunata kao razlika između konačne vrijednosti apsorbancije reakcijske smjese nakon određenog reakcijskog vremena (4 min) i apsorbancije FRAP reagensa prije dodatka uzorka, uspoređena je s vrijednostima dobivenim za otopinu standarda.[32] Kao standard korišten je $FeSO_4 \times 7H_2O$, a rezultati su izraženi kao μM Fe^{2+}. Sva mjerenja urađena su u 6 ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.



Slika 5. Ovisnost koncentracije $FeSO_4 \times 7H_2O$ o apsorbanciji FRAP reakcijske smjese.

2.4. Interakcijsko djelovanje fenolnih spojeva

2.4.1. Određivanje interakcijskog djelovanja

Interakcija između odabranih fenolnih kiselina, određena FRAP metodom, opisana je kao razlika u antioksidacijskoj aktivnosti i izračunata je preko jednadžbe:

Razlika (%) = [Eksperimentalna vrijednost smjese × 100 / Očekivana vrijednost smjese] – 100

gdje je:

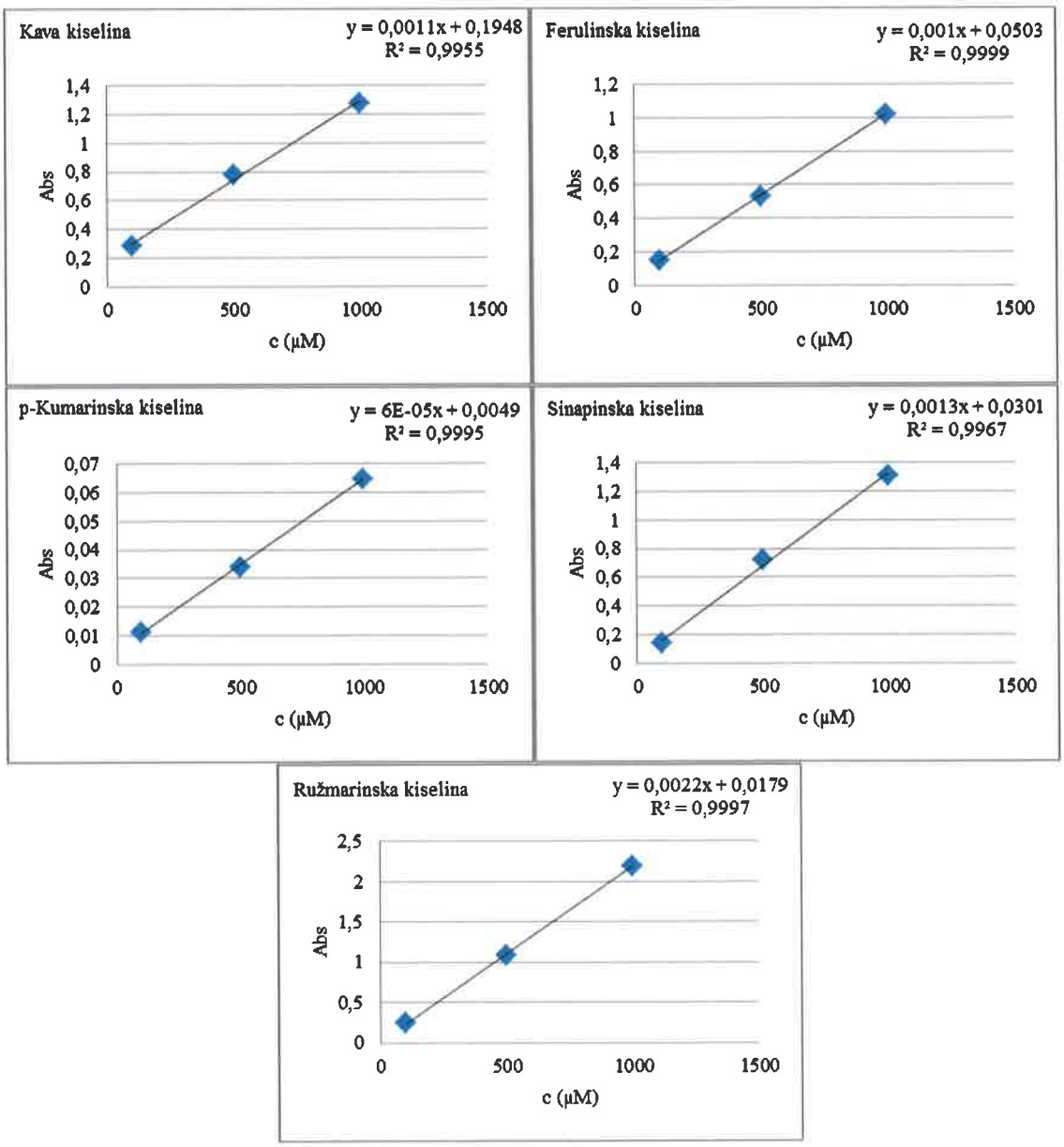
Eksperimentalna vrijednost- eksperimentalno dobiveni rezultat za smjesu dva ili više testiranih derivata hidroksicimetnih kiselina

Očekivana vrijednost - vrijednost za smjese dobivena računski zbrajanjem teoretskih FRAP vrijednosti za pojedini spoj iz smjese (teoretska vrijednost pojedinog spoja predstavlja eksperimentalnu FRAP vrijednost podijeljenu s 2, 3, 4 ili 5 ovisno o broju spojeva u kombinaciji)

Pozitivne vrijednosti razlike ukazuju na potencijalno ***sinergijsko djelovanje***, negativne vrijednosti na ***antagonističko djelovanje***, a za vrijednosti razlike „0%“ odnosno „±5%“ može se smatrati da nema interakcije odnosno da postoji ***aditivno djelovanje***.[33]

3. REZULTATI

3.1. Rezultati antioksidacijske aktivnosti derivata hidroksicimetne kiseline određene metodom FRAP

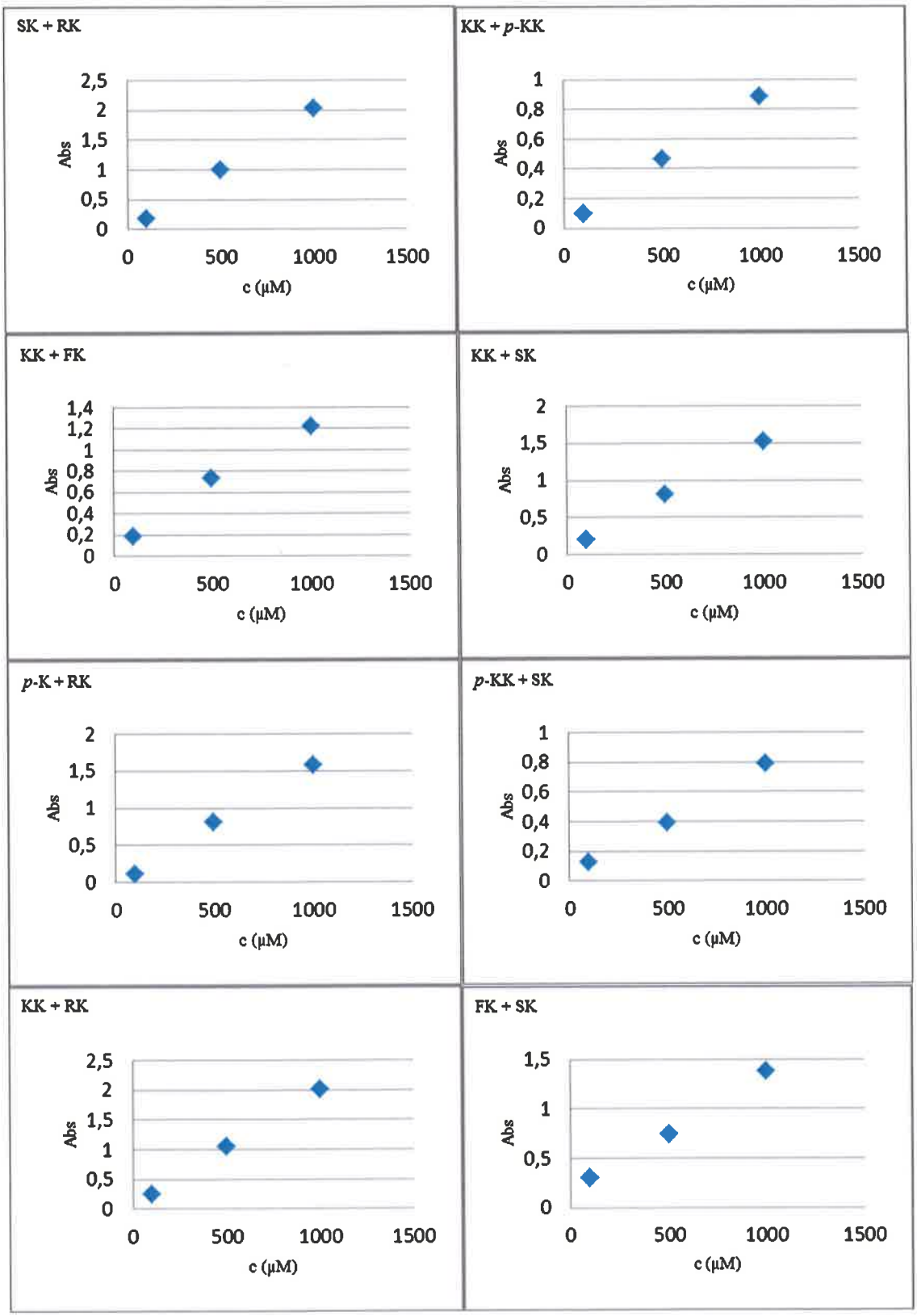


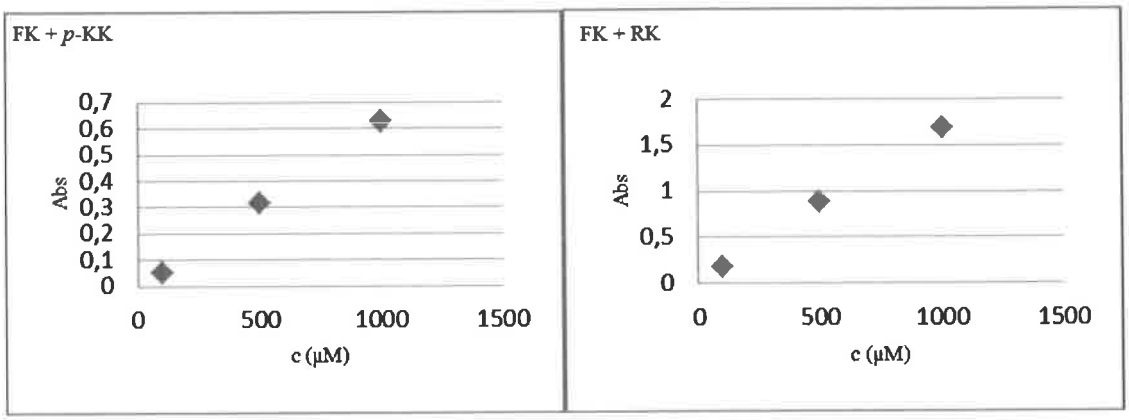
Slika 6. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije testirane hidroksicimetne kiseline na apsorbanciju FRAP reakcijske smjese.

Tablica 3. FRAP vrijednosti testiranih hidroksicimetnih kiselina izražena u μM Fe^{2+}.

	FRAP(μM Fe^{2+})		
	Koncentracija spoja (μM)		
SPOJ	**100**	**500**	**1000**
Kava kiselina	476,4 ± 16,63	1321,0 ± 18,48	2124,8 ± 17,71
Ferulinska kiselina	259,6 ± 5,64	885,3 ± 22,63	1705,6 ± 38,4
p-Kumarinska kiselina	23,9 ± 1,60	61,8 ± 0,96	113,1 ± 2,5
Sinapinska kiselina	235,3 ± 8,15	1200,8 ± 0,17	2186,0 ± 24,25
Ružmarinska kiselina	413,0 ± 13,65	1802,9 ± 50,44	3656,0 ± 147,6

3.2. Rezultati određivanja antioksidacijskih svojstava smjesa fenolnih kiselina određene metodom FRAP

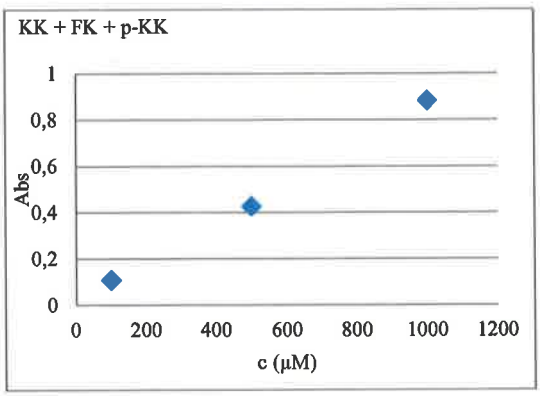


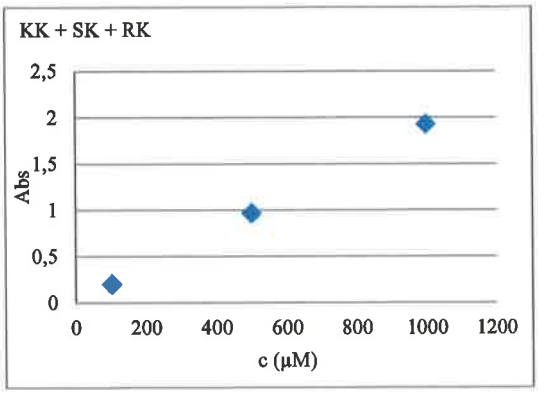


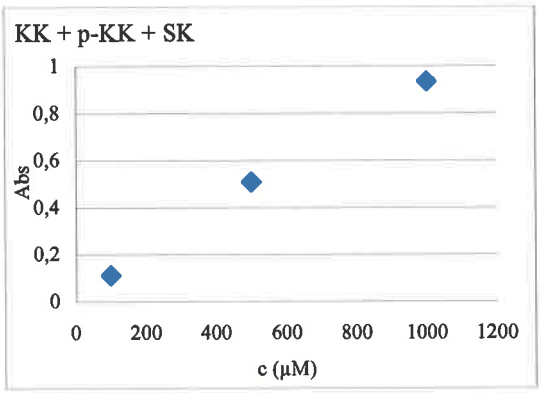
Slika 7. Grafički prikaz utjecaja koncentracije smjese dvije hidroksicimetne kiseline na apsorbanciju FRAP reakcijske smjese.

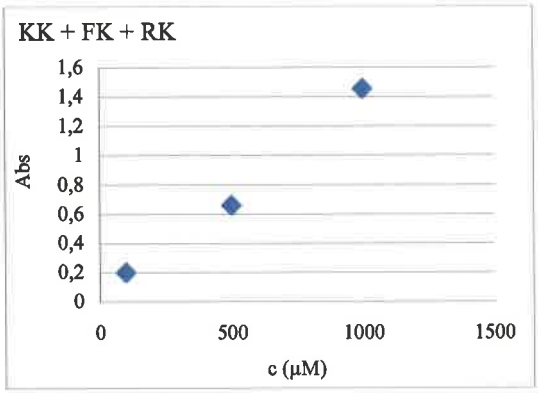
Tablica 4. FRAP vrijednosti smjese dvije hidroksicimetne kiseline izražena u μM Fe^{2+}.

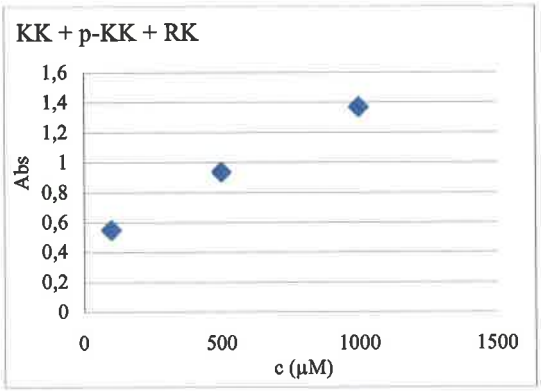
Oznaka smjesa	**FRAP(μM Fe^{2+})**		
	Koncentracija spoja (μM)		
	100	**500**	**1000**
SK + RK	307,3 ± 2,85	1673,5 ± 56,0	3393,9 ± 55,26
KK + *p*-KK	161,0 ± 9,86	778,5 ± 17,85	1479,3 ± 41,92
KK + FK	314,08 ± 1,66	1226,8 ± 27,52	2048,5 ± 27,86
KK + SK	341,8 ± 20,32	1362,3 ± 14,17	2541,8 ± 86,81
p-KK + RK	196,8 ± 10,41	1356,8 ± 25,86	2635,2 ± 404,4
p-KK + SK	223,1 ± 9,94	655,2 ± 31,7	1320,6 ± 38,52
KK + RK	427,7 ± 43,99	1750,6 ± 155,0	3347,3 ± 121,5
FK + SK	500,6 ± 5,34	1233,5 ± 24,65	2302, 7 ± 61,9
FK + *p*-KK	95,17 ± 1,67	536,8 ± 30,87	1046 ± 8,77
FK + RK	322,3 ± 6,99	1466,8 ± 18,61	2812,3 ± 56,5

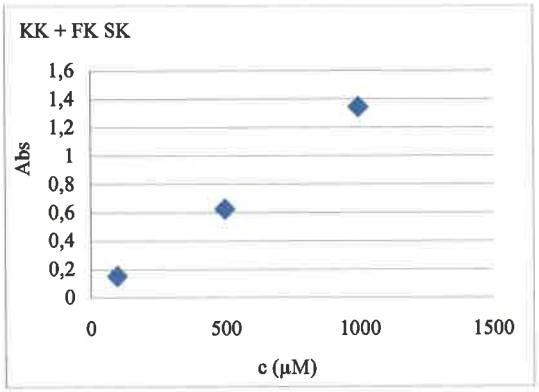

KK + FK + p-KK
Abs
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
200
400
600
800
1000
1200
c (μM)

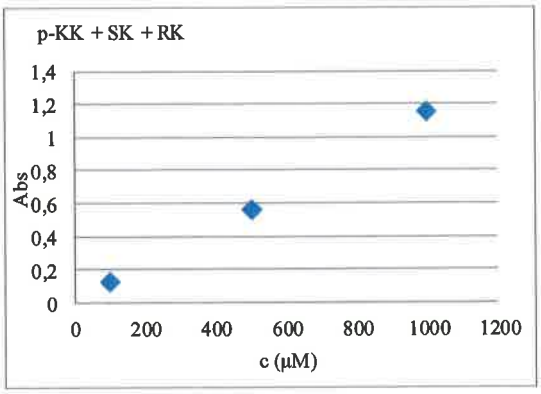

KK + SK + RK
Abs
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0
200
400
600
800
1000
1200
c (μM)

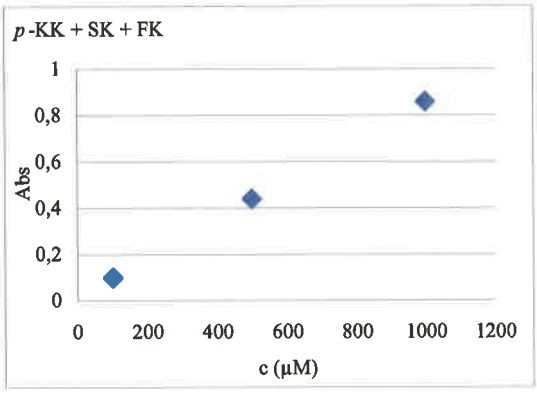

KK + p-KK + SK
Abs
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
200
400
600
800
1000
1200
c (μM)

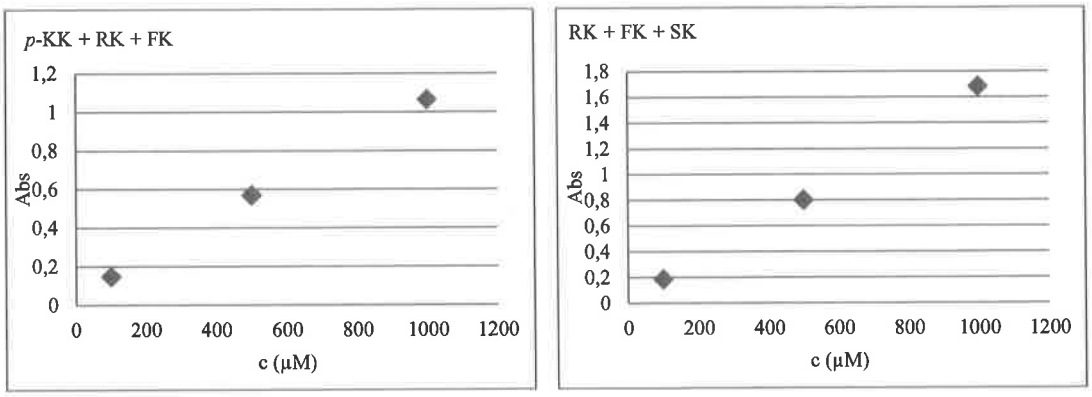

KK + FK + RK
Abs
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
500
1000
1500
c (μM)


KK + p-KK + RK
Abs
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
500
1000
1500
c (μM)


KK + FK SK
Abs
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
500
1000
1500
c (μM)


p-KK + SK + RK
Abs
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
200
400
600
800
1000
1200
c (μM)

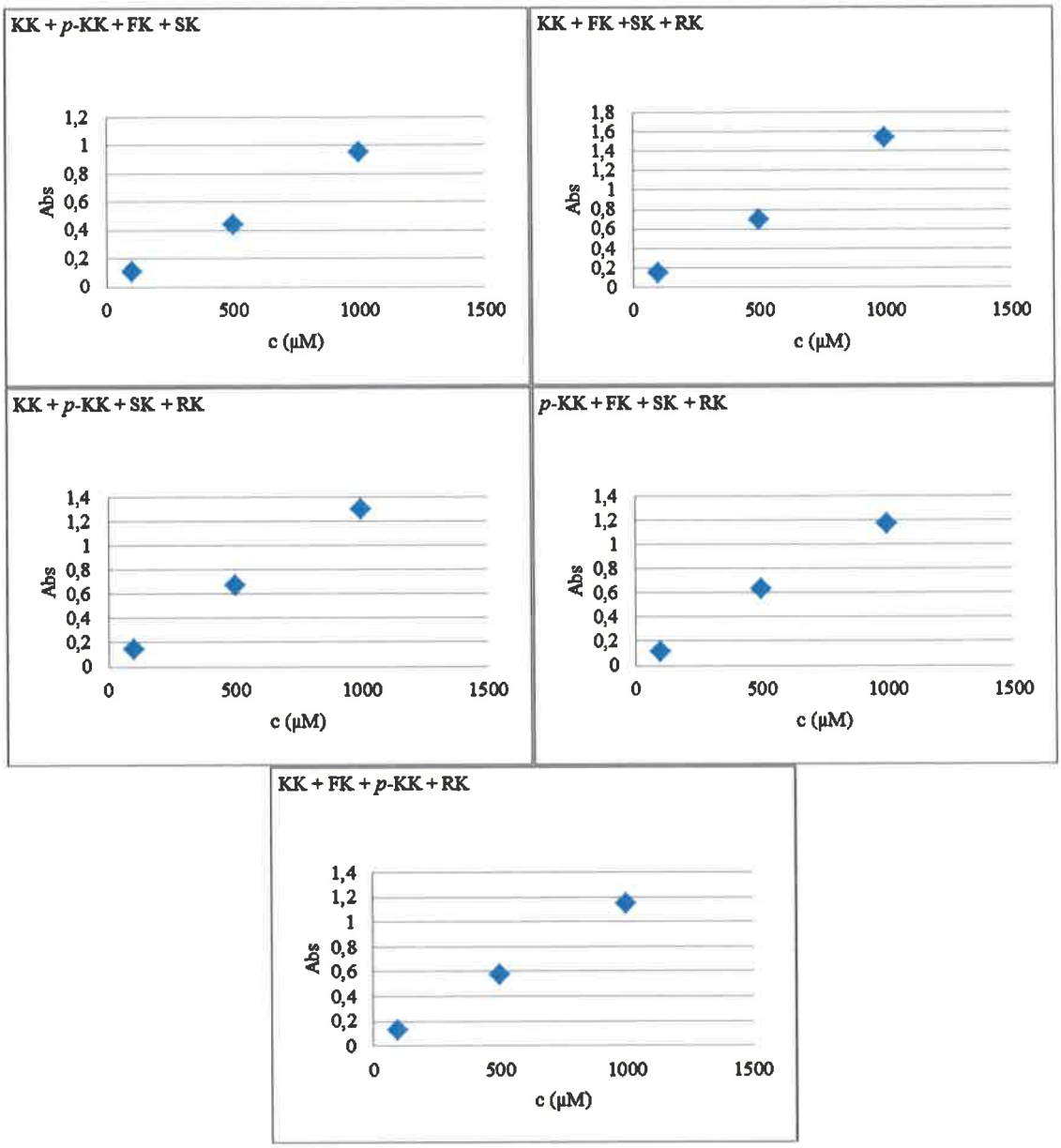

p-KK + SK + FK
Abs
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
200
400
600
800
1000
1200
c (μM)



Slika 8. Grafički prikaz utjecaja koncentracije smjese tri hidroksicimetne kiseline na apsorbanciju FRAP reakcijske smjese om.

Tablica 5. FRAP vrijednosti za smjese tri hidroksicimetne kiseline izražena u μM Fe^{2+}.

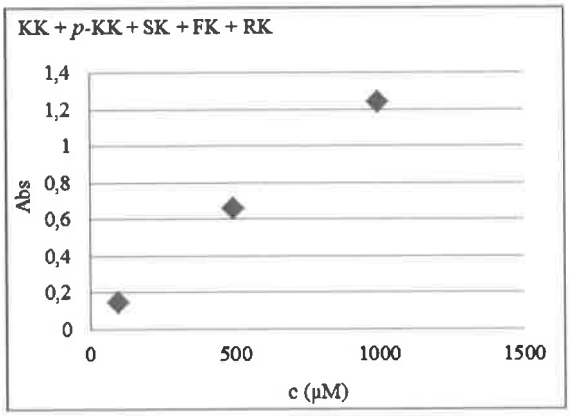
Oznaka smjesa	**FRAP(μM Fe^{2+})**		
	Koncentracija spoja (μM)		
	100	**500**	**1000**
KK + FK + *p*-KK	181,4 ± 2,1	716,4 ± 17,81	1472,3 ± 26,05
KK + SK + RK	327,7 ± 9,48	1617,3 ± 21,79	3214,3 ± 196,5
KK + *p*-KK + SK	189,8 ± 9,37	849,3 ± 19,2	1558,9 ± 20,47
KK + FK + RK	337,3 ± 9,27	1102,3 ± 23,27	2428,5 ± 54,31
KK + *p*-KK + RK	691,42 ± 839,2	1566,8 ± 32,09	2177,9 ± 19,18
KK + FK + SK	256,8 ± 4,91	1044,3 ± 30,81	2240,6 ± 29,17
p-KK + SK + RK	216,0 ± 6,38	947,3 ± 6,0	1925,2 ± 50,9
p-KK + SK + FK	171,4 ± 2,5	736,8 ± 59,81	1436,0 ± 57,63
p-KK + RK + FK	62,62 ± 6,85	953,5 ± 8,39	1780,2 ± 54,44
RK + FK + SK	314,3 ± 3,04	1331,4 ± 70,64	2809,8 ± 42,5



Slika 9. Grafički prikaz utjecaja koncentracije smjese četiri hidroksicimetne kiseline na apsorbanciju FRAP reakcijske smjese.

Tablica 6. FRAP vrijednosti za smjesu četiri hidroksicimetne kiseline izražena u μM Fe^{2+}.

Oznaka smjesa	**FRAP(μM Fe^{2+})**		
	Koncentracija spoja (μM)		
	100	**500**	**1000**
KK + *p*-KK + FK + SK	186,8 ± 8,44	740,6 ± 22,21	1596,0 ± 44,37
KK + FK + SK + RK	247,7 ± 10,76	1163,5 ± 11,59	2575,6 ± 112,7
KK + *p*-KK + SK + RK	245,2 ± 4,3	1120,2 ± 11,63	2175,6 ± 24,17
p-KK + FK + SK + RK	201,0 ± 10,67	1063,5 ± 20,55	1946,8 ± 35,82
KK + FK + *p*-KK + RK	224,3 ± 2,15	967,3 ± 41,46	1916,8 ± 10,41



Slika 10. Grafički prikaz utjecaja koncentracije smjese pet hidroksicimetnih kiselina na apsorbanciju FRAP reakcijske smjese.

Tablica 7. FRAP vrijednosti za smjesu pet hidroksicimetnih kiselina izražena u μM Fe^{2+}.

Oznaka smjesa	**FRAP(μM Fe^{2+})**		
	Koncentracija spoja (μM)		
	100	**500**	**1000**
KK + *p*-KK + SK + FK + RK	246,8 ± 0,96	1106,8 ± 38,90	2077,3 ± 35,02

3.3. Rezultati određivanja interakcijskog djelovanja fenolnih smjesa

Tablica 8. Usporedba očekivanih i eksperimentalnih FRAP vrijednosti i interakcijsko djelovanje ekvimolarnih smjesa fenolnih kiselina (% razlike) pri koncentraciji 100 μM.

	Eksperimentalna FRAP vrijednost (μM)	**Očekivana FRAP vrijednost (μM)**	**Razlika (%)**
2 kombinacije			
SK + RK	307,3	324,17	-5,20
KK + *p*-KK	161	250,17	-35,64
KK + FK	314,1	368,00	-14,65
KK + SK	341,8	355,88	-3,96
p-KK + RK	196,8	218,46	-9,91
p-KK + SK	223,1	129,63	72,11
KK + RK	427,7	444,71	-3,82
FK + SK	500,6	247,46	102,30
FK + *p*-KK	95,2	141,75	-32,84
FK + RK	322,3	336,29	-4,16
3 kombinacije			
KK + FK + *p*-KK	181,4	253,31	-28,39
KK + SK + RK	327,7	374,92	-12,59
KK + *p*-KK + SK	189,8	245,22	-22,60
KK + FK + RK	337,3	383,00	-11,93
KK + *p*-KK + RK	691,4	304,45	127,10
KK + FK + SK	256,8	323,78	-20,69
p-KK + SK + RK	216	224,08	-3,61
p-KK + SK + FK	171,4	172,94	-0,89
p-KK + RK + FK	62,6	232,17	-73,04
RK + FK + SK	314,3	302,64	3,85
4 kombinacije			
KK + *p*-KK + FK + SK	186,8	248,81	-24,92
KK + FK + SK + RK	247,7	346,08	-28,43
KK + *p*-KK + SK + RK	245,2	287,17	-14,61
p-KK + FK + SK + RK	201	232,96	-13,72
KK + FK + *p*-KK + RK	224,3	293,23	-23,51
5 kombinacije			
KK + *p*-KK + SK + FK + RK	246,8	281,65	-12,37

Razlika (%) > 0 ukazuju na potencijalno sinergijsko djelovanje; Razlika (%) < 0 na antagonističko djelovanje; Razlika (%) ≅ 0, tj. ±5% može se smatrati da nema interakcije odnosno da postoji aditivno djelovanje

Tablica 9. Usporedba očekivanih i eksperimentalnih FRAP vrijednosti i interakcijsko djelovanje ekvimolarnih smjesa fenolnih kiselina (% razlike) pri koncentraciji 500 μM.

	Eksperimentalna FRAP vrijednost (μM)	**Očekivana FRAP vrijednost (μM)**	**Razlika (%)**
2 kombinacije			
SK + RK	1673,5	1501,85	11,43
KK + *p*-KK	778,5	691,42	12,59
KK + FK	1226,8	5103,42	-75,96
KK + SK	1362,3	1260,92	8,04
p-KK + RK	1356,8	932,35	45,53
p-KK + SK	655,2	631,34	3,78
KK + RK	1750,6	1561,93	12,08
FK + SK	1233,5	5043,34	-75,54
FK + *p*-KK	536,8	4473,83	-88,00
FK + RK	1466,8	5344,35	-72,55
3 kombinacije			
KK + FK + *p*-KK	716,4	3422,89	-79,07
KK + SK + RK	1617,3	1441,57	12,19
KK + *p*-KK + SK	849,3	861,23	-1,38
KK + FK + RK	1102,3	4003,23	-72,46
KK + *p*-KK + RK	1566,8	1061,90	47,55
KK + FK + SK	1044,3	3802,56	-72,54
p-KK + SK + RK	947,3	1021,84	-7,30
p-KK + SK + FK	736,8	3382,84	-78,22
p-KK + RK + FK	953,5	3583,51	-73,39
RK + FK + SK	1331,4	3963,18	-66,41
4 kombinacije			
KK + *p*-KK + FK + SK	740,6	2867,38	-74,17
KK + FK + SK + RK	1163,5	3302,63	-64,77
KK + *p*-KK + SK + RK	1120,2	1096,63	2,15
p-KK + FK + SK + RK	1063,5	2987,84	-64,41
KK + FK + *p*-KK + RK	967,3	3017,88	-67,95
5 kombinacije			
KK + *p*-KK + SK + FK + RK	1106,8	2654,47	-58,30

Razlika (%) > 0 ukazuju na potencijalno sinergijsko djelovanje; Razlika (%) < 0 na antagonističko djelovanje; Razlika (%) ≅ 0, tj. ±5% može se smatrati da nema interakcije odnosno da postoji aditivno djelovanje

Tablica 10. Usporedba očekivanih i eksperimentalnih FRAP vrijednosti i interakcijsko djelovanje ekvimolarnih smjesa fenolnih kiselina (% razlike) pri koncentraciji 1000 μM.

	Eksperimentalna FRAP vrijednost (μM)	**Očekivana FRAP vrijednost (μM)**	**Razlika (%)**
2 kombinacije			
SK + RK	3393,9	2921,00	**16,19**
KK + *p*-KK	1479,3	1118,92	**32,21**
KK + FK	2048,5	1915,17	**6,96**
KK + SK	2541,8	2155,38	**17,93**
p-KK + RK	2635,2	1884,54	**39,83**
p-KK + SK	1320,6	1149,54	**14,88**
KK + RK	1320,6	2890,38	-54,31
FK + SK	2302,7	1945,79	**18,34**
FK + *p*-KK	1046	909,33	**15,03**
FK + RK	2812,3	2680,79	4,91
3 kombinacije			
KK + FK + *p*-KK	1472,3	1314,47	**12,01**
KK + SK + RK	3214,3	2655,58	**21,04**
KK + *p*-KK + SK	1558,9	1474,61	**5,72**
KK + FK + RK	2428,5	2495,44	-2,68
KK + *p*-KK + RK	2177,9	1964,61	**10,86**
KK + FK + SK	2240,6	2005,44	**11,73**
p-KK + SK + RK	1925,2	1985,03	-3,01
p-KK + SK + FK	1436	1334,89	**7,57**
p-KK + RK + FK	1780,2	1824,89	-2,45
RK + FK + SK	2809,8	2515,86	**11,68**
4 kombinacije			
KK + *p*-KK + FK + SK	1596	1532,35	4,15
KK + FK + SK + RK	2575,6	2418,08	**6,51**
KK + *p*-KK + SK + RK	2175,6	2019,96	**7,71**
p-KK + FK + SK + RK	1946,8	1915,17	1,65
KK + FK + *p*-KK + RK	1916,8	1899,85	0,89
5 kombinacije			
KK + *p*-KK + SK + FK + RK	2077,3	1957,08	**6,14**

Razlika (%) > 0 ukazuju na potencijalno sinergijsko djelovanje; Razlika (%) < 0 na antagonističko djelovanje; Razlika (%) ≅ 0, tj. ±5% može se smatrati da nema interakcije odnosno da postoji aditivno djelovanje

4. RASPRAVA

Redukcijska snaga fenolnih kiselina i njihovih ekvimolarnih smjesa određena je FRAP metodom. Ova brza metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti uzoraka temelji se na redukciji Fe^{3+} iona u Fe^{2+} ion uz prisustvo antioksidansa, u našem slučaju individualnih fenolnih kiselina i/ili njihovih smjesa, pri čemu nastaje plavo obojen kompleks.

U radu je određena antioksidacijska aktivnost pet derivata hidroksicimetne kiseline: kava, sinapinske, ferulinske, *p*-kumarinske i ružmarinske kiseline, te njihovih ekvimolarnih smjesa (dvije, tri, četiri ili svih pet fenolnih kiselina). Sve kiseline i smjese fenolnih kiselina su testirane pri koncentracijama 100, 500 i 1000 μM. Usporedbom eksperimentalnih i očekivanih FRAP vrijednosti testiranih fenolnih smjesa određen je potencijalni interakcijski (sinergijski/ aditivni/ antagonistički) učinak fenolnih kiselina u smjesi. Rezultati ovog rada prikazani su u tablicama 3-10 i slikama 6-10.

Iz grafičkog prikaza utjecaja koncentracije derivata hidroksicimetne kiseline na apsorbanciju reakcijske smjese s FRAP reagensom (slika 6) uočava se linearnost za sve testirane hidroksicimetne kiseline kao i postojanje razlika u jačini njihova djelovanja. Među testiranim kiselinama najslabiju redukcijsku snagu, pri svim koncentracijama, pokazala je *p*-kumarinska kiselina (pri koncentraciji 100 μM iznosila je 23,9 μM Fe^{2+}, pri 500 μM 61,8 μM Fe^{2+}, a pri 1000 μM 113,1 μM Fe^{2+}). U odnosu na *p*-kumarinsku kiselinu kava kiselina je imala gotovo 20 puta veće FRAP vrijednosti (pri koncentraciji 100 μM 476,4 μM Fe^{2+}, pri 500 μM 1321,0 μM Fe^{2+}, a pri 1000 μM 214,8 μM Fe^{2+}). Dobra redukcijska snaga kava kiseline može se pripisati kateholnoj skupini (dvije OH skupine na benzenskom prstenu) za koju je dokazano da utječe na bolja antioksidacijska svojstva fenolnih spojeva u odnosu na druge supstituente. Iznimno dobru redukcijsku snagu pokazale su i sinapinska kiselina i ferulinska kiselina (tablica 3) koja uz jednu hidroksilnu skupinu ima i dvije (sinapinska) ili jednu (ferulinska) metoksilne skupine u molekuli. Među svim testiranim fenolnim kiselinama osobito se ističe ružmarinska kiselina, ester kava kiseline, čije su FRAP vrijednosti pri koncentraciji 1000 μM bile dva puta veće u odnosu na kava kiselinu (FRAP = 3656,0 μM Fe^{2+}). U ovom slučaju su

četiri prisutne -OH skupine bile zaslužne za dobru antioksidacijsku aktivnost ružmarinske kiseline.

Utjecaj koncentracije smjesa dvaju ili više derivata hidroksicimetnih kiselina na apsorbanciju reakcijske smjese s FRAP reagensom je također određen i prikazan na slikama 7-10. I kod testiranih smjesa se može uočiti u svim slučajevima jako dobra linearna ovisnosti koncentracije o apsorbanciji.

Rezultati redukcijske aktivnosti ekvimolarnih smjesa dviju fenolnih kiselina prikazani su u tablici 4. Najveću redukcijsku aktivnost analiziranih smjesa pokazale su smjesa ferulinske i sinapinske kiseline pri koncentraciji 100 μM (500,6 μM Fe^{2+}), te kombinacija sinapinske i ružmarinske kiseline pri koncentracijama 500 i 1000 μM (1673,5 i 3393,3 μM Fe^{2+}). Kombinacija ferulinske i *p*-kumarinske kiseline pokazala je najslabiju antioksidacijsku aktivnost pri svim testiranim koncentracijama. Može se još istaknuti da kombinacije koje su kao drugu komponentu smjese sadržavale *p*-kumarinsku kiselinu uglavnom imaju niže FRAP vrijednosti u odnosu na smjese u kojima se nalazi ružmarinska kiselina.

Kod kombinacija tri hidroksicimetne kiseline, pri koncentraciji 100 μM najveća redukcijska aktivnost dokazana je za smjesu kava, *p*-kumarinske i ružmarinske kiseline (691,42 μM Fe^{2+}), dok je pri višim koncentracijama (500 i 1000 μM) najučinkovitija bila smjesa kava kiseline, sinapinske i ružmarinske kiseline (1617,3 i 3214,3 μM Fe^{2+}). Upravo ova kombinacija kiselina sadrži najveći broj hidroksilnih (dvije kod kava kiseline, jedna kod sinapinske i četiri kod ružmarinske kiseline) i metoksilnih (dvije kod sinapinske kiseline) skupina. Kod smjesa koje su pokazale slabiju redukcijsku snagu (npr. *p*-kumarinska, sinapinska i ferulinska kiselina pri 1000 μM) ponovno se često javlja *p*-kumarinska kiselina kao jedan od članova, no uz prisustvu ružmarinske kiseline u smjesi pri pojedinim testiranim koncentracijama FRAP vrijednosti ipak bivaju nešto veće (npr. *p*-kumarinska, sinapinska i ružmarinska kiselina) (tablica 5).

Iz tablice 6 i FRAP vrijednosti za kombinacije četiri kiseline vidljiva je najslabija redukcijska aktivnost za smjesu kava, *p*-kumarinske, ferulinske i sinapinske kiseline pri svim testiranim koncentracijama. Sve ostale smjese se pokazale dobru i sličnu antioksidacijsku aktivnost no posebno se može izdvojiti smjesa kava, ferulinske, ružmarinske i sinapinske kiseline koja je imala najveće FRAP vrijednosti pri svim

koncentracijama (pri 100 μM FRAP je iznosio 247,4 μM Fe^{2+}, pri koncentraciji 500 μM FRAP je iznosio 1163,5 μM Fe^{2+} i pri 1000 μM FRAP je iznosio 2575,6 μM Fe^{2+}).

Vrijednosti FRAP-a za otopine istraživanih ekvimolarnih smjesa pet fenolnih kiselina pri različitim koncentracijama prikazani su u tablici 7 i u odnosu na sve prethodno spomenute smjese ne ističu se s nešto značajnijim ili boljim vrijednostima.

Rezultati ispitivanja potencijalnog interakcijskog (sinergijsko/ aditivno/ antagonističko) djelovanja fenolnih kiselina prikazani su u tablicama 8, 9 i 10. Interakcijsko djelovanje je iskazano kao % razlike između eksperimentalne antioksidacijske aktivnosti fenolnih smjesa i očekivanih FRAP vrijednosti. Pozitivne vrijednosti ukazivale su na sinergijski, a negativne vrijednosti na antagonistički učinak fenolnih kiselina u testiranim smjesama, dok se aditivnim djelovanjem smatrala interakcija kod kojih je razlika bila ± 5%. Usporedba očekivanih i eksperimentalnih FRAP vrijednosti ekvimolarnih smjesa fenolnih kiselina pri koncentraciji 100 μM prikazani su u tablici 8. Sve smjese s četiri i pet fenolnih kiselina pokazale su antagonističko djelovanje, dok je kod ostalih smjesa osim antagonizma prisutno i aditivno i sinergijsko djelovanje. Najveću razliku između očekivanih i eksperimentalnih FRAP vrijednosti, a time i najznačajniji sinergijski učinak, pokazale su smjese kava, *p*-kumarinske i ružmarinske kiseline (127,10 % razlike), ferulinske i sinapinske kiseline (102,30 % razlike) i smjesa *p*-kumarinske i sinapinske kiseline (72,11 % razlike). Aditivno djelovanje pokazale su smjese kava i sinapinske kiseline, kava i ružmarinske kiseline, ferulinske i ružmarinske kiseline, *p*-kumarinske, sinapinske i ružmarinske kiseline, *p*-kumarinske, sinapinske i ferulinske kiseline, te smjesa ružmarinske, ferulinske i sinapinske kiseline. Iako je većina smjesa pri najnižoj koncentraciji pokazala antagonističko djelovanje, pri koncentraciji smjese 500 μM situacija je nešto drugačija (tablica 9). Kod pojedinih smjesa interakcijsko djelovanje iz antagonističkog prelazi u sinergijsko i obratno ili postaje aditivno. Tako npr. smjesa *p*-kumarinske i sinapinske kiseline iz iznimno dobrog sinergijskog djelovanja prelazi u aditivno (3,78 % razlike), a smjesa ferulinske i sinapinske kiseline iz sinergijskog u izrazito antagonističko djelovanje (-75,54 % razlike). Osobito zanimljivi rezultati uočeni su kod smjesa testiranih pri koncentraciji 1000 μM (tablica 10). U ovom slučaju su kod gotovo svih smjesa eksperimentalne FRAP vrijednosti bile veće u odnosu na očekivane, pa tako imamo 16 smjesa koje su pokazale sinergijsko djelovanje. Samo jedna smjesa i to

smjesa kava i ružmarinske kiseline pokazala je antagonističko djelovanje s -54,31 % razlike, dok je preostalih 7 smjesa imalo aditivno djelovanje.

Najzanimljiviji su zasigurno rezultati smjesa 4 i 5 fenolnih kiselina koji su pri nižim koncentracijama ukazivali uglavnom na negativnu interakciju fenolnih kiselina u smjesi, a pri koncentraciji smjese od 100 μM javlja se sinergija i/ili antagonizam. Povećanjem testirane koncentracije smjesa javlja se povećani sinergijski učinak kod pojedinih smjesa. Ova promjena se jako dobro uočava kod smjese kava, *p*-kumarinske i sinapinske kiseline kod koje je pri koncentraciji smjese 100 μM zabilježen antagonistički učinak (-22,60 % razlike), zatim pri koncentraciji smjese 500 μM aditivno djelovanje (-1,38% razlike) da bi u konačnici pri koncentraciji smjese 1000 μM zabilježeno sinergijsko djelovanje (5,72 % razlike). Slično povećanje interakcijskog učinka fenolnih kiselina u smjesama ovisno o koncentraciji zabilježeno je i za još poneke smjese (npr. smjesa sinapinske i ružmarinske kiseline, smjesa kava i *p*-kumarinske kiseline...).

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobivenih rezultata možemo izvesti nekoliko zaključaka:

- Najbolju antioksidacijsku aktivnost među testiranim derivatima hidroksicimetnih kiselina pokazala je kava kiselina i njen ester ružmarinska kiselina, a najslabiju *p*-kumarinska kiselina.

- Razlike u redukcijskoj snazi testiranih fenolnih kiselina mogu se prepisati razlikama u strukturi molekula, tj. vrsti i broju i rasporedu supstituenata na osnovnoj molekuli.

- Smjese dviju fenolnih kiselina su pokazale dobru redukcijsku snagu, osobito one koje su u smjesi sadržavale ružmarinsku kiselinu u odnosu na one s *p*-kumarinskom kiselinom kao članom fenolne smjese.

- Smjese tri, četiri ili svih pet fenolnih kiselina pokazuju različitu antioksidacijsku aktivnost pri čemu se ne može izdvojiti jedan spoj iz smjese kojem bi se pripisala zaslužnost za dobru aktivnost smjese.

- Interakcijski učinak, bilo antagonistički, aditivni ili sinergijski potvrđen je kod svih testiranih smjesa fenolnih kiselina i ovisan je o spojevima prisutnim u smjesama te njihovim koncentracijama.

Najbolji i najjači sinergijski učinak potvrđen je pri najnižoj testiranoj koncentraciji smjese, dok je najveći broj smjesa pokazao sinergijski učinak pri najvećoj testiranoj koncentraciji.

6. LITERATURA

1. Liu, R. H. (2003) *Health benefits of fruits and vegetables are from additive and synergistic combination of phytochemicals. Am. J. Clin. Nutr.* 78, 517-520
2. Kazačić, S. (2004) *Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida,* Arhiv za higijenu rada i toksikologiju,55(4)
3. Tanaka T, Kojima T, Kawamori T, Yoshimi N, Mori H. (1993) *Alterations of the nucleolar organizer regions during 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in rats*, 53, 2775-2779
4. Dai J, Mumper RJ. (2010) *Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties.* Molecules. 15(10), 7313-52
5. Naczk M, Shahidi F. (2004) *Extraction and analysis of phenolics in food, Journal of Chromatography A,* 1054, 95-111
6. Stalikas. (2007) *Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids,* J Sep Sci., 30(18), 3268-95
7. Amarowicz R, Shahidi F. (1995) *Antioxidant activity of green tea catechins in a β-carotene-linoleate model system, J. Agric. Food Chem., 45 (11), 4262–4266*
8. Brnic I, (2015) Utjecaj sorte i fenofaze na udio fenolnih spojeva u ekstraktima lišća *Vitis vinifera* L., Diplomski rad, Split, Kemijsko-tehnološki fakultet
9. Liu RH. (2004) *Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action*, J Nutr.134, 3479S-3485
10. Skroza D, (2015) *Učinak odabranih fenolnih spojeva na antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnost resveratrola u binarnim fenolnim smjesama, doktorska disertacija*, Sveučilište u Zagrebu
11. Adom KK, Liu RH. (2002) *Antioxidant activity of grains. J. Agric. Food Chem.* 50, 6182-6187
12. URL:https://i2.wp.com/img.fciencias.com/uploads/2014/02/cumarico.png?resize=800%2C411. Pristupljeno: 23.09.2017.
13. URL:https://sh.wikipedia.org/wiki/Ferulinska_kiselina#/media/File:Ferulic_acid_acsv.svg. Pristupljeno: 23.09.2017.
14. URL:https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/47/Sinapic_acid.png. Pristupljeno: 23.09.2017.
15. https://www.wikiwand.com/bs/Kofeinska_kiselina. Pristupljeno: 23.09.2017

16. Shahid F, Naczk M. (1995) *Phenolics in Food and Nutraceuticals,* J Chromatogr A. 29, 1054(1-2), 95-111
17. Shahidi F. (2000) *Antioxidants in food and food antioxidants,* Nahrung. 44(3), 158-63
18. Rauha J, (2000) *Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds,* Int J Food Microbiol. 25, 56(1), 3-12
19. Halliwell B, Gutteridge J.M. (1990) *Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods Enzymol*, 186, 1-85
20. Rice-Evans CA., Miller NJ., Paganga G. (1996) *Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids*. Free Radic. Biol. Med, 20, 933-956
21. Bradamante V, Lacković Z. (2001) *Oksidativni stres i djelotvornost antioksidansa, Zagreb*, Medicinska naklada 32
22. Gaziano J, Manosn J, Buring J, Hennekens C. (1992) *Dietary Antioxidants and Cardiovascular Disease,* 669, 249–258
23. Ramarathnam E, (1995) *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health*
24. Prior R.L, Wu X, Schaich K. (2005) *Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. Journal of Agricultural and Food Chem.* 53, 4290–4302
25. Landrault N, Poucheret P, Ravel P, Gasc F, Cros G.Teissedre P.L. (2001) *Antioxidant Capacities and Phenolics Levels of French Wines from Different Varieties and Vintages. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3341-3348.
26. Cerezo A, Moyá L, Troncoso A, García-Parrilla C. (2010) *Synergism Effect between Phenolic Metabolites and Endogenous Antioxidants in Terms of Antioxidant Activity María Nogue,* Chemical Engineering and Science, 4, 258-265
27. Hidalgo M, Sanchez–Moreno C, Pascual–Teresa *S. (2010) Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity*,Food Chemistry. 121, 691-696
28. Iacopini P, Baldi M, Storchi P, Sebastiani L. (2008) *Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions*. Journal of Food Composition and Analysis. 21, 589-598
29. Jakobek L. (2015) *Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins,* Food Chemistry, 175, 556-567

30. Bourvellec C, (2012) *Interactions between polyphenols and macromolecules: quantification methods and mechanisms.* Crit Rev Food Sci Nutr. 52(3), 213-48
31. Benzie IFF., Strain JJ. (1996) *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP assay.* Analitical Biochemistry. 239, 70-76
32. Benzie IFF., Strain JJ. (1999) *Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurment of Total Antioxidant Power and Ascorbic acid Concentration.* Methods in Enzimology. 299, 15-27
33. Skroza D, Generalić Mekinić I, Svilović S, Šimat V, Katalinić V. (2015) *Investigation of the potential synergistic effect of resveratrol with other phenolic compounds: A case of binary phenolic mixtures.* Journal of Food Composition and Analysis. 38, 13-18