Određivanje atioksidacijskog djelovanja fenolnih kiselina ORAC metodom

Vrdoljak, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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:167:221128

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

ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG DJELOVANJA FENOLNIH KISELINA ORAC METODOM

ZAVRŠNI RAD

LUCIJA VRDOLJAK

Matični broj: 1255

Split, rujan 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE
SMJER: KEMIJSKO INŽENJERSTVO

ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG DJELOVANJA FENOLNIH KISELINA ORAC METODOM

ZAVRŠNI RAD

LUCIJA VRDOLJAK

Matični broj: 1255

Split, rujan 2019.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
CHEMICAL ENGINEERING

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PHENOLIC ACIDS USING ORAC METHOD

BACHELOR THESIS

LUCIJA VRDOLJAK

Parent number: 1255

Split, September 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Preddiplomski studij kemijske tehnologije; smjer: Kemijsko inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Tema rada: je prihvaćena na 19. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta

Mentor: Doc. Dr. sc. Danijela Skroza

ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG DJELOVANJA FENOLNIH KISELINA ORAC METODOM

Lucija Vrdoljak, 1255

Sažetak:
Fenolni spojevi su jedni od najvažnijih, u vodi topivih antioksidansa prisutnih u biljkama. Zahvaljujući svojoj specifičnoj kemijskoj građi ova grupa sekundarnih biljnih metabolita posjeduje višestruka biološka djelovanja od kojih je posebice značajna njihova antioksidacijska aktivnost koja se pripisuje položaju, strukturi i broju –OH grupa. Cilj ovog rada bio je odrediti antioksidacijsku aktivnost fenolnih kiselina iz podgrupe derivata cimetne kiseline (*p*-kumarinska, ferulinska, sinapinska, kava i ružmarinska) i derivata benzojeve kiseline (galna, protokatehinska, vanilinska, siriginska i gentisinska) metodom određivanja sposobnosti inhibicije radikala kisika (engl. *Oxygen Radical Absorbance Activity,* ORAC). Rezultati ovog istraživanja potvrđuju razlike u antioksidacijskoj aktivnosti između odabranih fenolnih kiselina, a na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti da je najbolju aktivnost pokazala ružmarinska kiselina, a najslabiju *p*-kumarinska i galna kiselina. Položaj i broj reaktivnih skupina u molekuli ne može se u potpunosti povezati s antioksidacijskom aktivnosti.

Ključne riječi: fenolne kiseline, antioksidacijska aktivnost, ORAC

Rad sadrži: 18 stranica, 7 slika, 5 tablica, 18 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Mario Nikola Mužek
2. Doc. dr. sc. Danijela Skroza
3. Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić

Datum obrane: 30.09.2019.

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
Undergraduate Study of Chemical Technology, orientation: Chemical engineering

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food Technology
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 19.

Mentor: Ph. D. Danijela Skroza, Assistant Professor

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PHENOLIC ACIDS USING ORAC METHOD

Lucija Vrdoljak, 1255

Abstract:
Phenolic compounds are the one of the most important water soluble antioxidants present in plants. Thanks to their specific chemical structure, this group of secondary plant metabolites possess multiple biological activities such as antioxidant activity which is usually attributed to the position, structure, and number of -OH groups. The aim of this study was to determine the antioxidant activity of phenolic acids from the group of cinnamic acid derivatives (*p*-coumaric, ferulic, sinapic, caffeic and rosmarinic) and benzoic acid derivatives (gallic, protocatechuic, vanilic, siringic and gentisic) by Oxygen Radical Absorbance Activity assay (ORAC). The results of this study confirmed variations amongantioxidant activities of investigated phenolic acids. Based on the obtained results, it can be concluded that rosemarinic acid (ester of caffeic acid) showed the best activity, while the lowest was detected for *p*-coumaric acid and gallic acid. The position and the number of reactive groups in the molecule can not be fully associated with antioxidant activity.

Keywords: phenolic acids, antioxidant activity, ORAC

Thesis contains: 18 pages, 7 figures, 5 tables, 18 references

Original in: Croatian

Defence committee:
1. Ph. D. Mario Nikola Mužek, Assistant Professor
2. Ph. D. Ivana Generalić Mekinić, Assistant Professor
3. Ph. D. Danijela Skroza, Assistant Professor

Defence date: 30.09.2019.

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 doc. dr. sc. Danijele Skroza u razdoblju od svibnja do rujna 2019. godine.

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

ZAHVALA

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Danijeli Skroza na nesebičnom zalaganju i stručnoj pomoći čime je kao mentorica omogućila izradu ovoga rada.

Hvala mojoj obitelji na podršci, ljubavi i strpljenju koju su mi pružili tijekom cijelog studiranja.

Također hvala svim prijateljima koji su mi učinili ovaj studentski život zabavnijim i bili uz mene tijekom cijelog studiranja.

Veliko HVALA svima!

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak ovog završnog rada bio je:

- Pripraviti otopine odabranih fenolnih kiselina iz podgrupe derivata cimetne i benzojeve kiseline,

- Odrediti antioksidacijsku aktivnost odabranih fenolnih kiselina metodom određivanja kapaciteta apsorpcije radikala kisika (engl. *Oxygen radical absorbance capacity*, ORAC),

- Ispitati odnos između strukture fenolnih kiselina i njihove antioksidacijske aktivnosti QSAR analizom.

SAŽETAK

Fenolni spojevi su jedni od najvažnijih, u vodi topivih antioksidansa prisutnih u biljkama. Zahvaljujući svojoj specifičnoj kemijskoj građi ova grupa sekundarnih biljnih metabolita posjeduje višestruka biološka djelovanja od kojih je posebice značajna njihova antioksidacijska aktivnost koja se pripisuje položaju, strukturi i broju–OH grupa.

Cilj ovog rada bio je odrediti antioksidacijsku aktivnost fenolnih kiselina iz podgrupe derivata cimetne kiseline (*p*-kumarinska, ferulinska, sinapinska, kava i ružmarinska) i derivata benzojeve kiseline (galna, protokatehinska, vanilinska, siriginska i gentisinska) metodom određivanja sposobnosti inhibicije radikala kisika (engl. *Oxygen Radical Absorbance Activity,* ORAC). Rezultati ovog istraživanja potvrđuju razlike u antioksidacijskoj aktivnosti između odabranih fenolnih kiselina, a na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti da je najbolju aktivnost pokazala ružmarinska kiselina, a najslabiju *p*-kumarinska i galna kiselina. Položaj i broj reaktivnih skupina u molekuli ne može se u potpunosti povezati s antioksidacijskom aktivnosti

Ključne riječi: fenolne kiseline, antioksidacijska aktivnost, ORAC

SUMMARY

Phenolic compounds are the one of the most important water soluble antioxidants present in plants. Thanks to their specific chemical structure, this group of secondary plant metabolites possess multiple biological activities such as antioxidant activity which is usually attributed to the position, structure, and number of -OH groups,.

The aim of this study was to determine the antioxidant activity of phenolic acids from the group of cinnamic acid derivatives (*p*-coumaric, ferulic, sinapic, caffeic and rosmarinic) and benzoic acid derivatives (gallic, protocatechuic, vanilic, siringic and gentisic) by Oxygen Radical Absorbance Activity assay (ORAC). The results of this study confirmed variations amongantioxidant activities of investigated phenolic acids. Based on the obtained results, it can be concluded that rosemarinic acid (ester of caffeic acid) showed the best activity, while the lowest was detected for *p*-coumaric acid and gallic acid. The position and the number of reactive groups in the molecule can not be fully associated with antioxidant activity.

Keywords: phenolic acids, antioxidant activity, ORAC

SADRŽAJ

UVOD 1

1.OPĆI DIO 2

1.1. Fenolne kiseline 2

1.2. Antioksidansi 3

1.2.1. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti 3

1.2.1.1. ORAC metoda 4

1.3. Odnos struktura-aktivnosti (QSAR analiza) 5

2. EKSPERIMENTALNI DIO 8

2.1. Kemikalije 8

2.2. ORAC metoda 9

3. REZULTATI I RASPRAVA 12

3.1. Rezultati određivanja antioksidacijskih svojstava fenolnih kiselina 12

4. ZAKLJUČCI 16

5. LITERATURA 17

UVOD

Fenolne kiseline su fenolni spojevi koji osim hidroksilne skupine posjeduju i karboksilnu skupinu. Na temelju strukture razlikujemo dvije grupe fenolnih kiselina; derivate benzojeve kiseline (C_6-C_1) i derivate cimetne kiseline (C_6-C_3). Fenolne kiseline su poznate po svojoj antioksidacijskoj aktivnosti, odnosno učinku u inhibiciji molekula slobodnih radikala na čemu se bazira obrambeni mehanizam u ljudskom tijelu. Pored toga što imaju dobri antioksidacijski učinak pokazuju i antikancerogeno, antiviralno i antibakterijsko djelovanje. Dobra antioksidacijska aktivnost fenolnih kiselina ovisi o njihovoj kemijskoj strukturi, prvenstveno o položaju i broju -OH grupa. Antioksidacijska aktivnost je u pozitivnoj vezi s brojem –OH grupa vezanih na aromatski prsten, te monohidroksilni derivati s položajem –OH grupe u *o*- i *p*- položaju pokazuju značajno slabiju antioksidacijsku aktivnost od *m*- derivata.

Cilj ovog rada bio je metodom ORAC odrediti antioksidacijsku aktivnost deset odabranih fenolnih kiselina i provesti QSAR analizu.

1.OPĆI DIO

1.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su skupina sekundarnih metabolita i bioaktivnih spojeva u biljkama koje imaju i značajnu ulogu za ljudsko zdravlje. Fenolne kiseline, koje se unose prehranom, smatraju se fiziološkim antioksidansima koji imaju sposobnost *hvatanja* slobodnih kisikovih i dušikovih radikala. Antioksidansi na taj način pomažu smanjenju rizika od razvoja različitih oboljenja jer štite biološki sustav od štetnih učinaka i oksidacijskih procesa na makromolekulama kao što su ugljikohidrati, lipidi, proteini i DNA.[1]

In vitro studije koristile su različite sustave kako bi dokazale antioksidacijsko djelovanje fenolnih kiselina, a među testiranima spojevima osobito se ističu hidroksicimetne kiseline koje su pokazale snažno antioksidativno djelovanje.[2] Kava kiselina je tako pokazala dobru antioksidacijsku aktivnost, *in vitro* i *in vivo* hepatoprotektivno, protuvirusno, protuupalno djelovanje, a u kombinaciji s ružmarinskom kiselinom i antimikrobno djelovanje. Također, kava kiselina i njezin derivat, feniletil ester, inhibiraju karcinogenezu.[3] Objavljena su također i brojna istraživanja koja opisuju širok raspon bioloških aktivnosti ružmarinske kiseline. Nekoliko je istraživanja potvrdilo njen protuupalni učinak, čime je omogućena njena upotreba za liječenje različitih upala.[4] Osim toga, ovaj spoj je pokazao i antiangiogeni potencijal koji također može biti povezan s njenom antioksidacijskom aktivnošću.[5] Galna kiselina također posjeduje antioksidacijska, anifugalna i antiviralna svojstva. Za veliki broj ostalih fenolnih kiselina, osim antioksidacijskog, dokazana su i brojna druga biološka svojstva, kao što su hepatoprotektivno, protuvirusno, protuupalno, antimikrobno, antimutageno, antidepresivno, antibakterijsko, itd.[6]

1.2. Antioksidansi

Kemijski spojevi koji mogu odgoditi početak ili usporiti reakcije oksidacije nazivaju se antioksidansi. Među brojnim definicijama ističe se ona koja navodi da su antioksidansi tvari (sintetičke ili prirodne) koje sprječavaju reakcije oksidacije, a u biokemiji i medicini antioksidansima se smatraju i enzimi ili druge organske tvari, kao što su vitamin E ili *β*-karoten, koji su sposobni spriječiti štetne učinke oksidacije u biološkim sustavima. Biološki antioksidansi uključuju enzimske antioksidanse (npr. superoksid-dismutazu, katalazu i glutation-peroksidazu) i neenzimske antioksidanse kao što su oksidativni enzim (npr. inhibitori cikloksigenaze), kofaktori antioksidacijskih enzima (Se, koenzim Q10), *hvatači* ROS (reaktivne kisikove vrste) /RNS (reaktivne dušikove vrste) (vitamin C i E) i kelatori prijelaznih metala.[7] U kemiji hrane antioksidansima se smatraju komponente koje sprječavaju oksidaciju lipida (pojavu užeglost masti).[7]

1.2.1. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti

Postoje različite metode za procjenu antioksidacijske aktivnosti fenolnih spojeva, a njihova najčešća podjela 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).[8,12]

Najčešće korištene ET metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti su:[9,10]

- FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*)
- CUPRAC (engl. *Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*)
- ABTS (prema radikalu 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazoline-6-sulfonska kiselina))
- FC (Folin-Ciocalteu metoda)

U HAT metode ubrajaju se:[9,10]

- ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*)
- DPPH (prema radikalu 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil)
- TRAP (engl. *Total Radical Trapping Antioxidant Parameter*)
- β-karoten (metoda koja se temelji na izbjeljivanju β-karotena)
- SASA (engl. *Scavenging of Superoxide Radical Formation by Alkaline*)

Ostale metode koje imaju više različitih mehanizama dijelovanja su:[9,10]

- TOSC (engl. *Total Oxidant Scavenging Capacity*)
- BR (inhibicija Briggs-Rauscher oscilacijske reakcije)
- Kelatiranje (sposobnost stvaranja kelata s ionima željeza/bakra)
- CL (kemiluminiscencija)
- PCL (fotokemiluminiscencija)

Metoda korištena u ovom radu, a temeljena na prijenosu vodikovog atoma je ORAC metoda.[8]

1.2.1.1. ORAC metoda

ORAC je jedna je od najkorištenijih i standardiziranih metoda za određivanje antioksidacijskog kapaciteta uzoraka. Temelji se na inhibiciji oksidacije inducirane peroksidnim radikalom, započetom termičkom razgradnjom azo spoja 2,2'-azobis-2-metil-propanimidamid dihidroklorida (AAPH).[13]

Ova metoda se temelji na mjerenju smanjenja intenziteta fluorescencije tijekom vremena odvijanja reakcije zbog nastanka peroksil-radikala uslijed AAPH pri 37 °C, pri čemu je mjera antioksidacijske aktivnosti učinkovitost uzorka (antioksidansa) u usporavanju slabljenja intenziteta fluorescencije. Kod ove metode, Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), u vodi topljivi analog vitamina E, obično služi kao pozitivna kontrola.

Antioksidansi potiskuju ovu reakciju mehanizmom prijenosa vodikovog atoma, koji inhibira oksidacijsku razgradnju AAPH. a njihova koncentracija u uzorku je proporcionalna intenzitetu fluorescencije tijekom testa i procjenjuje se uspoređivanjem neto površine ispod krivulje s površinom poznatog antioksidansa, Troloksa. Izvorni ORAC test razvijen je korištenjem fluorescentnog proteina *β*-fikoeritrina kao radikalnog cilja koji je kasnije zamijenjen fluoresceinom zbog slabe ponovljivosti metode, osjetljivosti na svjetlo i problema vezanja polifenola.[14]

1.3. Odnos struktura aktivnosti (QSAR analiza)

QSAR (engl. *Quantitative Structure-Activity Relationship*) metoda je metoda kojom se neko strukturno svojstvo molekule želi dovesti u kvantitativnu vezu s njezinom biološkom aktivnošću.[15] QSAR se primjenjuje u kemiji, biologiji i toksikologiji, a rastući trend je rana primjena ove metode za eliminaciju molekula kojima nedostaju određena svojstva, u svrhu otkrića nekih pozitivnih bioloških svojstava ili onih za koje se predviđa da će izazvati toksičan učinak. Prvi korak korištenja metode QSAR je pronalazak grupe kemijskih spojeva ili vodećeg spoja koji pokazuju željenu biološku aktivnost nakon čega se uspostavlja kvantitativni odnos između fizikalno-kemijskih parametara i biološke aktivnosti. Na kraju se pomoću QSAR modela, provodi optimizacija aktivnih spojeva kako bi se povećala odgovarajuća biološka aktivnost. Odgovarajući se spojevi nakon uspostavljanja kvalitetnog matematičkog modela, eksperimentalno testiraju na željenu aktivnost.[15]

Uglavnom se sve QSAR metode usredotočuju na sljedeće ciljeve:

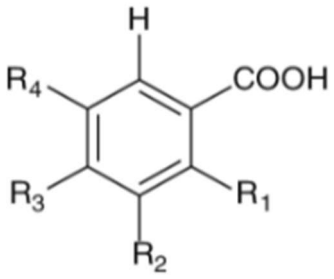
- potrebno je kvantitativno korelirati i rekapitulirati odnose između trendova u kemijskim strukturnim promjenama i odgovarajuće promjene u biološkoj krajnjoj točki za razumijevanje koje su kemijske osobine najvjerojatnije odrednice pojedinih bioloških aktivnosti,
- optimizirati postojeće potencijale kako bi se poboljšala biološka aktivnost, te
- predvidjeti biološke aktivnosti neprovjerenih i ponekad još nedostupnih spojeva.

Antioksidacijska aktivnost fenolnih kiselina u uskoj je vezi sa njihovom strukturom, sposobnosti otpuštanja vodikovog atoma i stabilizacije delokalizacijom elektrona u aromatskoj jezgri. Monofenoli i polifenoli sudjeluju u reakcijama otpuštanja vodikovog atoma i reakcijama „*hvatanja*“ slobodnih radikala pri čemu su polifenoli efikasniji te uvođenje druge hidroksilne grupe u *orto*- i *para*- položaju značajno povećava ovu aktivnost. Tako je antioksidacijska aktivnost *orto*-difenolnih kiselina, protokatehinske i kava kiseline, veća od odgovarajućih monofenolnih kiselina iste strukture, *p*-hidroksibenzojeve i *p*-kumarinske. Galna kiselina sa tri hidroksilne grupe je efikasniji antioksidans od protokatehinske kiseline.[15] Prisustvo jedne ili dvije metoksi grupe u *orto*-položaju također povećava antioksidacijsku aktivnost monofenola tako da je sinapinska kiselina aktivnija od ferulinske, a ferulinska pak aktivnija od *p*-kumarinske. Metoksi grupa u *orto*- položaju kod ferulinske kiseline stabilizira fenoksil radikal koji nastaje u reakciji sa slobodnim radikalom, i na taj način povećava njen antioksidacijski potencijal u odnosu na *p*-kumarinsku kiselinu.

Derivati cimetne kiseline su bolji antioksidansi od derivata benzojeve kiseline zbog prisustva CH=CH–COOH grupe koja doprinosi većoj mogućnosti doniranja atoma vodika i time stabilizacije radikala, nego li –COOH skupina kod hidroksibenzojevih kiselina. Aktivnost kava kiseline je veća od ferulnske i *p*-kumarinske zbog prisustva druge hidroksilne grupe i stvaranja intermolekulskih vodikovih veza.[16]

Tablica 1. Položaj reaktivnih skupina u molekuli derivata benzojeve kiseline[17]

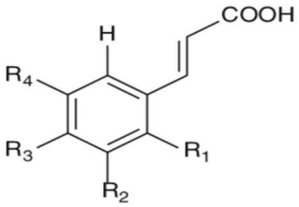
KISELINE	**R1**	**R2**	**R3**	**R4**
Protokatehinska	H	OH	OH	H
Vanilinska	H	OCH_3	OH	H
Galna	H	OH	OH	OH
Gentisinska	OH	H	H	OH
Siriginska	H	OCH_3	OH	OCH_3



Slika 1. Osnovna struktura derivata hidroksibenzojeve kiseline

Tablica 2. Položaj reaktivnih skupina u molekuli derivata cimetne kiseline[17]

KISELINE	**R1**	**R2**	**R3**	**R4**
***p*-kumarinska**	H	H	OH	H
Kava	H	OH	OH	H
Ferulinska	H	OCH_3	OH	H
Sinapinska	H	OCH_3	OH	OCH_3



Slika 2. Osnovna struktura derivata hidroksicimetne kiseline

2. EKSPERIMENTALNI DIO

Za testiranje antioksidacijskih svojstava, korištene su otopine standarda odabranih fenolnih kiselina (tablica 3) u koncentracijama od 5 i 2,5 μM. Pri pripravi početnih otopina uzeta je u obzir čistoća fenolnog spoja, a kao otapalo korišten je 80%-tni etanol. Sve otopine fenolnih kiselina do analize čuvane su u hladnjaku pri temperaturi od +4 °C.

Tablica 3. Odabrane fenolne kiseline korištene u eksperimentalnom dijelu rada

	Fenolne kiseline	**Ime po IUPAC-u**
Derivati benzojeve kiseline	Protokatehinska	3,4-dihidroksi benzojeva kiselina
	Vanilinska	4-hidroksi-3-metoksi benzojeva kiselina
	Gentisinska	2,4-dihidroksi benzojeva kiselina
	Siriginska	4-hidroksi-3,5-dimetoksi benzojeva kiselina
	Galna	3,4,5-trihidroksi benzojeva kiselina
Derivati cimetne Kiseline	*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

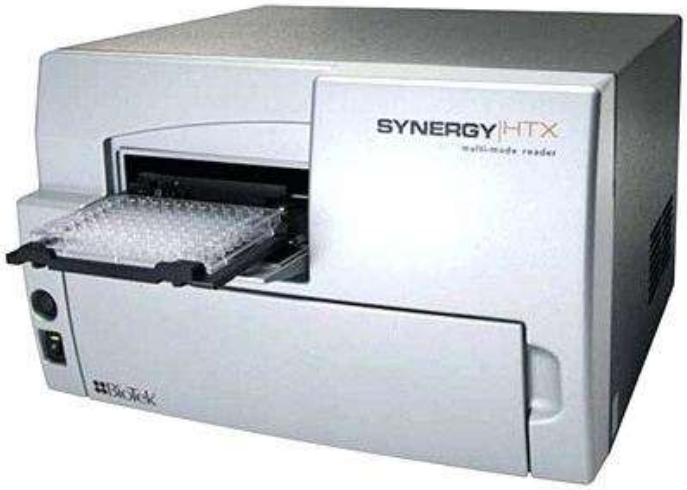
2.1. Kemikalije

- Natrijev fosfat dihidrat, $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Na_2HPO_4, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- Fluorescein, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Germany
- 2,2-azobis (2-metilpropionamid)–dihidroklorid (AAPH), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
- ružmarinska kiselina, 97%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
- 4-hidroksicimetna kiselina, 98%, Sigma, Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
- kava kiselina, ≥95%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka

- 4-hidroksi-3-metoksicimetna kiselina, ≥98%, Fluka, Buchs, Njemačka
- 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina, Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
- 4-hidroksi-3-metoksibenzojeva kiselina, Fluka, Buchs, Njemačka
- gentisinska kiselina hidrat, natrijeva sol, Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
- 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzojeva kiselina, 98%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
- galna kiselina, ≥98%, Fluka, Buchs, Njemačka.

2.2. ORAC metoda

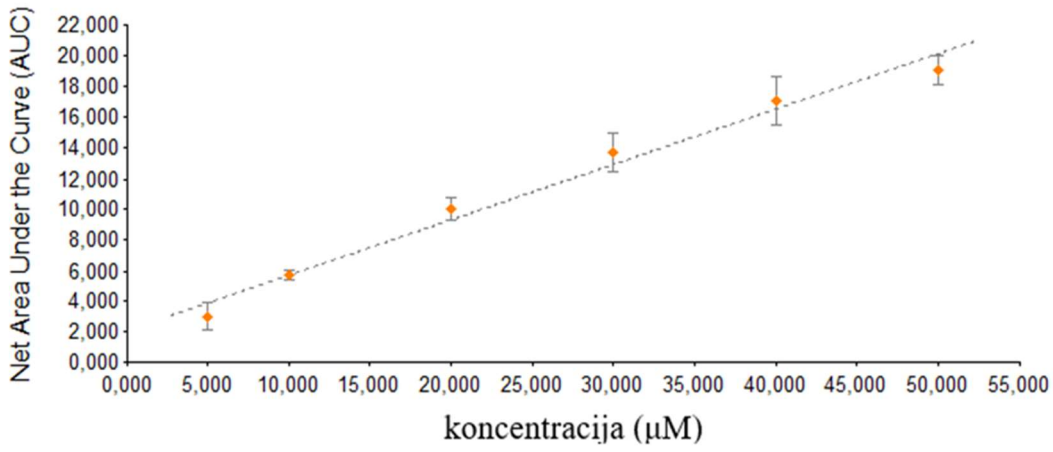
Ovom metodom se određuje antioksidacijski kapacitet uzorka praćenjem inhibicijskog djelovanja slobodnog peroksil radikala na fluorescentni spoj fluorescein. Promjene florescencije su čitane pomoću uređaja Tecan BioTek (Synergy HTX, Inc., Winooski, VT).[11]



Slika 3. Tecan BioTek[19]

Reagensi:

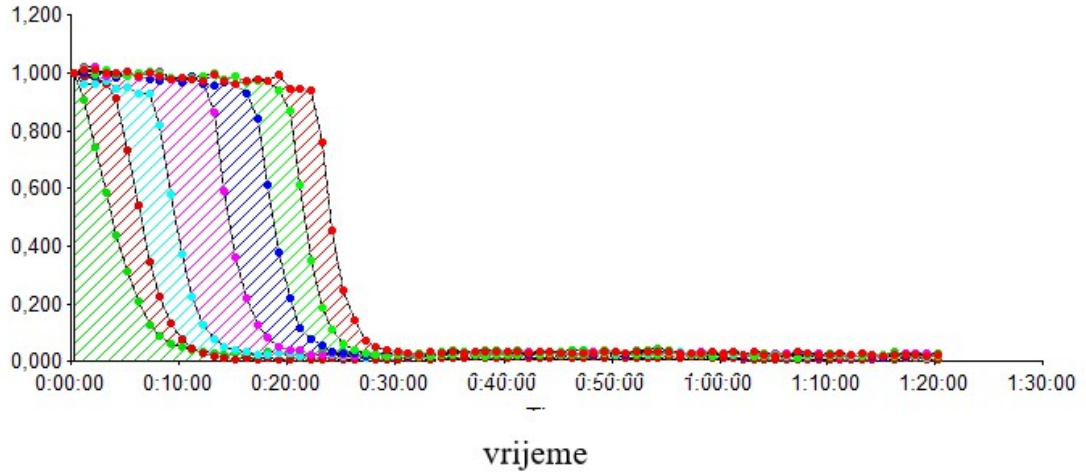
- ***Fosfatni pufer, pH=7, c=0,2 M:*** U zasebne odmjerne tikvice od 200 mL se odvaže 6,242 g natrijevog fosfata dihidrata ($NaH_2PO_4 \times 2H_2O$) i 5,687 g dinatrijevog hidrogenfosfata (Na_2HPO_4) te se iste nadopune do oznake destiliranom vodom. Potom se 61 mL 0,2 M otopine Na_2HPO_4 i 39 mL 0,2 M otopine $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$ pomiješa u novu tikvicu od 200 mL te se ista nadopuni do oznake.
- ***Fosfatni pufer, pH=7,4, c=0,075 M:*** U odmjernu tikvicu od 100 mL se doda 37,5 mL 0,2 M otopine fosfatnog pufera te se ista nadopuni destiliranom vodom do oznake. Svaki dan se priprema svježa otopina pufera.
- ***Fluorescein; Stock otopina (4,2 mM):*** Otopi se 15 mg fluoresceina u 100 mL 0,075 M fosfatnog pufera.
- ***Radna otopina fluoresceina (0,08 µM):*** Nadopuni se 1,9 µL stock otopine sa 100 mL 0,075 M fosfatnog pufera. Svaki dan se pripremaju svježa razrjeđenja otopina fluoresceina.
- ***AAPH:*** 0,207 g AAPH otopi se u 5 mL 0,075 M pufera. Svaki dan se priprema svježi reagens koji se priprema netom prije mjerenja i čuva u ledenoj kupelji.
- ***Otopina standarda – Trolox:*** Početna otopina Troloxa koncentracije 0,02 mM se pripravi otapanjem 0,25 g Troloxa u 50 mL 0,075 M fosfatnog pufera. Iz pripremljene 0,02 mM otopine Troloxa pripreme se razrjeđenja od 5-50 µM od kojih se izrađuje baždarna krivulja. Dobivena jednadžba pravca služi za određivanje antioksidacijskog kapaciteta i računanje ORAC vrijednosti izraženih u µM Trolox ekvivalenta (TE).



Slika 4. Baždarni pravac za otopine Trolox-a

Postupak:

U svaku jažicu mikrotitarske pločice doda se 150 µL fluoresceina i 25 µL uzorka. Uzorak predstavljaju 0,075 M fosfatni pufer za slijepu probu (blank), otopina standarda Troloxa za izradu baždarne krivulje i uzorci fenolnih kiselina. Tako pripremljene otopine se termostatiraju 30 minuta pri 37 °C. Nakon pola sata termostatiranja dodaje se 25 µL AAPH, te se svake minute mjeri promjena intenziteta fluorescencije pri λ_{eks} = 485 nm i λ_{em} = 520 nm.



Slika 5. Primjer izgleda normaliziranih rezultata korištenih za računanje ORAC vrijednosti Trolox standarda

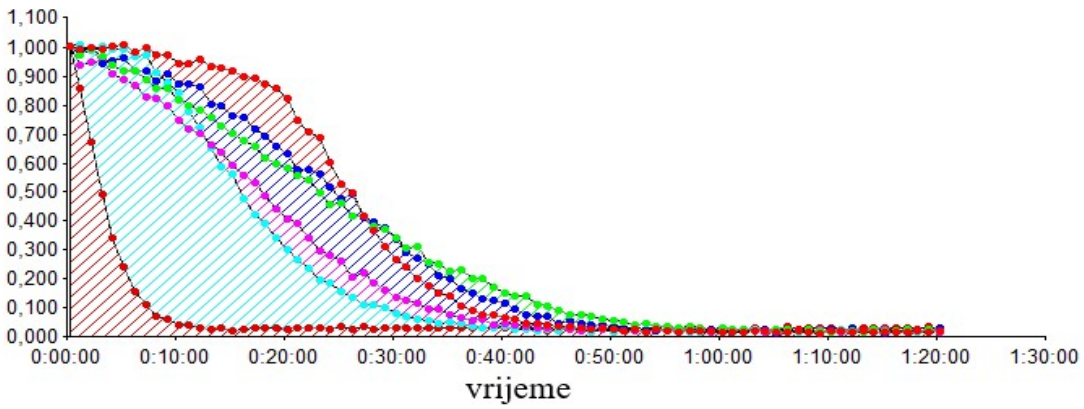
3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Rezultati određivanja antioksidacijskih svojstava fenolnih kiselina

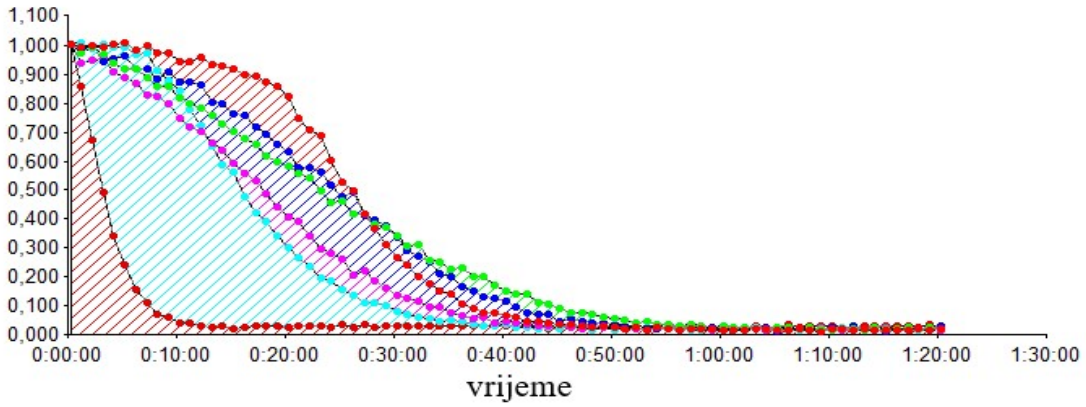
Za određivanje antioksidacijske aktivnosti fenolnih kiselina je korištena metoda ORAC. Ovom metodom određena je aktivnost pet derivata cimetne kiseline i to kava, sinapinske, ferulinske, *p*-kumarinske i ružmarinske, te pet derivata benzojeve kiseline: protokatehinske, siriginske, galne, vanilinske i gentisinske. Sve kiseline su testirane pri koncentraciji 2,5 i 5 µM, a dobiveni rezultati su prikazani u tablicama 4 i 5 te na slikama 6 i 7.

ORAC vrijednost se za određene kiseline povećanjem koncentracije s 2,5 na 5 µM nije značajno promjenila. Pri koncentraciji od 2,5 µM antioksidacijska aktivnost je rasla redom od *p*-kumarinske (19,9 µM TE), galne (22,7 µM TE), sinapinske (25,4 µM TE), vanilinske (25,6 µM TE), ferulinske (25,6 µM TE), siriginske (28,5 µM TE), gentisinske (28,5 µM TE), protokatehinske (30,0 µM TE), kava (31,3 µM TE) pa sve do ružmarinske (50,1 µM TE). Pri koncentraciji od 5 µM redoslijed je bio drugačiji: galna (28,0 µM TE), *p*-kumarinska (32,8 µM TE), siriginska (40,06 µM TE), sinapinska (44,3 µM TE), feulinska (44,9 µM TE), gentisinska (53,4 µM TE), vanilinska (55,7 µM TE), protokatehinska (57,0 µM TE), kava (59,7 µM TE) i ružmarinska (92,3 µM TE).

Iz grafičkog prikaza krivulja antioksidacijske aktivnosti testiranih kiselina (slika 6 i 7) u odnosu na slijepu probu (crvena linija na grafu) uočava se postojanje razlika u jačini djelovanja između testiranih kiselina kao i razlika između pojedinih skupina kiselina.



Slika 6. Primjer izgleda normaliziranih rezultata korištenih za računanje ORAC vrijednosti derivata benzojeve kiseline pri koncentraciji 5µM



Slika 7. Primjer izgleda normaliziranih rezultata korištenih za računanje ORAC vrijednosti derivata cimetne kiseline pri koncentraciji 5µM

Tablica 4. ORAC vrijednost za fenolne kiseline testirane pri koncentraciji 2,5 µM

	Spoj	**ORAC (µM TE)**
Derivati benzojeve kiseline	Protokatehinska kiselina	30,0 ± 0,92
	Vanilinska kiselina	25,6±0,74
	Gentisinska kiselina	28,5±1,37
	Siriginska kiselina	28,5±2,17
	Galna kiselina	22,7±1,08
Derivati cimetne kiseline	*p*-kumarinska kiselina	19,9±2,21
	Kava kiselina	31,3±1,58
	Ferulinska kiselina	25,6±2,17
	Sinapinska kiselina	25,4±1,28
	Ružmarinska kiselina	50,1±2,40

Među testiranim fenolnim kiselinama najslabiju antioksidacijsku aktivnost pokazale su *p*-kumarinska i galna kiselina pri obje testirane koncentracije. ORAC vrijednost za *p*-kumarinsku kiselinu pri koncentraciji od 2,5 μM iznosila je 19,9 μM TE, a pri koncentraciji od 5 μM 32,8 μM TE, dok je ORAC vrijednost za galnu kiselinu pri koncentraciji od 2,5 μM iznosila 22,7 μM TE, pri 5 μM 28,0 μM TE. Najbolji antioksidacijski učinak imala je ružmarinska kiselina (ester kava kiseline) koja je pri koncentraciji od 2,5 μM pokazala ORAC vrijednost od 50,1 μM TE, dok je kod koncentracije od 5 μM ona iznosila 92,3 μM TE.

Slabo antioksidacijsko djelovanje *p*-kumarinske kiseline može se pripisati prisutnosti samo jedne –OH skupine koju ova kiselina posjeduje, a osim toga poznato je da aktivnost ovisi i o rasporedu –OH (i -CH_3) skupina u molekuli. Stoga se dobra antioksidacijska aktivnost ružmarinske kiseline mogla i očekivati obzirom da ta kiselina posjeduje četiri –OH skupine u svojoj kemijskoj strukturi.

Tablica 5. ORAC vrijednost za fenolne kiseline testirane pri koncentraciji 5μM

	Spoj	**ORAC (μM TE)**
Derivati benzojeve kiseline	Protokatehinska kiselina	57,0±2,35
	Vanilinska kiselina	55,7±1,21
	Gentisinska kiselina	53,4±0,38
	Siriginska kiselina	40,06±0,93
	Galna kiselina	28,0±0,75
Derivati cimetne kiseline	*p*-kumarinska kiselina	32,8±1,36
	Kava kiselina	59,7±0,87
	Ferulinska kiselina	44,9±0,30
	Sinapinska kiselina	44,3±1,07
	Ružmarinska kiselina	92,3±1,93

Prema jačini djelovanja nakon ružmarinske kiseline slijede kava kiselina i protokatehinska kiselina, molekule s dvije –OH skupine na položajima 2 i 3. ORAC

vrijednost za kava i protokatehinsku kiselinu pri koncentraciji od 2,5 μM iznosila je oko 30 μM TE, dok je kod koncentracije od 5 μM iznosila oko 57-60 μM TE. Iako oba spoja posjeduju –OH skupine na istim položajima kava kiselina je imala nešto bolje djelovanje, što je u skladu s prethodnim QSAR analizama koje navode bolji antioksidacijski kapacitet derivata cimetne kiseline (zbog prisustva CHOCH-COOH grupe) u odnosu na derivate hidroksibenzojeve kiseline.[12]

Nešto slabiju antioksidacijsku aktivnost od kava i protokatehinske kiseline pokazale su ostale testirane kiseline pri koncentraciji od 2,5 μM (ORAC vrijednosti od 25-28,5 μM TE). Gentisinska kiselina posjeduje dvije –OH skupine, siriginska i sinapinska posjeduju jednu -OH skupinu i dvije $–OCH_3$ skupine, a vanilinska i ferulinska po jednu –OH i jednu $–OCH_3$ skupinu. Navedene kemijske strukture i razlike u položaju i broju aktivnih skupina nisu ukazale na značajne razlike pri nižoj testiranoj koncentraciji, dok kod koncentracije od 5 μM nešto bolji učinak pokazuju vanilinska i gentisinska kiselina u odnosu na ostale kiseline koje u svojoj strukturi uz -OH skupinu posjeduju i $–OCH_3$ skupinu.

4. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih rezultata može se izvesti nekoliko zaključaka:

- Rezultati ukazuju na velike razlike u antioksidacijskoj aktivnosti testiranih kiselina

- Najbolju antioksidacijsku aktivnost među testiranim fenolnim kiselinama pokazala je ružmarinska kiselina

- Najslabiju antioksidacijsku aktivnost od hidroksicimetnih kiselina imala je *p*-kumarinska, a od hidroksibenzojevih galna kiselina

- Fenolne kiseline s istim brojem i položajem reaktivnih skupina imale su sličnu antioksidacijsku aktivnost

- QSAR analizom se ne može u potpunosti povezati aktivnost testiranih spojeva s njihovom strukturom.

5. LITERATURA

1. Saxena M, Saxena J, Pradhan A. Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. Int J Pharm Sci Rev Res. 2012;16:130-134.
2. Laranjinha J, Vieira O, Madeira V, Almeida L. Two related phenolic antioxidants with opposite effects on vitamin E content in low density lipoproteins oxidized by ferryl myoglobin: Consumption vs regeneration. 1995;323:373-381.
3. Ikeda K, Tsujimoto K, Uozaki M, Nishide M, Suzuki Y, Koyauma AH, Yamasaki H. Inhibition of multiplication of herpes simplex virus by caffeic acid. Int J Mol Med. 2011;28:595-598.
4. Oskabe N, Yasuda A, Yoshikawa T. Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of Perilla frutescens extract in the murine two-stage skin model. 2004;33:798-806.
5. Huang DJ, Ou BX, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Food Chem. 2010;61:1-20
6. Furtado MA, de Almeida LCF, Furtado RA, Cunha WR, Tavares DC. Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. Mut Res 2008;675:150-154
7. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. J Agric Food Chem. 2005;1841-56
8. Prior RL. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits J Func Foods. 2015;18:797–810.
9. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J Agric Food Chem. 2005;53:4290-4302.
10. Badarinath AV, Mallikarjuna RA, Sudhana Chetty CM, Ramkanth S, Rajan TVS, Gnanaprakash K A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlatinos and considerations. Int J PharmTech Res. 2010;2:1276-1285.
11. Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well form. J Agric Food Chem. 2002;50:4437–4444.
12. Amorati R, Valgimigli L. Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. Free Rad Res. 2015;49:633-649.

13. Glazer, AN. Phycoerythrin-based assay for reactive oxygen species. Methods Enzymol. 1990;186:161-8.
14. Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen and radical scavenging test for antioxidants. Free Rad Biol Med.1993;14:303-11.
15. Cuvelier ME, H Richard, Berset C. Comparison of the Antioxidative Activity of Some Acid-Phenols: Structure-Activity Relationship. Biosci Biotech Biochem. 1992;56:324–325.
16. Pratt, Birac P. Source of antioxidant activity of soybean and soud products. Food Antioxidants. 1979;1720-2.
17. URL:http://www.pmf.unsa.ba/hemija/files/Katedra%20za%20organsku%20hemiju%20i%20biohemiju/Predmeti%20KOHBH/I_ciklus/IV_godina/Hemija_prirodnih_produkata/9-_Fenolske_kiseline_i_Kumarini_.pdf, Pristupljeno:19.09.2019.
18. URL:http://cruze.me/see/, Pristupljeno:19.09.2019.