Antioksidativna aktivnost modelnih otopina fenolnih tvari

Mikulinjak, Mateja

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:162285

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO – TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Mateja Mikulinjak

Antioksidativna aktivnost modelnih otopina fenolnih tvari

završni rad

Osijek, 2015.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

Nastavni predmet

Kemija hrane

Antioksidativna aktivnost modelnih otopina fenolnih tvari

Završni rad

Mentor: izv. prof. dr. sc. Mirela Kopjar

Studentica: Mateja Mikulinjak MB: 3631/12

Mentor: izv. prof. dr. sc. Mirela Kopjar

Predano:

Pregledano:

Ocjena:

Potpis mentora:

_____

Antioksidativna aktivnost modelnih otopina fenolnih tvari

Sažetak

U ovom radu ispitivalo se antioksidativno djelovanje otopina triju fenolnih tvari: katehina, kvercetina i galne kiseline. Antioksidativna aktivnost određena je ABTS, DPPH i FRAP metodama. Ispitivane su pojedinačne otopine fenolnih tvari (otopina katehina, otopina kvercetina, otopina galne kiseline) i kombinirane otopine fenolnih tvari (otopina katehina i kvercetina, otopina katehina i galne kiseline, otopina kvercetina i galne kiseline, otopina katehina, kvercetina i galne kiseline). Razlog kombiniranja fenolnih tvari bio je ispitati postoji li sinergijski efekt antioksidativnog djelovanja kombinacije fenolnih tvari. Utvrđeno je da je najveću antioksidativnu aktivnost određenu ABTS, DPPH i FRAP metodom imala otopina katehina, kvercetina i galne kiseline, dok je najmanja vrijednost antioksidativne aktivnosti otopina ovisila o primjenjenoj metodi. Sinergijski efekt, kod svih tri metoda, pokazuje otopina katehina i galne kiseline. Otopina katehina i kvercetina ni u jednoj metodi ne pokazuje sinergijski efekt.

Ključne riječi: fenolne tvari, antioksidativna aktivnost, katehin, kvercetin, galna kiselina, sinergijski efekt, ABTS, DPPH, FRAP metode

Antioxidant activity of model solutions of phenolic compounds

Summary

The aim of this work was investigation of the antioxidant activity of phenolic solution of three substances: catechins, quercetin and gallic acid. The antioxidant activity was determined by ABTS, DPPH and FRAP methods. Individual solutions of phenolic compounds (catechin solution, quercetin solution, gallic acid solution) and their combined solutions (catechins and quercetin solution, catechins and gallic acid solution, quercetin and gallic acid solution, catechins, quercetin and gallic acid solution) were investigated. The reason of combining phenolic substances was to examine whether there is a synergistic effect of antioxidant action of phenolic substances. It was found that the highest antioxidant activity determined by ABTS, DPPH and FRAP method had a solution of catechins, quercetin and gallic acid, while the minimum value of antioxidant activity depended on the method. The synergetic effect, in all three methods, showed the solution of catechin and gallic acid. Solution of catechin and quercetin didnt show a synergistic effect.

Keywords: phenolics, antioxidant activity, catechin, quercetin, gallic acid, synergistic effect, ABTS, DPPH, FRAP methods

Sadržaj

1. UVOD 1

2.TEORIJSKI DIO 2

2.1. Polifenoli 2

2.1.1. Klasifikacija polifenola 2

2.1.1.1. Fenolne kiseline 3

2.1.1.2. Flavonoidi 3

2.1.1.3. Polifenolni amidi 4

2.1.1.4. Ostali polifenoli 4

2.1.2. Antioksidativna aktivnost polifenola 5

2.2. Veza između strukture i antioksidativne aktivnosti 5

2.2.1. Hidroksilne grupe 6

2.2.2. O-metilacija 7

2.2.3. 2-3 dvostruka veza i 4-keto funkcija 7

2.2.4. Glikozidacija 7

2.2.5. Stupanj polimerizacije 7

2.3. Antioksidansi 8

3. EKSPERIMENTALNI DIO 10

3.1. Zadatak 10

3.2. Materijali i metode 11

3.2.1. Kemikalije 11

3.2.2. Priprema uzoraka 12

3.2.3. Metode 12

3.2.3.1. DPPH metoda 12
3.2.3.2. ABTS metoda 13
3.2.3.3. FRAP metoda 13
4. REZULTATI I RASPRAVA 14
4.1. Antioksidativna aktivnost modelnih otopina fenolnih tvari 14
4.2. Sinergijski efekt modelnih otopina fenolnih tvari 16
5. ZAKLJUČAK 19
6. LITERATURA 20

1. UVOD

U posljednje vrijeme sve više se ističe važnost spojeva koji nisu esencijalni za ljudsko zdravlje, ali pokazuju biološko djelovanje u ljudskom organizmu. Polifenolni spojevi su jedan od primjera takvih spojeva. Polifenolni spojevi kompleksne su građe te su iz tog razloga podjeljeni u brojne skupine od kojih se posebno ističu flavonoidi i fenolne kiseline. Važna karakteristika ovih spojeva je antioksidacijsko djelovanje koje je povezano s različitim fiziološkim djelovanjem u ljudskom organizmu, a iskazuje se hvatanjem slobodnih radikala te vezanjem metalnih iona. Njihovo antiupalno, antialergijsko i antikancerogeno djelovanje je razlog zbog kojeg su postali predmet brojnih istraživanja u posljednjih nekoliko desetljeća (Jakobek i sur., 2008.).

Cilj ovog rada je odrediti antioksidativnu aktivnost modelnih otopina fenolnih tvari pomoću ABTS, DPPH i FRAP metode. Fenolne tvari za koje su se ispitivanja provodila su: katehin, kvercetin i galna kiselina. Osim određivanja antioksidativne aktivnosti pojedinačnih otopina fenolnih tvari (otopina katehina, otopina kvercetina, otopina galne kiseline), cilj je bio i odrediti postoji li sinergijski efekt kod antioksidativnog djelovanja te su se ispitivanja provodila i na kombinacijama otopina fenolnih tvari (otopina katehina i kvercetina, otopina kvercetina i galne kiseline, otopina katehina i galne kiseline, otopina katehina, kvercetina i galne kiseline).

2.TEORIJSKI DIO

2.1. Polifenoli

Polifenoli su najveća skupina fitokemikalija, a najviše su zastupljeni u biljnoj hrani. Polifenoli imaju važnu ulogu za ljudsko zdravlje, posebice u prevenciji degenerativnih bolesti, osobito raka, kardiovaskularnih bolesti i neurodegenerativnih bolesti (Tsao, 2010.).

Antioksidacijsko svojstvo polifenola je uglavnom posljedica njihova redoks svojstva koje im omogućuje djelovanje kao redukcijsko sredstvo, donor vodika, uklanjanje slobodnih radikala, ali i inhibicija enzima koji povećavaju oksidacijski stres (Šubarić i sur., 2010.).

Polifenoli uključuju više od 8000 spojeva različite kemijske strukture, od jednostavnih hidroksimetilnih kiselina i antocijana (biljni pigmenti) do složenijih flavonoida i tanina čije je osnovno obilježje prisutnost jednog ili više hidroksiliranih benzenskih prstenova (Šubarić i sur., 2010.).

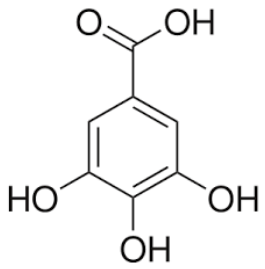
2.1.1. Klasifikacija polifenola

Polifenoli čine skupinu od oko 8000 različitih spojeva. Voće, povrće, cjelovite žitarice i druge vrste hrane i pića, kao što su čaj, čokolada i vina su bogat izvor polifenola. Raznolikost i široka distribucija polifenola u biljkama doveli su do različitih načina kategorizacije polifenola. Klasificirani su prema njihovim izvorima podrijetla, biološkim funkcijama i kemijskoj strukturi. Također, većina polifenola u biljkama postoje kao glikozidi s različitim jedinicama šećera i aciliranih šećera na različitim pozicijama polifenolnih kostura (Tsao, 2010.).

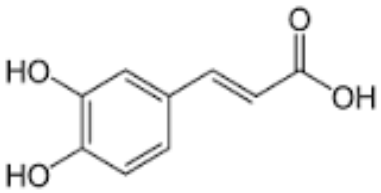
Prema kemijskoj strukturi aglikona, polifenoli se mogu klasificirati prema dolje navedenoj podjeli (Tsao, 2010.).

2.1.1.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su neflavonoidni polifenolni spojevi. Razlikujemo dvije glavne vrste fenolnih kiselina: derivati benzojeve kiseline (**Slika 1**) i derivati cinamične kiseline (**Slika 2**). Slobodne fenolne kiseline najćešće se nalaze u voću i povrću, a fenolne kiseline u vezanom obliku najćešće su u žitaricama i sjemenkama (Tsao, 2010.).



Slika 1 Galna kiselina (Web 1)



Slika 2 Kafeinska kiselina (Web 2)

2.1.1.2. Flavonoidi

Flavonoidi spadaju u skupinu polifenolnih spojeva koji se nalaze u mnogim biljkama, a posjeduju antioksidacijsku i antiradikalsku aktivnost (Kazazić, 2004.).

Osim što djeluju antibakterijsko, protuupalno, antialergijsko, antiviralno i antikancerogeno, flavonoidi doprinose boji i okusu hrane (Kazazić, 2004.).

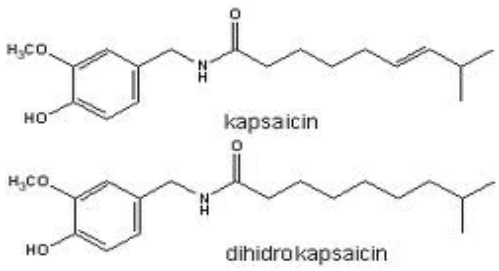
Flavonoidi imaju višestruko djelovanje poput sposobnosti sparivanja elektrona slobodnog radikala, ketalnog vezanja iona prijelaznih metala (Fe^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mg^{2+}), aktiviranja antioksidacijskih enzima i inhibiranja oksidaza (Kazazić, 2004.).

Povezanost između pojedinih strukturnih komponenata i svojstva hvatanja radikala, stvaranja ketalnih kompleksa i antioksidacijske aktivnosti omogućuje razumijevanje antioksidacijskog i prooksidacijskog djelovanja flavonoida (Kazazić, 2004.).

Flavonoidi su podijeljeni u nekoliko podgrupa: flavoni, flavonoli, flavanoni, izloflavoni, flavanonoli, flavani, flavanoli, halkoni, dihidrohalkoni, flavan-3,4-dioli te antocijani. U prirodi se flavonoidi nalaze uglavnom u obliku glikozida, tj. povezani su s različitim molekulama šećera (Kazazić, 2004.).

2.1.1.3. Polifenolni amidi

Polifenolni amidi su polifenoli koji sadrže N funkcionalne supstituente. To su komponente koje se nalaze u chili paprici i zobi te posjeduju antioksidativna i antiupalna svojstva (**Slika 3**) (Tsao, 2010.).

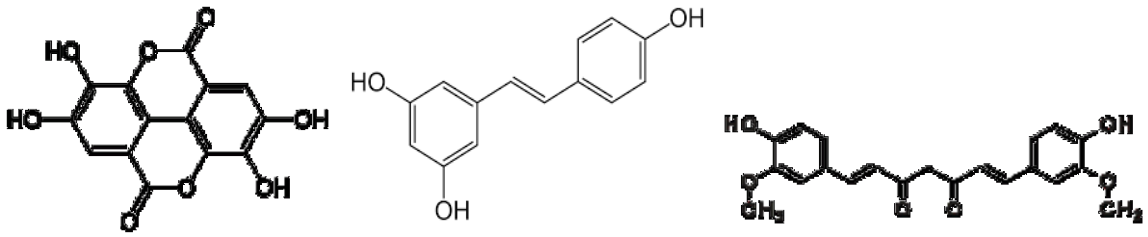


Slika 3 Polifenolni amidi (Web 3)

2.1.1.4. Ostali polifenoli

U hrani je zastupljeno nekoliko neflavonoida koji imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje. To su resveratrol, elaginska kiselina i njeni derivati, lignani, kurkumin i ružmarinska kiselina (**Slika 4**). Resveratrol se nalazi u grožđu i crnom vinu, elaginska kiselina i njeni derivati u bobičastom

voću i koži orašastih plodova, lignani u lanu, sezamu i mnogim žitaricama, a kurkumin je snažan antioksidans iz kurkume. Ružmarinska kiselina je dimer kafeinske kiseline, dok je elaginska kiselina dimer galne kiseline (Tsao, 2010.).



Slika 4 Lijevo - elaginska kiselina, sredina - resveratrol, desno - kurkumin (Web 4)

2.1.2. Antioksidativna aktivnost polifenola

Polifenoli su snažni antioksidansi koji nadopunjuju antioksidativne funkcije vitamina i enzima za obranu od oksidativnog stresa uzrokovanog viškom reaktivnih kisika (Tsao, 2010.). Najvažniji način djelovanja polifenola kao antioksidansa je hvatanje slobodnih radikala prilikom čega se prekidaju lančane reakcije slobodnih radikala. Da bi bili antioksidansi, polifenoli moraju u maloj koncentraciji bitno usporiti ili spriječiti reakciju oksidacije, a radikal koji iz njega nastaje mora biti stabilan. Stabilizacija radikala obično se postiže delokalizacijom elektrona, stvaranjem intramolekularnih vodikovih veza ili daljnjom reakcijom s drugim lipidnim radikalom. Osim hvatanja slobodnih radikala, polifenoli imaju još jedan način antioksidacijskog djelovanja, a to je interakcija flavonoida s drugim fiziološkim antioksidansima, npr. vitaminom C ili vitaminom E (Kazazić, 2004.).

2.2. Veza između strukture i antioksidativne aktivnosti

Antioksidativna aktivnost polifenola ovisi o kemijskoj strukturi i prostornom rasporedu supstituenata (Cao i sur., 1997.).

2.2.1. Hidroksilne grupe

Na jačinu antioksidativne aktivnosti flavonoida najviše utječe prostorni raspored substituenata, no i konfiguracija i broj hidroksilnih grupa imaju utjecaj na mehanizam antioksidativne aktivnosti (Cao i sur., 1997; Haenen i sur., 1997.; Sekher Pannala i sur., 2001; Burda i Oleszek, 2001.). Hidroksilne skupine prstena B posjeduju najveću sposobnost hvatanja reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta. Hidroksilne skupine prstena B doniraju vodik i elektron hidroksilnim i peroksidnim radikalima i tako stabiliziraju slobodne radikale, a nastaje relativno stabilan flavonoidni radikal (Kazazić, 2004.).

3'4'-katehol struktura B prstena pojačava inhibiciju oksidacije lipida. Takva struktura je najznačajnija odlika potencijalnih hvatača peroksil, superoksid i peroksinitril radikala. Na primjer, iako i luteolin i kampferol imaju jednaku hidroksilnu konfiguraciju, luteolin ima jaču sposobnost hvatanja peroksil radikala od kamferola zbog toga što kampferol nema B prsten katehola. Hvatanje peroksinitril radikala pomoću katehina također se pripisuje B prstenu katehola (Kerry i Rice-Evans, 1999.). Važnost drugih hidroksilnih grupa je manje jasna, ali osim što povećava ukupni broj OH grupa, A prsten vrlo malo doprinosi antioksidativnoj aktivnosti. Heterociklički dio flavonoida doprinosi antioksidativnoj aktivnosti tako što osigurava prisutnost slobodnih OH grupa i omogućava konjugaciju između aromatskih prstenova. S obzirom da su halkoni aktivni antioksidansi, zatvoreni C prsten nije neophodan za aktivnost flavonoida (Matthiesen i sur., 1997.). Hvatanje slobodnih radikala pomoću flavonoida jako ovisi i o slobodnoj 3-OH grupi (Burda i Oleszek, 2001.), tako da je utvrđeno da flavonoidi koji imaju slobodnu 3-OH grupu i 3´,4´-katehol strukturu posjeduju 10 puta jaču sposobnost hvatanja slobodnih radikala.

2.2.2. O-metilacija

Razlika u antioksidativnoj aktivnosti između polihidroksiliranih flavonoida i polimetoksiliranih flavonoida može se pripisati njihovoj razlici i u hidrofobnosti i molekularnoj planarnosti. O-metiliranje narušava planarnost, stoga je antioksidativna aktivnost manja u odnosu na polihidroksilirane flavonoide (Kazazić, 2004.).

2.2.3. 2-3 dvostruka veza i 4-keto funkcija

Prisustvo odnosno odsustvo nezasićene 2-3 dvostruke veze zajedno s 4-okso funkcijom je od vrlo velikog značenja. Flavonoidi kojima nedostaju ova dva obilježja slabiji su antioksidansi. Konjugacija između prstena A i B omogućava rezonancijsku stabilizaciju preko većeg broja aromatskih jezgra, čime se povećava stabilnost flavonoidnih radikala (Kazazić, 2004.).

2.2.4. Glikozidacija

Glikozidi pokazuju manju antioksidativnu aktivnost od samih aglikona. Antioksidacijska svojstva flavonskih glikozida smanjuju se s porastom glikozidnih skupina, a to se može vidjeti uspoređivajući luteolin (TEAC-vrijednost 2,1 mmol dm^{-3}) s njegovim 4'-mono (TEAC-vrijednost 1,7 mmol dm^{-3}) i 3',7-diglukozidom (TEAC-vrijednost 0,8 mmol dm^{-3}). Također, važnu ulogu ima i položaj u kojem se nalazi pojedina skupina, kao i struktura šećera (Kazazić, 2004.).

2.2.5. Stupanj polimerizacije

Antioksidativna aktivnost polimernih flavonoida je teško razumljiva. Procijanidni dimeri i trimeri su učinkovitiji nego monomeri kada su u pitanju superoksid anioni (Vennat i sur., 1994). Tetrameri su učinkovitiji nego trimeri kada su u pitanju peroksinitril i superoksid radikali, dok su heptameri i heksameri znatno učinkovitiji od trimera i tetramera (Vennat i sur., 1994).

2.3. Antioksidansi

Istraživanja su pokazala jasnu pozitivnu povezanost između unosa voća i povrća i smanjenog broja srčanih bolesti, tumora i drugih degenerativnih bolesti kao i usporavanja starenja (Kopjar, 2007.). Za sprječavanje ili usporavanje oksidativnog stresa potrebno je konzumirati određenu količinu antioksidansa koji štite stanične sustave od oksidacijskih oštećenja te u konačnici smanjuju rizik od kroničnih bolesti (Kaur i Kapoor, 2001.).

Antioksidansi su tvari koje usporavaju procese oksidacije u organizmu, neutraliziraju slobodne radikale i na taj način kontroliraju procese starenja i razvoj kroničnih bolesti (Shahidi i Zhong, 2007.). Uz prirodne antioksidanse razvijeni su i sintetski antioksidansi koji se u praksi koriste kao aditivi, nadomjesci i lijekovi, ali je opće prihvaćena činjenica da su prirodni antioksidansi vrijedniji, učinkovitiji i sigurniji od sintetskih. Antioksidativna aktivnost ovisi ne samo o strukturnim svojstvima antioksidansa već i o mnogim drugim čimbenicima kao što su temperatura, svjetlost, tip supstrata, fizikalno stanje sistema, kao i o brojnim mikrokomponentama koje djeluju kao prooksidansi ili sinergisti (Yanishlieva-Maslarova i Heinonen, 2001.).

Antioksidansi u hrani definiraju se kao bilo koji sastojak koji posjeduje sposobnost odgađanja, zaustavljanja ili spriječavanja kvarenja hrane ili stvaranja nepoželjne arome kao posljedice oksidacije, no ukoliko se antioksidans doda nakon kvarenja, njegov je učinak zanemariv (Kopjar, 2007.). S obzirom na način na koji inhibiraju oksidaciju postoje dva tipa antioksidansa, primarni i sekundarni. Primarni inhibiraju oksidaciju uklanjanjem slobodnih radikala, dok sekundarni inhibiraju oksidaciju mehanizmom koji ne uključuje direktno uklanjanje slobodnih radikala te poprimaju antioksidativnu aktivnost samo u prisustvu neke druge manje komponente. Mehanizam djelovanja koje imaju sekundarni antioksidansi su: vezanje metalnih iona, vezanje kisika, pretvaranje hidroperoksida u ne-radikalske vrste, apsorpcija UV radijacije i deaktivacija singleton kisika (Pokorny, 2001.). U primarne spadaju fenolne tvari, a u sekundarne limunska kiselina koja postaje aktivna samo u prisustvu metalnih iona te askorbinska kiselina koja postaje aktivna u prisustvu tokoferola ili nekih drugih primarnih antioksidanasa (Kopjar, 2007.).

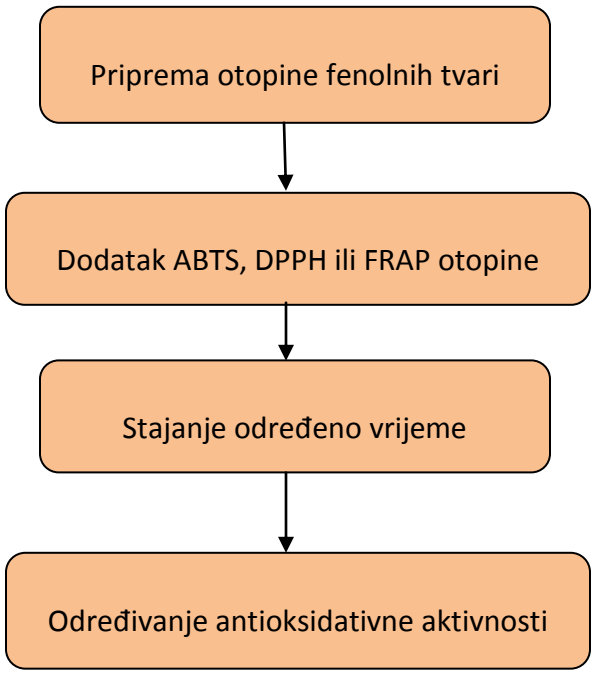
Ulja, masti i hrana na bazi lipida degradira se kroz nekoliko reakcija na koje utječu zagrijavanje i dugotrajno skladištenje. Oksidacija i razgradnja oksidacijskih produkata spadaju u glavne reakcije degradacije. Postoje različiti načini da se inhibira oksidacija koja dovodi do smanjenja nutritivne vrijednosti i senzorske kvalitete, a to su: uklanjanje kisika, upotreba niskih temperatura, inaktivacija enzima koji kataliziraju oksidaciju, upotreba prikladne ambalaže ili upotreba specifičnih aditiva koji inhibiraju oksidaciju. Ovi inhibitotri oksidacije predstavljaju skupinu tvari različite kemijske strukture i različitog mehanizma djelovanja, a danas su poznatiji pod nazivom antioksidansi (Kopjar, 2007.).

Antioksidansi u reakciji sa slobodnim radikalima lipida tvore inaktivne produkte. Aditivi s ovim mehanizmom djelovanja su antioksidansi u pravom smislu. Oni obično reagiraju s peroksi ili alkoksi slobodnim radikalima koji nastaju raspadanjem lipidnih hidroperoksida. Osim njih postoje i inhibitori koji stabiliziraju lipidne hidroperokside sprečavajući njihovo raspadanje na slobodne radikale. Raspadanje hidroperoksida je katalizirano teškim metalima koji djeluju kao helirajući agensi inhibirajući oksidaciju. Tvari kao što su sinergisti osim što posjeduju antioksidativnu aktivnost, mogu i poboljšati aktivnost pravih antioksidanasa. Za razgradnju lipidnih hidroperoksida odgovorna je druga grupa spojeva koja prilikom razgradnje ne stvara slobodne radikale već smanjuje njihov sadržaj. Razlika između singleton kisika i triplet kisika je u tome što singleton kisik oksidira lipide mnogo brže te iz tog razloga tvari koje ga vežu imaju važan inhibirajući učinak na oksidaciju lipida (Kopjar, 2007.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak

Zadatak ovog rada bio je ispitati antioksidativnu aktivnost modelnih otopina fenolnih tvari DPPH metodom, ABTS metodom i FRAP metodom te utvrditi postoji li sinergijski efekt antioksidativne aktivnosti kada su u otopini prisutne dvije, odnosno tri različite fenolne tvari (**Slika 5**).



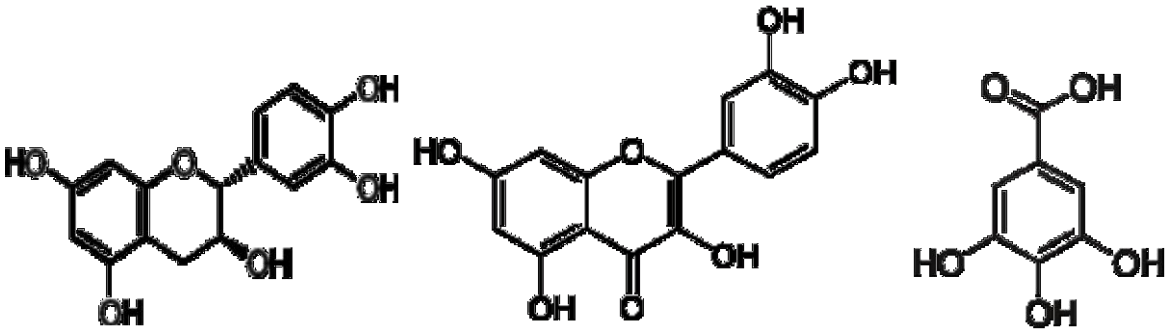
Slika 5 Shematski prikaz rada

3.2. Materijali i metode

3.2.1. Kemikalije

Kemikalije koje su se koristile za određivanje antioksidativne aktivnosti modelnih otopina fenolnih tvari su:

- katehin
- kvercetin
- galna kiselina
- ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenztiazolin-6-sulfonat))
- DPPH (2,2,-difenil-1-pikrilhidrazil)
- TPTZ (2,4,6,-tri (2-piridil)-s-triazin)



Slika 6 Katehin (lijevo), kvercetin (sredina), galna kiselina (desno) (Kazazić, 2004.)

3.2.2. Priprema uzoraka

Pripremljeno je 7 različitih uzoraka da bi se ispitala antioksidativna aktivnost, to su otopine:

- katehina (K)
- kvercetina (Q)
- galne kiseline (G)
- katehina i kvercetina (KQ)
- katehina i galne kiseline (KG)
- kvercetina i galne kiseline (QG)
- katehina, kvercetina I galne kiselina (KQG)

3.2.3. Metode

Metode koje su se koristile da bi se odredila antioksidativnost modelnih otopina fenolnih tvari su:

- DPPH metoda
- ABTS metoda
- FRAP metoda

Za svaki uzorak provedena su 3 mjerenja, a rezultati su prikazani preko trolox-a kao standarda.

3.2.3.1. DPPH metoda

Ova metoda temelji se na reaktivnosti ispitivanog spoja sa stabilnim slobodnim radikalom. DPPH jako apsorbira u vidljivu dijelu spektra (ljubičasta boja) pri valnoj duljini 517 nm, a razlog tome je nespareni elektron DPPH-a (Kazazić, 2004.).

Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka i 3 mL otopine DPPH, dobro promiješa i reakcijska smjesa se ostavi stajati 15 minuta. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 517 nm. Za slijepu probu umjesto uzorka dodan je metanol.

3.2.3.2. ABTS metoda

U ABTS metodi prati se raspadanje radikala $ABTS^{\cdot+}$ koji nastaje oksidacijom 2,2`azinobis(3-etilbenzotiazilin-6-sulfonat) (ABTS) djelovanjem fenolnih tvari. U odsustvu fenolnih tvari, $ABTS^{\cdot+}$ je relativno stabilan, ali brzo reagira u prisustvu donora H^+ te prelazi u neobojeni oblik ABTS-a (Arnao i sur., 2001.).

Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka te se doda 3,2 mL otopine ABTS. Nakon što se dobro promiješa, smjesa se ostavi u mraku na 1 sat i 35 minuta da bi odreagirala. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 734 nm.

3.2.3.3. FRAP metoda

Metoda se temelji na redukciji Fe^{3+} iona u Fe^{2+} ion u prisutnosti antioksidansa. Nastali Fe^{2+} ion u prisutnosti TPZT reagensa formira intenzivno obojeni kompleks koji pokazuje maksimum apsorpcije pri 593 nm.

Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka i 3 mL FRAP otopine. Nakon što se dobro promiješa smjesa se ostavi stajati 30 minuta. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri 593 nm. Za slijepu probu umjesto uzorka dodana je voda.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Antioksidativna aktivnost modelnih otopina fenolnih tvari

Rezultati antioksidativne aktivnosti modelnih otopina fenolnih tvari određeni ABTS, DPPH i FRAP metodom prikazani su u **Tablici 1**.

Tablica 1 Antioksidativna aktivnost modelnih otopina fenola određena ABTS, DPPH i FRAP metodama (μmolTE/100 mL)

uzorci	ABTS	DPPH	FRAP
K	384,940 ± 4,17	172,39 ± 4,694	194,075 ± 10,942
Q	498,749 ± 10,76	236,564 ± 3,097	104,873 ± 2,820
G	500,384 ± 28,259	238,04 ± 17,447	186,454 ± 7,679
KQ	881,443 ± 53,138	394,289 ± 18,287	242,519 ± 24,247
KG	930,922 ± 20,901	437,992 ± 29,016	404,640 ± 37,766
QG	898,777 ± 20,986	441,476 ± 19,692	295,658 ± 48,823
KQG	1250,448 ± 21,999	624,755 ± 23,885	530,868 ± 43,758

Usporedbom vrijednosti antioksidativne aktivnosti za svaki uzorak vidljivo je da ABTS metoda pokazuje najviše vrijednosti, iza nje slijedi DPPH metoda, koja pokazuje nešto manje vrijednosti, dok FRAP metoda pokazuje najmanje vrijednosti antioksidativne aktivnosti za iste uzorke. Odstupaju jedino vrijednosti za otopinu katehina (K) kod koje su FRAP metodom dobivene veće vrijednosti nego DPPH metodom.

Najveća antioksidativnu vrijednost, bilo da je ona određena ABTS, DPPH ili FRAP metodom, ima otopina katehina, kvercetina i galne kiseline (ABTS = 1250,448 µmolTE/100 mL, DPPH = 624,755 µmolTE/100 mL, FRAP = 530,868 µmolTE/100 mL), dok najniža vrijednost antioksidativne aktivnosti varira ovisno o metodi. Kod ABTS i DPPH metode najnižu vrijednost imala je otopina katehina (ABTS = 384,94 µmolTE/100 mL, DPPH = 172, 39 µmolTE/100 mL), a kod FRAP metode otopina kvercetina (104, 873 µmolTE/100 mL).

Što se tiče poretka otopina fenolnih tvari prema njihovim vrijednostima antioksidativne aktivnosti razlikuje se, ali vrlo malo.

Poredak kod ABTS metode je: najmanju vrijednost ima katehin pa slijede kvercetin, galna kiselina, kombinacija katehina i kvercetina, kombinacija kvercetina i galne kiseline, kombinacija katehina i galne kiseline, dok kombinacija triju fenolnih tvari ima najvišu vrijednost.

Poredak kod DPPH metode isti je za pojedinačne otopine fenolnih tvari, ali se razlikuje u poretku za kombinaciju otopina fenolni tvari, tj. otopina katehina i galne kiseline imala je manju vrijednost antioksidativne aktivnosti od otopine kvercetina i galne kiseline te je poredak sljedeći: katehin sa najmanjom vrijednošću pa slijede kvercetin, galna kiselina, kombinacija katehina i kvercetina, kombinacija katehina i galne kiseline, kombinacija kvercetina i galne kiseline te kombinacija katehina, kvercetina i galne kiseline s najvišom vrijednoti.

Poredak kod FRAP metode najviše se razlikuje za pojedinačne otopine fenolnih tvari dok je za kombinacije otopina fenolnih tvari ista kao i kod ABTS metode te izgleda ovako: kvercetin, galna kiselina, katehin, kombinacija katehina i kvercetina, kombinacija kvercetina i galne kiseline, kombinacija katehina i galne kiseline, kombinacija katehina, kvercetina i galne kiseline.

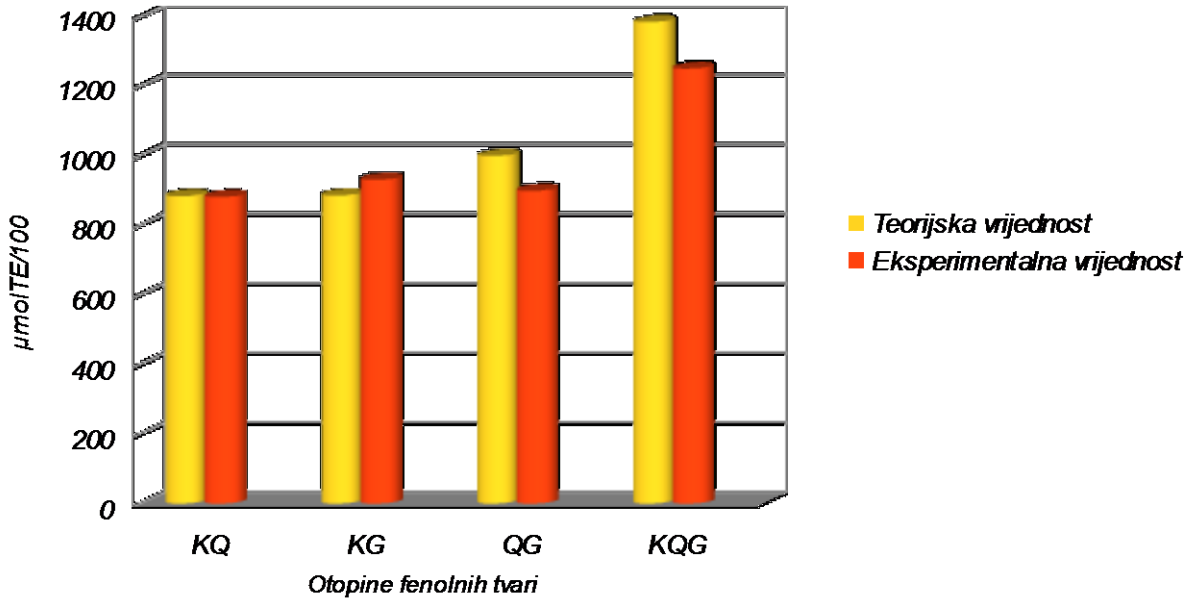
4.2. Sinergijski efekt modelnih otopina fenolnih tvari

Da bismo odredili je li došlo do sinergijskog efekta antioksidativne aktivnosti fenolnih tvari kada su u otopini prisutne dvije odnosno tri fenolne tvari, potrebno je usporediti teorijsku i eksperimentalnu vrijednost antioksidativne aktivnosti. Teorijske vrijednosti antioksidativne aktivosti za otopine sa dvije odnosno tri fenolne tvari dobivene su zbrajanjem eksperimentalno dobivenih vrijednosti antioksidativne aktivnosti pojedinačnih otopina fenolnih tvari. U slučaju da je teorijska vrijednost manja od eksperimentalno dobivene vrijednosti zaključuje se da je došlo do sinergijskog efekta fenolnih tvari kada su prisutne zajedno u otopini.

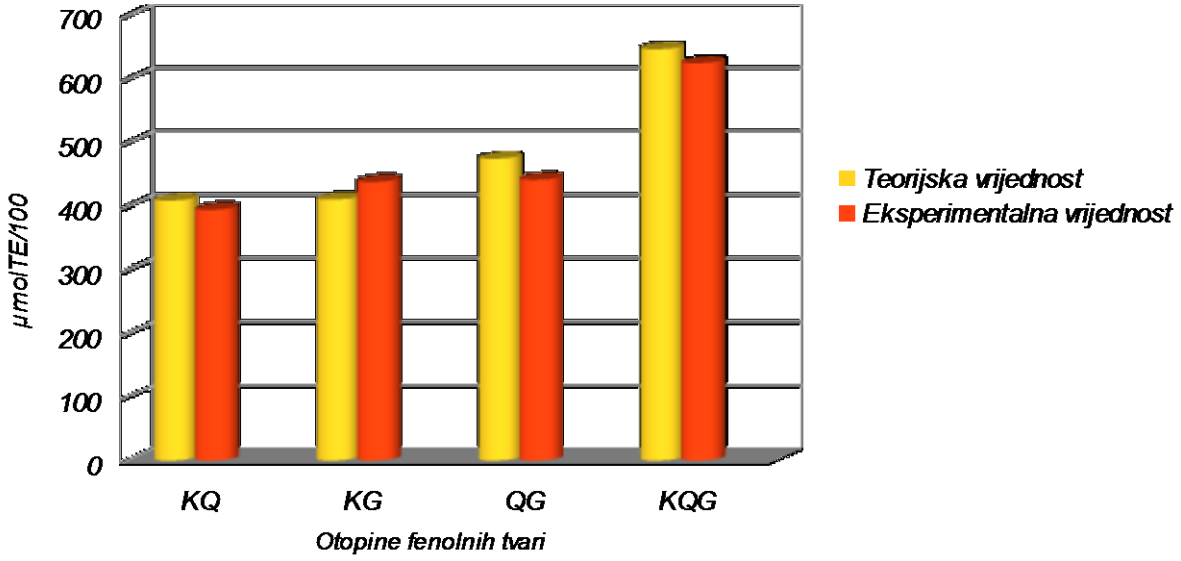
Na grafovima (**Slika 7 - 9**) prikazane su teorijske i eksperimentalne vrijednosti za antioksidativnu akivnost za otopine: katehina i kvercetina, katehina i galne kiseline, kvercetina i galne kiseline te katehina, kvercetina i galne kiseline. Iz grafova je vidljivo da postoje sinergijski efekti antioksidativne aktivnosti kod ABTS metode za otopinu katehina i galne kiseline, kod DPPH metode također, za otopinu katehina i galne kiseline, dok za FRAP metodu postoje sinergijski efekti za tri otopine: otopinu katehina i galne kiseline, otopinu kvercetina i galne kiseline, otopinu katehina, kvercetina i gane kiseline.

U FRAP metodi najveći sinergijski efekt ima otopina katehina, kvercetina i galne kiseline, dok ukupno gledajući, najveći sinergijski efekt ima otopina katehina i galne kiseline u ABTS metodi.

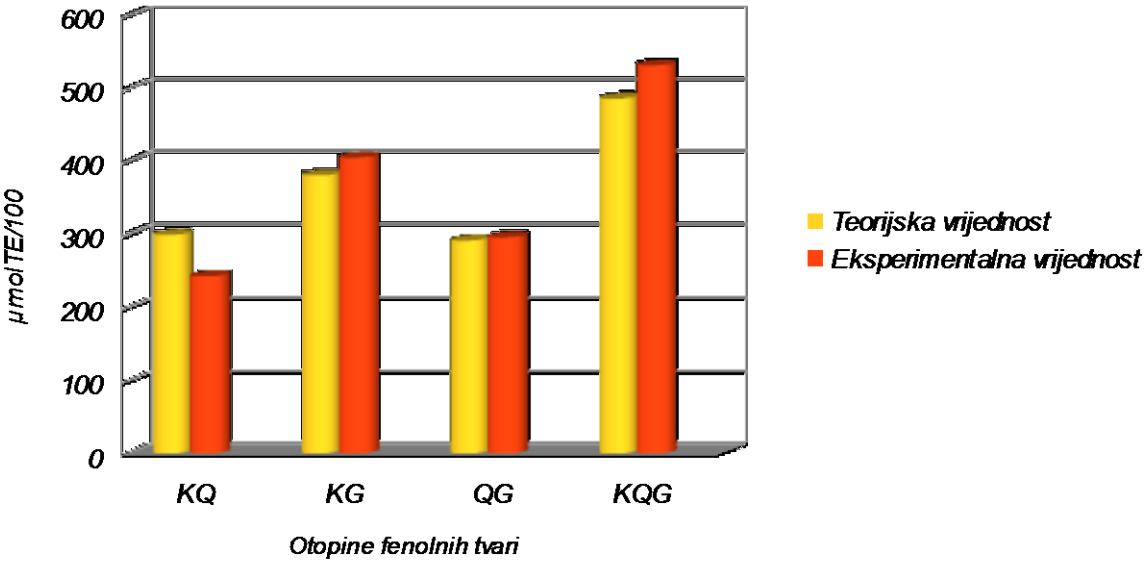
Zajedničko u svim metodama je da otopina katehina i kvercetina ne pokazuje sinergijski efekt ni u jednoj metodi, a otopina katehina i galne kiseline pokazuje sinergijski efekt antioksidativne aktivnosti u svim metodama.



Slika 7 Teorijske i eksperimentalne vrijednosti antioksidativne aktivnosti, ABTS metoda



Slika 8 Teorijske i eksperimentalne vrijednosti antioksidativne aktivnosti, DPPH metoda



Slika 9 Teorijske i eksperimentalne vrijednosti antioksidativne aktivnosti, FRAP metoda

5. ZAKLJUČAK

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da najvišu antioksidativnu aktivnost ima otopina katehina, kvercetina i galne kiseline. Uspoređivanjem vrijednosti antioksidativne aktivnosti pojedinačnih otopina kod ABTS i DPPH metode, najvišu vrijednost ima galna kiselina, zatim kvercetin pa katehin. Kod FRAP metode najvišu vrijednost ima otopina katehina, zatim otopina galne kiseline pa kvercetina. Antioksidativna aktivnost otopina kombinacijom dviju fenolnih tvari u svim metodama pokazuje različit redoslijed.

Ni jednom od metoda nije utvrđen sinergijski efekt otopine katehina i kvercetina, dok najviši sinergijski efekt pokazuje otopina katehina i galne kisline kod svih metoda. Ostale kombinacije, tj. otopine kvercetina i galne kiseline te otopina katehina, kvercetina i galne kiseline pokazuju sinergijski efekt jednom metodom.

6. LITERATURA

Arnao MB, Cano A, Acosta M: The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. Food Chemistry 73:239-244, 2001.

Burda S, Oleszek W: Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49:2774–2779, 2001.

Haenen GR, Paquay JB, Korthouwer RE, Bast A: Peroxynitrite scavenging by flavonoids. Biochemical and Biophysical Research Communications, 236:591–593, 1997.

Jakobek L, Šeruga M, Novak I, Medvidović-Kosanović M, Lukačević I: Antioksidacijska aktivnost polifenola iz borovnice i jagode, Pomologia Croatica, 14, 13-25, 2008.

Kaur C, Kapoor HC: Antioxidants in fruits and vegetables – the millenium's healt. Interernational Journal of Food Science and Technology, 2001.

Kazazić SP: Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. Arhiva Higijene Rada i Toksikologije 55:279-290, 2004.

Kerry N, Rice-Evans C: Inhibition of peroxynitrite-mediated oxidation of dopamine by flavonoid and phenolic antioxidants and their structural relationships. Journal of Neurochemistry, 73:247–253, 1999.

Kopjar, M: Utjecaj dodataka trehaloze na kvalitetu paste od jagoda, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.

Matthiesen L, Malterud KE, Sund RB: Hydrogen bond formation as basis for radical scavenging activity: a structure-activity study of C-methylated dihydrochalcones from Myrica gale and structurally related acetophenones. Free Radical Biology and Medicine, 2:307–311, 1997.

Pokorny J: Antioxidants in food. Woodhead Publishing Ltd, 2001.

Rein MJ: Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. Disertacija. Sveučilište Helsinki, Helsinki, 2005.

Sekher Pannala A, Chan TS, O'Brien PJ, Rice-Evans CA: Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. Biochemical and Biophysical Research Communications, 282:1161–1168, 2001.

Shahidi F, Zhong, Y: Measurment of Antioxidant Activity in Food and Biological Systems. U Antioxidant Measurment an Applications (Shahidi, F., Ho, C.H., ured.), American Chemical Society, Washington, 2007.

Šubarić D, Kopjar M, Ačkar Đ: Polifenoli i zdravlje. U Zbornik radova i sažetaka sa međunarodnog seminara „Dodaci prehrani u zdravlju i bolesti". Tuzla, 32-39, 2010.

Tsao, R: Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols, Nutrients 2(12): 1231-1246, 2010.

Vennat B, Bos MA, Pourrat A, Bastide P: Procyanidins from tormentil: fractionation and study of the anti-radical activity towards superoxide anion. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 17:1613–1615, 1994.

Web 1 http://www.wikiwand.com/bs/Tanin, preuzeto 25.9.2015.

Web 2 http://www.wikiwand.com/sr/Kofeinska_kiselina, preuzeto 25.9.2015.

Web 3 http://eskola.chem.pmf.hr/odgovori/odgovor.php3?sif=831, preuzeto 25.9.2015.

Web 4 http://www.rdchemicals.com/chemicals.php?mode=details&mol_id=7762, preuzeto 25.9.2015.

Web 4 http://www.wikiskripta.eu/index.php/Chinoidní_barviva, preuzeto 25.9.2015.

Web 4 https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Resveratrol_trans.png, preuzeto 25.9.2015.

Yanishlieva-Maslarova NV, Heinonen IM: Sources of natural antioxidants: vegetables, fruits, herbs, spices and teas. U Antioxidants in food. Woodhead Publishing Ltd, 2001.