

Antioksidativna aktivnost modelnih otopina fenolnih tvari s dodatkom trehaloze

Šrajbek, Žaklina

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:109:804235>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-23**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO – TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Žaklina Šrajbek

Antioksidativna aktivnost modelnih otopina fenolnih tvari s
dodatkom trehaloze

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 s dodatkom trehaloze**

Završni rad

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

Studentica: Žaklina Šrajbek

MB: 3672/12

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

Predano:

Pregledano:

Ocjena:

Potpis mentora:

Antioksidativna aktivnost modelnih otopina fenolnih tvari s dodatkom trehaloze

Sažetak

Cilj ovog rada bio je odrediti antioksidativnu aktivnost modelnih otopina fenolnih tvari s dodatkom trehaloze te utvrditi postoji li sinergijski učinak modelnih otopina kombinacijom fenolnih tvari s dodatkom trehaloze. Antioksidativna aktivnost određena je ABTS, DPPH i FRAP metodom. Usporedbom eksperimentalnih vrijednosti s teorijski izračunatim vrijednostima antioksidativne aktivnosti utvrđeno je dolazi li do sinergijskog učinka. Najveću antioksidativnu aktivnost, određenu ABTS, DPPH i FRAP metodom, pokazuje modelna otopina katehina, kvercetina i galne kiseline s trehalozom, a najmanju antioksidativnu aktivnost pokazuje otopina galne kiseline s trehalozom. Sinergijski učinak, kod svih tri metoda, pokazuje modelna otopina katehina i galne kiseline s trehalozom, dok ni jednom metodom nije dokazan sinergijski učinak modelne otopine katehina i kvercetina s trehalozom.

Ključne riječi: katehin, kvercetin, galna kiselina, trehaloza, antioksidativna aktivnost, sinergijski učinak, DPPH, ABTS, FRAP

Antioxidant activity of model solution of phenolic compounds with trehalose addition

Summary

The aim of this work was to determine the antioxidant activity of model solutions of phenolic compounds with addition of trehalose and determined the synergistic effect of combination of model solutions of phenolic compounds with the addition of trehalose. The antioxidant activity was determined by ABTS, DPPH and FRAP method. By comparing the experimental value with the theoretical, calculated value of antioxidant activity, it was determined whether the synergistic effect exist. The highest antioxidant activity, with ABTS, DPPH and FRAP method, had a model solution of catechin, quercetin and gallic acid with trehalose, and the lowest antioxidant activity had a solution of gallic acid with trehalose. With all three methods, synergistic effect was observed for a model solution of catechin and gallic acid with trehalose, while a model solution of catechin and quercetin with trehalose did not show synergistic effect.

Keywords: catehin, quercetin, gallic acid, trehalose, antioxidant activity, synergistic effect, DPPH, ABTS, FRAP method

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Polifenoli.....	2
2.2. Struktura polifenolnih spojeva	2
2.2.1. <i>Flavonoidi</i>	2
2.2.2. <i>Neflavonoidi</i>	4
2.3. Antioksidativna aktivnost.....	4
2.4. Veza između strukture polifenola i antioksidativne aktivnosti	5
2.4.1. <i>Hidroksilna skupina</i>	5
2.4.2. <i>2,3-dvostruka veza i 4-keto-skupina</i>	7
2.4.3. <i>O-metiliranje</i>	7
2.4.4. <i>Glikozidacija</i>	7
2.4.5. <i>Stupanj polimerizacije</i>	7
2.5. Trehaloza	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	9
3.1. Zadatak.....	9
3.2. Materijali i metode	10
3.2.1. <i>Kemikalije</i>	10
3.2.2. <i>Priprema uzorka</i>	10
3.2.3. <i>DPPH metoda</i>	11
3.2.4. <i>ABTS metoda</i>	11
3.2.5. <i>FRAP metoda</i>	12
4. REZULTATI I RASPRAVA	14
4.1. Antioksidativna aktivnost modelnih otopina fenolnih tvari s dodatkom trehaloze .	14
4.2. Sinergijski učinak modelnih otopina fenolnih tvari s dodatkom trehaloze	16
4.2.1. <i>Sinergijski učinak ispitan ABTS metodom</i>	16
4.2.2. <i>Sinergijski učinak ispitan DPPH metodom</i>	17
4.2.3. <i>Sinergijski učinak ispitan FRAP metodom</i>	17
5. ZAKLJUČAK	19
6. LITERATURA	20

1. UVOD

Vrlo važnu ulogu u ljudskom organizmu imaju antioksidansi, tvari koje neutraliziraju slobodne radikale i na taj način kontroliraju procese starenja i razvoj kroničnih bolesti (Shahidi i Zhong, 2007.). Jedna od najmnogobrojnijih skupina antioksidansa su polifenolni spojevi. Osim mnogih pozitivnih učinaka na ljudski organizam, polifenoli posjeduju razne pozitivne učinke na svojstva hrane. Od nositelja boje i zaštitne uloge od insekata kod biljaka, polifenoli se dodaju u prehrambene proizvode s ciljem povećanja nutritivne vrijednosti. S obzirom da polifenolni spojevi utječu na kvalitetu prehrambenih proizvoda, važno je poznavati njihovu stabilnost tijekom procesiranja i skladištenja prehrambenih proizvoda. Čimbenici koji utječu na stabilnost polifenola je prisutstvo kisika, svjetlosti, temperatura, pH vrijednost, sastav hrane te mnogi drugi (Gharras, 2009.). Zbog svoje izuzetno velike antioksidativne moći, polifenolni spojevi privlače pozornost mnogih znanstvenika. Zbog toga, broj polifenolnih spojeva raste iz dana u dan (Kazazić, 2004.).

Cilj rada je odrediti antioksidativnu aktivnost modelnih otopina fenolnih tvari: katehina, kvercetina i galne kiseline s dodatkom trehaloze te utvrditi postoji li sinergijski učinak njihovih kombinacija. Antioksidativna aktivnost ispitivanih otopina određena je ABTS, DPPH te FRAP metodama. Na temelju dobivenih vrijednosti izračunate su teorijske vrijednosti antioksidativne aktivnosti otopina pojedinačnih fenolnih spojeva, pomoću kojih je utvrđeno da li postoji sinergijski učinak u otopinama s kombinacijom fenolnih spojeva.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Polifenoli

Jedna od najmnogobrojnijih skupina fitokemikalija u prirodi jesu polifenoli, sekundarni metaboliti biljaka u kojima obavljaju najrazličitije uloge. Od vrlo jednostavnih spojeva antocijana koji su zaslužni za boju biljaka, do vrlo složenih spojeva tanina koji su važni za zaštitu od insekata, polifenoli danas broje preko 8000 spojeva (Šubarić i sur., 2010). U biljkama ovi spojevi djeluju antimikrobno, kao fotoreceptori, kao agensi za privlačenje pozornosti (Kazazić, 2004.), no zanimanje za tim spojevima raste upravo zbog njihove antioksidativne aktivnosti (Kazazić, 2004.; Gharras, 2009.). Polifenolni spojevi su najrašireniji antioksidansi u ljudskoj prehrani. Nalaze se u voću, povrću, cjelovitim žitaricama, začinicima i nekim pićima kao što su čaj i vino. Posebno bogato polifenolnim spojevima je bobičasto voće (Seeram i Heber, 2007.). Ovi spojevi u našem organizmu pokazuju antibakterijski, antialergijski, sedativni, antimutageni učinak te imaju druga pozitivna djelovanja (Kazazić, 2004.).

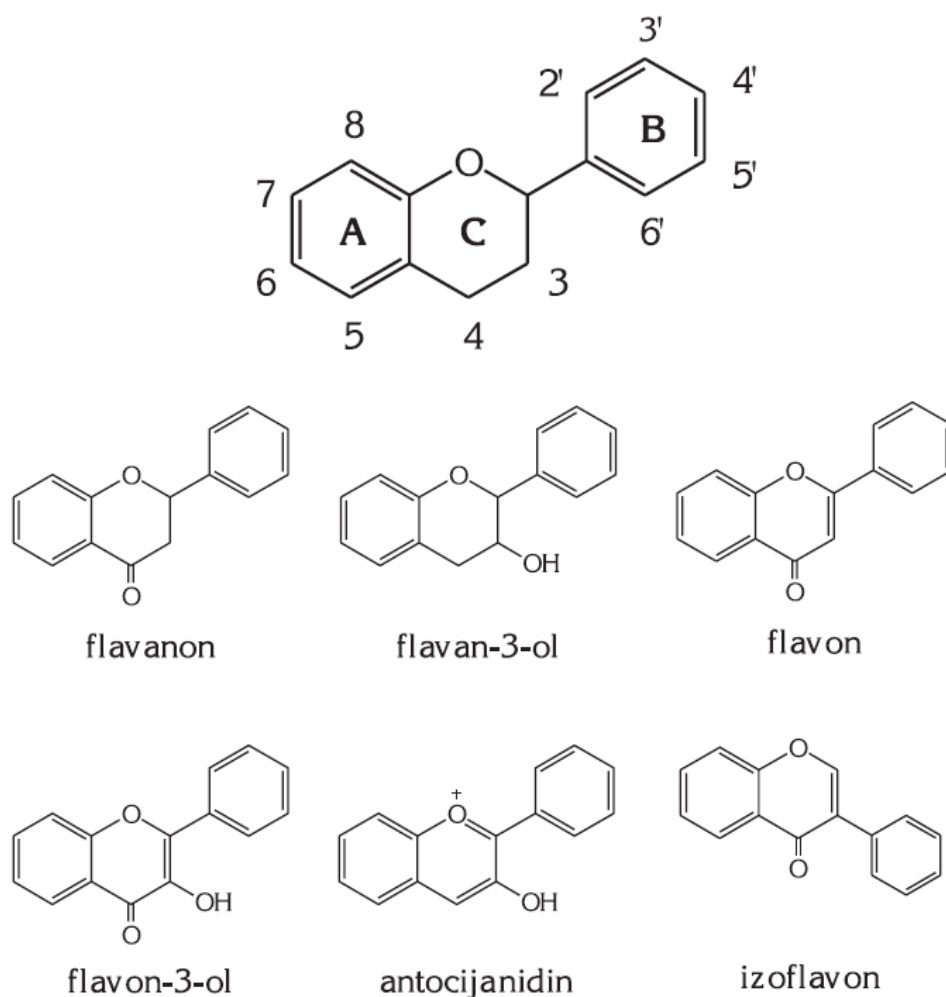
2.2. Struktura polifenolnih spojeva

Polifenoli su kemijski okarakterizirani kao komponentne s fenolnom strukturom. Zbog velike raznolikosti polifenolnih spojeva, postoje različiti načini kategorizacije. Kategorizacija prema izvoru podrijetla, biološkoj funkciji i kemijskoj strukturi. Najčešća kategorizacija polifenola temelji se na strukturi aglikona (Tsao, 2010.) i to najčešće na flavonoide i neflavonoide.

2.2.1. Flavonoidi

Najmnogobrojnija skupina polifenolnih spojeva su flavonoidi. Ovi spojevi dolaze samo u biljkama, a danas ih je otkriveno preko 4000. U biljkama flavonoidi su nositelji boje cvijeća, voća i lišća, a zajedno sa neflavonoidnim spojevima grade drvenaste dijelove, kao što su stabljike i kore (Gharras, 2009.). Veliki broj ljekovitih biljaka sadrži flavonoide koji imaju antioksidacijsku i antiradikalnu aktivnost (Kazazić, 2004.). Osnovnu strukturu flavonoida čini C₆-C₃-C₆ kostur, u kojoj su dvije C₆ jedinice, tzv. prsten A te prsten B, fenolne prirode (**Slika 1**) (Tsao, 2010.). Prsten C je oksigenirani heterociklik (Gharras, 2009.), a zbog varijacije ovog

prstena, flavonoidi se mogu dalje podjeliti na: antocijanine, flavan-3-ole, flavone, flavanone, i flavonole. Kod većine flavonoida prsten B povezan je preko C2 pozicije s prstenom C, ali postoje i neki flavonoidi kod kojih je B prsten u poziciji C3, odnosno C4, kao npr.: isoflavoni, odnosno neoflavonoidi (**Slika 1**). U skupinu flavonoida također se ubrajaju halkoni iako nemaju heterociklički prsten C. Ta osnovna struktura flavonoida naziva se aglikon, no flavonoidi u biljkama dolaze u obliku glikozida (Tsao, 2010.), odnosno na sebe imaju vezane različite jedinice monosaharida ili oligosaharida u različitoj poziciji. Osim šećera, na sebe još mogu vezati i hidroksilne i metoksilne skupine. Kod flavonoida postoji i velika sklonost umrežavanju i polimerizaciji (Kazazić, 2004.). Sve to pridonosi velikom broju i raznolikosti ovih spojeva (Jakobek, 2007.).



Slika 1 Osnovna struktura (gore) i skupine flavonoida (dolje) (Kazazić, 2004.)

2.2.2. Neflavonoidi

U neflavonoidne spojeve ubrajaju se: fenolne kiseline, fenolni amidi te još neki spojevi za koje se smatra da imaju pozitivan učinak na zdravlje (Tsao, 2010.).

Razlikujemo dvije glavne vrste fenolnih kiselina: derivati benzojeve kiseline i derivati cinamične kiseline (Tsao, 2010.; Gharras, 2009.). Nalaze se u obrađenoj hrani (Gharras, 2009.) te voću i povrću u slobodnom obliku, no češće se nalaze u vezanom obliku i kao takve nalaze se u žitaricama i sjemenkama, osobito u ljusci (Tsao, 2010.).

2.3. Antioksidativna aktivnost

Nedavna istraživanja pokazala su da su mnoge kronične bolesti, kao što su kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti te karcinom, posljedica oksidativnog stresa od reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta (Tsao, 2010.). 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 u hrani mogu se definirati kao bilo koje tvari koje su sposobne odgoditi, zaustaviti ili spriječiti razvoj užeglosti ili drugog neugodnog okusa radi oksidacije. Antioksidansi usporavaju razvoj nepoželjne arome na način da odgađaju indukcijski period, što znači da je dodatak antioksidansa nakon tog perioda neučinkovit. Oni mogu inhibirati ili odgoditi oksidaciju na dva načina. Prvi način uključuje direktno uklanjanje slobodnih radikala, a takve komponente se nazivaju primarnim antioksidansima. Drugi obuhvaća mehanizame koji ne uključuju direktno uklanjanje slobodnih radikala, u tom slučaju komponente se nazivaju sekundarnim antioksidansima. Sekundarni antioksidansi imaju sljedeće mehanizme djelovanja: vezanje metalnih iona, vezanje kisika, pretvaranje hidroperoksida u ne-radikalske vrste, apsorpcija UV radijacije i deaktivacija singleton kisika (Pokorny, 2001.).

Polifenolni spojevi kao antioksidansi djeluju na više različitih načina. Smatra se da mogu neutralizirati slobodne radikale doniranjem elektrona ili vodika čime oni sami postaju radikali, ali stabilni, manje reaktivni (Tsao, 2010.). Ovi radikali se stabiliziraju delokalizacijom elektrona, stvaranjem intramolekularnih vodikovih veza ili daljnjom reakcijom s drugim lipidnim radikalom. Kao hvatači slobodnih radikala, polifenoli prekidaju lančanu reakciju slobodnih

radikala. Upravo je to najvažniji način djelovanja polifenola kao antioksidansa. Sljedeći mogući način antioksidacijskog djelovanja je interakcija flavonoida s drugim fiziološkim antioksidansima, npr. vitaminom C ili vitaminom E. Iz sinergijskog efekta međudjelovanjem tih antioksidansa povećava se antiproliferativni učinak, npr. kod interakcije kvercetina s askorbinskom kiselinom (Kazazić, 2004.). Polifenoli su poznati kao metalni kelatori. Keliranjem metala, kao npr. Fe^{2+} , sprječava se oksidacija uzrokovana visoko reaktivnim hidroksilnim radikalima. Također se smatraju važnim i drugi mehanizmi djelovanja polifenola kao što je oksidacija ksantin oksidaze i povišenje endogenih antioksidansa. Polifenoli mogu inducirati antioksidativne enzime koji razgrađuju hidroperokside (Tsao, 2010.). Istraživanja pokazuju da neki polifenolni spojevi imaju veću antioksidativnu aktivnost *in vitro* od vitamina E i C (Gharras, 2009.) te da konzumacija hrane bogata polifenolima ima preventivno djelovanje kod degenerativnih bolesti, osobito tumora, neurodegenerativnih i kardiovaskularnih bolesti (Tsao, 2010.). Na antioksidativnu aktivnost utječe više različitih čimbenika kao što su sastav lipida, koncentracija antioksidansa, temperatura, prisutstvo drugih antioksidansa i drugi sastojci hrane kao što su proteini i voda (Pokorny, 2001.).

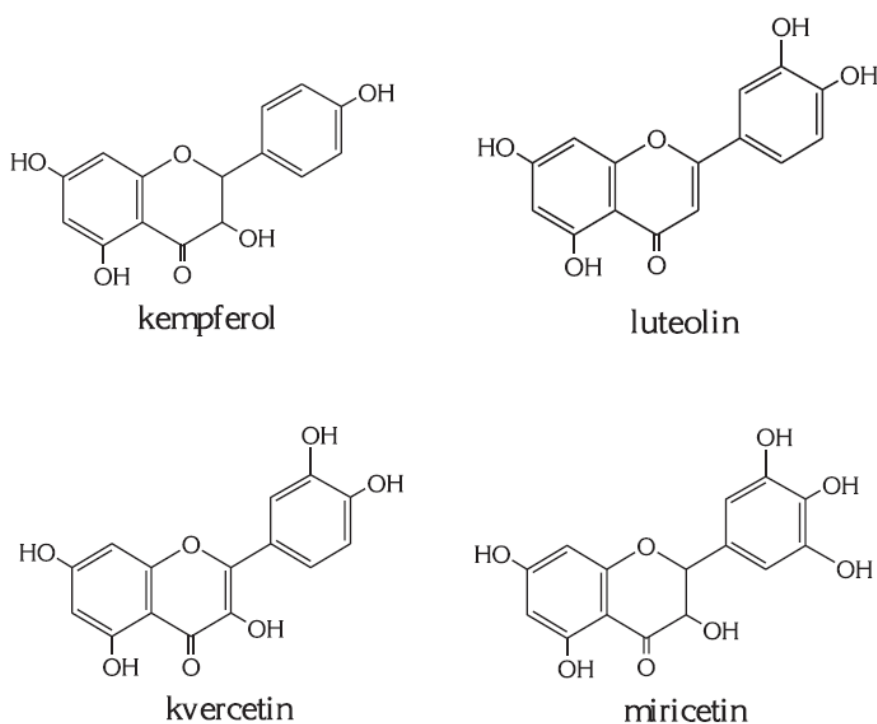
2.4. Veza između strukture polifenola i antioksidativne aktivnosti

Iako polifenoli dijele zajedničku značajku fenola, s obzirom na veliku strukturnu raznolikost, ovi spojevi značajno se razlikuju u svojim fizikalno-kemijskim karakteristikama (Tsao, 2010.). Prema tome, antioksidativna aktivnost polifenola uvelike ovisi o kemijskoj strukturi i prostornom rasporedu supstituenata (Cao i sur., 1997.).

2.4.1. Hidroksilna skupina

Antioksidativna aktivnost većine polifenolnih spojeva ovisi o broju hidroksilnih skupina te njihovom rasporedu. Hidroksilne skupine prstena B pokazuju 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.). Flavoni sa jednom hidroksilnom skupinom imaju nižu antioksidativnu aktivnost za razliku od kempferola, kvercetina i miricetina sa dvije, tri i

četiri hidroksilne skupine. Vrlo je važna prisutnost dviju susjednih hidroksilnih skupina, na C3 i C4 poziciji prstena B, tzv. katehol struktura. Luteolin, koji ima četiri hidroksilne skupine i 3',4'-katehol strukturu, pokazuje veću antioksidativnu aktivnost od kempferola koji također ima četiri hidroksilne skupine, no nema katehol strukturu prstena B (Cao i sur., 1997.) (**Slika 2**). Kvercetin s pet hidroksilnih skupina te 3',4'-katehol strukturu pokazuje veću antioksidativnu aktivnost, za razliku od miricetina sa šest hidroksilnih skupina, ali bez katehol strukture (**Slika 2**). Flavonoidi s katehol strukturu daju stabilan o-semikinonski radikal zbog delokalizacije elektrona. Flavoni koji nemaju katehol strukturu daju nestabilne radikale i slabi su hvatači (Kazazić, 2004.).



Slika 2 Broj i raspored hidroksilnih skupina flavonoida (Kazazić, 2004.)

Prsten C pridonosi antioksidativnoj aktivnosti ukoliko ima prisutnu slobodnu hidroksilnu skupinu u položaju 3 i/ili ukoliko omogućuje konjugaciju između aromatskih prstena. Prisutnost hidroksilne skupine u položaju 3 prstena C zajedno sa katehol strukturu pokazuje izuzetno veliku moć hvatanja peroksinitrila. Djelovanje kvercetina kao antioksidansa djelomično se pripisuje slobodnoj hidroksilnoj skupini u položaju 3 jer ona povećava stabilnost flavonoidnog radikala (Kazazić, 2004.).

2.4.2. 2,3-dvostruka veza i 4-keto-skupina

Flavonoidi koji imaju 2,3-dvostruku vezu zajedno s 4-keto skupinom imaju veću sposobnost hvatanja slobodnih radikala. Konjugacija između prstena A i B omogućava rezonancijsku stabilizaciju preko većeg broja aromatskih jezgra, čime se povećava stabilnost flavonoidnih radikala (Kazazić, 2004.).

2.4.3. O-metiliranje

Postoji razlika u antioksidativnoj aktivnosti između polihidroksiliranih i polimetoksiliranih flavonoida zbog razlike u hidrofobnosti i molekularnoj planarnosti. O-metiliranje narušava planarnost, stoga je antioksidativna aktivnost manja u odnosu na polihidroksilirane flavonoide (Kazazić, 2004.).

2.4.4. Glikozidacija

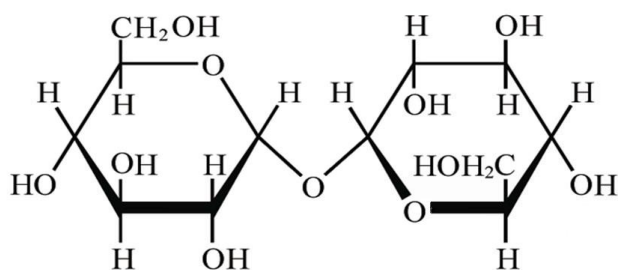
Flavonoidi se pojavljuju u hrani obično kao o-glikozidi sa šećerom vezanim najčešće u C3 položaju (Cao i sur., 1997.). Struktura šećera te položaj u kojem se nalazi pojedina skupina utječe na antioksidativnu aktivnost. S povećanjem broja glikozidnih skupina smanjuje se antioksidativna aktivnost flavonskih glikozida. Glikozidi pokazuju manju antioksidativnu aktivnost od samih aglikona (Kazazić, 2004.). Šećer okupira slobodnu hidroksilnu skupinu neophodnu za hvatanje slobodnih radikala i narušava planarnost B prstena čime dolazi do promjene dostupnosti za radikale (Heim i sur., 2002.).

2.4.5. Stupanj polimerizacije

Ovisnost antioksidativne aktivnosti sa stupnjem polimerizacije teško je razumljiva. Postoji određena učinkovitost s povećanjem polimerizacije, ali do određenog stupnja. Procijanidni dimeri i trimeri pokazali su se jačim antioksidansima od monomera, kada su u pitanju superoksid anioni (Vennat i sur., 1994.). Tetrameri su učinkovitiji antioksidansi nego trimeri kada su u pitanju peroksinitril (Arteel i Sies, 1999.) i superoksid radikali. Heksameri i heptameri pokazuju veću antioksidativnu aktivnost od trimera i tetramera (Vennat i sur., 1994.).

2.5. Trehaloza

Trehaloza je jedan od najstabilnijih šećera. To je disaharid sastavljen od dvije molekule D-glukoze povezane α -1,1 glikozidnom vezom, molekulske formule $C_{12}H_{22}O_{11}$ (**Slika 3**). Trehaloza je nereducirajući šećer koji se teško hidrolizira djelovanjem kiselina. U odnosu na druge šećere, trehaloza je vrlo stabilna pri širokom rasponu pH vrijednosti i temperatura. Izraz trehaloza odnosi se na α,α -trehalozu, a taj izomer je vrlo rasprostranjen u biljnom i životinjskom svijetu (Kopjar, 2007.). Trehaloza je glavni šećer u cirkulacijskom sustavu kukaca. Smatra se da je to kod kukaca glavni izvor energije, a također i rezervni ugljikohidrat u njihovim jajima, ličinkama i kukuljicama (Pine, 1994.).



Slika 3 Kemijska formula trehaloze (Kawashima i Goto, 2011.)

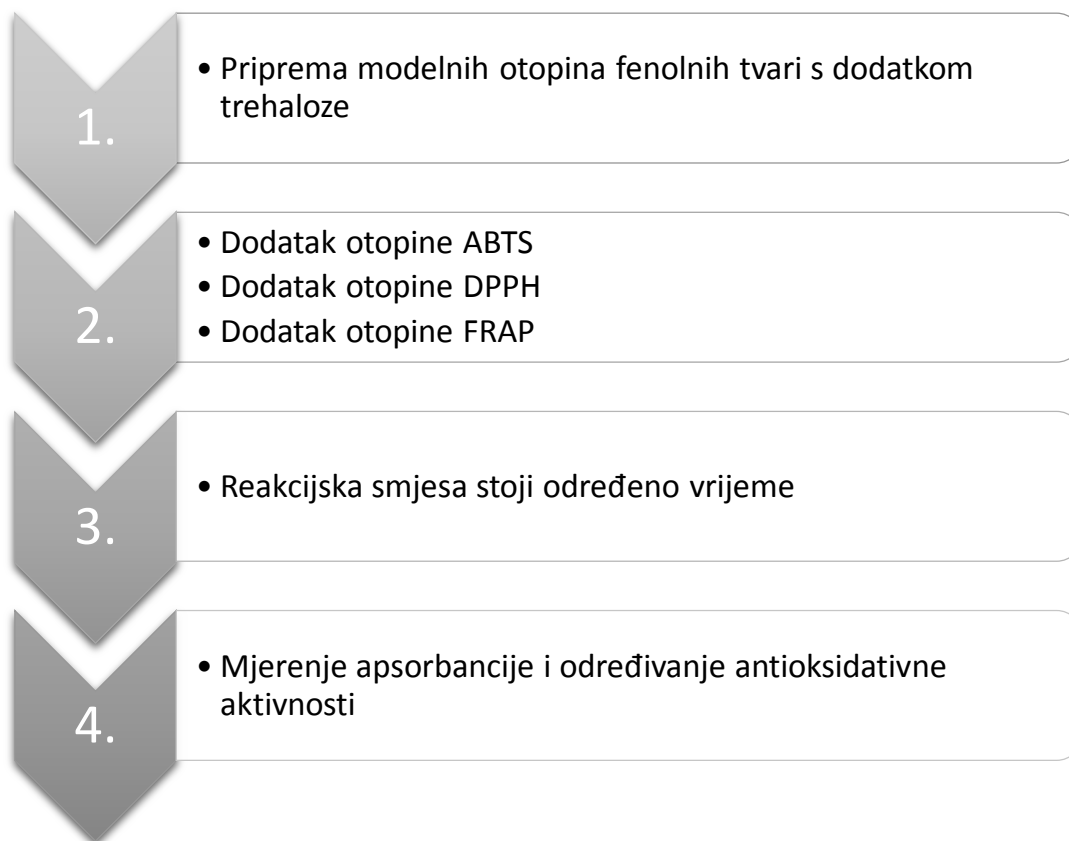
Trehaloza ima slatkoću 40-45% saharoze. Značajne količine trehaloze nađene su u medu, pivskom i pekarskom kvascu te ostalim proizvodima kod kojih se koristi kvasac. Osim zaštitne uloge, trehaloza ima druga pozitivna djelovanja na svojstva prehrambenih i medicinskih proizvoda. Jedno od svojstava je niska higroskopnost (Kopjar, 2007.). Istraženo je da se svježe voće koje sadrži trehalozu lako suši pri čemu se dobije suhi prah. Nakon dodatka vode, viskoznost i tekstura se vraćaju u kratkom vremenu, a proizvodi dobivaju jedinstvenu aromu svježeg voća. Sušenjem bez trehaloze, voće izgubi više svježeg arome (Colacço i Roser, 1995.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak

Zadatak mog rada bio je ispitati:

1. Antioksidativnu aktivnost modelnih otopina fenolnih tvari (pojedinačno i u kombinacijama) s dodatkom trehaloze:
 - DPPH metodom,
 - ABTS metodom i
 - FRAP metodom.
2. Utvrditi postoji li sinergijski učinak modelnih otopina kombinacijom fenolnih tvari



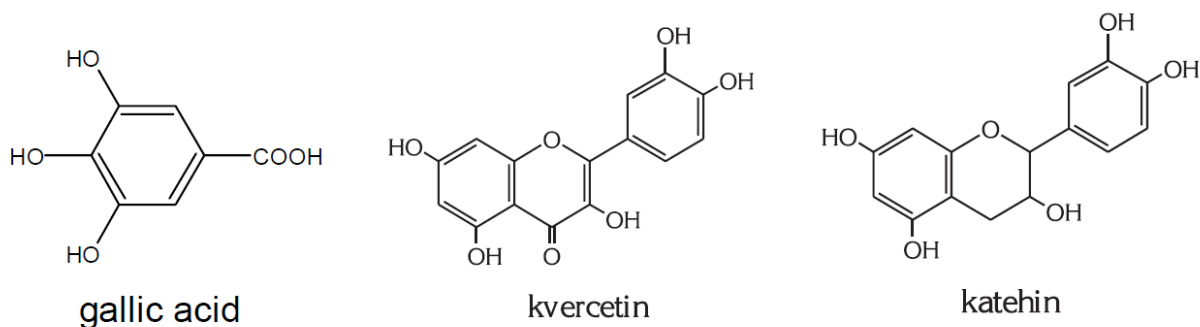
Slika 4 Shematski prikaz rada

3.2. Materijali i metode

U ovom poglavlju navedene su kemikalije koje su korištene u ispitivanju antioksidativne aktivnosti, uzorci te su opisane metode i postupak rada.

3.2.1. Kemikalije

- metanol je nabavljen od proizvođača Kemika, Zagreb
- galna kiselina, katehin i kvercetin nabavljeni su od proizvođača Sigma, Njemačka (**Slika 5**),
- 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS) i 2,2,-difetil-1-pikrilhidrazil (DPPH) nabavljeni su od proizvođača Sigma, Njemačka,
- 2,4,6,-tri(2-piridil)-s-triazin (TPTZ) nabavljen je od proizvođača Sigma, Njemačka,
- trolox je nabavljen od proizvođača Sigma, Njemačka, a
- trehaloza je dobivena od Hayashibara Co, Japan.



Slika 5 Struktura galne kiseline (Rein, 2005,), kvercetina i katehina (Kazazić, 2004.)

3.2.2. Priprema uzorka

Uzorci na kojima je ispitivana antioksidativna aktivnost su otopine:

- katehina s dodatkom trehaloze (K), kvercetina s dodatkom trehaloze (Q) te galne kiseline s dodatkom trehaloze (G),
- katehina i kvercetina s dodatkom trehaloze (KQ), katehina i galne kiseline s dodatkom trehaloze (KG) te kvercetin i galne kiseline s dodatkom trehaloze (QG) i
- katehina, kvercetin i galne kiseline s dodatkom trehaloze (KQG)

3.2.3. DPPH metoda

DPPH metoda je jedna od najrazvijenijih metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti na osnovi sintetskih radikala. Metoda se temelji na uklanjanju sintetskog radikala DPPH u metanolnoj otopini, te mjerenju apsorbancije pri 517 nm. Zbog određene količine antioksidansa ili zbog reakcije sa slobodnim radikalima, dolazi do smanjenja apsorbancije pri 517 nm (Brand-Williams i sur., 1995.) Ove kemijske reakcije prikazane su prikazima **(1)** i **(2)**.



Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka, 3 mL otopine DPPH, dobro promješa i reakcijska smjesa se ostavi stajati 15 minuta (**Slika 6**). Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 517 nm. Za slijepu probu umjesto uzorka dodan je metanol. Antioksidativna aktivnost izračunata je iz kalibracijske krivulje uz trolox kao standard. Za svaki uzorak provedena su tri mjerenja.



Slika 6 Otopina DPPH i modelnih otopina fenolnih tvari s trehalozom

3.2.4. ABTS metoda

ABTS metoda se temelji na raspadanju radikal kationa $\text{ABTS}^{\cdot+}$ koji nastaje oksidacijom 2,2'-azinobis(3-etilbenzotizilin-6-sulfonat) (ABTS) djelovanjem fenolnih tvari. $\text{ABTS}^{\cdot+}$ je relativno stabilan u odsutstvu fenolnih tvari, no u prisutstvu H^+ brzo reagira i prelazi u nebojani oblik ABTS-a (Arnao i sur., 2001.).

Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka te se doda 3,2 mL otopine ABTS (**Slika 7**), dobro promiješa i smjesa se ostavi reagirati 1 sat i 35 minuta u mraku. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 734 nm. Antioksidativna aktivnost izračunata je iz kalibracijske krivulje uz trolox kao standard. Za svaki uzorak provedena su tri mjerenja.



Slika 7 Otopina ABTS i modelnih otopina fenolnih tvari s trehalozom

3.2.5. 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, 3 mL FRAP otopine (**Slika 8**), dobro promiješa i reakcijska smjesa se ostavi stajati 30 minuta. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri 593 nm. Za slijepu probu umjesto uzorka dodana je voda. Antioksidativna aktivnost izračunata je iz kalibracijske krivulje uz trolox kao standard. Za svaki uzorak provedena su tri mjerenja.



Slika 8 Otopina FRAP i modelnih otopina fenolnih tvari s trehalozom

4. REZULTATI I RASPRAVA

U radu je ispitana antioksidativna aktivnost modelnih otopina fenolnih tvari s dodatkom trehaloze ABTS, DPPH i FRAP metodom, a dobiveni rezultati prikazani su u tablici. Ispitano je postoji li sinergijski učinak antioksidativne aktivnosti kada su u otopini prisutne dvije, odnosno tri različite fenolne tvari.

4.1. Antioksidativna aktivnost modelnih otopina fenolnih tvari s dodatkom trehaloze

U **Tablici 1** prikazani su rezultati antioksidativne aktivnosti modelnih otopina fenolnih tvari i trehaloze određene ABTS, DPPH te FRAP metodom, a vrijednosti su izražene u $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$.

Tablica 1 Antioksidativna aktivnost modelnih otopina fenolnih tvari i trehaloze određena ABTS, DPPH i FRAP metodama ($\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$)

uzorci	ABTS	DPPH	FRAP
K	446,197 \pm 1,689	117,774 \pm 1,090	116,578 \pm 2,448
Q	680,908 \pm 0,719	437,290 \pm 3,133	301,744 \pm 5,016
G	62,026 \pm 1,892	11,470 \pm 1,892	1,405 \pm 0,195
KQ	890,425 \pm 5,785	367,816 \pm 27,850	186,805 \pm 8,184
KG	1021,096 \pm 5,769	353,200 \pm 15,640	362,504 \pm 22,260
QG	1057,259 \pm 6,363	458,754 \pm 31,794	288,167 \pm 20,387
KQG	1326,518 \pm 11,088	566,437 \pm 42,144	462,357 \pm 3,762

Razvidno iz tablice, najviše vrijednosti antioksidativne aktivnosti pokazuje ABTS metoda, a zatim slijede vrijednosti DPPH metode, dok najniže vrijednosti daje FRAP metoda. Jedina iznimka postoji kod otopine katehina i galne kiseline s trehalozom u kojem FRAP metoda daje nešto višu vrijednost antioksidativne aktivnosti od DPPH metode. Razlika u dobivenim

vrijednostima antioksidativne aktivnosti, određene ABTS, DPPH i FRAP metodom, posljedica je razlike u reaktivnosti primjenjenih sintetskih slobodnih radikala s antioksidansima.

Najvišu vrijednost antioksidativne aktivnosti određene ABTS metodom pokazuje otopina kombinacijom triju fenolnih tvari: kvercetina, katehina i galne kiseline s trehalozom (1326,518 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$). Što se tiče pojedinačnih otopina fenolnih tvari s trehalozom, najvišu vrijednost ima kvercetin (680,908 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$), zatim katehin (446,197 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$), a najnižu vrijednost pokazuje galna kiselina (62,026 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$). Kombinacija otopine kvercetina i katehina (890,425 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$) ima nižu vrijednost nego kombinacija galne kiseline i kvercetina (1057,259 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$) i kombinacije galne kiseline i katehina (1021,096 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$). Otopina galne kiseline i kvercetina ima višu vrijednost antioksidativne aktivnosti od otopine galne kiseline i katehina.

DPPH metodom također je određeno da najvišu antioksidativnu aktivnost ima otopina kvercetina, katehina i galne kiseline (566,437 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$), no vrijednost antioksidativne aktivnosti ovom metodom upola je manja nego ABTS metodom. Poredak pojedinačnih otopina fenolnih tvari s dodatkom trehaloze ostaje isti i kod ove metode, tj. najvišu vrijednost pokazuje kvercetin (437,290 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$) pa katehin (117,774 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$) i galna kiselina (11,470 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$). Što se tiče otopina kombinacijom dviju fenolnih tvari s dodatkom trehaloze, i ovom metodom najvišu vrijednost ima otopina galne kiseline i kvercetina (458,754 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$), no u ovom slučaju otopina kvercetina i katehina (367,816 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$) ima višu vrijednost od otopine galne kiseline i katehina (353,200 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$).

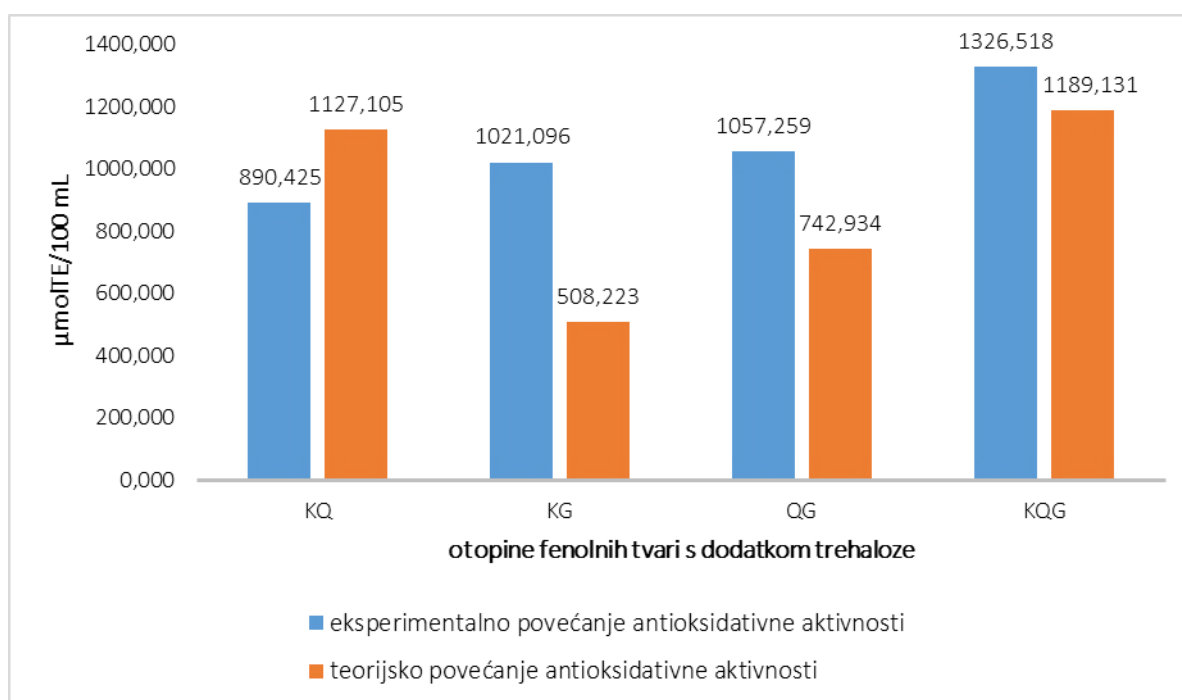
Otopina katehina, kvercetina i galne kiseline s trehalozom, ispitane FRAP metodom, ima najvišu vrijednost antioksidativne aktivnosti (462,357 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$). Poredak pojedinačnih otopina i kod ove metode se ne mijenja, najvišu vrijednost pokazuje kvercetin (301,744 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$), zatim slijedi katehin (116,578 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$), a najnižu otopina galne kiseline (1,405 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$). Redoslijed otopina kombinacijom dviju fenolnih tvari s dodatkom trehaloze ne slaže se s nijednom od prethodnih metoda. Ovom metodom najvišu vrijednost pokazuje otopina galne kiseline i katehina (362,504 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$), a zatim slijedi otopina galne kiseline i kvercetina (288,167 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$). Najnižu vrijednost pokazuje otopina kvercetina i katehina (186,805 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$) što se slaže i s ABTS metodom.

4.2. Sinergijski učinak modelnih otopina fenolnih tvari s dodatkom trehaloze

Izračunate vrijednosti teorijskog povećanja antioksidativne aktivnosti dobivene su zbrojem eksperimentalno dobivenih vrijednosti antioksidativne aktivnosti pojedinačnih otopina fenolnih tvari s trehalozom. Ukoliko je zbroj vrijednosti antioksidativnih aktivnosti pojedinačnih otopina manji od eksperimentalno dobivene vrijednosti njihovih kombinacija, znači da je došlo do sinergijskog učinka fenolnih tvari kada su prisutne zajedno u otopini.

4.2.1. Sinergijski učinak ispitan ABTS metodom

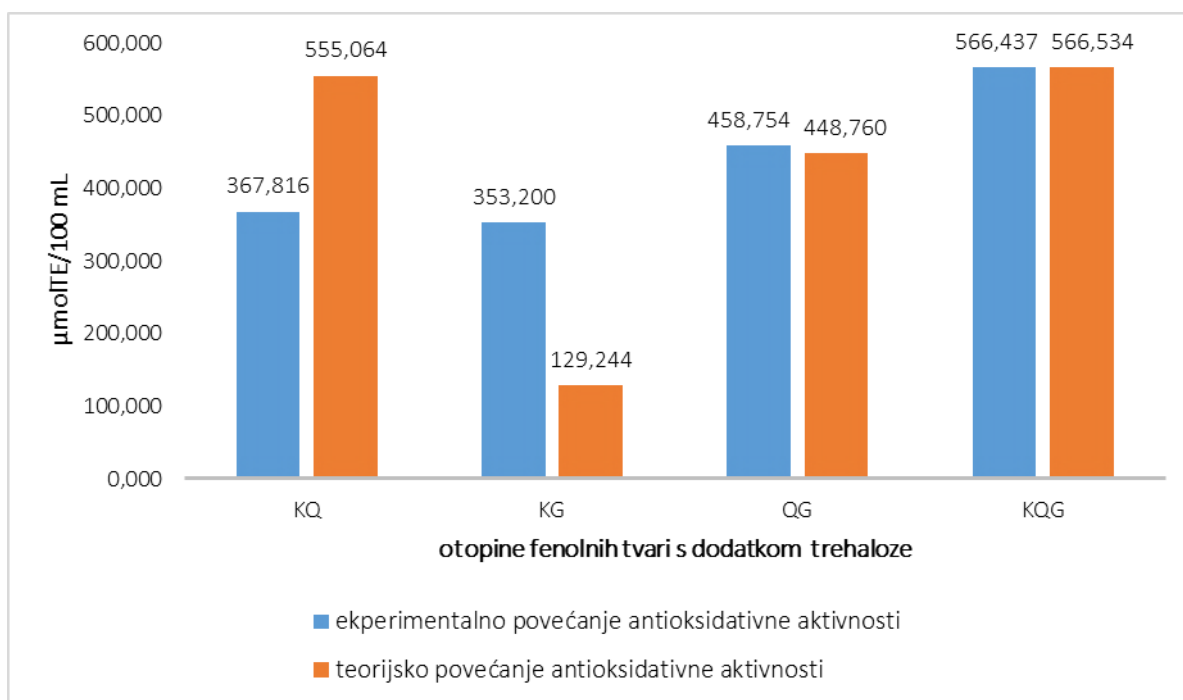
Na **Slici 9** uočeni su sinergijski učinci antioksidativne aktivnosti kod otopina katehina i galne kiseline (1021,096 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$), kvercetina i galne kiseline (1057,259 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$), te katehina, kvercetina i galne kiseline (1326,518 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$). Najveći sinergijski učinak ABTS metodom pokazuje otopina katehina i galne kiseline, jer eksperimentalna vrijednost iznosi 1021,096 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$, dok teorijski dobivena iznosi 508,223 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$. Eksperimentalna vrijednost antioksidativne aktivnosti otopine katehina i kvercetina (890,425 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$) pokazuje nižu vrijednost od zbroja njihovih pojedinačnih vrijednosti (1127,105 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$), odnosno kod ove otopine nije došlo do sinergijskog učinka.



Slika 9 Povećanje antioksidativne aktivnosti određene ABTS metodom

4.2.2. Sinergijski učinak ispitan DPPH metodom

Iz **Slike 10** vidljivi su sinergijski učinci kod otopina kvercetina i galne kiseline (458,754 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$) te katehina i galne kiseline (353,200 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$), što je ujedno i najveći sinergijski učinak i kod ove metode, jer teorijska vrijednost iznosi 129,244 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$. Eksperimentalno određena vrijednost antioksidativne aktivnosti otopine kvercetina, katehina i galne kiseline (566,437 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$) nešto je niža od teorijske vrijednosti (566,534 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$), što znači da ova metoda nije pokazala sinergijski učinak. Ovom metodom također nije utvrđen sinergijski učinak antioksidativne aktivnosti otopine katehina i kvercetina, jer eksperimentalna vrijednost iznosi 367,816 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$, a teorijska 555,064 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$.

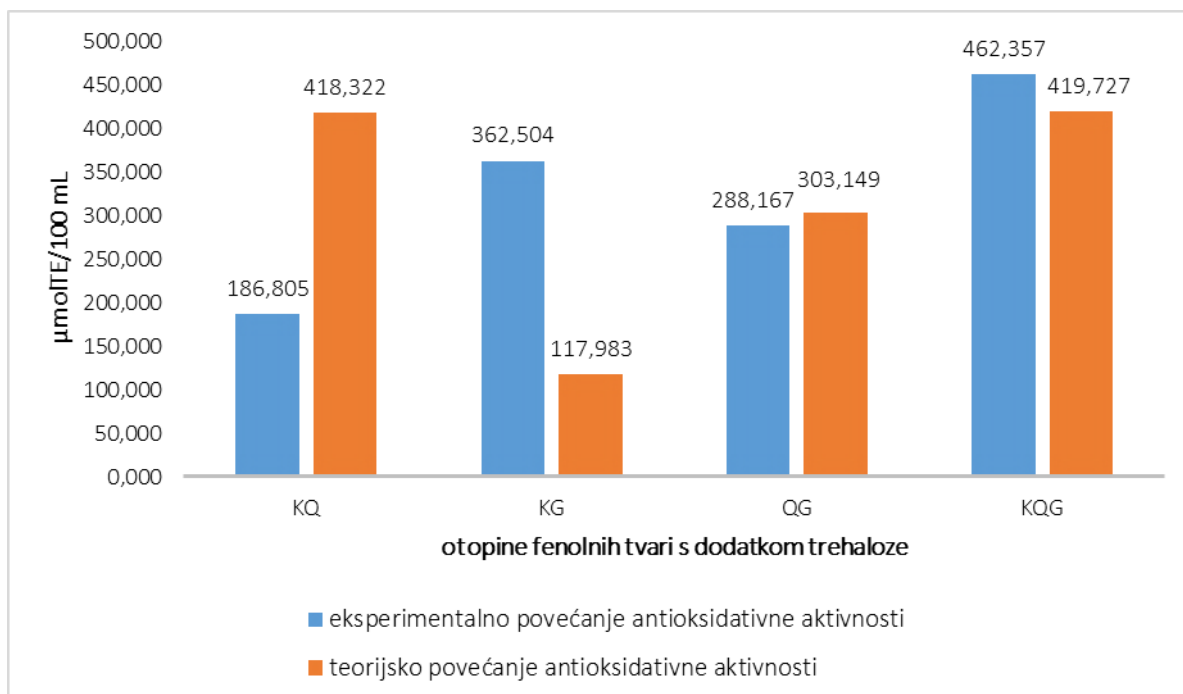


Slika 10 Povećanje antioksidativne aktivnosti određene DPPH metodom

4.2.3. Sinergijski učinak ispitan FRAP metodom

FRAP metodom, iz **Slike 11**, sinergijski učinak pokazuju otopine katehina i galne kiseline (362,504 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$) te katehina, kvercetina i galne kiseline (462,357 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$). Otopina kvercetina i galne kiseline u ovom slučaju ne pokazuje sinergijski učinak, jer je eksperimentalna vrijednost (288,167 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$) manja u odnosu na teorijsku (303,149 $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$).

μmol TE/100 mL). Ni ovom metodom nije utvrđen sinergijski učinak antioksidativne aktivnosti otopine katehina i kvercetina, jer eksperimentalno dobivena vrijednost iznosi 186,805 μmol TE/100 mL, dok teorijska 418,322 μmol TE/100 mL.



Slika 11 Povećanje antioksidativne aktivnosti određene FRAP metodom

Ukupno gledano, u svim metodama nije utvrđen sinergijski učinak otopine katehina i kvercetina, a sinergijski učinak otopine katehina i galne kiselina utvrđen je svim trima metodama.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata najvišu antioksidativnu aktivnost ima modelna otopina katehina, kvercetina i galne kiseline s trehalozom. Uspoređivanjem vrijednosti antioksidativne aktivnosti pojedinačnih modelnih otopina najvišu vrijednost ima kvercetin, zatim katehin pa slijedi galna kiselina s najnižom vrijednosti. Antioksidativne aktivnosti otopina kombinacijom dvije fenolne tvari s trehalozom u svim metodama pokazuju različiti redoslijed. Važno je naglasiti da otopina kvercetina i katehina s trehalozom ne pokazuje ni u jednoj od metoda najvišu vrijednost, iako je antioksidativna aktivnost kod pojedinačnih otopina najviša kod kvercetina, a zatim kod katehina.

Ni jednom od metoda nije utvrđen sinergijski učinak otopine kvercetina i katehina. Najveći sinergijski učinak pokazuje otopina katehina i galne kiseline kod svih ispitanih metoda. Ostale kombinacije, tj. otopina kvercetina i galne kiseline te otopina katehina, kvercetina i galne kiseline, pokazuju sinergijski učinak dvjema metodama.

6. LITERATURA

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

Arteel GE, Sies H: Protection against peroxynitrite by cocoa polyphenol oligomers. *FEBS Letters*, 462:167–170, 1999.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28:25–30, 1995.

Cao G, Sofic E, Prior RL: Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 22:749–760, 1997.

Colacço C.A.L.S., Roser B: Trehalose—a multifunctional additive for food preservation. U *Food Packaging and Preservation*, Blackie Professional, London, 1995.

Gharras, HE: Polyphenols: food sources, properties and applications. *International Journal of Food Science and Technology*, 44:2512–2518, 2009.

Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ: Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13:572-84, 2002.

Jakobek, L: Karakterizacija polifenola u voću i njihov utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.

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.

Kawashima H, Goto H: Preparation and Properties of Polyaniline in the Presence of Trehalose, Institute of Materials Science, Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan, 2011.

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

Pine, SP: Organic chemistry, McGraw-Hill Book Company, Školska knjiga Zagreb, 1994.

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

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

Seeram, NP, Heber, D: Impact of Berry Phytochemicals on Human Health: Effects beyond Antioxidation. U *Antioxidant Measurement and Applications* (Shahidi, F., Ho, C.H., ured.), American Chemical Society, Washington, 2007.

Shahidi F, Zhong, Y: Measurement of Antioxidant Activity in Food and Biological Systems. U *Antioxidant Measurement and 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.