ORAC vrijednosti ekvimolarnih fenolnih smjesa

Skelin, Anica

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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:167:790272

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

ORAC VRIJEDNOSTI EKVIMOLARNIH FENOLNIH SMJESA

ZAVRŠNI RAD

ANICA SKELIN
Matični broj: 6

Split, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA

ORAC VRIJEDNOSTI EKVIMOLARNIH FENOLNIH SMJESA

ZAVRŠNI RAD

ANICA SKELIN
Matični broj: 6

Split, rujan 2020

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE STUDY OF FOOD TECHNOLOGY

ORAC VALUES OF EQUIMOLAR PHENOLIC MIXTURES

BACHELOR THESIS

ANICA SKELIN
Parent number: 6

Split, September 2020

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Preddiplomski studij Prehrambene tehnologije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Tema rada je prihvaćena na 28. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: Doc. dr. sc. Danijela Skroza

ORAC VRIJEDNOSTI EKVIMOLARNIH FENOLNIH SMJESA

Anica Skelin, 6

Sažetak:
Fenoli su najzastupljeniji organo-kemijski spojevi u prirodi. Ova grupa sekundarnih biljnih metabolita ima razne uloge u prirodi, ali ipak najvažnija je ona antioksidacijska koja ovisi o nekoliko čimbenika. Cilj ovo rada bio je analizirati smjese fenolnih kiselina i to iz podgrupa derivata hidroksibenzojeve i derivata hidroksicimetne kiseline metodom ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorance Activity*) te na temelju rezultata donijeti zaključke o mogućem sinergijskom, aditivnom ili antagonističkom učinku. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je većina smjesa, osobito binarnih smjesa pokazala sinergijsko djelovanje. Dodatkom treće kiseline u smjesu u slučaju derivata hidroksibenzojeve kiseline antioksidacijska aktivnost smjese slabi, ali i dalje uočavamo sinergijski učinak, dok su rezultati kod derivata hidroksicimetne kiseline uglavnom ukazali na aditivno i antagonističko djelovanje. U smjesama četiri i pet kiselina derivati hidroksibenzojeve kiseline su uglavnom pokazali sinergiju, a derivati hidroksicimetne kiseline aditivno djelovanje. Na temelju ovog istraživanja može se zaključiti da su ekvimolarne smjese derivata hidroksibenzojeve kiseline imale bolji antioksidacijsko djelovanje i interakcijski učinak od derivata hidroksicimetne kiseline.

Ključne riječi:fenolne kiseline, antioksidacijska aktivnost, ORAC metoda, sinergija

Rad sadrži: 24 stranice, 5 slika, 5 tablica, 21 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:
1. Doc. dr. sc. Franko Burčul
2. Doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović
3. Doc. dr. sc. Danijela Skroza

Datum obrane: 28. rujna 2020.

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 Chemistryand Technology Split
Food Technology

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food Technology

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no.28

Mentor: Assistant Professor Danijela Skroza, Ph. D.

ORAC VALUES OF EQUIMOLAR PHENOLIC MIXTURES

Anica Skelin, 6

Abstract:
Phenols are the most abundant organochemical compounds in nature. This group of secondary plant metabolites has various roles in nature, yet the most important one is the antioxidant activity which depends on several factors. The aim of this study was to analyze mixtures of phenolic acids from subgroups of hydroxybenzoic derivatives and hydroxcinnamic acid derivatives by the ORAC method (Oxygen Radical Absorbance Activity) and to draw conclusions about possible synergistic, additive or antagonistic effect based on the results obtained. The results of this research show that most mixtures, especially mixtures of two acids, showed a synergistic effect. The addition of a third acid in the mixture in the case of hydroxbenzoic acid derivatives weakens the antioxidant activity of the mixture, but we still see a synergistic effect. While, in case of hydroxcinnamic acid derivatives, results mainly indicated both additive and antagonistic effects. In the mixtures containing four and five acids hydroxbenzoic acid derivatives mainly showed synergy, while hydroxcinnamic acid derivatives additive action. Based on this study, it can be concluded that equimolar mixtures of hydroxbenzoic acid derivatives had a better antioxidant activity and interaction effect than hydroxcinnamic acid derivatives.

Keywords: phenolic acids, antioxidant activity, ORAC method, synergy

Thesis contains: 24 pages, 5 figures, 5 tables, 21 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Assistant Professor Franko Burčul, Ph. D.
2. Assistant Professor Zvonimir Marijanović, Ph. D.
3. Assistant Professor Danijela Skroza, Ph. D.

Defence date: September 28, 2020.

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 ožujka do rujna 2020. godine.

ZAHVALA

Od srca se zahvaljujem doc. dr. sc. Danijeli Skroza na nesebičnom zalaganju, posvećenom vremenu, iznimnom strpljenju te uloženom trudu i pomoći prilikom izrade ovog rada.

Hvala mojim prijateljima, pogotovo kolegici i prijateljici Karli koja je bila uz mene i pomagala svojim savjetima.

Velika zahvalnost izražavam svojoj obitelji na razumijevanju i potpori koju su mi pružili prilikom studiranja.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak ovog završnog rada bio je odrediti antioksidacijsku aktivnost ekvimolarnih smjesa fenolnih kiselina metodom određivanja kapaciteta apsorpcije radikala kisika (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*, ORAC) te donijeti zaključke o mogućem sinergijskom/ aditivnom/ antagonističkom učinku pojedinih smjesa fenolnih kiselina.

SAŽETAK

Fenoli su najzastupljeniji organo-kemijski spojevi u prirodi. Ova grupa sekundarnih biljnih metabolita ima razne uloge u prirodi, ali ipak najvažnija je ona antioksidacijska koja ovisi o nekoliko čimbenika. Cilj ovo rada bio je analizirati smjese fenolnih kiselina i to iz podgrupa derivata hidroksibenzojeve i derivata hidroksicimetne kiseline metodom ORAC (engl. Oxygen Radical Absorance Activity) te na temelju rezultata donijeti zaključke o mogućem sinergijskom, aditivnom ili antagonističkom učinku. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je većina smjesa, osobito binarnih smjesa pokazala sinergijsko djelovanje. Dodatkom treće kiseline u smjesu u slučaju derivata hidroksibenzojeve kiseline antioksidacijska aktivnost smjese slabi, ali i dalje uočavamo sinergijski učinak, dok su rezultati kod derivata hidroksicimetne kiseline uglavnom ukazali na aditivno i antagonističko djelovanje. U smjesama četiri i pet kiselina derivati hidroksibenzojeve kiseline su uglavnom pokazali sinergiju, a derivati hidroksicimetne kiseline aditivno djelovanje. Na temelju ovog istraživanja može se zaključiti da su ekvimolarne smjese derivata hidroksibenzojeve kiseline imale bolji antioksidacijsko djelovanje i interakcijski učinak od derivata hidroksicimetne kiseline.

Ključne riječi: fenolne kiseline, antioksidacijska aktivnost, ORAC metoda, sinergija

SUMMARY

Phenols are the most abundant organochemical compounds in nature. This group of secondary plant metabolites has various roles in nature, yet the most important one is the antioxidant activity which depends on several factors. The aim of this study was to analyze mixtures of phenolic acids from subgroups of hydroxybenzoic derivatives and hydroxcinnamic acid derivatives by the ORAC method (Oxygen Radical Absorbance Activity) and to draw conclusions about possible synergistic, additive or antagonistic effect based on the results obtained. The results of this research show that most mixtures, especially mixtures of two acids, showed a synergistic effect. The addition of a third acid in the mixture in the case of hydroxbenzoic acid derivatives weakens the antioxidant activity of the mixture, but we still see a synergistic effect. While, in case of hydroxcinnamic acid derivatives, results mainly indicated both additive and antagonistic effects. In the mixtures containing four and five acids hydroxbenzoic acid derivatives mainly showed synergy, while hydroxcinnamic acid derivatives additive action. Based on this study, it can be concluded that equimolar mixtures of hydroxbenzoic acid derivatives had a better antioxidant activity and interaction effect than hydroxcinnamic acid derivatives.

Keywords: phenolic acids, antioxidant activities, ORAC method, synergy

SADRŽAJ

UVOD 1

1. OPĆI DIO 2

1.1. Fenolni spojevi 2

1.1.1. Klasifikacija fenolnih spojeva 2

1.1.1.1. Fenolne kiseline 3

1.2. Antioksidacijska aktivnost 4

1.3. Utjecaj strukture na antioksidacijsku aktivnost fenolnih kiselina 6

1.4. Interakcijsko djelovanje fenolnih kiselina 7

2. EKSPERIMENTALNI DIO 9

2.1. Otopine ekvimolarnih fenolnih smjesa 9

2.2. Kemikalije i uređaji 11

2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ORAC metodom 12

2.4. Određivanje interakcijskog djelovanja fenolnih smjesa 13

3. REZULTATI I RASPRAVA 15

3.1. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti i interakcijskog djelovanja smjesa derivata hidroksibenzojeve kiseline 16

3.2. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti i interakcijskog djelovanja smjesa derivata hidroksicimetne kiseline 19

4. ZAKLJUČCI 22

5. LITERATURA 23

UVOD

Posljednjih godina fenoli, sekundarni metaboliti biljaka, su sve češće u fokusu brojnih znanstvenika zahvaljujući svojim biološkim svojstvima, a osobito zbog antioksidacijske aktivnosti. Fenole, uz druge fitokemikalije, nalazimo u brojnim biljnim vrstama (koncentrirani u kori, sjemenkama, pokožici i sl.). Osobito su važni za aromu, boju i nutritivna svojstva voća i povrća kao i njihovih prerađevina. Broj do danas identificiranih fenolnih spojeva u različitim biljkama je ogroman, no njihovo otkrivanje i istraživanje njihovih aktivnosti i mehanizama djelovanja se i dalje nastavlja. Novim saznanjima o aktivnosti pojedinih biljnih vrsta bogatim polifenolnim spojevima, raste i interes prehrambene industrije za dodatkom biljnih ekstrakata u prehrambene proizvode u svrhu povećanja nutritivne vrijednosti i kvalitete proizvoda.

Ono što treba istaknuti je činjenica da se fenoli u biljkama nalaze u smjesama, a ne kao pojedinačni spojevi pa je osim antioksidacijske aktivnosti pojedinih fenolnih spojeva važno poznavati djelovanje fenolnih smjesa. Broj takvih istraživanja također raste i mehanizmi djelovanja pojedinih spojeva se danas jako dobro poznaju, no i dalje je nedovoljno podataka o njihovim združenim učincima u smjesi ili biljnom materijalu. U tom pogledu cilj rada je bio ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorance Activity*) metodom odrediti međusobno djelovanje (sinergističko/aditivno/antagonitičko) ekvimolarnih smjesa odabranih predstavnika fenolnih kiselina.

1. OPĆI DIO

1.1. Fenolni spojevi

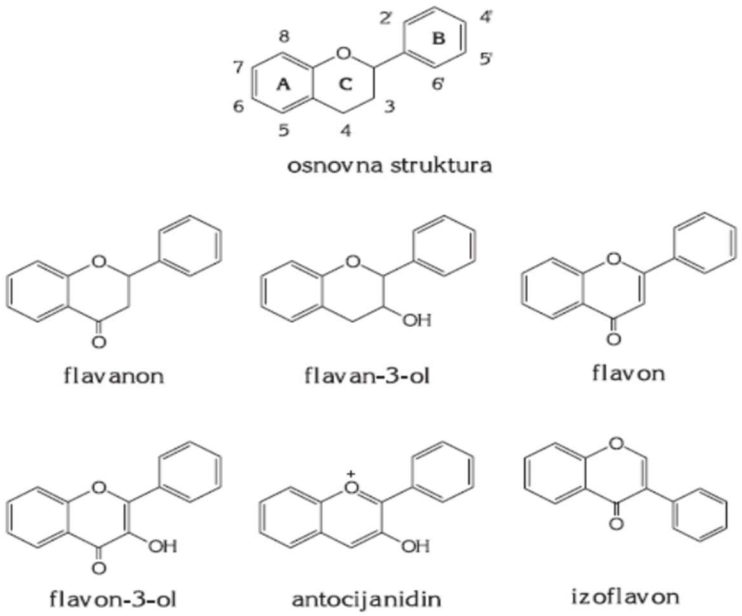
Prema udjelu organskih spojeva u biljci, fenolni spojevi su druga najzastupljenija skupina. Oni imaju različite uloge u biljci, od strukturne potpore do zaštite od ultraljubičastog zračenja, raznih patogena ili abiotskog stresa. Osim uloge u biljkama ovi spojevi imaju i pozitivan učinak na ljudsko zdravlje zahvaljujući brojnim biološkim učincima. Konzumacijom namirnica bogatim fenolnim spojevima može se smanjiti broj oboljenja od kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa i kancerogenih oboljenja. (1)

1.1.1. Klasifikacija fenolnih spojeva

Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti koji sadrže u svojoj strukturi aromatski prsten na koji su izravno vezane jedna ili više hidroksilnih skupina. (2) Do sada je poznato više od 8000 različitih biljnih fenolnih spojeva koji imaju male strukturne razlike te se razvrstavaju u dvije glavne skupine flavonoide i neflavonoide.

Flavonoidi su najzastupljenije bioaktivnekomponente, a u svom sastavu sadrže kostur fenilbenzopirana, koji sačinjavaju dva fenilna prstena spojena kroz heterociklički pirinski prsten (slika 1). Flavonoidi se mogu podijeliti na flavone, izoflavone, flavanoni, flavan-3-ole, flavon-3-ole i antocijanidine. (1)

U **neflavonoide** spadaju fenolni spojevi s raznolikom kemijskom strukturom. Većina neflavonoida ima manju i jednostavniju strukturu od flavonoida, ali postoje i spojevi kojima je struktura složenija s velikom molekulskom težinom. Najvažnija neflavonoidna skupina su fenolne kiseline koje se dijele na hidroksibenzojeve kiseline, hidroksicimetne kiseline i ostale hidroksifenilne kiseline. (1)



Slika 1. Prikaz osnovne strukture flavonoida i njihove podjele(3)

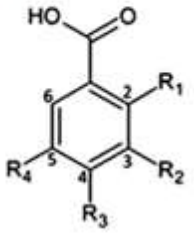
1.1.1.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline u svom sastavu sadrže jednu fenilnu skupinu koja je supstituirana s jednom karboksilnom skupinom i jednom ili više -OH grupa. Kao što je već spomenuto fenolne kiseline se mogu podijeliti na tri glavne skupine koje se razlikuju po duljini lanca koji sadrži karboksilnu skupinu. (1)

Neki od derivata hidroksibenzojeve kiseline su siriginska, galna, protokatehinska i *p*-hidroksibenzojeva kiselina, dok u derivate hidroksicimetne kiseline ubrajamo *p*-kumarinsku kiselinu, feruličnu, sinapinsku i kava kiselinu. (2)(4)

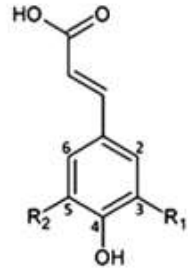
Hidroksibenzojeve kiseline (C6-C1 struktura) se rijetko nalaze u svom slobodnom obliku, najčešće se pojavljuju povezani sa manjim organskim kiselinama poput maleinske ili vinske kiseline, ali mogu biti i povezani sa strukturnim komponentama biljnih stanica poput celuloze, lignina ili proteina. Mogu se sintetizirati izravno iz šikiminske kiseline od kojih su za taj put nastajanja najznačajnije galna i salicilna kiselina. (1)

Hidroksibenzojeva kiselina



	R1	R2	R3	R4
Salicilna kiselina	OH	H	H	H
p-Hidroksibenzojeva kiselina	H	H	OH	H
Protokatehinska kiselina	H	OH	OH	H
Vanilinska kiselina	H	OCH_3	OH	H
Galna kiselina	H	OH	OH	OH
Siringinska kiselina	H	OCH_3	OH	OCH_3

Hidroksicimetna kiselina



	R1	R2
p-kumarinska kiselina	H	H
Kafeinska kiselina	OH	H
Ferulična kiselina	OCH_3	H
Sinapinska kiselina	OCH_3	OCH_3

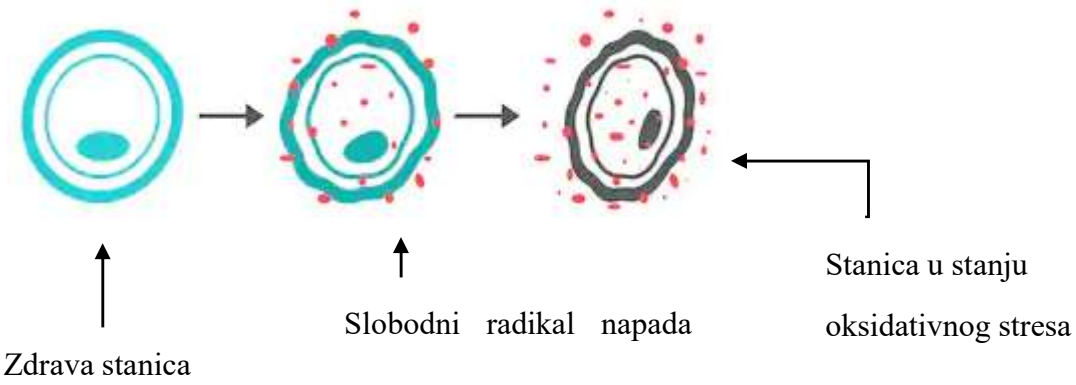
Slika 2.Prikaz osnovne strukture fenolnih kiselina i njihove podjela (1)

Hidroksicimetne kiseline(C6-C3 struktura) su gotovo uvijek povezane s velikim ili malim molekulama. U biljnoj hrani najrašireniji derivati su esteri kava kiseline i kvininske kiseline, koji su pod zajedničkim nazivom poznate kao klorogena kiselina. (1) Hidroksicimetne kiseline su sastavni dio međuprodukata u biosintezi lignina. (4)

1.2. Antioksidacijska aktivnost

Svi spojevi koju spadaju u skupinu fenola se klasificiraju kao snažni antioksidansi pa tako i fenolne kiseline. Njihova glavna uloga je obrana od oksidativnog stresa koju uzrokuje višak slobodnih radikala kisika te oni nadopunjavaju djelovanje antioksidacijskih vitamina i enzima. (5)(6)

Oksidativni stres predstavlja štetno stanje stanice koje nastaje uslijed smanjene razine antioksidansa i povećane koncentracije slobodnih radikala, te ono u konačnici uzrokuje fizička i kemijska oštećenja tkiva koja dovode do razvoja bolesti. (6)



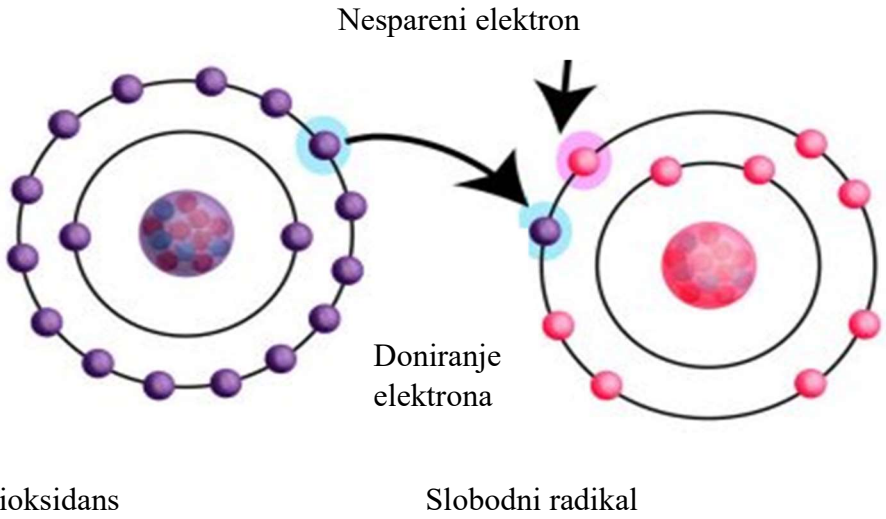
Slika 3.Ilustracija oksidativnog stresa (7)

Slobodni radikal je svaka molekula koja ima neparni elektron u atomskoj orbitali. Kao takvi su nestabilni i visoko reaktivni, a ovisno o ostalim molekulama one mogu primati ili davati elektron, pa prema tome mogu biti i oksidansi i reducensi. Najznačajniji kisikovi radikali su superoksidni radikali, vodikov peroksidni radikali, hidroksilni radikali i peroksilni radika i alkoksilni radikal, to su izrazito reaktivne molekule koje imaju sposobnost oštećenja molekula poput DNK, proteina, lipida i ugljikohidrata. (8)(9)

Antioksidansi su tvari koje imaju mogućnost zaštite stanica od oksidativnog stresa koji može biti uzrokovan zbog nestabilnih molekula kisika ili zbog slobodnih radikala. One djeluju na način da antioksidans koji je dovoljno stabilna molekula donira elektron nestabilnoj molekuli slobodnog radikala pri čemu ga neutralizira i na taj način smanjuje njegovu moć štećenja stanica. (9)

Postoji veliki broj mehanizama po kojima su fenolne kiseline ponašaju kao antioksidansi: (8) (9)(10)

- Hvatanje slobodnih radikala
- Donacija vodika
- Kelatori metalnih iona (Fe^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} i Mg^{2+}) i dr.



Slika 4. Prikaz nastajanja slobodnog radikala (11)

1.3. Utjecaj strukture na antioksidacijsku aktivnost fenolnih kiselina

Antioksidacijska aktivnost fenolnih kiselina se zasniva na njihovoj sposobnosti vezanja slobodnih radikala i donacije vodikovih atoma ili elektrona. Za takav način djelovanja smatra se da su najviše zaslužni kemijska struktura i prostorni rasporedu supstituenata u molekuli. (5)(12)(13)

Antioksidacijska aktivnost fenolnih kiselina ovisi o: (13)

- Broju hidroksilnih skupina (-OH) i njihovom položaju u odnosu na karboksilnu skupinu (-COOH)
- Steričkim smetnjama

Antioksidacijska aktivnost fenolnih kiselina se povećava stupnjem hidroksilacije pa tako npr. trihidroksilirana galna kiselina koja pokazuje visoku vrijednost antioksidacijskog djelovanja. (13)

Veza između kemijske strukture fenolnih kiselina i antioksidacijske aktivnosti se povećava kada je prisutna dodatna -OH grupa. Naime, monohidroksibenzojeve kiseline s –OH ostatkom na *orto*- ili *para*- položaju u odnosu na –COOH skupinu ne pokazuju nikakvu antioksidacijsku aktivnost, dok se isto ne odnosi za *m*-hidroksibenzojeve kiseline.(13) Općenito, monofenoli i polifenoli su spojevi koji su prisutni u reakcijama otpuštanja vodikova atoma te u reakcijama ″hvatanja″ slobodnih radikala. Pri tom su polifenoli učinkovitiji pa uvođenje druge –OH grupe na *orto*- i *para*- položaj značajno poboljšava njihovu antioksidacijsku aktivnost pa je prema tome galna kiselina s tri –OH grupe bolji antioksidans od *p*-kumarinske kiseline. Jedna ili dvije metoksi grupe prisutne u *orto*- položaju također povećavaju antioksidacijsku aktivnost. Primjerice, sinapinska kiselina s dvije metoksi grupe je aktivnija od ferulinske kiseline s jednom metoksi grupom. (14)

Steričke smetnje povećavaju antioksidacijsku aktivnost što je primijećeno sa sintetskim antioksidansom, butiliranim hidroksitoluenom. (8)

U dostupnoj znanstevnoj literaturi se ističe učinkovitije djelovanje hidroksicimetnih kiselina u odnosu na hidroksibenzojeve kiseline, a aktivnost je izražena kod kava kiseline i klorogenih kiselina. Veća učinkovitost hidroksicimetne kiseline u odnosu na hidroksibenzojeve kiseline je posljedica CH=CH-COOH skupine kod hidroksicimetne kiseline koja osigurava veću sposobnost darivanja vodikovih atoma i stabilizacije radikala u odnosu na -COOH skupinu kod hidroksibenzojeve kiseline. (13)

Kemijski gledano, doniranjem elektrona ili atoma vodika i molekule fenolnih kiselina same postaju slobodni radikali, no oni su manje aktivni. U slučaju njihove visoke koncentracije mogu izazvati pro-oksidacijske aktivnosti. (15)

1.4. Interakcijsko djelovanje fenolnih kiselina

Kao što je prethodno u uvodu navedeno, fenoli su zbog svojih svojstava vrlo zanimljivi u znanstvenom svijetu, no vode se pitanja bi li fenolne smjese bile učinkovite kao što su i čisti spojevi. Nekolicina znanstvenika se upustila u takva istraživanja.

Freeman i sur. (2010) su proveli istraživanje na sedam najčešćih spojeva u naranči: klorogenakiselina, hesperidin, miricetin, *p*-kumarinska kiselina, luteolin, naringenin, i kvercetin. Oni su pomoću ORAC metode ispitivali sinergijsko djelovanje pojedinih komponenti te su došli do zaključka da naringenin i hesperidin imaju najjače interakcijsko djelovanje, dok dodavanje trećeg spoja smjesi dovodi do poboljšanja, a dodatak četvrtog spoja nije značajno utjecao na povećanje antioksidacijske aktivnosti. (16)

Kurin i sur. (2012.) su proučavali interakcijsko djelovanje kvercetina, resveratrola i kava kiseline u crvenom vinu korištenjem različitih antioksidacijskih metoda kao što su FRAP, DPPH, ABTS, NO i dr. (17) Došli su do zaključka da je resveratrol pokazao najnižu inhibicijsku aktivnost, učinak mu je bio od 1,7 do 50 puta slabiji u odnosu na kvercetin, te 1,9 do 21,8 puta manji usporedbi s kava kiselinom. Nakon utvrđivanja djelovanja pojedinih komponenti ispitana je antioksidacijska aktivnost smjesa. Smjesa kvarcetina i resveratrola u jednom testu je pokazala aditivni učinak, kod dva testa sinergiju a u ostalima antagonističko djelovanje. Smjesa kvercetina i kava kiseline je u gotovo svim testiranim metodama imala sinergijski učinak. Smjesa resveratrola i kava kiseline u tri testa je imala antagonističko djelovanje, dok je u ostala četiri testa imala sinergijsko djelovanje. (17)

Hajimehdipoor i sur. (2014.) su istraživali potencijalno sinergističko/antagonističko djelovanje koristeći otopine galne, ružmarinske, klorogene i kava kiseline te kvercetina i rutina. Od navedenih otopina pripremili su otopine s kombinacijama dvije i tri kiseline. Uz nekoliko binarnih kombinacija najbolji sinergijski učinak pokazala je smjesa galne i kava kiseline (137,8%). Dokazano je također da rutin u kombinaciji s drugom kiselinom ne mijenja antioksidacijsku aktivnost što ukazuje da ne ulazi u interakciju s drugim komponentama. Kombiniranjem 3 kiseline primijećen je znatan antagonizam, primjerice smjesa rutina, kava kiseline i ružmarinske kiseline (-21,8%) i smjesa klorogenske, ružmarinske i kava kiseline (-20%). (18)

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Otopine ekvimolarnih fenolnih smjesa

U eksperimentalnom dijelu ovog rada korišteni su otopine fenolnih kiselina pripravljene pri istim molarnim koncentracijama (5 μM) od kojih su pripravljene ekvimolarne smjese derivata hidroksibenzojeve (Tablica 1) i hidroksicimetne kiseline (Tablica 2). Fenolne smjese su pripravljene miješanjem jednakih volumena otopina (iste koncentracije) dvaju ili više fenolnih spoja. Sve otopine ekvimolarnih fenolnih smjesa pripravljene su u dva ponavljanja i do provođenja analize čuvane su u hladnjaku pri temperaturi +4°C.

Tablica 1. Smjese derivata hidroksibenzojeve kiseline

Molarni omjer	**Fenolne smjese**	**Oznaka**
1:1	Galna + Protokatehinska	G +P
	Galna + Siriginska	G + S
	Galna + Vanilinska	G + V
	Galna + Gentisinska	G + GEN
	Protokatehinska + Gentisinska	P + GEN
	Protokatehinska + Siriginska	P + S
	Protokatehinska + Vanilinska	P + V
	Vanilinska + Gentisinska	V + GEN
	Vanilinska + Siriginska	V + S
	Siringinska + Gentisinska	S + GEN
1:1:1	Siriginska + Gentisinska + Galna	S + GEN + G
	Siriginska + Vanilinska + Galna	S +V + G
	Siriginska + Vanilinska + Gentisinska	S + V + GEN
	Siriginska + Protokatehinska + Galna	S + P + G
	Siriginska + Protokatehinska + Gentisinska	S +P + GEN
	Siriginska + Vanilinska + Protokatehinska	S + V + P
	Galna + Gentisinska + Protokatehinska	G + GEN + P
	Galna +Vanilinska + Gentisinska	G + V + GEN

	Galna + Vanilinska + Protokatehinska	G + V + P
	Protokatehinska + Vanilinska + Gentisinska	P + V + GEN
1:1:1:1	Protokatehinska + Siriginska + Galna + Gentisinska	P + S + G + GEN
	Protokatehinska + Vanilinska + Gentisinska + Galna	P + V + GEN + G
	Protokatehinska + Vanilinska + Galna + Siriginska	P + V + G + S
	Protokatehinska + Vanilinska + Gentisinska + Siriginska	P + V + GEN + S
	Siriginska + Vanilinska + Gentisinska + Galna	S + V + GEN + G
1:1:1:1:1	Galna +Vanilinska + Protokatehinska + Siriginska + Gentisinska	G + V+ P + S + GEN

Tablica 2. Smjese derivata hidroksicimetne kiseline

Molarni omjer	**Fenolne smjese**	**Oznaka**
1:1	Ferulinska + Ružmarinska	F + R
	Ferulinska + *p*-kumarinska	F + *p*K
	Ferulinska + Sinapinska	F + SIN
	Ferulinska + Kava	F + K
	Kava + Sinapinska	K + SIN
	Kava + *p*-kumarinska	K + *p*K
	Kava + Ružmarinska	K + R
	Ružmarinska + *p*-kumarinska	R + *p*K
	Ružmarinska + Sinapinska	R + SIN
	Sinapinska + *p*-kumarinska	SIN + pK
1:1:1	Kava + Sinapinska + Ferulinska	K + SIN + F
	Kava + Ferulinska + Ružmarinska	K + F + R
	Kava + *p*-kumarinska + Ružmarinska	K + *p*K + R
	Kava + Sinapinska + Ružmarinska	K + SIN + R
	Kava + Ferulinska + *p*-kumarinska	K + F + pK
	Kava + *p*-kumarinska + Sinapinska	K + *p*K + SIN
	p-kumarinska + Sinapinska + Ferulinska	*p*K + SIN + F
	p-kumarinska + Ružmarinska + Ferulinska	*p*K + R + F

	p-kumarinska + Sinapinska + Ružmarinska	*p*K + SIN + R
	Ružmarinska + Ferulinska + Sinapinska	R + F + SIN
1:1:1:1	Kava + Ferulinska + *p*-kumarinska + Ružmarinska	K + F + *p*K + R
	Kava + *p*-kumarinska + Sinapinska + Ružmarinska	K + *p*K + SIN + R
	Kava + *p*-kumarinska + Ferulinska + Sinapinska	K + *p*K + F + SIN
	Kava + Ferulinska + Sinapinska + Ružmarinska	K + F + SIN + R
	p-kumarinska + Ferulinska + Sinapinska + Ružmarinska	*p*K + F + SIN + R
1:1:1:1:1	Kava +*p*-Kumarinska +Sinapinska +Ferulinska +Ružmarinska	K + *p*K + SIN + F + R

2.2. Kemikalije i uređaji

Kemikalije:

- Natrijev-fosfat dihidrat
- Dinatrijevdihidrogen fosfat
- Fluorescein 3',6'- dihidroksispiro[izobenzofuran-1(3H),9'-[9H] kstanten]-3-on
- 2,2'- azobis(2-metilpropionamidin) dihidroklorid, granularni, 97 %,
- Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka.

Uređaji:

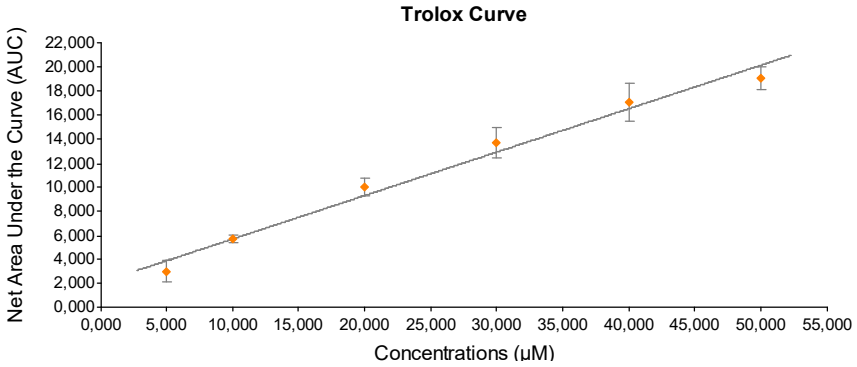
- Analitička Vaga Kern Model ALS 120-4, Kingston, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Mikrotitarski čitač pločica, Synergy HTX Multi-Mode Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA).

2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti ORAC metodom

Ovom metodom se određuje antioksidacijski kapacitet uzorka praćenjem inhibicije djelovanja slobodnog peroskil radikala koji nastaje raspadanjem 2,2-azobis(2-metilpropionamid)-dihidroklorida (AAPH) na fluorescentni spoj fluorescein. (19)

Reagensi:

- ***Fosfatni pufer, pH=7, c=0,2 M:***Odvaže se 6,242 g natrijevog fosfata dihidrata ($NaH_2PO_4 \times 2H_2O$) i 5,687 g dinatrijevoghidrogen fosfata (Na_2HPO_4), te se svaka količina posebno otopi u tikvici sa 200 mL destilirane vode. Nakon toga 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 destiliranom vodom 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 je potrebno pripremiti svježu otopinu pufera.
- ***Fluorescein; Početna otopina (4,2 mM):***Otopi se 15 mg fluoresceina u 100 mL 0,075 M fosfatnog pufera. Otopina se čuva na +4 °C u mraku par dana. ***Radna otopina fluoresceina(0,08 µM):*** Nadopuni se 1,9 µL početne otopine sa 100 mL 0,075 M fosfatnog pufera. Svaki dan se obavezno pripremaju svježa razrjeđenja otopina fluoresceina.
- ***AAPH(2,2-azobis (2-metilpropionamid)-dihidroklorid):*** 0,207 g AAPH otopi se u 5 mL 0,075 M pufera. Svaki dan se priprema svježi reagens, do mjerenja se čuva u ledenoj kupelji i stabilan je 8 h.
- ***Otopina standarda – Trolox:***otopinaTroloxa, početne 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 5. *Baždarni pravac za Trolox*

Postupak:

U svaku poru mikrotitarske pločice pipetira 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 smjesa fenolnih kiselina. Tako pripremljene otopine se termostatiraju 30 minuta pri 37 °C, nakon čega im se doda 25 µL AAPH, te se svake minute mjeri promjena intenziteta fluorescencije pri λ_{eks}= 485 nm i λ_{em} = 520 nm.

2.4. Određivanje interakcijskog djelovanja fenolnih smjesa

Interakcija između ekvimolarnih smjesa fenolnih kiselina, određena ORAC metodom, opisana je kao razlika u antioksidacijskoj aktivnosti i izračunata je preko jednadžbe:

Razlika = ((eksperimentalna vrijednost)*100/(očekivana vrijednost smjese))-100

gdje je:

Eksperimentalna vrijednost – eksperimentalno dobiven rezultat za smjesu dva ili više testiranih fenolnih smjesa

Očekivana vrijednost – vrijednost za smjese dobivene računski zbrajanjem teoretskih ORAC vrijednosti za pojedini spoj iz smjese

Pozitivne vrijednosti razlike ukazuju na potencijalno sinergijsko djelovanje, negativne vrijednosti na antagonističko djelovanje, a za vrijednosti razlike 0% odnosno ± 5% može se smatrati da postoji aditivno djelovanje.

3. REZULTATI I RASPRAVA

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti ekvimolarnih smjesa fenolnih kiselina korištena je ORAC metoda koja se temelji na mjerenju inhibicije AAPH peroksil-radikala, pri čemu je azo-spoj AAPH izvor radikala koji se raspada pri 37 ^{o}C stalnom brzinom stvarajući peroksil-radikale. (20)

U ovom je radu analizirana antioksidacijska aktivnost smjesa fenolnih kiselina (dvije i više) u koncentraciji od 5 μM. Ekvimolarne smjese fenolnih kiselina pripravljene su od pet derivata hidroksibenzojeve kiseline (galna, gentisinska, protokatehinska, siriginska i vanilinska) i pet derivata hidroksicimetne kiseline (ferulinska, kava, *p*-kumarinska, ružmarinska i sinapinska) miješanjem jednakih volumena otopina u sljedećim kombinacijama:

- Kombinacija dvije kiseline (omjer 1:1)
- Kombinacija tri kiseline (omjer 1:1:1)
- Kombinacija četiri kiseline (omjer 1:1:1:1)
- Kombinacija pet kiselina (omjer 1:1:1:1:1)

Na osnovu dobivenih teoretskih i eksperimentalnih ORAC vrijednosti testiranih fenolnih smjesa određen je sinergijski, aditivni i/ili antagonistički učinak, a rezultati su prikazani u tablicama 3 i 4.

Dio ovog završnog rada nije bio ispitivanje antioksidacijske aktivnosti čistih fenolnih kiselina već je to odrađeno u sklopu drugog završnog rada (14), no radi lakšeg tumačenja rezultata u tablici 3 su prikazane i te vrijednosti. Iz prikazanih podataka vidljivo je da je najslabiju aktivnost među testiranim pojedinačnim fenolnim kiselinama imala galna kiselina od derivata hidroksibenzojeve kiseline i *p*-kumarinska kiselina od derivata hidroksicimetne kiseline. Najveće ORAC vrijednosti među testiranim kiselinama zabilježene su kod ružmarinske kiseline, dok su ostale kiseline imale ORAC vrijednosti od 40-50 μM TE.

Tablica 3. ORAC vrijednosti za fenolne kiseline pri koncentraciji 5 μM (14)

	Spoj	**ORAC (μM TE)**
Hidroksibenzojeve kiseline	Protokatehinska kiselina	57,0 ± 2,35
	Vanilinska kiselina	55,7 ± 1,21
	Gentisinska kiselina	53,4 ± 0,38
	Siriginska kiselina	40,6 ± 0,93
	Galna kiselina	28,0 ± 0,75
Hidroksicimetne 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

3.1. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti i interakcijskog djelovanja smjesa derivata hidroksibenzojeve kiseline

U tablici 4 prikazani su rezultati antioksidacijske aktivnosti ekvimolarnih smjesa fenolnih kiselina derivata hidroksibenzojeve kiseline. Iz prikazanih rezultata može se uočiti da su samo dvije smjese fenolnih kiselina pokazale antagonistički učinak i to smjese G+S (-24% razlike) i G+V (-30% razlike), dok su sve ostale imale sinergijski učinak. Ono što se posebno ističe je znatno bolji antioksidacijski učinka i sinergijsko djelovanje binarnih smjesa u odnosu na smjese s tri i više kiselina. Smjesa S+GEN je pokazala najveću antioksidacijsku aktivnost (157,9 μM TE), ali isto tako i sinergijski učinak (236,1% razlike). Nakon ove smjese slijede P+GEN (150,3 μM TE), V+GEN (149,5 μM TE) te P+V (147,5 μM TE) s izvrsnim sinergističkim djelovanjem osobito u slučaju kombinacija V+S s razlikom od 209,91%. Nešto niže ORAC vrijednost pokazale su smjese G+P (54,6 μM TE), G+GEN (76,7 μM TE) i P+S, no ne i zanemarivo sinergijsko djelovanje (28,4%; 88,6%; redom). Od binarnih smjesa samo je smjesa P+S pokazala aditivno djelovanje s razlikom između očekivane i eksperimentalne vrijednosti u iznosu od 4,13%.

Tablica 4. Usporedba teoretskih i eksperimentalnih ORAC vrijednosti i interakcijsko djelovanje ekvimolarnih smjesa derivata hidroksibenzojevih kiselina (% razlike)

Oznaka fenolne smjese	**Eksperimentalna ORAC vrijednost (μM)**	**Očekivana ORAC vrijednost (μM)**	**Razlika (%)**
2 kombinacije			
G + P	54,6± 1,71	42,5	28,4
G + S	26,1 ± 5,50	34,3	-24,0
G + V	29,3 ± 0,73	41,9	-30,0
G + GEN	76,7 ± 5,34	40,7	88,6
P + GEN	150,3 ± 0,42	55,2	172,4
P + S	50,8 ± 0,10	48,8	4,1
P + V	147,5 ± 1,07	56,3	161,8
V + GEN	149,5 ± 1,02	54,5	174,2
V + S	149,3 ± 0,68	48,2	209,9
S + GEN	157,9 ± 2,10	47,0	236,1
3 kombinacije			
S + GEN + G	49,7 ± 2,28	40,7	22,4
S +V + G	53,1 ± 1,13	41,4	28,2
S + V + GEN	64,5 ± 0,97	49,9	29,3
S + P + G	42,6 ± 1,22	41,9	1,9
S +P + GEN	69,2 ± 1,74	50,3	37,54
S + V + P	64,9 ± 4,06	51,1	26,94
G + GEN + P	56,2 ± 0,51	46,1	21,94
G + V + GEN	66,4 ± 4,38	45,7	45,24
G + V + P	60,7 ± 2,43	46,9	29,4
P + V + GEN	81,8 ± 2,21	55,3	47,8
4 kombinacije			
P + S + G + GEN	62,3 ± 8,64	44,73	39,3
P + V + GEN + G	76,8 ± 2,31	48,5	58,3
P + V + G + S	65,3 ± 4,01	45,3	44,1
P + V + GEN + S	86,4 ± 4,11	51,7	67,2
S + V + GEN + G	66,8 ± 2,40	44,47	50,3
5 kombinacije			
G + V+ P + S + GEN	59,5 ± 1,77	46,9	26,7

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

Dodatkom treće kiseline u smjesu antioksidacijska aktivnost smjese slabi, ali i dalje uočavamo sinergijski učinak. U smjesama s četiri fenolne kiseline ORAC vrijednosti su se kretale od 62 do 86 μM TE i sve testirane smjese su pokazale sinergijski učinak i to bolji od smjesa koje su činile tri fenolne kiseline. Kombinacija svih pet kiselina iz podgrupe derivata hidroksibenzojeve kiseline također je pokazala sinergijski učinka s razlikom između eksperimentalne i teoretske vrijednosti antioksidacijske aktivnosti od 26,7%.

Smjesa V+S koja je imala najbolji sinergijski učinak, posebno se izdvaja jer u svojoj strukturi ove fenolne kiseline jedine imaju prisutnu $–OCH_3$ skupinu, i to vanilinska kiselina (V) jednu, a siringinska kiselina (S) dvije $–OCH_3$ skupine. Uz ove skupine obje kiseline posjeduju i po jednu -OH skupinu u svojoj strukturi. Usprkos tome ne možemo reći da postoji pravilo u kojem je prisutnost kiselina s $–OCH_3$ skupinom utjecalo na bolji učinak smjesa obzirom da su neke od njih pokazale i antagonistički učinak (G+S i G+V). Nadalje, u svim binarnim smjesama koje su sadržavale protokatehinsku (P) i gentisinsku (GEN) kiselinu dokazan je sinergijski učinak pa možemo donijeti zaključak da je prisustvo katekolne skupine (*o*-dihidroksilna skupina) u njihovoj strukturi vrlo vjerojatno zaslužno za to jer u smjesama u kojima je prisutna kiselina s jednom ili tri –OH skupine (npr. galna) nemamo takav trend. U smjesama s tri i više kiselina, ipak ne možemo u potpunosti donijeti zaključak o kojim skupinama (-OH i/ili $–OCH_3$) prisutnim na benzenskom prstenu ovisi ukupna aktivnost smjese.

U odnosu na ovaj rad slični ili drukčiji zaključci su doneseni u radu Jolić (2017) u kojem je bio cilj FRAP metodom zaključakiti postoji li sinergističko, antagonističko i/ili aditivno djelovanje u ekvimolarnim smjesama derivata hidroksibenzojeve kiseline pri različitim koncentracijama (100 μM, 500 μM i 1000 μM). Iako su metoda i koncentracije različite u odnosu na ovaj rad pri najnižim testiranim koncentracijama u navedenom radu su fenolne smjese pokazale slične rezultate. (15) Jolić (2017) također izdvaja smjesu V+G koja pokazuje antagonistički učinak kao što je bio slučaj i u ovom radu. Ono što se posebno ističe u radu Jolić (2017) je činjenica da povećanjem koncentracije fenolnih kiselina u smjesama dolazi do slabljenja antioksidacijskog učinka i interakcijskog djelovanja. Pri koncentraciji od 1000 μM sve testirane smjese su pokazale antagonistički učinak a kod nekih smjesa s tri kiseline, kao što je P+S+GEN, ipak postoji sinergijski učinak i to s vrlo visokim postotkom razlike (173,6%). Kod smjesa četiri i pet kiselina, samo pri nižim koncentracijama dokazan je blagi sinergijski učinak. (15)

3.2.Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti i interakcijskog djelovanja smjesa derivata hidroksicimetne kiseline

U tablici 5 prikazani su rezultati antioksidacijske aktivnosti ekvimolarnih smjesa derivata hidroksicimetne kiseline. Iz tablice možemo uočiti da, za razliku od derivata hidroksibenzojeve kiseline, ove smjese imaju nešto niže ORAC vrijednosti i puno manji broj smjesa pokazuje sinergijski učinak. Najbolji antioksidacijski potencijal pokazala je smjesa F+*p*K(159,7 μM TE) s razlikom od 311,17% te smjesa K+SIN (161,6 μM TE) s razlikom od 210,67%. Također, nešto slabije, ali svejedno dobro, sinergijsko djelovanje pokazale smjese F+R s razlikom od 127,25% te K+R s razlikom od 114,52%. Ostale binarne smjese derivata hidroksicimetne kiseline pokazale su blago sinergijsko ili aditivno djelovanje.

U smjesama koje su sadržavale tri kiseline samo je smjesa K+F+*p*K pokazala sinergijsko djelovanje i to vrlo slabo s razlikom od 16,24%. Smjesa K+*p*K+R je pokazala sinergijsko djelovanje koje je približno aditivnom s razlikom od 7,29%. Blago antagonistički učinak pokazale su smjese K+SIN+F s razlikom od -12,66% i smjesa R+F+SIN s razlikom od -22,27%. Ostatak smjesa s tri kiseline su pokazale aditivno djelovanje. Dodatkom četvrte kiseline u smjesu samo je kod smjese *p*K+F+SIN+R dovelo do sinergijskog djelovanja s vrlo visokim postotkom razlike od 44,2%. Ostatak smjesa je pokazao aditivno djelovanje, dok je antagonizam uočen u smjesi K+F+SIN+R (-13,86%). Smjesa pet kiselina je u ovom slučaju pokazala aditivno djelovanje s razlikom od 2,69%.

Za razliku od derivata hidroksibenzojeve kiseline, u ovom slučaju ne uočavamo bolji antioksidacijski učinak u smjesama u kojima su prisutne kiseline koje u svojoj strukturi posjeduju $–OCH_3$ skupinu kao što su ferulinska (F) i sinapinska (SIN) kiselina. Također, ni prisustvo kava kiseline, s katekolnom strukturom, nije rezultiralo boljim učinkom binarnih smjesa što vidimo i po rezultatima koji ukazuju na aditivno i sinergijsko djelovanje u smjesama. I kod derivata hidrokicimetne kiseline ne možemo zaključiti o kojim skupinama (-OH i/ili $–OCH_3$) prisutnim na benzenskom prstenu ovisi ukupna aktivnost smjese.

Tablica 5. Usporedba teoretskih i eksperimentalnih ORAC vrijednosti i interakcijsko djelovanje ekvimolarnih smjesa derivata hidroksicimetnih kiselina (% razlike)

Oznaka fenolne smjese	**Eksperimentalna ORAC vrijednost (μM)**	**Očekivana ORAC vrijednost (μM)**	**Razlika (%)**
2 kombinacije			
F + R	155,9 ± 1,39	68,6	127,2
F + *p*K	159,7 ± 3,93	38,8	311,2
F + SIN	50,5 ± 3,58	44,6	13,2
F + K	58,9 ± 2,46	48,8	20,8
K + SIN	161,6 ± 4,37	52,0	210,7
K + *p*K	52,3 ± 1,50	46,3	13,1
K + R	163,1 ± 8,63	76,0	114,5
R + *p*K	61,2 ± 6,49	62,5	-2,1
R + SIN	74,0 ± 3,45	68,3	8,5
SIN + *p*K	51,6 ± 2,99	38,5	33,9
3 kombinacije			
K + SIN + F	43,4 ± 2,79	49,6	-12,7
K + F + R	60,2 ± 1,66	65,7	-8,4
K + *p*K + R	66,1 ± 2,45	61,6	7,3
K + SIN + R	56,2 ± 1,74	65,4	-14,1
K + F + *p*K	53,3 ± 1,33	45,8	16,2
K + *p*K + SIN	46,6 ± 2,74	45,6	2,1
*p*K + SIN + F	39,0 ± 1,41	40,7	-4,2
*p*K + R + F	54,7 ± 2,19	56,7	-3,6
*p*K + SIN + R	54,3 ± 1,37	56,4	-3,7
R + F + SIN	47,0 ± 2,01	60,5	-22,3
4 kombinacije			
K + F + *p*K + R	55,7 ± 2,07	57,4	-2,9
K + *p*K + SIN + R	52,0 ± 0,65	57,3	-9,2
K + *p*K + F + SIN	44,7 ± 1,78	45,4	1,7
K + F + SIN + R	51,9 ± 0,58	60,3	-13,9
*p*K + F + SIN + R	77,2 ± 3,76	53,6	44,2
5 kombinacije			
K + *p*K + SIN + F + R	56,3 ± 3,20	54,8	2,7

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

Vrdoljak (2017.) je u svom radu FRAP metodom dokazivala sinergijsko/antagonističko i/ili aditivno djelovanje derivata hidroksicimetne kiseline pri različitim koncentracijama (100 μM, 500 μM i 1000 μM). U ekvimolarnim binarnim smjesama testiranim pri niskoj koncentraciji sinergijski učinak je dokazan za sve fenolne smjese osim za smjesu R+*p*K (-2,1%). Pri višim koncentracijama nije bilo značajnih sličnosti ovim radom. Miješanjem tri kiseline fenolne smjese su uglavnom imali aditivni učinak uz iznimku smjese K+*p*K+R koja je pokazala izvrsno sinergijsko djelovanje s razlikom od 127,10% (pri 100 μM). I u ovom slučaji smjese četiri i pet kiselina uglavnom se imale aditivno djelovanje uz iznimku smjese *p*K+F+SIN+R s razlikom od 44,2%. (21)

4. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih rezultata možemo izvesti nekoliko zaključaka:

- Ekvimolarne smjese derivata hidroksibenzojeve kiseline imale su bolji antioksidacijsko djelovanje i interakcijski učinak u odnosu na smjese derivata hidroksicimetne kiseline.

- Smjese dviju fenolnih kiselina su pokazale dobru antioksidacijsku aktivnost u odnosu na smjese s tri i više kiselina, ali ne i bolji sinergijski učinak.

- Interakcijski učinak smjesa fenolnih kiselina ovisio je o kemijskoj strukturi spojeva prisutnih u smjesama.

- Prisustvo $–OCH_3$ ili katekolne skupine ne opisuje u potpunosti bolji ili lošiji interakcijski učinak testiranih fenolnih smjesa.

5. LITERATURA

1. Yahia EY, Carillo-Lopez A, editors. Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables. Ciudad Juárez, Mexico:Woodhead Publishing; 2019

2. Sanchez-Maldonado AF, Schieber A i Ganzle MG. Structure–function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism ly lactid acid bacteria. Journal of Applied Microbiology. 2011; 111(5): 1176 - 1184.

3. Lovrić S. Fiziološka i ekološka značajnost fenolnih spojeva u biljci (završni rad). Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera; 2014.

4. Vuković R. Učinak inducibilne ekspresije gena crypt na sintezu fenolnih spojeva i antioksidacijski status transgenog korijenja ukrasne koprive (Coleus blumei Benth.) (doktorski rad). Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilište u Dubrovniku, Institut Ruđer Bošković u Zagrebu, Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij, 2013.

5. Mikulinjak M. Antioksidativna aktivnost modelnih otopina fenolnih tvari (završni rad). Osijek: Sveučilište Josipa Strossmayera u Osijeku; 2015.

6. 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.

7.URL:https://image.shutterstock.com/image-vector/oxidative-stress-diagram-vector-illustration-260nw-648541939.jpg. Pristupljeno 22.3.2020.

8. Robards K, Prenzler PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. Food Chemistry. 1999; 66: 401-436.

9. Lobo V, Patil A i Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy Reviews. 2010; 4(8): 118-126

10. Kazazić SP. Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju. 2004; 4 (55), 279-290.

11.URL:https://st4.depositphotos.com/11640498/23005/v/450/depositphotos_230054234-stock-illustration-chemical-diagram-showing-antioxidant-dinates.jpg Pristupljeno 23.3.2020.

12. Rastija V, Medić-Šarić M .QSAR study of antioxidant activity of wine polyphenols. European Journal of Medicinal Chemistry. 2009; 44: 400-408.

13. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chem. 2005; 99(1), 191-203
14. Vrdoljak L. Određivanje antioksidacijskog djelovanja fenolnih kiselina ORAC metodom (završni rad). Split: Sveučilište u Splitu; 2019.
15. Jolić N. Antoiksidacijska aktivnost fenola: interakcija derivata hidroksibenzojeve kiseline (završni rad). Split: Sveučilište u Spllitu; 2017.
16. Freeman, BL, Eggett, DL i Parker, TL. Synergistic and Antagonistic Interactions of Phenolic Compounds Found in Navel Oranges. Journal of Food Science. 2010; 75(6), 570-576.
17. Kurin, E, Mučaji, P i Nagy, M. In Vitro Antioxidant Activities of Three Red Wine Polyphenols and Their Mixtures: An Interaction Study. Molecules; 2012; 17: 14336-14348.
18. Hajimehdipoor H, Shahrestani R, Shekarchi M. Investigating the synergistic antioxidant effects of some flavonoid and phenolic compounds. Research Journal of Pharmacognosy (RJP). 2014; 1(3): 35-40.
19. Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R, et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL)) of plasma and other biological and food samples. J Agric Food Chem. 2003;51(11):3273-9.
20. Mišković A. Antioksidacijske metode: metoda ORAC (završni rad). Split: Sveučilište u Splitu; 2016.
21. Vrdoljak L. Antioksidacijska aktivnost fenola: Interakcija derivata hidroksicimetne kiseline (završni rad). Split: Sveučilište u Splitu; 2017.