

Sinergijski antioksidacijski učinak flavan-3-ola

Grbavac, Marijana

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:523983>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

SINERGIJSKI ANTIOKSIDACIJSKI UČINAK FLAVAN-3-OLA

ZAVRŠNI RAD

MARIJANA GRBAVAC

Mat. br. 1157

Split, rujan 2017.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE

KEMIJSKO INŽENJERSTVO

SINERGIJSKI ANTIOKSIDACIJSKI UČINAK FLAVAN-3-OLA

ZAVRŠNI RAD

MARIJANA GRBAVAC

Mat. br. 1157

Split, rujan 2017.

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

SYNERGISTIC ANTIOXIDANT EFFECT OF FLAVAN-3-OLS

BACHELOR THESIS

MARIJANA GRBAVAC

Parent number: 1157

Split, September 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Preddiplomski studij kemijske tehnologije, smjer Kemijsko inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Tema rada je prihvaćena na 21. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta

Mentor: dr. sc. Danijela Skroza, znan. sur.

SINERGIJSKI ANTIOKSIDACIJSKI UČINAK FLAVAN-3-OLA

Marijana Grbavac, 1157

Sažetak:

Fenolni spojevi su izuzetno velika i kemijski raznolika skupina spojeva, od onih jednostavnih do vrlo složenih struktura poput katehina, flavanola, flavonola, antocijana, proantocijanida, itd.

U ovom radu ispitivana je antioksidacijska aktivnost predstavnika podgrupe flavan-3-ola (katehina, epikatehina, epikatehin galata i epigalokatehin galata), ekvimolarnih smjesa dvaju i više flavan-3-ola, sinergijski, aditivni i antagonistički učinak smjesa te utjecaj strukture na aktivnost korištenjem FRAP metode.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na razlike u biološkoj aktivnosti testiranih flavan-3-ola i njihovih ekvimolarnih smjesa. Na temelju rezultata možemo zaključiti da međusobna interakcija ispitivanih fenolnih spojeva rezultira sinergijskim ili antagonističkim učinkom obzirom na antioksidacijski kapacitet. Ekvimolarne smjese flavan-3-ola pokazale su izuzetno dobru redukcijsku snagu. FRAP metodom potvrđen je sinergijski učinak za sve smjese flavan-3-ola.

Ključne riječi: katehin, epikatehin, epigalokatehin galat, epikatehin galat, FRAP, sinergija

Rad sadrži: 37 stranica, 14 slika, 9 tablica, 39 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić – predsjednik
2. Izv. prof. dr. sc. Sandra Svilović – član
3. Dr. sc. Danijela Skroza – član - mentor

Datum obrane: (25. rujna 2017.)

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split

Faculty of Chemistry and Technology Split

Undergraduate study of chemical technology

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 21.

Mentor: Ph.D. Danijela Skroza

SYNERGISTIC ANTIOXIDANT EFFECT OF FLAVAN-3-OLS

Marijana Grbavac, 1157

Abstract:

Phenolic compounds are extremely large and chemically diverse group, ranging from simple compounds to very complex structures such as catechins, flavanols, flavonols, anthocyanins, proanthocyanidines, etc.

In this paper, the antioxidant activity of compounds from flavan-3-ol subgroup (catechin, epicatechin, epicatechin gallate and epigallocatechin gallate), equimolar mixtures of two or more flavan-3-ols, synergistic, additive and antagonistic effect of the mixture was investigated as well as the influence of their structure on activity using FRAP assay.

The results of this study indicate differences in the biological activity of the flavan-3-ols and their equimolar mixtures. Based on the results we can conclude that the mutual interaction of the investigated phenolic compounds results in a synergistic or antagonistic effect considering to the antioxidant capacity. The equimolar mixtures of flavan-3-ols showed an extremely good reduction power. The synergistic effect of all flavan-3-ols mixtures was confirmed using FRAP method.

Keywords: catechin, epicatechin, epigallocatechin gallate, epicatechin gallate, FRAP, synergy

Thesis contains: 37 pages, 14 figures, 9 tables, 39 references

Original in: Croatian

Defence committee: (September 25 2017.)

1. Ph.D. Ivana Generalić Mekinić, assistant prof. – chair person
2. Ph.D. Sandra Svilović, associate prof. - member
3. Ph.D. Danijela Skroza - supervisor

Defence date:

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

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

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

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici dr.sc. Danijeli Skroza koja mi je pomogla svojim savjetima pri izradi ovog završnog rada i što je uvijek imala strpljenja i vremena za moje brojne upite.

Također, zahvaljujem se cijeloj svojoj obitelji koja me podržava i usmjerava na pravi put.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

- Pripraviti otopine odabranih fenolnih spojeva i ekvimolarnih fenolnih smjesa.
- Odrediti antioksidacijsku aktivnost predstavnika podgrupe flavan-3-ola (katehina, epikatehina, epikatehin galata i epigalokatehin galata) metodom određivanja redukcijske snage (engl. *Ferric Reducing/Antioxidant Power*, FRAP).
- Odrediti antioksidacijsku aktivnost dvaju ili više ekvimolarnih smjesa flavan-3-ola metodom FRAP.
- Odrediti mogući sinergijski/ aditivni/ antagonistički učinak u smjesama flavan-3-ola.

SAŽETAK

Fenolni spojevi su izuzetno velike i kemijski raznolike skupine u rasponu od jednostavnih spojeva do vrlo složenih struktura poput katehina, flavanola, flavonola, antocijana, proantocijanida, itd.

U ovom radu ispitivana je antioksidacijska aktivnost predstavnika podgrupe flavan-3-ola (katehina, epikatehina, epikatehin galata i epigalokatehin galata), 2 ili više ekvimolarnih smjesa flavan-3-ola, sinergijski, aditivni i antagonistički učinak smjesa te utjecaj struktura na aktivnost korištenjem FRAP metode.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na razlike u biološkoj aktivnosti testiranih flavan-3-ola i ekvimolarnih smjesa flavan-3-ola. Na temelju rezultata možemo zaključiti da međusobna interakcija ispitivanih fenolnih spojeva rezultira sinergijskim ili antagonističkim učinkom obzirom na antioksidacijski kapacitet. Ekvimolarne smjese flavan-3-ola pokazale su izuzetno dobru redukcijsku snagu. FRAP metodom potvrđen je sinergijski učinak za sve smjese flavan-3-ola.

Ključne riječi: katehin, epikatehin, epigalokatehin galat, epikatehin galat, FRAP, sinergija

SUMMARY

Phenolic compounds are extremely large and chemically diverse groups ranging from simple compounds to very complex structures such as catechins, flavanols, flavonols, anthocyanins, proanthocyanides, etc.

In this paper, antioxidant activity of flavan-3-ol subgroup (catechin, epicatechin, epicatechin gallate and epigallocatechin gallate), 2 or more equimolar mixtures of flavan-3, synergistic, additive and antagonistic effect of the mixture was investigated and the influence of structure on activity using FRAP Methods (Ferric Reducing / Antioxidant Power).

The results of this study indicate differences in the biological activity of the flavan-3-ol and the equimolar mixtures of flavan-3-ol. Based on the results we can conclude that the mutual interaction of the investigated phenolic compounds results in a synergistic or antagonistic effect considering to the antioxidant capacity. The equimolar mixtures of flavan-3-ol showed an extremely good reduction power. FRAP method confirmed the synergistic effect of all mixtures.

Keywords: catechin, epicatechin, epigallocatechin gallate, epicatechin gallate, FRAP, synergy

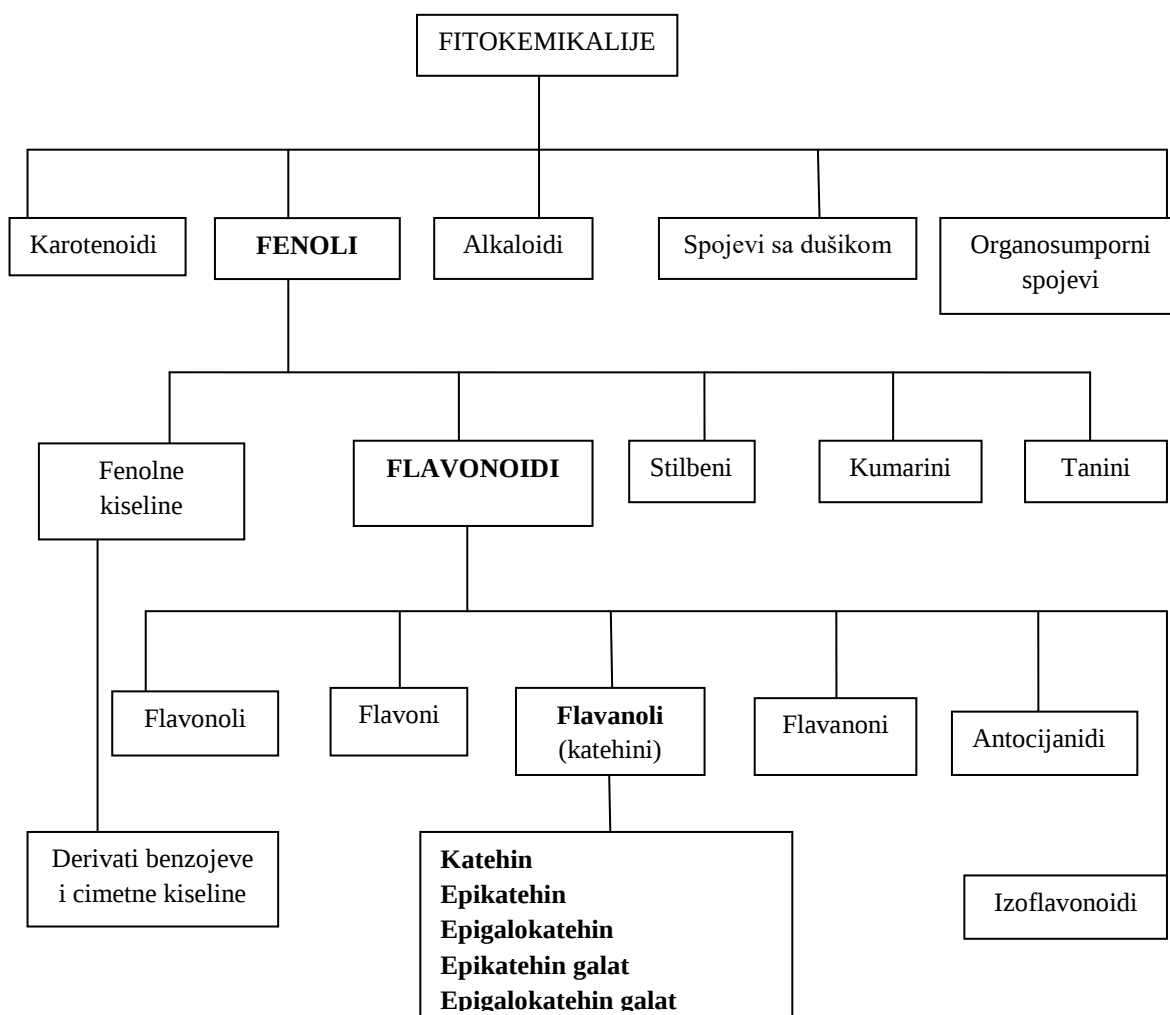
SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO	3
1.1. Flavonoidi	3
1.1.1. Flavani	4
1.2. Antioksidacijska aktivnost flavonoida	6
1.3. Odnos strukture i antioksidativne aktivnosti	8
1.4. Sinergija flavonoida	11
2. EKSPERIMENTALNI DIO	13
2.1. Materijal	13
2.1.1. Kemikalije	14
2.1.1.1. Odabrani fenolni spojevi.	14
2.1.1.2. Kemikalije korištene za određivanje antioksidacijskih svojstava	14
2.2. Priprava fenolnih otopina	15
2.2.1. Priprava otopina odabranih fenolnih spojeva	15
2.2.2. Priprava ekvimolarnih fenolnih smjesa	15
2.3. Metode određivanja antioksidacijskih svojstava	17
2.3.1. FRAP metoda	17
2.4. Interakcijsko djelovanje fenolnih spojeva	19
2.4.1. Određivanje interakcijskog djelovanja	19

3. REZULTATI.	20
3.1. Rezultati antioksidacijske aktivnosti flavan-3-ola određene metodom FRAP	20
3.2. Rezultati određivanja antioksidacijskih svojstava ekvimolarnih fenolnih smjesa određene metodom FRAP	22
3.3. Rezultati određivanja interakcijskog djelovanja ekvimolarnih fenolnih smjesa određene metodom FRAP	25
4. RASPRAVA.	28
5. ZAKLJUČAK	33
6. LITERATURA	34

UVOD

Fitokemikalije, odnosno fitonutrijenti, su skupina biološki aktivnih nehranjivih spojeva iz bilja, za koje je dokazano da imaju funkcionalnu vrijednost za ljudski organizam, djelujući u smislu zaštite ili prevencije nastanka različitih bolesti. Iako je do danas identificirano na tisuće različitih fitokemikalija velik broj nam je još uvijek nepoznat. Uobičajena podjela fitokemikalija prikazana je na slici 1.¹



Slika 1. Podjela fitokemikalija.¹

Fenolni spojevi predstavljaju najveću skupinu sekundarnih metabolita. Do sada ih je otkriveno preko 8000, a obuhvaćaju jednostavne spojeve poput fenolnih kiselina, ali i velike polimerne spojeve kao što su kondenzirani tanini. Fenolni spojevi su građeni od jednog ili više aromatskih prstenova koji posjeduju jednu ili više hidroksilnih (-OH) grupa.² Iako se fenolni spojevi najčešće spominju kao spojevi s fenolnim prstenom oni su zapravo veoma raznolika skupina sekundarnih metabolita zbog čega su u literaturi prisutni i različiti načini njihove klasifikacije: prema strukturi (slika 1), na temelju broja ugljikovih atoma u molekuli, na temelju biološke aktivnosti, biosintetskog puta i sl.³ Iako su dugo spominjani samo kao sekundarni produkti biljnog metabolizma, polifenoli se danas ubrajaju među najkorisnije fitokemikalije u hrani.

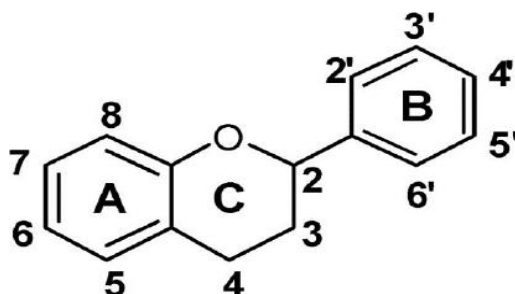
Za mnoge fenolne spojeve potvrđena su izuzetno dobra antioksidacijska i antimikrobna svojstva. Potencijalni antioksidativni učinak fenolnih spojeva do sada je najčešće istraživao testiranjem aktivnosti pojedinih spojeva, a razlike u njihovoj aktivnosti prepisivale su se strukturnim razlikama među molekulama (broju i položaju -OH skupina i dvostrukih veza). Iako su u prirodi uvijek prisutni kao fenolne smjese, a ne samo kao jedan izdvojeni sastojak, vrlo je malo informacija o mogućem združenom (sinergijskom/ aditivnom/ antagonističkom) djelovanju fenolnih spojeva.

Upravo iz tog razloga javlja se potreba za dodatnim istraživanjima mogućeg interakcijskog djelovanja bioaktivnih polifenola u cilju boljeg razumijevanja načina djelovanja složenih fenolnih smjesa.

1. OPĆI DIO

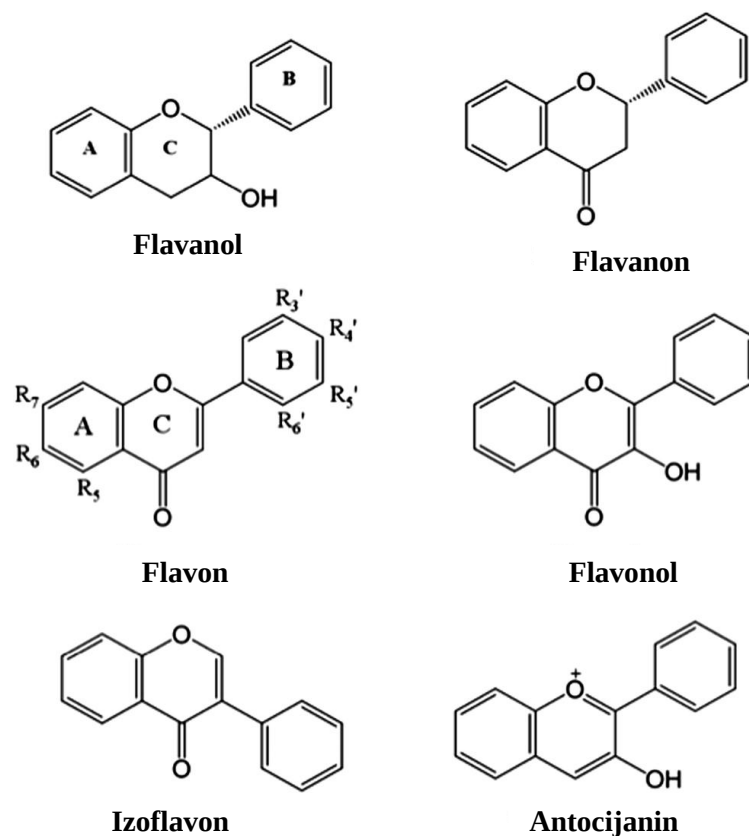
1.1. Flavonoidi

Flavonoidi su najbrojnija skupina fenolnih spojeva i nalaze u mnogim biljkama, koncentrirani u sjemenkama, koži ili kori drveća, lišću i cvijeću. Velik broj ljekovitih biljaka sadržava flavonoide koji imaju izraženu antioksidacijsku i antiradikalnu aktivnost.⁴



Slika 2. Osnovna struktura flavonoida.⁵

Osnovnu strukturu molekule svih flavonoida čini difenilpropan ($C_6C_3C_6$), a međusobno se razlikuju po stupnju oksidacije središnjeg piranskog prstena (slika 2).⁶ Ovisno o supstituciji i stupnju nezasićenosti središnjeg prstena C, razlikujemo nekoliko specifičnih podskupina: flavoni, izo-flavoni, flavonoli i flavononoli, antocijani, flavanoli i srodni spojevi (slika 3). Svi oni mogu biti hidroksilirani, metoksilirani ili glikozidirani s monosaharidima ili oligosaharidima, a često sadržavaju i acilne skupine na različitim položajima osnovne flavonoidne strukture ili glikozidnog dijela.⁴



Slika 3. Kemijske strukture različitih podskupina flavonoida.⁷

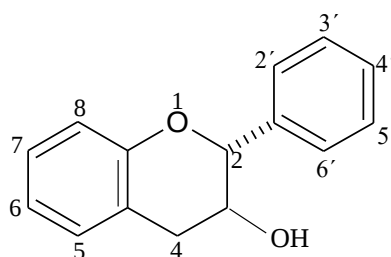
1.1.1. Flavani

Flavani čine podskupinu flavonoida koji u svom heterocikličkom prstenu C nemaju dvostruku vezu, te na položaju C-3 ili položaju C-3 i C-4, imaju vezanu -OH skupinu. U ovu flavonoidnu podskupinu ubrajamo flavan-3,4-diole i flavan-3-ole, poznatije i kao katehine (flavanol monomeri).⁸

Katehini su polifenoli s dobrim antioksidacijskim djelovanjem, a produkti su metabolizma biljaka. Mogu se pronaći u čajevima, kakaou, čokoladi i dr. U prirodi ih najčešće nalazimo u slobodnom obliku ili međusobno povezane u obliku dimera, trimera ili oligomera.⁹

Najčešći spojevi iz ove grupe flavan-3-ola su (Slika 4):¹⁰

- **(+)-katehin** i **(-)-epikatehin** (epimeri), spojevi koji imaju dvije hidroksilne grupe u B prstenu;
- **epigalokatehin** i **galokatehin**, spojevi koji sadrže tri hidroksilne grupe u B prstenu;
- **epikatehin galat** i **epigalokatehin galat**, esteri epikatehina i epigalokatehina s galnom kiselinom na prstenu C.



Flavan-3-oli	3	5	7	3'	4'	5'
(+)-katehin	β OH	OH	OH	OH	OH	-
(-)-epikatehin	α OH	OH	OH	OH	OH	-
(+)-galokatehin	β OH	OH	OH	OH	OH	OH
(-)-epigalokatehin	α OH	OH	OH	OH	OH	OH
(+)-epikatehin galat	Ga*	OH	OH	OH	OH	-
(-)-epigalokatehin galat	Ga*	OH	OH	OH	OH	OH

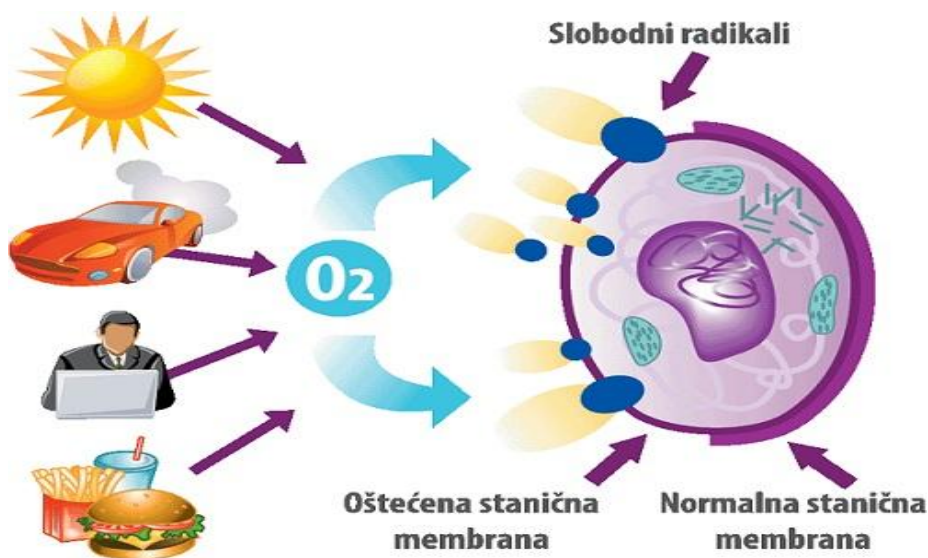
*Ga- galna kiselina (ester)

Slika 4. Strukture najpoznatijih flavan-3-ola.¹⁰

1.2. Antioksidacijska aktivnost flavonoida

Vjerojatno najbolje opisana i proučena osobina flavonoida je upravo njihova sposobnost da djeluju kao antioksidansi. Antioksidansi se definiraju kao tvari ili nutrijenti u hrani koji mogu spriječiti ili usporiti oksidativnu štetu. Najpoznatiji antioksidansi su vitamini A, C, E, selen i flavonoidi.¹¹ **Slobodni radikali** su vrlo nestabilni oblici koje imaju manjak elektrona te stoga reagiraju s najbližom molekulom uzrokujući oštećenje ili degradaciju. Naš organizam je izložen napadu slobodnih radikala iz zagađenog zraka i vode, zbog pušenja i prevelikog stresa, uslijed dugotrajne konzumacije lijekova ili uslijed teških bolesti. U slobodne radikale ubrajamo i brojne toksine koji se nalaze u pesticidima, umjetnim bojama, plastičnoj i aluminijskoj ambalaži, itd..¹¹

Ukoliko u organizmu dođe do nastanka ili nakupljanja slobodnih radikala u većoj količini nego što ih naše tijelo može neutralizirati i eliminirati nastupa stanje koje se naziva **oksidativni stres**. Srećom, kao pomoć postoje antioksidansi tj. spojevi koji uništavaju slobodne radikale (slika 5).¹¹



Slika 5. Djelovanje slobodnih radikala.¹²

U svakom organizmu postoji ravnoteža između oksidativnog stresa tj. oštećenja koje radikali i oksidansi izazivaju na površinskim membranama i receptorima te antioksidativne reparacije. Ako izostane antioksidativna zaštita protiv nastalih slobodnih radikala, može doći do oksidativnog stresa. Značenje antioksidansa u prehrani i njihova vrijednost u intervenciji i prevenciji kardiovaskularnih bolesti i ostalih patofizioloških stanja u posljednje su vrijeme posebno interesantni.⁴

Flavonoidi su nove zvijezde među antioksidansima, najproučavanije molekule posljednjih desetak godina. To su biljni pigmenti i polifenoli koji daju živopisne boje voću, povrću i cvijeću te ih nalazimo u bobičastom voću, zelenom čaju, crvenom vinu i raznim vrstama povrća.¹¹

Flavonoidima se pripisuju mnoga terapijska djelovanja, npr. antibakterijsko, protuupalno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno i antikancerogeno. U samim biljkama flavonoidi djeluju antioksidacijski, antimikrobno, služe kao fotoreceptori, agensi za privlačenje pozornosti, za odbijanje nametnika i kao zaštita biljke od UV zračenja. Do danas je identificirano više od 6400 flavonoida. Očito su to spojevi koji imaju važnu ulogu u održavanju i zaštiti životnih funkcija biljaka, a njihovom konzumacijom imaju sličnu ulogu i za druga živa bića.⁴

1.3. Odnos strukture i antioksidativne aktivnosti

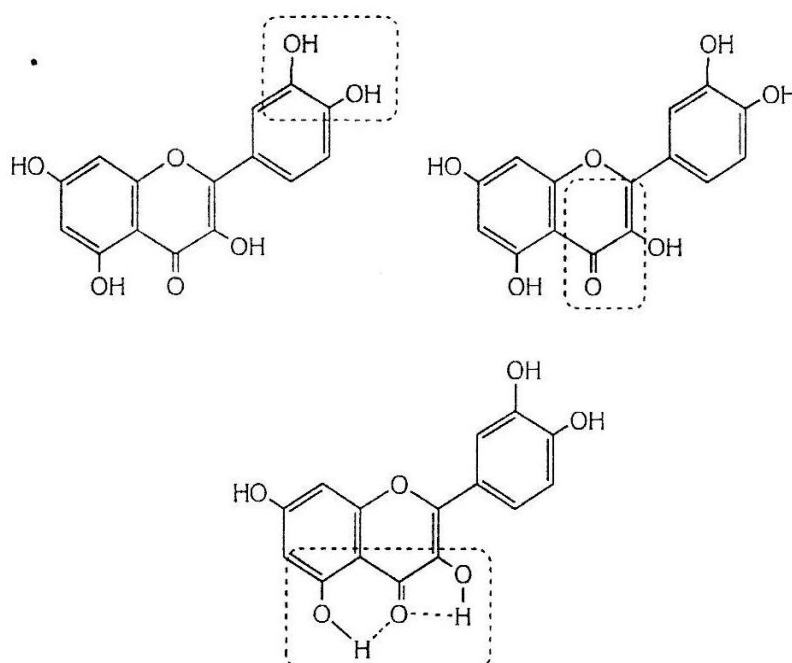
Istraživanja odnosa struktura-aktivnost (engl. *Structure Activity Relationship*, SAR) posljednjih godina pokazala su da postoji veza između pojedinih strukturnih komponenata i svojstva *hvatanja* radikala, stvaranja kelatnih kompleksa i antioksidacijske aktivnosti. Provedena istraživanja i dobiveni rezultati omogućuju bolje razumijevanje antioksidacijskog i prooksidacijskog djelovanja flavonoida te daju prihvatljiva predviđanja utjecaja strukture spojeva na njihovu biološku aktivnost.

Međutim, potpuni mehanizam djelovanja flavonoida na molekularnoj razini u biološkim sustavima nije potpuno razjašnjen, kako zbog velike razlike u kemijskim svojstvima, tako i zbog njihove velike strukturne heterogenosti.⁴

Flavonoidi koji su zastupljeni u hrani razlikuju se po položaju hidroksilnih, metoksi i glikozidnih skupina i u konjugaciji između prstena A i B. Flavonoidi u biljkama uglavnom su u obliku 3-O-glikozida ili polimera. Tanini ili galotanini su esteri 3,4,5-trihidroksibenzojeve kiseline. Galoilna skupina tih tanina i monomernih katehina u zelenom čaju djelomično je odgovorna za svojstva kelatiranja i hvatanja slobodnih radikala. Kondenzirani tanini ili proantocijanidini sastoje se od flavanolskih jedinica kojih može biti i do 17 u jednoj molekuli. Za ljudsku prehranu najvažniji od tih spojeva su procijanidini koji se sastoje od monomera (+)-katehina i (–)-epikatehina. (–)-katehini i (+)-epikatehini su fitotoksični i neke ih biljke sintetiziraju u korijenu da bi spriječile rast drugih biljaka na tom teritoriju.⁴

Glavne strukturne značajke flavonoida važne za sposobnost hvatanja radikala su:

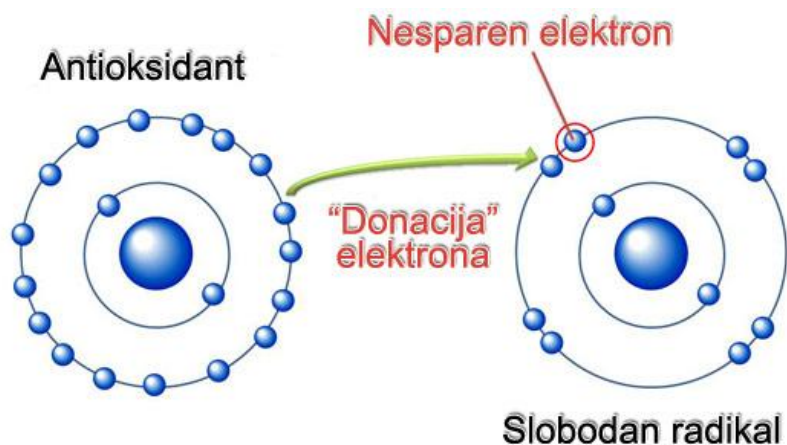
1. o-dihidroksilna (kateholna) struktura u B-prstenu koja daje stabilnost radikalu i omogućuje delokalizaciju elektrona
2. 2,3-dvostruka veza u konjugaciji s 4-ketoskupinom što omogućuje delokalizaciju elektrona iz B-prstena
3. hidroksilne skupine na položaju 3- i 5- koje osiguravaju vodikovu vezu s keto-skupinom (Slika 5).⁴



Slika 6. Strukturne skupine važne za hvatanje slobodnih radikala.⁴

Općenito se vjeruje da se antioksidacijsko svojstvo flavonoida temelji na njihovoj sposobnosti doniranja vodikova atoma i na taj način *hvatanja* slobodnih radikala generiranih u reakciji peroksidacije lipida (slika 7).¹³

Pretpostavlja se da antioksidacijsku aktivnost flavonoida uglavnom određuje raspored supstituenata, a smatra se da antioksidacijska aktivnost većine polifenolnih antioksidansa ovisi o rasporedu i ukupnom broju hidroksilnih skupina.⁴



Slika 7. Djelovanje antioksidansa.¹⁴

Na jačinu antioksidativne aktivnosti flavonoida najviše utječe prostorni raspored substituenata, međutim i konfiguracija i broj hidroksilnih grupa imaju utjecaj na mehanizam antioksidativne aktivnosti.¹⁵ Hidroksilne skupine u prstenu B posjeduju najveću sposobnost *hvatanja* reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta, na način da doniraju vodik ili elektron hidroksilnim i peroksidnim radikalima i tako stabiliziraju slobodne radikale pri čemu nastaje relativno stabilan flavonoidni radikal.⁴

3'4'-kateholna struktura B prstena pojačava inhibiciju oksidacije lipida jer je takva struktura najznačajnija odlika potencijalnih *hvatača* peroksil, superoksid i peroksinitril radikala.

Razlika u antioksidativnoj aktivnosti između polihidroksiliranih flavonoida i polimetoksiliranih flavonoida može se pripisati njihovoj razlici u hidrofobnosti i molekularnoj planarnosti. O-metiliranje narušava planarnost, stoga je antioksidativna aktivnost manja u odnosu na polihidroksilirane flavonoide.⁴

Prisustvo odnosno odsustvo nezasićene 2-3 dvostruke veze zajedno s 4-okso funkcijom je od vrlo velikog značaja. 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.⁴

1.4. Sinergija flavonoida

Polifenolni spojevi su široko rasprostranjeni u biljnom svijetu i proučavani su zbog svojih bioaktivnih svojstava, a posebno antioksidativne aktivnosti.¹⁶ Pretpostavlja se da polifenolni antioksidansi, kao što su flavonoidi u crnom vinu, zajedno s antioksidansima iz maslinova ulja i svježega voća i povrća kojim je bogata mediteranska kuhinja, mogu osigurati zaštitu protiv koronarnih bolesti srca te brojnih ostalih oboljenja (slika 8).⁴



Slika 8. Crno vino kao izvor flavonoida.¹⁷

Hipoteza da antioksidansi smanjuju rizik kroničnih bolesti rezultat je brojnih epidemioloških istraživanja. Pokazalo se da je konzumacija svježih namirnica kao što su voće, povrće i cjelovite žitarice snažno povezana s smanjenim rizikom oboljenja od kroničnih bolesti, osobito raka. Prema tome, znanstvenici istražuju bioaktivne tvari s ciljem pronalaska komponenti koje bi prevenirale, spriječavale i ublažavale pojavu i razvoj kroničnih bolesti.



Slika 9. Voće kao izvor polifenola.¹⁸

Istraživani bioaktivni spojevi prirodno su prisutni u većim količinama u različitim biljnim materijalima, a osobito voću i povrću koje ima dokazane pozitivne učinke na ljudsko zdravlje. Kako se ti pozitivni učinci pripisuju uglavnom bioaktivnim fenolnim spojevima, njihova biološka svojstva su vrlo dobro istražena. Međutim, problem je u tome što se fenolne komponente ne nalaze same u navedenim prirodnim izvorima već su prisutni i brojni drugi spojevi koji imaju biološku aktivnost. Stoga je vrlo važno istražiti kakva je njihova aktivnost u različitim kombinacijama, a ne samo kao individualnih komponenti.

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Materijal

U eksperimentalnom dijelu ovog rada korišteni su standardi odabranih fenolnih spojeva (tablica 1). Osnovne otopine fenolnih spojeva (flavan-3-ola) pripravljene su u istim molarnim koncentracijama te su dalje korištene za pripravu ekvimolarnih fenolnih smjesa. Sve otopine fenolnih spojeva, kao i ekvimolarnih fenolnih smjesa, do provođenja analize čuvane su u hladnjaku pri temperaturi +4°C.

Tablica 1. Odabrani polifenoli iz grupe flavonoida.

Polifenol	Ime po IUPAC-u
(+)- Katehin	2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihidro-3,5,7-kromantriol
(-)- Epikatehin	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-2-(3,4-dihidroksifenil)-3,4-dihidro-2 <i>H</i> -benzopiran-3,5,7-triol
(+)- Epikatehin galat	(-)- <i>cis</i> -2-(3,4-dihidroksifenil)-3,4-dihidro-1(2 <i>H</i>)-benzopiran-3,5,7-triol 3-galat, (-)- <i>cis</i> -3,3',4',5,7-pentahidroksiflavan 3-galat
(-)- Epigalokatehin galat	[(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-5,7-dihidroksi-2-(3,4,5-trihidroksifenil)kroman-3-il] 3,4,5-trihidroksibenzoat

2.1.1. Kemikalije

2.1.1.1 Odabrani fenolni spojevi

- (+)-katehin, $C_{15}H_{14}O_6$, $M_r=290,30$ g/mol, min 98% čistoće, 5% H_2O (*Sigma, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Njemačka*);
- (-)-epikatehin, $C_{15}H_{14}O_6$, $M_r=290,28$ g/mol, $\geq 90\%$ HPLC čistoće (*Fluka, Buchs, Njemačka*);
- (-)-epigalokatehin galat, $C_{22}H_{18}O_{11}$, $M_r=458,4$ g/mol, 95% čistoće (*Sigma, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Njemačka*);
- (-)-epikatehin galat, $C_{22}H_{18}O_{10}$, $M_r=422,37$ g/mol, (*Extrasynthese, Genay, Francuska*);

2.1.1.2. Kemikalije korištene za određivanje antioksidacijskih svojstava

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

2.2. PRIPRAVA FENOLNIH OTOPINA

2.2.1. Priprava otopina odabranih fenolnih spojeva

Za testiranje antioksidacijskih svojstava, pripravljene su osnovne otopine svakog pojedinog fenolnog spoja u koncentraciji od 1000 μM . Pri pripravi početnih otopina uzeta je u obzir čistoća fenolnog spoja, a kao otapalo korišten je 80%-tni etanol.

Osnovna otopina svakog pojedinog fenolnog spoja je, dodatkom adekvatne količine otapala, razrijeđena do koncentracija 100, 300 i 500 μM .

2.2.2. Priprava ekvimolarnih fenolnih smjesa

Za pripravu ekvimolarnih fenolnih smjesa korištene su osnovne otopine fenolnih spojeva, izvorne ili u odgovarajućem razrjeđenju. Fenolne smjese su pripravljene miješanjem jednakih volumena otopina (iste koncentracije) dvaju ili više fenolnih spoja. Pregled fenolnih smjesa korištenih u analizi antioksidacijskih svojstava naveden je u tablici 2.

Tablica 2. Fenolni sastav testiranih smjesa.

Molarni omjer	Fenolne smjese	Oznaka
1:1	(+)- Katehin + (-)- Epikatehin	K+E
	(+)- Katehin + Epikatehin galat	K+ECG
	(+)- Katehin + Epigalokatehin galat	K+EGCG
	(-)- Epikatehin + Epikatehin galat	E+ECG
	(-)- Epikatehin + Epigalokatehin galat	E+EGCG
	Epikatehingalat + Epigalokatehin galat	ECG+EGCG
1:1:1	(+)- Katehin + (-)- Epikatehin + Epikatehin galat	K+E+ECG
	(+)- Katehin + (-)- Epikatehin + Epigalokatehin galat	K+E+ECG
	(-)- Epikatehin + Epikatehin galat + Epigalokatehin galat	E+ECG+EGCG
1:1:1:1	(+)- Katehin + (-)- Epikatehin + Epikatehin galat + Epigalokatehin galat	K+E+ECG +EGCG

2.3. METODE ODREĐIVANJA ANTIOKSIDACIJSKIH SVOJSTAVA

2.3.1. FRAP metoda

Antioksidacijski kapacitet odabranih fenolnih spojeva i ekvimolarnih fenolnih smjesa određen je metodom FRAP (engl. *Ferric Reducing/Antioxidant Power*). Izvorna metoda koju su razvili Benzie i Strain (1996) je modificirana kako bi se testiranje provelo u mikrotitarskim pločicama (Micro test plates, PS, Withoud lid, nesterilne, Sarsted, Germany). U radu je korišten spektrofotometar Tecan MicroPlates Reader, model Sunrise (Tecan Group Ltd., Mannedorf, Švicarska). Mehanizam FRAP reakcije zasniva se na redukciji žuto obojenog kompleksa Fe^{III} -TPTZ u Fe^{II} oblik, dodatkom antioksidansa i pri niskom pH, pri čemu dolazi do pojave plavog obojenja maksimalne apsorpcije pri 593 nm.¹⁹ Brzina i intenzitet formiranja plavo obojenog Fe^{II} -TPTZ kompleksa ovise o reduksijskoj snazi i koncentraciji dodanog antioksidansa.

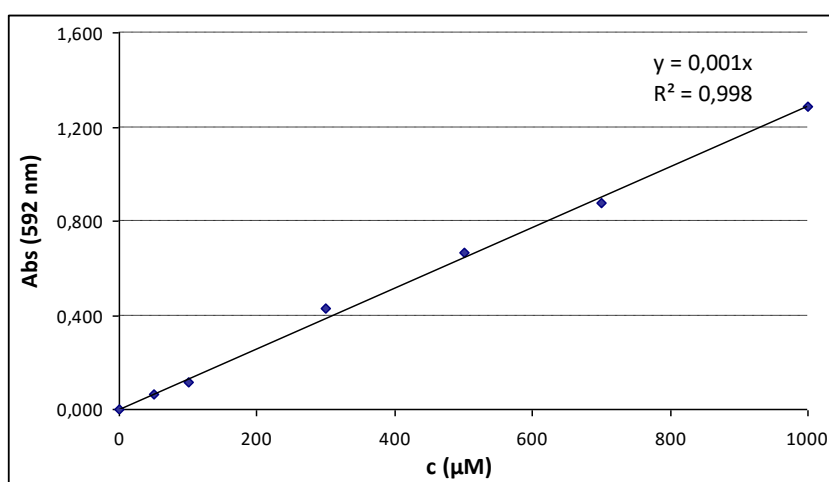
Osim za određivanja reduksijske snage složenih bioloških tekućina (plazma, serum, urin, suze), ova metoda se danas veoma često koristi u testiranju antioksidacijskih svojstava biljnih ekstrakata, čistih spojeva ili njihovih smjesa.^{20, 21, 22, 23, 24}

Reagensi:

- *acetatni pufer*, c ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$) = 300 mmol/L; pH 3,6: 3,1 g natrijevog acetata i 16 mL glacijalne octene kiseline se pomiješa s vodom do volumena 1 litre;
- *otopina klorovodične kiseline*, c (HCl) = 40 mmol/L: 400 mL 0,1 M klorovodične kiseline u odmjerenoj tikvici od 1 L razrijedi se destiliranom vodom do oznake;
- *otopina 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) u 40 mmol/L HCl*, c ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_6$) = 10 mmol/L: 159,4 mg TPTZ se otopi u 50 mL 40 mmol/L otopine klorovodične kiseline;
- *otopina FeCl_3* , c (Fe^{3+}) = 20 mmol/L: 551,6 mg željezova (III) klorida se otopi u 100 mL destilirane vode;
- *FRAP reagens* se priprema miješanjem 25 mL acetatnog pufera, 2,5 ml otopine FeCl_3 i 2,5 ml otopine TPTZ

Postupak:

Svježe pripravljena otopina FRAP reagensa (300 μL) se pipetira u otvore mikrotitarske pločice, nakon čega se očita apsorbancija otopine pri 592 nm. U reagens se potom doda 10 μL uzorka (pojedinih fenolnih spoja ili fenolne smjese) i prati se promjena apsorbancije nakon 4 min. Testirana je aktivnost svih uzoraka i to u koncentracijama od 100, 300 i 500 μM . Promjena apsorbancije, izračunata kao razlika između konačne vrijednosti apsorbancije reakcijske smjese nakon određenog reakcijskog vremena (4 min) i apsorbancije FRAP reagensa prije dodatka uzorka, uspoređena je s vrijednostima dobivenim za otopinu standarda.²⁰ Kao standard korišten je Troloks. Rezultati za FRAP fenolnih otopina uspoređeni su s rezultatima za FRAP Troloksa i izraženi kao μM Troloks ekvivalenti (TE) (slika 10). Sva mjerenja urađena su u 4 ponavljanja, a rezultati svih ispitivanja prikazani su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija (SD).



Slika 10. Ovisnost koncentracije Troloksa o apsorbanciji FRAP reakcijske smjese.

2.4. Interakcijsko djelovanje fenolnih spojeva

2.4.1. Određivanje interakcijskog djelovanja

Interakcija između testiranih flavan-3-ola, određena FRAP metodom, opisana je kao razlika u antioksidacijskoj aktivnosti i izračunata je preko jednadžbe:

$$\text{Razlika (\%)} = [\text{Eksperimentalna vrijednost smjese} \times 100 / \text{Očekivana vrijednost smjese}] - 100$$

gdje je:

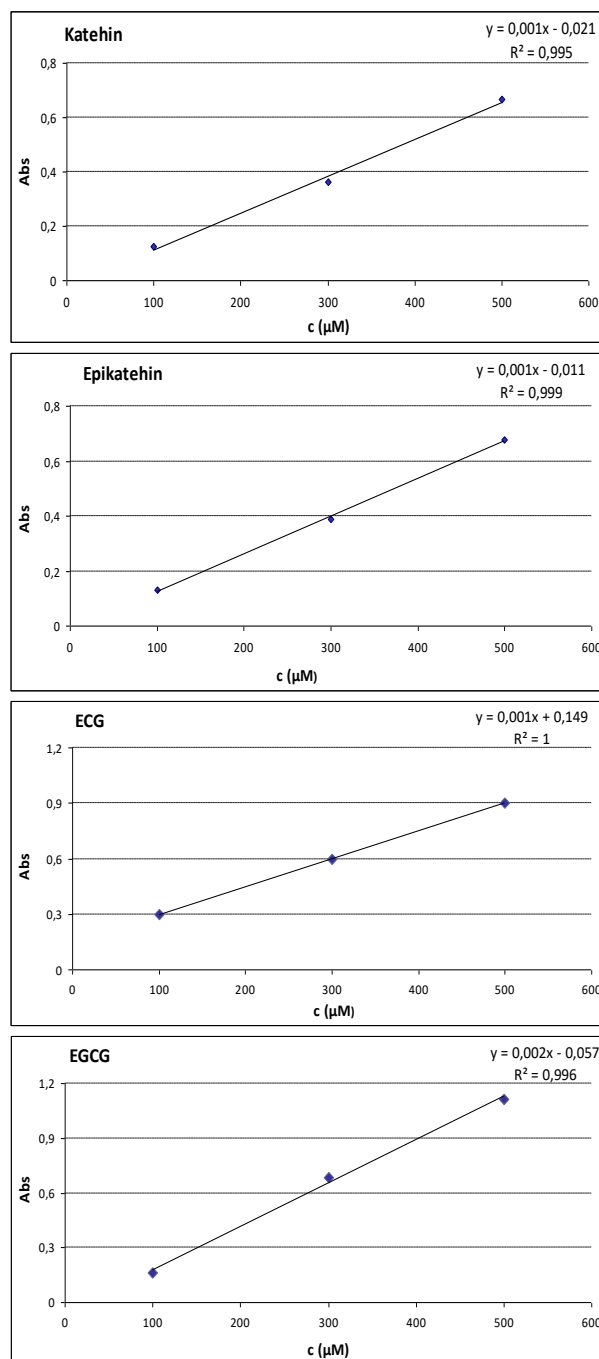
Eksperimentalna vrijednost- eksperimentalno dobiveni rezultat za smjesu dva ili više testiranih flavan-3-ola

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

Dobivene *pozitivne vrijednosti razlike (%)* ukazuju na potencijalno sinergijsko djelovanje, *negativne vrijednosti* na antagonističko djelovanje, a za *vrijednosti nula ili oko nule* može se smatrati da nema interakcije (aditivno djelovanje).

3. REZULTATI

3.1. Rezultati antioksidacijske aktivnosti flavan-3-ola određene metodom FRAP



ECG - epikatehin galat; EGCG - epigalokatehin galat

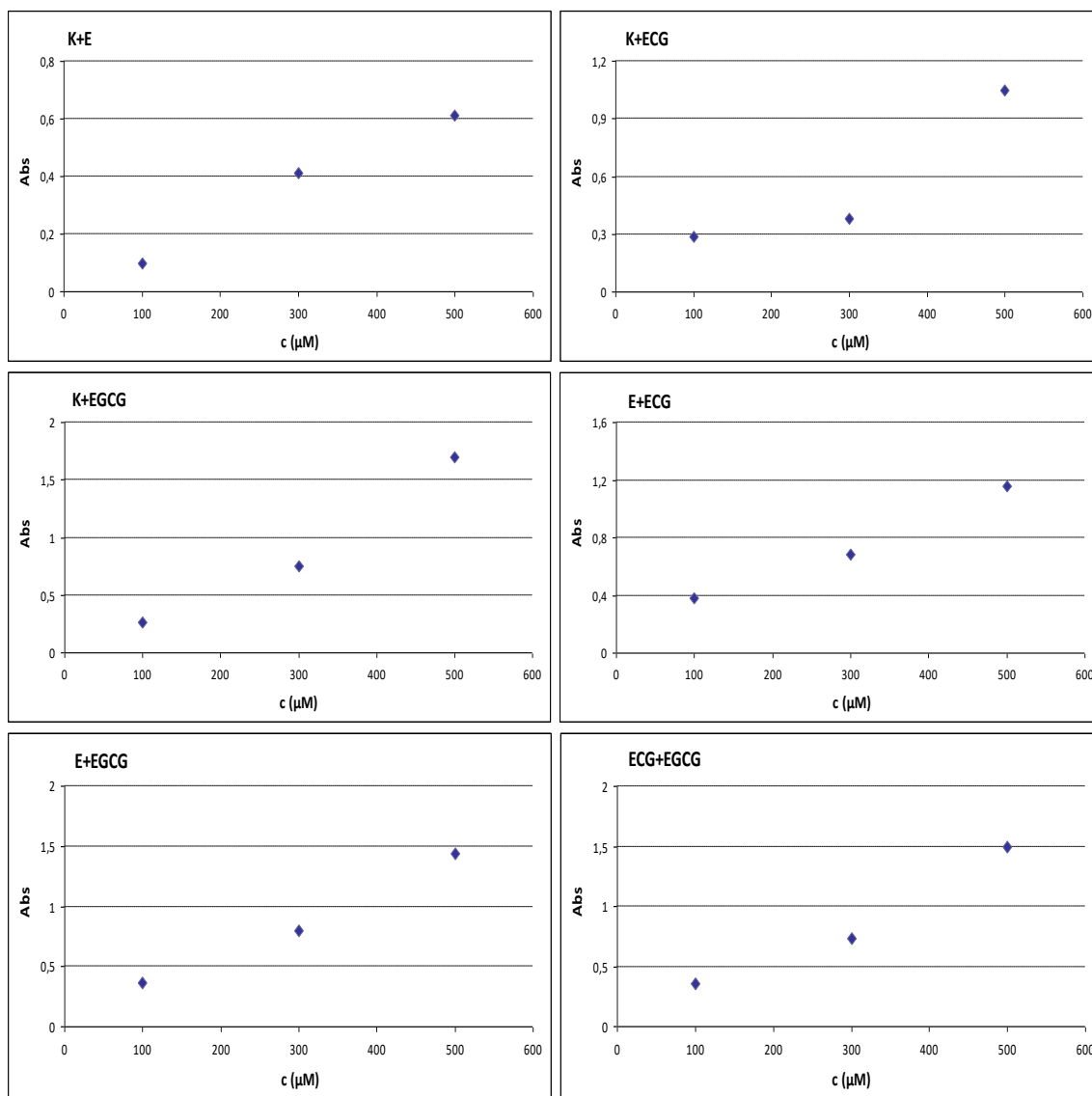
Slika 11. Grafički prikaz utjecaja koncentracije flavan-3-ola na apsorbanciju FRAP reakcijske smjese

Tablica 3. Antioksidacijska aktivnost testiranih flavan-3-ola određena FRAPmetodom (c = 100, 300 i 500 μ M).

Spoj	FRAP (μ M TE)		
	Koncentracija spoja (μ M)		
	100	300	500
K	96,34 $\pm$ 2,21	278,65 $\pm$ 6,84	511,54 $\pm$ 2,81
E	99,23 $\pm$ 5,69	297,12 $\pm$ 9,62	519,62 $\pm$ 5,98
ECG	230,77 $\pm$ 9,10	461,15 $\pm$ 4,72	756,15 $\pm$ 53,94
EGCG	126,15 $\pm$ 6,62	526,54 $\pm$ 4,89	855,96 $\pm$ 25,55

K – katehin; E – epikatehin; ECG - epikatehin galat; EGCG - epigalokatehin galat

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



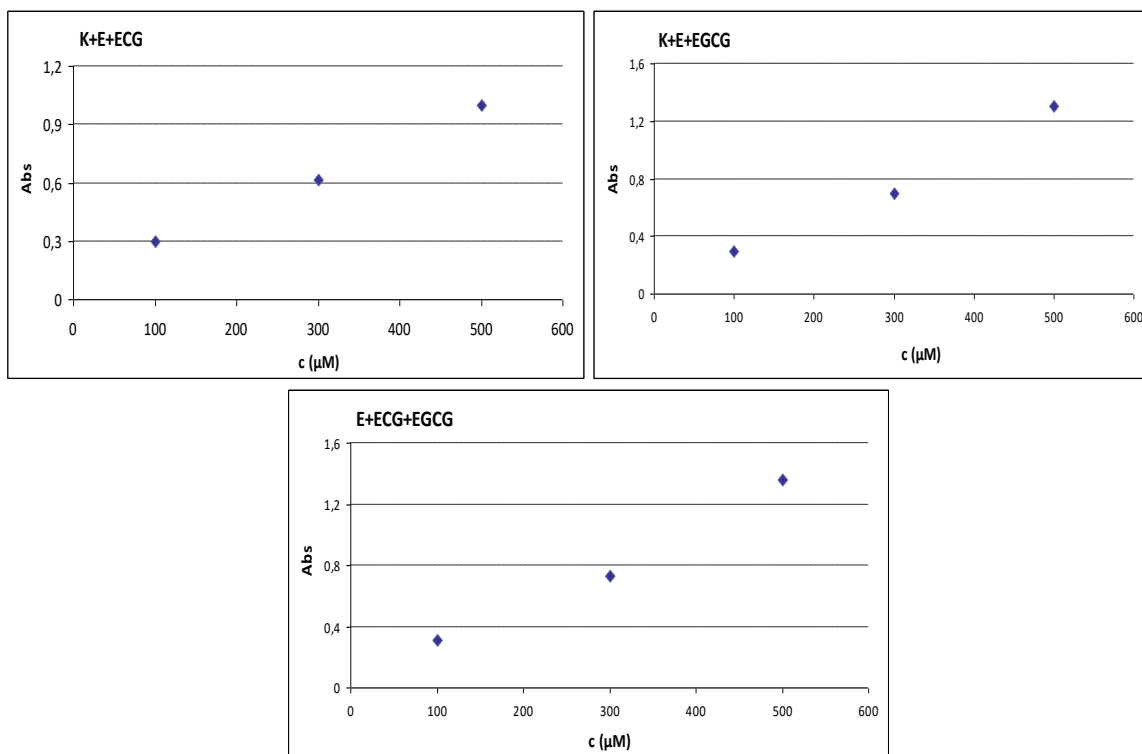
K - katehin, E - epikatehin, ECG - epikatehin galat; EGCG - epigalokatehin galat

Slika 12. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije ekvimolarne smjese flavan-3-ola na apsorbanciju FRAP reakcijske smjese.

Tablica 4. Antioksidacijska aktivnost ($\mu\text{M TE}$) testiranih ekvimolarnih smjesa flavan-3-ola određena FRAP metodom ($c = 100, 300$ i $500 \mu\text{M}$).

Smjesa	FRAP (μM)		
	Koncentracija spoja (μM)		
	100	300	500
K+E	$197,89 \pm 6,81$	$315,77 \pm 2,84$	$469,62 \pm 8,44$
K+ECG	$218,46 \pm 5,40$	$291,15 \pm 3,69$	$805,96 \pm 12,89$
K+EGCG	$204,81 \pm 2,12$	$578,85 \pm 13,14$	$1308,46 \pm 6,62$
E+ECG	$288,27 \pm 8,59$	$524,23 \pm 5,81$	$892,88 \pm 31,82$
E+EGCG	$278,08 \pm 7,04$	$608,65 \pm 9,78$	$1106,92 \pm 33,22$
ECG+EGCG	$271,35 \pm 3,94$	$563,46 \pm 9,68$	$1151,15 \pm 33,98$

K – katehin; E – epikatehin; ECG - epikatehin galat; EGCG - epigalokatehin galat



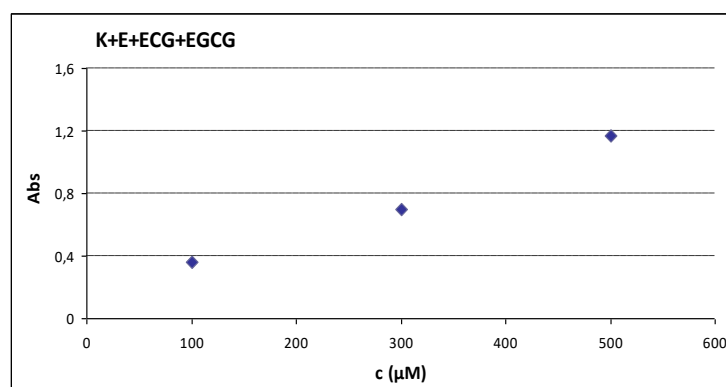
K - katehin, E - epikatehin, ECG - epikatehin galat; EGCG - epigalokatehin galat

Slika 13. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije ekvimolarnih smjesa triju flavan-3-ola na apsorbanciju FRAP reakcijske smjese.

Tablica 5. Antioksidacijska aktivnost ($\mu\text{M TE}$) testiranih ekvimolarnih smjesa flavan-3-ola određena FRAP metodom ($c = 100, 300$ i $500 \mu\text{M}$).

Smjesa	Koncentracija (μM)		
	Koncentracija spoja (μM)		
	100	300	500
K+E+ECG	$229,81 \pm 1,59$	$471,73 \pm 14,97$	$768,27 \pm 12,22$
K+E+EGCG	$225,58 \pm 2,97$	$530,38 \pm 11,69$	$1005,58 \pm 19,20$
E+ECG+EGCG	$240,58 \pm 2,97$	$562,12 \pm 10,90$	$1042,89 \pm 9,26$

K – katehin; E – epikatehin; ECG - epikatehin galat; EGCG - epigalokatehin galat



K - katehin, E - epikatehin, ECG - epikatehin galat; EGCG - epigalokatehin galat

Slika 14. Grafički prikaz utjecaja koncentracije ekvimolarnih smjesa četiri flavan-3-ola na apsorbanciju FRAP reakcijske smjese.

Tablica 6. Antioksidacijska aktivnost ($\mu\text{M TE}$) testiranih ekvimolarnih smjesa flavan-3-ola određena FRAP metodom ($c = 100, 300$ i $500 \mu\text{M}$).

Smjesa	Koncentracija (μM)		
	Koncentracija spoja (μM)		
	100	300	500
K+E+ECG+EGCG	$272,12 \pm 3,10$	$536,15 \pm 8,54$	$898,08 \pm 17,11$

K – katehin; E – epikatehin; ECG - epikatehin galat; EGCG - epigalokatehin galat

3.3. Rezultati određivanja interakcijskog djelovanja ekvimolarnih fenolnih smjesa određene metodom FRAP

Tablica 7. Usporedba očekivanih i eksperimentalnih FRAP vrijednosti i interakcijsko djelovanje ekvimolarnih fenolnih smjesa (% razlike) pri koncentraciji smjese 100 μ M.

	Eksperimentalna FRAP vrijednost (μM TE)	Očekivana FRAP vrijednost (μM TE)	Razlika (%)
2 kombinacije			
K+E	197,88	97,785	102,37
K+ECG	218,46	163,555	33,57
K+EGCG	204,81	111,245	84,11
E+ECG	288,27	165	74,71
E+EGCG	278,08	112,69	146,77
ECG+EGCG	271,35	178,46	52,05
3 kombinacije			
K+E+ECG	229,81	142,1133	61,71
K+E+EGCG	225,58	107,24	110,35
E+ECG+EGCG	240,58	152,05	58,22
4 kombinacije			
K+E+ECG+ EGCG	272,12	138,1225	97,01

Razlike (%)> 0 ukazuju na potencijalno sinergijsko djelovanje, razlika (%)< 0 na antagonističko djelovanje, a razlika (%) $\approx$ 0 može se smatrati da nema interakcije (aditivno djelovanje).

Tablica 8. Usporedba očekivanih i eksperimentalnih FRAP vrijednosti i interakcijsko djelovanje ekvimolarnih fenolnih smjesa (% razlike) pri koncentraciji smjese 300 μ M.

	Eksperimentalna FRAP vrijednost (μM TE)	Očekivana FRAP vrijednost (μM TE)	Razlika (%)
2 kombinacije			
K+E	315,77	287,885	9,69
K+ECG	291,15	369,9	-21,29
K EGCG	578,85	402,595	43,78
E+ECG	524,23	379,135	38,27
E+EGCG	608,65	411,83	47,79
ECG+EGCG	563,46	493,845	14,10
3 kombinacije			
K+E+ECG	471,73	345,64	36,48
K+E+EGCG	530,38	367,4367	44,35
E+ECG+EGCG	562,12	428,27	31,25
4 kombinacije			
K+E+ECG+ EGCG	536,15	390,865	37,17

Razlike (%)> 0 ukazuju na potencijalno sinergijsko djelovanje, razlika (%)< 0 na antagonističko djelovanje, a razlika (%) $\cong$ 0 može se smatrati da nema interakcije (aditivno djelovanje).

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

	Eksperimentalna FRAP vrijednost (μM TE)	Očekivana FRAP vrijednost (μM TE)	Razlika (%)
2 kombinacije			
K+E	469,62 $\pm$ 8,44	515,58	-8,91
K+ECG	805,96 $\pm$ 12,89	633,845	27,15
K EGCG	1308,46 $\pm$ 6,62	683,75	91,37
E+ECG	892,88 $\pm$ 31,82	637,885	39,98
E+EGCG	1106,92 $\pm$ 33,22	687,79	60,90
ECG+EGCG	1151,15 $\pm$ 33,98	806,055	42,81
3 kombinacije			
K+E+ECG	768,27 $\pm$ 12,22	595,77	28,95
K+E+EGCG	1005,577 $\pm$ 19,20	629,04	59,86
E+ECG+EGCG	1042,89 $\pm$ 9,26	710,5767	46,77
4 kombinacije			
K+E+ECG+ EGCG	898,08 $\pm$ 17,11	660,8175	35,90

Razlike (%)> 0 ukazuju na potencijalno sinergijsko djelovanje, razlika (%)< 0 na antagonističko djelovanje, a razlika (%) $\approx$ 0 može se smatrati da nema interakcije (aditivno djelovanje).

4. RASPRAVA

Zbog nepostojanja univerzalne metode kojom bi se u potpunosti mogla opisati antioksidacijska svojstva nekog uzorka (spoja, smjese spojeva, ekstrakta, ...), najčešće se, u cilju što potpunijeg opisivanja antioksidacijskog profila testiranog uzorka, primjenjuje više različitih metoda koje se temelje na različitim reakcijskim mehanizmima, čime se dobiva više informacija o antioksidacijskim svojstvima odabranih fenolnih spojeva i/ili fenolnih smjesa (npr. metode FRAP, DPPH, BR, i dr.)

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti čistih fenolnih spojeva i fenolnih smjesa, u ovom radu korištena je metoda FRAP. FRAP metoda je jedna od najčešće korištenih metoda za mjerenje redukcijske snage uzoraka i ubraja se u brze metode određivanja antioksidacijske aktivnosti. Metoda se temelji na redukciji Fe^{3+} iona u Fe^{2+} ion (doniranjem jednog elektrona) u prisutnosti antioksidansa. Nastali Fe^{2+} ion u prisutnosti TPZT reagensa formira intenzivno obojeni kompleks koji pokazuje maksimum apsorpcije pri 592 nm.²⁵

U ovom radu analizirana je antioksidacijska aktivnost predstavnika podgrupe flavan-3-ola (katehina, epikatehina, epikatehin galata i epigalokatehin galata). Osim za pojedine flavan-3-ole, određena je i redukcijska snaga ekvimolarnih smjesa dvaju ili više flavan-3-ola. Na osnovu dobivenih eksperimentalnih i teoretskih FRAP vrijednosti smjesa donešeni su zaključci o sinergijskom, aditivnom i/ili antagonističkom učinku testiranih spojeva u smjesi, kao i na utjecaj strukture spoja na njegovu aktivnost te aktivnost smjese. Dobiveni rezultati su prikazani u tablicama 3-9 i na slikama 11-14.

Utjecaj koncentracije odabranih flavonoida na njihovu antioksidacijsku aktivnost, određenu FRAP metodom, bio je očekivan. Svi spojevi testirani su u koncentraciji od 100, 300 i 500 μM , a krivulje ovisnosti koncentracija-apsorbancija određene su za reakcijsko vrijeme od 4 min. Slika 11 grafički prikazuje utjecaje koncentracija flavan-3-ola na apsorbanciju FRAP reakcijske smjese nakon 4 min. Kao što se vidi iz prikazanih rezultata, linearna ovisnost koncentracije testiranog fenolnog spoja i njegove redukcijske snage je jasno uočljiva i potvrđena za sva 4 testirana spoja (slika 11, tablica 3). Najveću FRAP vrijednost pokazao je epigalokatehin galat, a najnižu FRAP vrijednost katehin pri svim testiranim koncentracijama (tablica 3).

Pri tome treba istaknuti da su uočene jako male razlike u redukcijskoj snazi između strukturno istih molekula, katehina i epikatehina, tj. za epikatehin su zabilježene tek oko 3-18 μM TE veće FRAP vrijednosti u odnosu na njegov stereoizomer (epimer) katehin. Flavanoli s tri -OH skupine u prstenu B su galokatehini, a katehini esterificirani galnom kiselinom na položaju 3-OH u prstenu C su katehin galati.²⁶ Esteri flavanola s galnom kiselinom, epikatehin galat i epigalokatehin galat, bili su znatno učinkovitiji antioksidansi od epikatehina. Dobivene veće FRAP vrijednosti ukazuju na doprinos esterifikacije s galnom kiselinom, ali ne i doprinos treće -OH skupine u B prstenu kod epigalokatehin galata, što je u skladu s istraživanjima drugih autora.^{26,27}

Iako pojedini autori u svojim radovima navode mogućnost sinergijskog, aditivnog ili čak antagonističkog učinka fenolnih spojeva, istraživanje potencijalne interakcije nekog fenolnog spoja s drugim fenolima provedeno je za veoma mali broj spojeva.^{28,29,30} Iz tog razloga je u radu ispitana interakcijska aktivnost odabranih predstavnika flavan-3-ola kao i njihov združen (sinergijski/ aditivni/ antagonistički) učinak u testiranim ekvimolarnim fenolnim smjesama (2 ili više spojeva).

Rezultati određivanja antioksidacijskih svojstava ekvimolarnih fenolnih smjesa prikazani su na slikama 12, 13 i 14, te u tablicama 4, 5 i 6. Slike grafički prikazuju utjecaj koncentracije ekvimolarne smjese od dvije, tri ili četiri kombinacije flavan-3-ola na apsorbanciju FRAP reakcijske smjese nakon 4 min. Za razliku od čistih spojeva u ovom slučaju se iz grafova ne može uočiti linearna ovisnost koncentracija-absorbancija za testirane smjese. Kod kombinacija 3 i 4 flavan-3-ola uočava se bolja linearnosti u odnosu na kombinacije dvaju flavan-3-ola što se očituje i kasnije u rezultatima potencijalnog združenog učinka (% razlike se mijenja ovisno o koncentraciji) Najveću antioksidacijsku aktivnost (μM TE) testiranih ekvimolarnih smjesa kombinacije dvaju flavan-3-ola pokazala je smjesa epikatehina i epikatehin galata pri $c=100 \mu\text{M}$ ($288,27 \pm 8,59 \mu\text{M TE}$), epikatehina i epigalokatehin galata pri $c=300 \mu\text{M}$ ($608,65 \pm 9,78 \mu\text{M TE}$) te smjesa katehina i epigalokatehin galata pri $c=500 \mu\text{M}$ ($1308,46 \pm 6,62 \mu\text{M TE}$). Smjesa katehina i epikatehina je imala najslabiju redukcijску snagu pri koncentracijama od 100 i 500 μM , dok je pri koncentraciji 300 μM najnižu FRAP vrijednost imala smjesa katehina i epikatehin galata.

Tablica 5 prikazuje antioksidacijsku aktivnost (μM TE) testiranih ekvimolarnih smjesa od kombinacije tri flavan-3-ola, i slično kao i kod kombinacije dvaju flavan-3-ola postoji razlika u FRAP vrijednostima između testiranih smjesa u različitim koncentracijama.

Kod testiranja koncentracija 300 i 500 μM najveću FRAP vrijednost imala je ekvimolarna smjesa epikatehina, epikatehin galata i epigalokatehin galata ($562,12 \pm 10,90$ odnosno $1042,89 \pm 9,26 \mu\text{M TE}$), a najmanju smjesa katehina, epikatehina i epigalokatehin galata pri 100 μM ($225,58 \pm 2,97 \mu\text{M TE}$). Antioksidacijska aktivnost smjese sva četiri testirana flavan-3-ola nije se znatno istaknula. Redukcijska snaga ove smjese je bila brojčano gotovo jednaka smjesi epikatehina i epikatehin galata (Tablica 4 i 6). Usporedbom svih testiranih smjesa možemo uočiti da su najbolju redukcijsku snagu pokazale binarne smjese (pri 500 μM) i to smjese katehina i epigalokatehin galata ($1308,46 \pm 6,62 \mu\text{M TE}$), epikatehina i epigalokatehin galata ($1106,92 \pm 33,22 \mu\text{M TE}$) te epikatehin galata i epigalokatehin galata ($1151,15 \pm 33,98 \mu\text{M TE}$).

Unatoč sve većem zanimanju za pojašnjenje mehanizma interakcijskog djelovanja fenolnih spojeva, veoma mali broj dosadašnjih istraživanja obuhvaća i interakciju pojedinih flavan-3-ola. Rezultati određivanja potencijalnog interakcijskog djelovanja ekvimolarnih fenolnih smjesa FRAP metodom prikazani su u tablicama 7-9. Konačni učinak interakcijskog djelovanja izraženi je kao razlika u antioksidacijskoj aktivnosti (%), pri čemu su pozitivne vrijednosti upućivale na sinergijski, a negativne na antagonistički učinak između dva fenolna spoja u testiranoj binarnoj smjesi. Iz prikazanih rezultata jasno se može zaključiti da velik broj testiranih smjesa pokazuje veću redukcijsku snagu u odnosu na očekivanu teoretsku vrijednost što ukazuje na sinergiju. Međutim, samo dvije fenolne smjese pokazuju slabiju redukcijsku snagu u odnosu na očekivane vrijednosti, što upućuje na antagonistički učinak dvaju fenolnih spojeva u testiranoj smjesi.

U tablicama 7, 8 i 9 prikazane su usporedbe očekivanih i eksperimentalnih FRAP vrijednosti i interakcijsko djelovanje ekvimolarnih fenolnih smjesa (% razlike) pri koncentracijama smjesa 100, 300 i 500 μM . U tablici 7 prikazani su rezultati interakcijskog djelovanja pri koncentraciji smjese od 100 μM . Kod kombinacije dvaju spojeva sve ispitivane smjese imale su eksperimentalnu FRAP vrijednost veću od očekivane što ujedno i ukazuje na sinergijsko djelovanje spojeva u tim smjesama. Najjače sinergijsko djelovanje imala je smjesa epikatehina i epigalokatehin galata (146,77 % razlike) a najslabije smjesa katehina i epikatehin galata (33,57 % razlike). Kod kombinacije tri spoja, sve smjese pokazuju sinergijsku učinak, ali najjaču sinergiju pokazala je smjesa katehina, epikatehina i epigalokatehin galata (110,35 % razlike), a najslabiju smjesa epikatehina, epikatehin galata i epigalokatehin galata (58,22 % razlike). Kod kombinacije četiri spoja očekivana FRAP vrijednost je gotovo dva puta manja od eksperimentalne vrijednosti stoga se i u ovom slučaju može govoriti o sinergijskom djelovanju (97,01 % razlike).

Pri koncentraciji smjese 300 μM (tablica 8) sinergijski učinak je potvrđen za sve smjese osim za smjesu katehina i epikatehin galata koja je imala antagonističko djelovanje (-21,29 % razlike) pri testiranoj koncentraciji. Iako je za gotovo sve smjese potvrđen sinergijski učinak uočavaju se i znatno manje razlike između očekivanih i eksperimentalnih FRAP vrijednosti. Najjače sinergijsko djelovanje imala je ponovno smjesa epikatehina i epigalokatehin galata (47,79 % razlike) s tim da je sinergijski učinak tri puta manji u odnosu na smjesu koncentracije 100 μM . Najveći pad sinergijskog učinka u odnosu na prethodno testiranu koncentraciju smjese zabilježen je za smjesu katehina i epikatehina (10,6 puta manja sinergija). Ostaje smjese testirane pri koncentraciji 300 μM imale su dva do tri pta manji sinergijski učinak u odnosu na smjese koncentracije 100 μM .

Povećanjem testirane koncentracije smjese i dalje dolazi do razlike u združenom učinku pojedinih smjesa. Tako pri koncentraciji smjese od 500 μM , kombinacije dvaju flavan-3-ola uglavnom pokazuju sinergijski učinak, uz iznimku smjese katehina i epikatehina. Ekvimolarna smjesa katehina i epikatehina pokazala je manju eksperimentalnu FRAP vrijednost od očekivane pri čemu smo zaključili da je došlo do antagonističkog djelovanja. Ovo je iznenađujuće obzirom na činjenicu da je navedena smjesa imala u prethodnim koncentracijama dobro, pa čak i iznimno sinergijsko djelovanje. Iznimku čine i smjesa katehina i epikatehin galata kod koje se ponovno javlja sinergijski činak (27,15 % razlike). Ostale smjese flavan-3-ola pri testiranoj koncentraciji pokazuju manju ili veću sinergijsku aktivnost u odnosu na prethodno testiranu koncentraciju. Kod kombinacije svih testiranih spojeva očekivana FRAP vrijednost je ponovno manja od eksperimentalne što je još jednom potvrdilo da združeni učinak svih testiranih flavan-3-ola, iako povećanjem koncentracije smjese slabi, pokazuje sinergijski učinak (35,90% razlike; tablica 9).

Prva saznanja i teorije o sinergijskom djelovanju pojedinih spojeva potječu od pretpostavke da postoji sinergijski učinak flavonoida s vitaminom C.³¹ Nakon toga, pojedine studije su potvrdile postojanje interakcije između flavonoida i pojedinih vitamina. Broj provedenih ispitivanja sinergijskog učinka flavan-3-ola s drugim spojevima i/ili fenolima postoji, ali je znatno malen i nedostatan. Tako je na primjer sinergijsko djelovanje potvrđeno između katehina i α -tokoferola^{32,33}, δ -tokoferola i epikatehina i epigalokatehin galata³⁴, a Frank i sur.³⁵ (2006) su potvrdili interakcijski učinak kvercetina, katehina i epikatehina u kombinaciji s α -tokoferolom, a Skroza i sur.³⁰ (2015) sinergiju katehina s resveratrolom.

Usprkos navedenim istraživanjima, sam mehanizam interakcijskog djelovanja još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Razvijeno je tek nekoliko hipoteza koje objašnjavaju mogući antagonistički ili sinergijski učinak smjese antioksidansa. Peyrat-Maillard i sur.³⁶ (2003) su opisali interakcijsko djelovanje smjese slabog antioksidansa s jakim antioksidansom, u kojoj slabi antioksidans može regenerirati jaki antioksidans i tako povećati ukupnu anti-radikalnu aktivnost kombinacije.

Slično se može objasniti i antagonizam, tj. mogućnost da jaki antioksidans regenerira slabi antioksidans, što zauzvrat znači smanjenje sposobnosti *hvatanja* slobodnih radikala. U kombinaciji dva jaka antioksidansa, obje komponente mogu regenerirati jedna drugu i na taj način poboljšati ukupnu antioksidacijsku snagu smjese.^{37,38,39} Rezultati ovog istraživanja potvrđuju navedene hipoteze o pojačavanju djelovanja jednog spoja prisutvom drugim, ako i prisustvo određenih skupina u smjesi (broj i položaj -OH skupina). Iz navedenog se može zaključiti da rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti fenolnih smjesa podupiru načelo da strukture s više slobodnih -OH skupina imaju bolju aktivnost, kao i u slučaju pojedinih fenolnih spojeva. No ni ovo pravilo nije uvijek potvrđeno obzirom na razlike u združenom učinku pri različitim koncentracijama smjese. Ono što se može istaknuti jest da prisustvo galata u smjesi (npr. kateholna skupina iz katehina ili epikatehina i esterigicirana galna kiselina u prstenu C) znatno poboljšava učinak smjese u odnosu na prisustvo samo 2 kateholne skupine (katehin + epikatehin).

5. ZAKLJUČAK

Temeljem postignutih rezultata i provedene rasprave, mogu se izdvojiti sljedeći zaključci:

- Rezultati ovog istraživanja ukazuju na razlike u antioksidacijskoj aktivnosti testiranih fenolnih spojeva i ekvimolarnih fenolnih smjesa.
- Antioksidacijska aktivnost testiranih flavonoida ovisi o njihovoj strukturi, te broju, vrsti i rasporedu funkcionalnih skupina u molekuli.
- Ekvimolarne smjese flavan-3-ola pokazale su izuzetno dobru redukcijsku snagu.
- Pojedine smjese pokazale su gubitak redukcijske snage u odnosu na očekivanu vrijednost, dok je ipak veći broj fenolnih smjesa pokazao redukcijsku snagu veću od očekivane, što upućuje na sinergijski učinak dvaju ili više fenolnih spojeva u testiranoj smjesi.
- FRAP metodom potvrđen je sinergijski učinak kod svih smjesa flavan-3-ola.
- Rezultati istraživanja ukazuju na mogući utjecaj strukture molekula na aktivnost smjesa.

Na osnovu rezultata dobivenih ovom studijom, može se zaključiti da postoji interakcija između flavan-3-ola, te da njihovo zajedničko djelovanje u smjesama rezultira sinergijskim učinkom, obzirom na redukcijsku snagu smjese.

6. LITERATURA

1. Liu R.H. (2004) International Research Conference on Food, Nutrition, and Cancer. Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. *The Journal of Nutrition*. 3479S-3485S.
2. Dai J., Mumper R.J. (2010) Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 15, 7313–7352.
3. Tsao R. (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2, 1231-1246.
4. Kazazić S.P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 55, 279–290.
5. Racchi M.L. (2013) Antioxidant Defenses in Plants with Attention to Prunus and Citrus spp. *Antioxidants*. 2,340-369. Dostupno: https://www.researchgate.net/figure/258902284_fig3_Figure-3-Basic-structure-of-flavonoids
6. Shahidi F., Nazck M. (1995) Food phenolics- sources, chemistry, effects, applications. Technomic Publishing Compan, Inc. Basel, str. 1-4. 75-100; 171-273.
7. Bordenave N., Hamaker B.R., Ferruzzi G.M. (2014) Nature and consequences of non-covalent interactions between flavonoids and macronutrients in foods. *Food Funct.*; 5, 18-34. Dostupno: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/fo/c3fo60263j/unauth#!divAbstract>
8. Shahidi F., Naczck M. (2004) Phenolics in food and nutraceuticals. CRC Press, Boca Raton, FL. str. 352-355.
9. Ljubetić Katija (2009), Uvid u fenolni sastav voća i proizvoda od voća, Diplomski rad, Split.
10. Stalikas C.D. (2007) Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*. 30, 3268–3295.
11. URL: <http://matuzalem.hr/o-antioksidansima/>; Pristupljeno: 11.7.2017.
12. URL: <https://tinkturedrsulca.com/sta-su-to-slobodni-radikali/>; Pristupljeno: 11.7.2017.

13. Bradamante V., Granić P., Klepac R., Lacković Z., Lovrić J., Medić-Šarić M., Šošić Z., Žarković N. (2001) Oksidativni stres i djelotvornost antioksidansa. Priručnik, Medicinska naklada, Zagreb.
14. URL:https://zena.rtl.hr/clanak/ostalo_na_temu_zdravlja/antioksidansi_jesu_li_nam_doista_potrebni/11233; Pristupljeno: 15.9.2017.
15. Cao G., Sofic E., Prior R.L. (1997) Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology & Medicine*. 22, 749-760.
16. Noguer M., Cerezo A.B., Moya M.L., Troncoso A.M., Garcia-Parrilla M.C. (2014) Synergism Effect between Phenolic Metabolites and Endogenous Antioxidants in Terms of Antioxidant Activity. *Chemical Engineering and Science* 4: 258-265.
17. URL: <http://novi.ba/clanak/2687/crno-vino-kao-lijek>; Pristupljeno: 11.7.2017.
18. URL: <http://www.vitamini.hr/4709.aspx>; Pristupljeno: 19.7.2017.
19. Benzie I.F.F., Strain J.J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239, 70-76.
20. Benzie I.F.F., Strain J.J. (1999) Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic acid Concentration. *Methods in Enzymology*. 299, 15-27.
21. Prior R.L., Wu X., Schaich K. (2005) Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 4290–4302.
22. Badarinath A.V., Mallikarjuna Rao K., Madhu Sudhana Chetty C., Ramkanth S., Rajan T.V.S., Gnanaprakash K. (2010) A Review on *In – vitro* Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations and Considerations. *International Journal of Pharm Tech Research*. 2 (2), 1276– 285.
23. Katalinić V., Smole Možina S., Skroza D., Generalić I., Abramović H., Miloš M., Ljubenković I., Piskernik S., Pezo I., Terpinč P., Boban M. (2010) Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry*. 119, 715-723.
24. Generalić I., Skroza D., Ljubenković I., Katalinić A., Burčul F., Katalinić V. (2011) Influence of the phenophase on the phenolic profile and antioxidant properties of Dalmatian sage. *Food Chemistry*. 127 (2), 427–433.

25. Firuzi O., Lacanna A., Petrucci R., Marrosu G., Saso L. (2005) Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1721, 174 – 184.
26. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Bolwell P.G., Bramley P.M., Pridham J.B. (1995) The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*. 22 (4), 375-383.
27. Prochazkova D., Boušova I., Wilhelmova N. (2011) Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. 82, 513–523.
28. Hidalgo M., Sanchez–Moreno C., de Pascual–Teresa S. (2010) Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry*. 121, 691-696.
29. Milos M., Makota D. (2012) Investigation of antioxidant synergisms and antagonisms among thymol, carvacol, thymoquinone and *p*-cymene in a model system using the Briggs–Rauscher oscillating reaction. *Food Chemistry*. 131, 296–299.
30. Skroza D., Generalić Mekinić I., Svilović S., Šimat V., Katalinić V. (2015) Investigation of the potential synergistic effect of resveratrol with other phenolic compounds: A case of binary phenolic mixtures. *Journal of Food Composition and Analysis*. 38, 13-18.
31. Rusznyák S., Szent-Györgyi A. (1936) Vitamin P: Flavonols as vitamins. *Nature*. 138, 27.
32. Mahmoud M.A.A., Chedea V.S., Detsi A., Kefalas P. (2013) Ascorbic acid modifies the free radical scavenging behaviour of catechin: An insight into the mechanism. *Food Research International*. 51, 907–913.
33. Lotito S.B., Fraga C.G. (1998) (+)-Catechin prevents human plasma oxidation. *Free Radical Biology & Medicine*. 24, 435-441.
34. Kadoma Y., Ishihara M., Okada N., Fujisawa S. (2006) Free radical interaction between vitamin E (alpha-, beta-, gamma- and delta-tocopherol), ascorbate and flavonoids. *In vivo*. 20, 823–827.
35. Frank J., Budek A., Lundh T., Parker R.S., Swanson J.E., Lourenço C.F., et al. (2006) Dietary flavonoids with a catechol structure increase alpha-tocopherol in rats and protect the vitamin from oxidation in vitro. *Journal of Lipid Research*. 47, 2718–2725.

36. Peyrat-Millard M.N., Cuvelier M.E., Berset C. (2003) Antioxidant activity of phenolic compounds in 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: synergistic and antagonistic effects. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 80, 1007-1012.
37. Frankel E.N., Huang S.W., Kanner J., German J.B. (1994) Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oil vs. emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42, 1054-1059.
38. Koga T., Terao J. (1995) Phospholipids increase radical-scavenging activity of vitamin E in a bulk oil model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43, 1450-1454.
39. Cuvelier C., Bondet V., Berset C. (2000) Behavior of phenolic antioxidants in a partitioned medium: structure-activity relationship. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 77, 819-823.