

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**ANTOIKSIDACIJSKA AKTIVNOST FENOLA:**  
**INTERAKCIJA DERIVATA**  
**HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE**

**ZAVRŠNI RAD**

**NINA JOLIĆ**

**Matični broj: 1448**

**Split, rujan 2017.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**STRUČNI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE**  
**SMJER: PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA**

**ANTOIKSIDACIJSKA AKTIVNOST FENOLA:**  
**INTERAKCIJA DERIVATA**  
**HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE**

**ZAVRŠNI RAD**

**NINA JOLIĆ**

**Matični broj: 1448**

**Split, rujan 2017.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**PROFFESIONAL STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY**  
**COURSE: FOOD TECHNOLOGY**

**ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PHENOLICS:**  
**INTERACTION BETWEEN HYDROXYBENZOIC**  
**ACID DERIVATIVES**

**BACHELOR THESIS**

**NINA JOLIĆ**

**Parent number: 1448**

**Split, September 2017.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu  
Stručni studij kemijske tehnologije; smjer Prehrambena tehnologija

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Tema rada** je prihvaćena na 21. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta  
**Mentor:** Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić  
**Pomoć pri izradi:** Dr. sc. Danijela Skroza

### ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST FENOLA: INTERAKCIJA DERIVATA HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE

Nina Jolić, 1448

#### Sažetak:

Posljednjih godina sve više raste interes znanstvenika za fenolne spojeve zbog njihove dokazane biološke aktivnosti koja ih čini zanimljivima farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. U ovom završnom radu zadatak je bio odrediti antioksidacijsku aktivnost pet hidroksibenzojevih kiselina, i to galne, vanilinske, protokatehinske, siriginske i gentisinske kiseline, FRAP metodom. Osim čistih spojeva testirane su ekvimolarne smjese navedenih fenolnih kiselina pri različitim koncentracijama (50, 100, 1000  $\mu\text{M}$ ) u kojima su bile kombinacije dvije, tri, četiri te svih pet spojeva. Eksperimentalno dobivene redukcijske aktivnosti smjesa su uspoređene sa izračunatim teoretskim vrijednostima te je na taj način dokazano postojanje aditivnog, sinergijskog ili antagonističkog učinka. Zaključeno je kako interakcija i učinak fenolnih spojeva u smjesama uvelike ovisi o koncentracijama u kojim su navedeni spojevi prisutni. Najveću sinergiju je pokazala smjesa protokatehinske, siriginske i gentisinske kiseline pri koncentraciji od 100  $\mu\text{M}$  dok je pri istoj koncentraciji najveći antagonizam pokazala smjesa vanilinske i protokatehinske kiseline.

**Ključne riječi:** hidroksibenzojeve kiseline, FRAP, aditivno djelovanje, sinergija, antagonizam

**Rad sadrži:** 49 stranica, 39 slika, 13 tablice, 33 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. Doc. dr. sc. Franko Burčul
2. Dr. sc. Danijela Skroza, znan. sur.
3. Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić

**Datum obrane:** 28. rujna 2017.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

**University of Split**  
**Faculty of Chemistry and Technology Split**  
**Professional study of Chemical Technology; Course: 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. 21.  
**Mentor:** Ph. D. Ivana Generalić Mekinić, Assistant Professor  
**Technical assistance:** Ph. D. Danijela Skroza

### ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PHENOLICS: INTERACTION BETWEEN HYDROXYBENZOIC ACID DERIVATIVES

Nina Jolić, 1448

**Abstract:**

In last few years, there has been a growing interest in phenolic compounds due to their biological activities which make them interesting to the pharmaceutical, cosmetic and food industries. The aim of this work was to determine antioxidant activity of five hydroxybenzoic acids; gallic, vanillic, protocatechuic, syringic and gentisic acid using the FRAP assay. Besides pure phenolic compounds, the equimolar mixtures of the investigated acids were also tested at different concentrations (50, 100, 1000  $\mu\text{M}$ ) as well as combinations of two, three, four and all five acids. The experimental results were compared with the theoretical values, thus proving the existence of an additive, synergistic or antagonistic effect. It can be concluded that interaction of investigated phenolic compounds depends on concentrations in which the compounds are present. The highest synergy effect was observed for the mixture of protocatechuic, syringic and gentisic acid at concentration of 100  $\mu\text{M}$  while the highest antagonism was detected for the mixture of vanillic and protocatechuic acid at same concentration.

**Keywords:** hydroxybenzoic acids, FRAP assay, additive effect, synergy, antagonism

**Thesis contains:** 49 pages, 39 figures, 13 tables, 33 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Ph. D. Franko Burčul, Assistant Professor
2. Ph. D. Danijela Skroza
3. Ph. D. Ivana Generalić Mekinić, Assistant Professor

**Defence date:** 28.09.2017.

**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 doc. dr. sc. Ivane Generalić Mekinić, u razdoblju od svibnja do rujna 2017. godine.*

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

## **ZAHVALA**

*Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Ivani Generalić Mekinić na svim stručnim savjetima, uloženom trudu, vremenu, iznimnom strpljenju i pomoći iskazanoj prilikom izrade ovoga rada. Također, zahvaljujem se i dr. sc. Danijeli Skroza na posvećenom vremenu i pomoći pri izradi ovog rada.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji, prijateljima i kolegama na pomoći, razumijevanju i potpori koju su mi pružili tijekom studiranja.*



## ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak ovog završnog rada bio je pripremiti otopine odabranih fenolnih kiselina i njihovih ekvimolarnih smjesa koje su sadržavale kombinacije dvije, tri, četiri i pet kiselina te testirati njihovu redukcijsku snagu metodom FRAP (engl. *Ferric Reducing/Antioxidant Power*).

Dobivene eksperimentalne FRAP vrijednosti istraživanih smjesa fenolnih kiselina je potrebno usporediti sa teoretskim vrijednostima FRAP, te na temelju dobivenih vrijednosti odrediti aditivni, sinergijski ili antagonistički učinak spojeva u smjesi.

## SAŽETAK

Posljednjih godina sve više raste interes znanstvenika za fenolne spojeve zbog njihove dokazane biološke aktivnosti koja ih čini zanimljivima farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. U ovom završnom radu zadatak je bio odrediti antioksidacijsku aktivnost pet hidoksibenzojevih kiselina, i to galne, vanilinske, protokatehinske, siriginske i gentisinske kiseline, FRAP metodom. Osim čistih spojeva testirane su ekvimolarne smjese navedenih fenolnih kiselina pri različitim koncentracijama (50, 100, 1000  $\mu\text{M}$ ) u kojima su bile kombinacije dvije, tri, četiri te svih pet spojeva. Eksperimentalno dobivene redukcijske aktivnosti smjesa su uspoređene sa izračunatim teoretskim vrijednostima te je na taj način dokazano postojanje aditivnog, sinergijskog ili antagonističkog učinka. Zaključeno je kako interakcija i učinak fenolnih spojeva u smjesama uvelike ovisi o koncentracijama u kojim su navedeni spojevi prisutni. Najveću sinergiju je pokazala smjesa protokatehinske, siriginske i gentisinske kiseline pri koncentraciji od 100  $\mu\text{M}$  dok je pri istoj koncentraciji najveći antagonizam pokazala smjesa vanilinske i protokatehinske kiseline.

**Ključne riječi:** hidoksibenzojeve kiseline, FRAP, aditivno djelovanje, sinergija, antagonizam

## **ABSTRACT**

In last few years, there has been a growing interest in phenolic compounds due to their biological activities which make them interesting to the pharmaceutical, cosmetic and food industries. The aim of this work was to determine antioxidant activity of five hydroxybenzoic acids; gallic, vanillic, protocatechuic, syringic and gentisic acid using the FRAP assay. Besides pure phenolic compounds, the equimolar mixtures of the investigated acids were also tested at different concentrations (50, 100, 1000  $\mu\text{M}$ ) as well as combinations of two, three, four and all five acids. The experimental results were compared with the theoretical values, thus proving the existence of an additive, synergistic or antagonistic effect. It can be concluded that interaction of investigated phenolic compounds depends on concentrations in which the compounds are present. The highest synergy effect was observed for the mixture of protocatechuic, syringic and gentisic acid at concentration of 100  $\mu\text{M}$  while the highest antagonism was detected for the mixture of vanillic and protocatechuic acid at same concentration.

**Keywords:** hydroxybenzoic acids, FRAP assay, additive effect, synergy, antagonism

## SADRŽAJ

<b>UVOD</b>	1
<b>1. OPĆI DIO</b>	3
1.1. Fenolni spojevi	3
1.2. Klasifikacija fenolnih spojeva	3
1.3. Polifenoli	4
<i>1.3.1. Flavanoidi</i>	5
<i>1.3.2 Neflavanoidi</i>	6
<i>1.3.3 Fenolne kiseline</i>	6
1.4. Uloga fenolnih kiselina u biljkama	10
1.5. Fenolne kiseline u hrani	11
1.6. Fenolne kiseline i ljudsko zdravlje.	11
1.7. Antioksidacijska aktivnost fenolnih spojeva	12
1.8. Interakcijsko djelovanje fenolnih spojeva	13
<b>2. EKSPERIMENTALNI DIO</b>	14
2.1. Materijal	14
2.2. Standardi, kemikalije i reagensi	14
2.3. Priprava otopina fenolnih kiselina i ekvimolarnih fenolnih smjesa	15
2.4. Metode određivanja antioksidacijskih svojstava	17
<i>2.4.1 FRAP metoda</i>	17
<i>2.4.2. Određivanje interakcijskog djelovanja.</i>	19

<b>3. REZULTATI</b>	20
3.1. Redukcijska aktivnost otopina fenolnih kiselina	20
3.2. Redukcijska aktivnost ekvimolarnih smjesa dvije fenolne kiseline	23
3.3. Redukcijska aktivnost ekvimolarnih smjesa triju fenolne kiseline	29
3.4. Redukcijska aktivnost ekvimolarnih smjesa četiri fenolne kiseline	35
3.5. Redukcijska aktivnost ekvimolarnih smjesa pet fenolnih kiselina	38
3.6. Rezultati određivanja interakcijskog djelovanja ekvimolarnih fenolnih smjesa	39
<b>4. RASPRAVA</b>	42
<b>5. ZAKLJUČAK</b>	46
<b>6. LITERATURA</b>	47

## UVOD

Fenolni spojevi u posljednje vrijeme privlače veliku pozornost zbog svoje izvanredne antioksidacijske aktivnosti, pa stoga imaju važnu ulogu u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Osim ove biološke aktivnosti, ove spojeve odlikuje i širok niz drugih pozitivnih djelovanja kao što su antiupalno, antimikrobno, antikancerogeno, spazmolitičko, analgetsko, animutageno itd.<sup>1</sup>

Flavonoidi i fenolne kiseline su najrasprostranjenije podgrupe fenolnih spojeva koje imaju značajnu ulogu u samim biljkama te dokazane pozitivne učinke na ljudsko zdravlje, stoga je izrazito važno bolje upoznavanje i istraživanje navedenih spojeva i njihovih aktivnosti, osobito onih koje bi se potencijalno mogle koristiti u prevenciji i liječenju različitih bolesti.<sup>1</sup> Fenolne kiseline i njihovi derivati imaju dokazane brojne biološke funkcije, ali do danas se jako malo zna o odnosima između njihovih kemijskih struktura s navedenim učincima, kao mehanizmima njihovog djelovanja.<sup>2</sup>

U prirodi (biljnim materijalima) su fenolne kiseline uvijek prisutne kao smjese različitih spojeva odnosno njihovih kombinacija, a ne kao jedan izdvojeni sastojak, te se uglavnom aktivnost različitih biljnih materijala ne može prepisati učinku samo jednog spoja već se smatra da je on rezultat interakcije svih spojeva koji su u njemu prisutni. Nasuprot tome, znanstvena istraživanja biološke aktivnosti pojedinih spojeva uglavnom su usmjerena na ispitivanja individualnih komponenti, dok je vrlo mali broj studija koje istražuju združeni učinak većeg broja spojeva.<sup>3</sup>

Združeni učinci pojedinih kombinacija dvaju ili više spojeva mogu rezultirati sa različitim djelovanjima:<sup>3</sup>

- **Aditivnom**- ukoliko je združeni učinak smjese spojeva jednak ili se ne razlikuje značajno od zbroja pojedinačnih učinaka sastojaka smjese,
- **Sinergijskom**- ukoliko je združeni učinak veći odnosno bolji od zbroja pojedinačnih učinaka sastojaka smjese,
- **Antagonističkom**- ukoliko je združeni učinak smjese spojeva manji odnosno slabiji od zbroja pojedinačnih učinaka sastojaka smjese

Cilj ovog rada je bio metodom FRAP odrediti antioksidativnu, odnosno redukcijsku aktivnost pet fenolnih kiselina iz grupe derivata hidroksibenzojeve kiseline kao i aktivnost otopina njihovih kombinacija. Testirane su ekvimolarne smjese istraživanih fenolnih kiselina, i to kombinacije dviju, tri, četiri te svih pet kiselina. U konačnici je usporedbom eksperimentalno dobivenih vrijednosti redukcijske aktivnosti fenolnih smjesa s teoretskim vrijednostima koje su dobivene proračunom, potvrđeno postojanje aditivnog, sinergijskog ili antagonističkog učinka.

# 1. OPĆI DIO

## 1.1. Fenolni spojevi

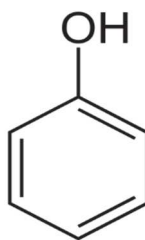
Fenolni spojevi su aromatski sekundarni biljni metaboliti, široko rasprostranjeni u cijelom biljnom kraljevstvu. Posljednjih godina se za njih razvio veliki interes zbog njihovih brojnih dokazanih pozitivnih svojstava. Strukturno, fenolni spojevi sadrže aromatski prsten na kojem se nalazi jedna ili više hidroksilnih skupina (-OH). Fenoli su iznimno heterogena kemijska skupina spojeva obzirom da osim hidroksilnih grupa na osnovnoj aromatskoj strukturi fenola mogu biti vezane i druge funkcionalne skupine, može ih biti i više na istom prstenu, a složeniji oblici fenola sadrže i veći broj aromatskih prstena. Prema ovome u fenole ubrajamo različite spojeve, od jednostavnih fenolnih molekula do visoko polimeriziranih spojeva.<sup>4</sup> U prirodi su fenolni spojevi najčešće prisutni kao konjugati s mono- i polisaharidima, povezani s jednom ili više fenolnih skupina, a mogu se pojaviti i kao esteri i metilni esteri.<sup>5</sup> Nedavna istraživanja su dokazala da fenoli imaju i veliku zaštitnu ulogu za ljudski organizam pa se smatra da se konzumiranjem namirnica bogatim fenolnim spojevima (voće, povrće, žitarice, čajevi, začini itd.) može smanjiti rizik od oksidacijskih oštećenja te time zaštititi organizam od različitih oboljenja kao što su kardiovaskularne bolesti, moždani udar i neke vrste karcinoma.<sup>6</sup>

## 1.2. Klasifikacija fenolnih spojeva

Fenolni spojevi obuhvaćaju približno oko 8000 spojeva, koji posjeduju zajedničku strukturnu osobinu- fenolnu strukturu odnosno aromatski prsten koji posjeduje najmanje jedan hidroksilni supstituent. Heterogenu skupinu fenola stoga možemo najjednostavnije klasificirati na polifenole i jednostavne fenole.

Polifenoli su složeniji fenolni spojevi koji posjeduju najmanje dvije fenolne podjedinice, dok oni jednostavni imaju samo jednu.





**Slika 1.** Osnovna kemijska struktura fenola<sup>12</sup>

### 1.3. Polifenoli

Polifenoli su spojevi karakteristične građe jer je -OH skupina vezana na ugljik u benzenskom prstenu. Biljkama polifenoli primarno služe kao molekule uključene u obranu od UV zračenja ili napada patogena, imaju funkciju u pigmentaciji, rastu i kod razmnožavanja.<sup>7</sup> Osim toga, polifenoli su jaki antioksidansi koji nadopunjavaju i pojačavaju funkcije antioksidacijskih vitamina i enzima koji se nalaze u našem organizmu za obranu od oksidativnog stresa izazvanog viškom reaktivnih kisikovih vrsta. Ipak, različite podskupine polifenola se mogu značajno razlikovati u stabilnosti, biorasploživosti i fiziološkim funkcijama povezanim s ljudskim zdravljem.<sup>9</sup>

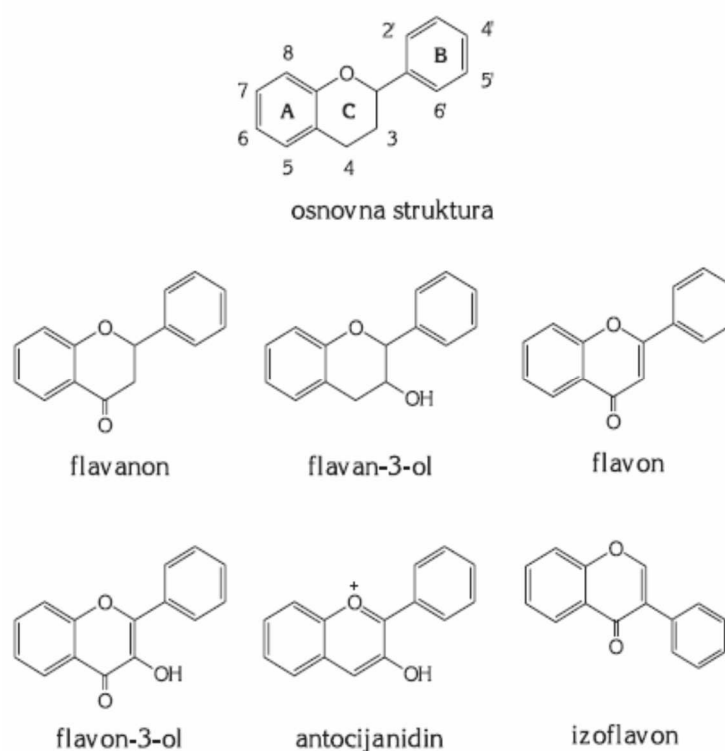
Raznolikost i široka uloga polifenola u biljkama je dovela do različitih načina kategorizacije tih spojeva stoga ih možemo klasificirati prema podrijetlu, biološkoj funkciji i kemijskoj strukturi.

Obzirom na osnovnu kemijsku strukturu, polifenoli se mogu podijeliti na *flavonoide* i *neflavonoide*.<sup>8</sup>

### 1.3.1. Flavonoidi

Flavonoidi su spojevi male molekulske mase koji obuhvaćaju petnaest ugljikovih atoma raspoređenih unutar dva aromatska prstena međusobno povezana piranskim prstenom.<sup>5</sup> Do danas je poznato više od 8000 fenolnih spojeva, među kojima je identificirano preko 4000 flavonoida.<sup>9</sup> Glavne podskupine unutar skupine flavonoida su **flavoni**, **flavonoli**, **flavan-3-oli**, **izoflavoni**, **flavanoni** i **antocijanidini**.

Ostale skupine flavonoida koji se u hrani nalaze u vrlo malim količinama su halkoni, dihidrohalkoni, dihidroflavonoli, flavan-3,4-dioli, kumarini i auronii.<sup>10,7</sup>



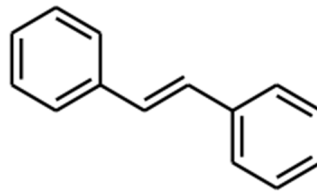
**Slika 2.** Osnovna struktura flavonoida i glavne podskupine<sup>11</sup>

Velik broj ljekovitih biljaka sadrži flavonoide koji imaju dokazanu dobru antioksidacijsku i antiradikalnu aktivnost pa se upravo te značajke flavonoida povezuju s terapijskim učincima njihove konzumacije kao i njihovim utjecajem na boju i okus hrane.<sup>11</sup>

### 1.3.2. Neflavonoidi

Neflavonoidi su spojevi jednostavnije građe od one flavonoida i u ovu skupinu fenolnih spojeva ubrajamo : *fenolne kiseline, stilbene i lignade*.

Pojedini pripadnici ove skupine spojeva se nalaze u namirnicama te se smatraju izuzetno važnim za ljudsko zdravlje. Među njima spoj resveratrol je stilben koji je karakterističan za grožđe i crno vino; elaginska kiselina i njezini derivati koji se nalaze u bobičastom voću, npr. jagode i maline, te u kožici različitih orašastih plodova.<sup>9</sup>



**Slika 3.** Osnovna struktura stilbena<sup>13</sup>

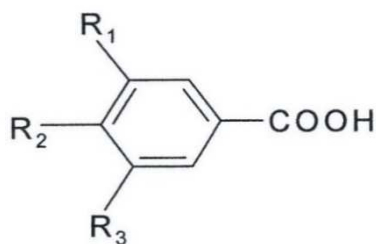
### 1.3.3. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline i njihovi derivati su podskupina neflavonoida koja je široko rasprostranjena u biljnom carstvu. Zanimanje za fenolne kiseline i njihove derivate uglavnom se javlja zbog njihovih potencijalnih bioloških funkcija, kao što su protuupalno, antialergijsko, antimikrobno, antikancerogeno i antivirusno djelovanje.<sup>2</sup> Obzirom na osnovnu strukturu razlikujemo dvije podskupine fenolnih kiselina:

- *derivate hidrosibenzojeve kiseline*
- *derivate hidrokiscimetne kiseline*

Osim razlike u osnovnoj strukturi, razlike među derivatima navedenih kiselina proizlaze iz različitih stupnjeva hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena.<sup>6</sup>

Hidroksibenzojeve kiseline su fenolni spojevi koji imaju sedam atoma ugljika, a opće su strukture C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>. Ovi spojevi su najjednostavniji fenolni spojevi pronađeni u prirodi.

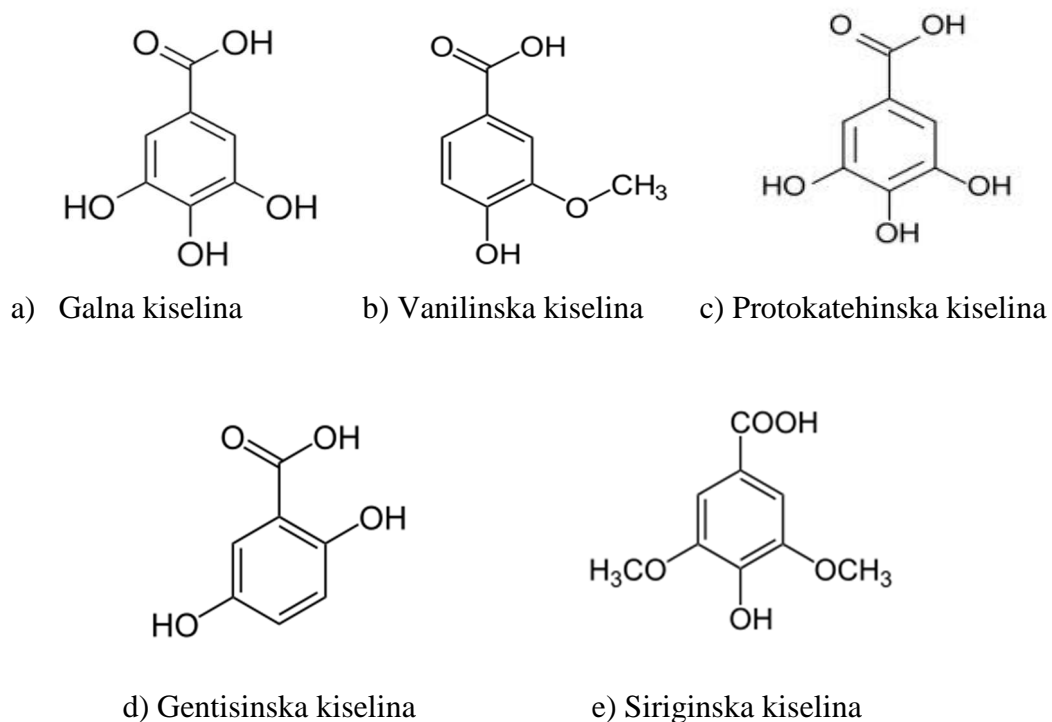


**Slika 4.** Osnovna struktura hidroksibenzojeve kiseline<sup>15</sup>

Među najrasprostranjenije hidroksibenzojeve kiseline ubrajamo: vanilinsku, siriginsku, protokatehinsku kiselinu, galnu, *m*-hidroksibenzojevu, *p*-hidroksibenzojevu, gentisinsku, itd.<sup>16</sup> Strukture najznačajnijih hidroksibenzojevih kiselina prikazane su u tablici 1 i slici 5, dok su najznačajniji prehrambeni izvori ovih spojeva prikazani u tablici 2.

**Tablica 1.** Strukture najčešćih hidroksibenzojevih kiselina.<sup>16</sup>

<i>NAZIV KISELINE</i>	<i>Položaj –OH skupine</i>	<i>Položaj –OCH<sub>3</sub> skupine</i>
Galna	3, 4, 5	/
<i>m</i> -hidroksibenzojeva	2	/
<i>p</i> -hidroksibenzojeva	3	/
Protokatehinska	3, 4	/
Vanilinska	4	3
Siriginska	4	3, 5
Gentisinska	2, 5	/



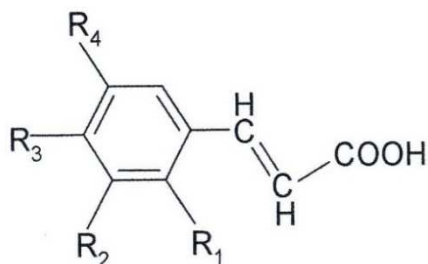
**Slika 5.** Kemijske strukture pojedinih hidroksibenzojevih kiselina<sup>17,18,19,14</sup>

**Tablica 2.** Prisutnost hidroksibenzojevih kiselina u različitim prehranbenim izvorima<sup>16</sup>

<i>NAZIV KISELINE</i>	<i>IZVOR U HRANI</i>
<i>m</i> -hidroksibenzojeva	Malina, koromač, ogrozd, pekan orah
Vanilinska	Vanilija, paprika
Siriginska	Ružmarin, bosiljak, timijan
Protokatehinska	Rajčica, cimet, klinčić, kupina, borovnica
Galna	Čaj, maslinovo ulje, orah

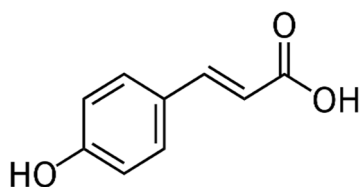
Hidroksicimetne kiseline i njihovi derivati su druga značajna skupina fenolnih kiselina prisutnih u biljnim materijalima, prvenstveno voću i povrću. U prirodi uglavnom dolaze u različitim konjugiranim oblicima te kao esteri.<sup>20</sup>

U hidroksicimetne kiseline ubrajamo: *p*-kumarinsku, kafeinsku, ferulinsku i sinapinsku kiselinu.

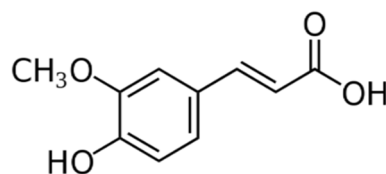


**Slika 6.** Osnovna struktura hidroksicimetne kiseline<sup>15</sup>

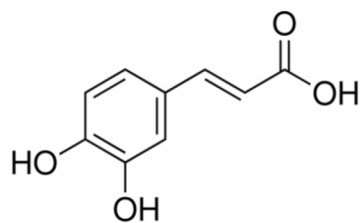
Najpoznatije namirnice bogate derivatima hidroksicimetne kiseline su špinat, brokula, rajčica i proizvodi od rajčice, kava, citrus sokovi, itd.<sup>16</sup>



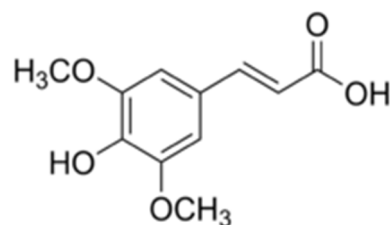
a) *p*-kumarinska kiselina



b) Ferulinska kiselina



b) Kafeinska kiselina



d) Sinapinska kiselina

**Slika 7.** Kemijske strukture pojedinih hidroksicimetnih kiselina<sup>21,22,23,24</sup>

**Tablica 3.** Prisutnost hidroksicimetnih kiselina u različitim prehrambenim izvorima<sup>16</sup>

<i>NAZIV KISELINE</i>	<i>IZVOR U HRANI</i>
<i>p</i> -kumarinska	Špinat, vlakna šećerne repe, žitarice
Kafeinska	Kava, borovnica, jabuka
Ferulinska	Kava, citrus sokovi, vlakna šećerne repe, žitarice
Sinapinska	Brokula, lisnato povrće, citrus sokovi

#### **1.4. Uloga fenolnih kiselina u biljkama**

Iako još nije u potpunosti poznata uloga fenolnih kiselina u biljkama, one su povezane sa različitim funkcijama, uključujući apsorpciju, sintezu proteina, aktivnost enzima, fotosintezu i aleopatiju.<sup>6</sup> Derivati hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline prisutni su u gotovo svim biljnim materijalima (voće, povrće, žitarice, ljekovite biljke) te se nalaze u svim dijelovima biljke; u sjemenu, lišću, korijenu i stabljici.<sup>25</sup>

Manji dio kiselina prisutan je kao „slobodne kiseline“ jer su većinom vezane preko esterske, eterske ili acetatne veze za strukturne komponentne biljnih stanica kao što su celuloza, proteini, lignin, ili na veće polifenole (flavonoide), na manje organske molekule ili na ostale vrste spojeva u stanicama. Upravo su te veze razlog velikom broju derivata fenolnih kiselina, a ta raznolikost jedan je od glavnih čimbenika zaslužnih za složenosti njihovih analiza. Fenolne kiseline nisu homogeno rasprostranjene u biljnim tkivima jer je poznato da uzgojni uvjeti, kao što su na primjer temperatura, lokacija, način uzgoja i ostali čimbenici utječu na profil i sadržaj fenolnih kiselina u nekom materijalu.<sup>6</sup>

## 1.5. Fenolne kiseline u hrani

Fenolne kiseline utječu na izgled (boju), organoleptička, nutritivna i biološka svojstva hrane.<sup>26</sup> Osim voća, povrća i žitarica, pića poput voćnih sokova, čaja i vina su također važni izvori fenola u ljudskoj prehrani. Prehrambena industrija istražila je i njihov utjecaj na procese zrenja voća, sprječavanje aktivnosti enzima koji uzrokuju posmeđivanje tkiva i njihovu ulogu kao prehrambeni konzervansi u različitim vrstama namirnicama. Također, dokazano je da obrada i skladištenje samih namirnica ima utjecaji na fenolne spojeve u njima, a njihova uloga u oksidacijskim procesima u hrani dodatno čini analizu ovih spojeva još složenijom.<sup>6</sup>

## 1.6. Fenolne kiseline i ljudsko zdravlje

Potencijalne zdravstvene koristi koje proizlaze iz prehrane bogate fenolnim kiselinama ovise o njihovoj apsorpciji i metabolizmu.<sup>5</sup> Visok sadržaj antioksidansa u voću i povrću povezuje se sa sprječavanjem oksidacijskih oštećenja u samim stanicama, a time i na pojavu i razvoj različitih oboljenja. Određene namirnice su obzirom na visok sadržaj fenolnih spojeva klasificirane kao funkcionalna hrana, zahvaljujući dokazanim pozitivnim zdravstvenim učincima na ljudsko zdravlje.

Flavonoidi su najzastupljeniji fenoli u biljnoj hrani i čine oko dvije trećine od ukupnih biljnih fenola. Na fenolne kiseline otpada preostala trećina od ukupnih fenola te se zbog toga razvija sve veće zanimanje i za ove spojeve. Fenolne kiseline djeluju kao antikancerogena sredstva, stimulansi imunološkog sustava te reguliraju hormone metabolizma.<sup>27</sup>

Fenolne kiseline su dobro poznate po svojoj antioksidativnoj aktivnosti. Antioksidansi su specifični spojevi koji štite ljudske, životinjske i biljne stanice od štetnih učinaka slobodnih radikala i sprječavaju procese oksidacije. Neravnoteža između antioksidansa i slobodnih radikala rezultira oksidativnim poremećajem i stanjem koje se naziva *oksidativni stres* koje dovodi do staničnih oštećenja i razvoja bolesti kao što su kardiovaskularne bolest i različiti oblici raka.



Slobodni radikali su kemijske strukture koje imaju kratki vijek trajanja jer sadrže nesparene elektrone. Takva nepotpuna elektronska konfiguracija ih čini nestabilnima i izrazito reaktivnima. To im omogućuje da mogu donirati ili primiti elektron od drugih molekula, ponašajući se kao oksidansi ili reducensi. Tako novonastali slobodni radikal može ponovno reagirati sa drugim molekulama i time šteti staničnim strukturama.<sup>28</sup>

Tvari koje su prisutne u našem organizmu, od enzima do tvari koje normalno hranom uzimamo iz okoline imaju svojstva antioksidansa. Svi antioksidansi mogu se podijeliti na one koji čine prirodnu obranu organizma (enzimi, bjelančevine, vitamini i sl.) i one koje pretežno ili isključivo u organizam unosimo putem prehrane, odnosno tzv. farmakološke antioksidanse.<sup>29</sup>

Biljke su bogati izvori prehranbenih antioksidansa. Prirodni ili fitokemijski antioksidansi su obično sekundarni metaboliti u biljkama, a u ove spojeve ubrajamo fenolne kiseline, flavonoide, alkaloidne, karotenoide i ostale biljne pigmente, itd.,<sup>30</sup>

### 1.7. Antioksidacijska aktivnost fenolnih spojeva

Antioksidacijski kapacitet fenolnih spojeva predstavlja sposobnost gašenja radikala, doniranja atoma vodika ili elektrona, uz nastajanje manje reaktivnog fenoksil-radikala

Antioksidacijski kapacitet fenolnih spojeva ovisi o:

- položaju i broju –OH skupina u odnosu na –COOH funkcionalnu skupinu,
- mono-hidroksibenzojeve kiseline s –OH skupinom na *meta*-položaju u odnosu na karboksilnu skupinu pokazuju značajan antioksidacijski kapacitet,
- stupnju hidroksilacije spoja,
- supstituciji hidroksilnih grupa na 3- i 5- položaju s metoksilnim skupinama

Dokazano je da hidroksicimetne kiseline pokazuju veću antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s hidroksibenzojevim kiselinama čemu je razlog CH=CH-COOH skupina koja doprinosi većoj mogućnosti doniranja atoma vodika i time stabilizacije radikala, nego li –COOH skupina kod hidroksibenzojevih kiselina.<sup>5</sup>

S kemijske točke gledišta, molekule fenolnih kiselina, nakon što doniraju elektron ili atom vodika, same postaju slobodni radikali. Nastali radikali su manje aktivni, ali ukoliko je njihova koncentracija visoka mogu potencijalno izazvati pro-oksidacijske aktivnosti.<sup>9</sup>

### **1.8. Interakcijsko djelovanje fenolnih spojeva**

Općenito, svojstva fenolnih spojeva možemo podijeliti na: farmakološke učinke i nutritivna svojstva. Kod nutritivnih svojstava, najvažnije svojstvo je interakcija fenolnih spojeva s proteinima. Osim sa proteinima, fenolni spojevi mogu tvoriti komplekse i sa ugljikohidratima, a mogu se također naći u interakciji s mineralima i vitaminima i na taj način smanjuju njihovu dostupnost u organizmu.<sup>25</sup>

Moguća je također i interakcija između flavonoida i fenolnih kiselina s drugim fiziološkim antioksidansima. Ipak, kao i ostali antioksidansi, flavonoidi mogu djelovati i kao prooksidansi u posebnim okolnostima. Interakcija molekula niske molekulske mase, poput fenolnih kiselina i flavonoida, s makromolekulama može mijenjati njihova kemijsko-fizikalna svojstva. Različite studije potvrđuju sposobnost fenola da modeliraju pojedine enzime kao što su npr. hidrolaze, transferaze, kinaze, oksidaze itd.<sup>16</sup>

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Materijal

U eksperimentalnom dijelu ovog rada korišteni su standardi fenolnih kiselina navedenih u tablici 4. Početne otopine fenolnih spojeva pripravljene su pri molarnoj koncentraciji 1000  $\mu\text{M}$  te su dalje korištene za pripravu nižih razrijeđena te fenolnih smjesa. Sve korištene otopine su do provođenja analiza čuvane u hladnjaku pri temperaturi  $+4^{\circ}\text{C}$ .

*Tablica 4.* Odabrane fenolne kiseline.

Učestali naziv kiseline	IUPAC naziv kiseline
Protokatehinska	3,4-dihidroksi benzojeva kiselina
Vanilinska	4-hidroksi-3-metoksi benzojeva kiselina
Gentisinska	2,4-dihidroksi benzojeva kiselina
Siriginska	4-hidroksi-3,5-dimetoksi benzojeva kiselina
Galna	3,4,5-trihidroksi benzojeva kiselina

### 2.2. Standardi, kemikalije i reagensi

- 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina,  $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$ ,  $M_r=154,00$  g/mol (*Sigma, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Njemačka*);
- 4-hidroksi-3-metoksibenzojeva kiselina,  $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$ ,  $M_r=168,15$  g/mol (*Fluka, Buchs, Njemačka*);
- gentisinska kiselina hidrat, natrijeva sol,  $\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ,  $M_r=176,10$  g/mol (*Sigma, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Njemačka*);
- 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzojeva kiselina,  $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_5$ ,  $M_r=198,17$  g/mol, 98% čistoće (*Sigma, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Njemačka*);
- galna kiselina,  $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ ,  $M_r=170,12$  g/mol,  $\geq 98\%$  HPLC čistoće (*Fluka, Buchs, Njemačka*);

- etanol, p.a.,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  (*Kemika, Zagreb, Hrvatska*);
- troloks (*Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka*)
- željezo (III) klorid heksahidrat,  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  (*Kemika, Zagreb, Hrvatska*);
- klorovodična kiselina, p.a.,  $\text{HCl}$  (*Panreac, Barcelona, Španjolska*);
- natrijev acetat,  $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$  (*Alkaloid AD-Skopje, Skopje, Makedonija*);
- glacijalna octena kiselina,  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$  (*Alkaloid AD-Skopje, Skopje, Makedonija*);
- TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin),  $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_6$  (*Fluka, Sigma-Aldrich, Njemačka*)

### 2.3. Priprava otopina fenolnih kiselina i ekvimolarnih fenolnih smjesa

Za ispitivanje antioksidacijskih svojstava, pripravljene su početne otopine svake fenolne kiseline u koncentraciji od  $1000 \mu\text{M}$ . 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 potom razrijeđena na niže koncentracije:  $100$  i  $500 \mu\text{M}$ .

Za pripravu ekvimolarnih fenolnih smjesa korištene su pripravljene otopine na način da pomiješani jednaki volumeni otopina (iste koncentracije) dvaju ili više fenolnih spojeva. Pregled svih fenolnih smjesa korištenih u ovom istraživanju prikazan je u tablici 5.

**Tablica 5.** Istraživane smjese fenolnih kiselina

Molarni omjer	Fenolne smjese
<b>1:1</b>	Vanilinska+Galna
	Vanilinska+Protokatehinska
	Vanilinska+Siriginska
	Vanilinska+Gentisinska
	Galna+Protokatehinska
	Galna+Siriginska
	Galna+Gentisinska
	Protokatehinska+Siriginska
	Protokatehinska+Gentisinska
	Siriginska+Gentisinska
<b>1:1:1</b>	Vanilinska+Galna+Protokatehinska
	Vanilinska+Galna+Siriginska
	Vanilinska+Galna+Gentisinska
	Vanilinska+Protokatehinska+Siriginska
	Vanilinska+Gentisinska+Siriginska
	Vanilinska+Protokatehinska+Gentisinska
	Protokatehinska+Siriginska+Gentisinska
	Protokatehinska+Siriginska+Galna
	Galna+Gentisinska+ Protokatehinska
	Siriginska+Gentisinska+Galna
<b>1:1:1:1</b>	Vanilinska+Galna+Protokatehinska+Siriginska
	Vanilinska+Galna+Gentisinska+Siriginska
	Vanilinska+ Gentisinska+Protokatehinska+Siriginska
	Vanilinska+Gentisinska+Galna+Protokatehinska
	Protokatehinska +Siriginska+Galna+Gentisinska
<b>1:1:1:1:1</b>	Vanilinska+Galna+Protokatehinska+Siriginska+Gentisinska

## 2.4. Metode određivanja antioksidacijskih svojstava

### 2.4.1. FRAP metoda

Antioksidacijska svojstva odabranih fenolnih spojeva i ekvimolarnih fenolnih smjesa određena su metodom FRAP (engl. *Ferric Reducing/Antioxidant Power*). Ova metoda se danas učestalo koristi u testiranju antioksidacijskih svojstava biljnih ekstrakata, čistih spojeva ili njihovih smjesa.<sup>31</sup> Prvotno su metodu razvili Benzie i Strain (1996)<sup>33</sup> kako bi odredili redukcijsku snagu plazme. U ovom radu za mjerenja su rađena na spektrofotometru Tecan MicroPlates Reader, model Sunrise (Tecan Group Ltd., Mannedorf, Švicarska).

Metoda FRAP se temelji na redukciji  $\text{Fe}^{3+}$  iona u  $\text{Fe}^{2+}$  ion u prisutnosti antioksidansa. Nastali  $\text{Fe}^{2+}$  ion u prisutnosti TPZT reagensa formira intenzivno plavo obojeni kompleks koji pokazuje maksimum apsorpcije pri 592 nm. Brzina te reakcije ovisi o redukcijskoj snazi i koncentraciji dodanog antioksidansa.<sup>32</sup>

### Reagensi

- *acetatni pufer*,  $c(\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}) = 300 \text{ mmol/L}$ ; pH 3,6: 3,1 g natrijevog acetata i 16 mL glacijalne octene kiseline miješa se s vodom do volumena 1 litre;
- *otopina klorovodične kiseline*,  $c(\text{HCl}) = 40 \text{ mmol/L}$ : 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*,  $c(\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_6) = 10 \text{ mmol/L}$ : 159,4 mg TPTZ se otopi u 50 mL 40 mmol/L otopine klorovodične kiseline;
- *otopina  $\text{FeCl}_3$* ,  $c(\text{Fe}^{3+}) = 20 \text{ mmol/L}$ : 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 TPTZ reagensa i 2,5 ml otopine  $\text{FeCl}_3$ .

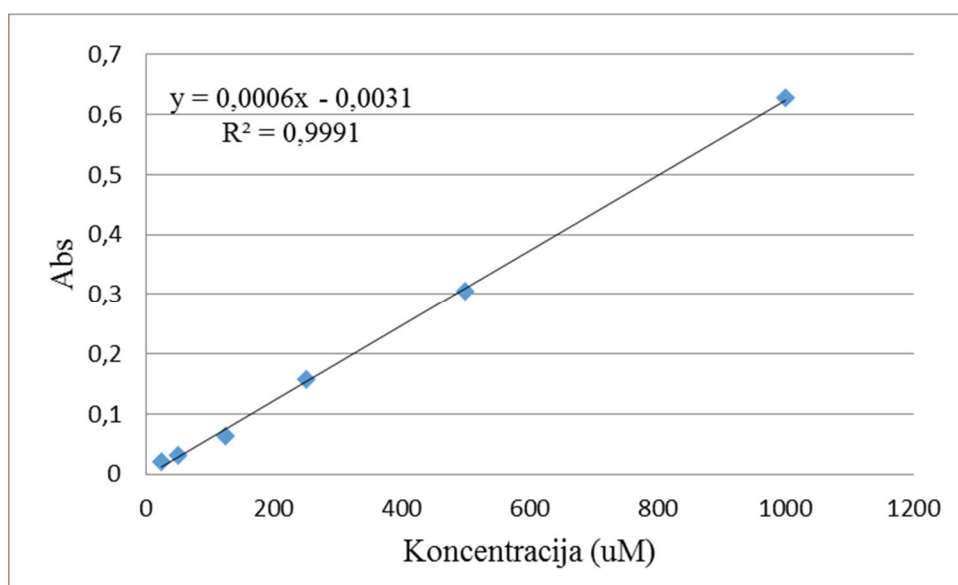
## ***Postupak***

Prema opisanom postupku pripravlja se FRAP reagens koji se pipetira u otvore mikrotitarske pločice (300  $\mu\text{L}$ ) te mu se očita absorbancija pri 592 nm. Potom se u reagens doda uzorak, otopina fenolne kiseline ili smjesa fenolnih kiselina (10  $\mu\text{L}$ ), sve se pomiješa te se reakcijskoj smjesi mjeri absorbancije nakon 4 minute.

Testirani su svi navedeni uzorci, i to u koncentracijama od 100, 500 i 1000  $\mu\text{M}$ . Promjena absorbancije je računata kao razlika između konačne vrijednosti absorbancije reakcijske smjese nakon 4 minute i absorbancije FRAP reagensa prije nego li se dodao uzorak. Promjena absorbancije reakcijske smjese s uzorkom je uspoređena s vrijednostima dobivenim za otopinu standarda,<sup>33</sup> a kao standard je korištena vodena otopina željezo sulfata. Sva mjerenja urađena su u 6 ponavljanja

## ***Izrada baždarnog pravca***

Za izradu baždarnog pravca korištena je otopina standarda,  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , poznatih koncentracija u rasponu od 100-1000  $\mu\text{M}$ . Pripravljene otopine standarda testirane su prema opisanom postupku. Dobiveni podaci korišteni su za izradu baždarnog pravca i računanje jednadžbe pravaca (slika 8).



**Slika 8.** Ovisnost absorbancije o koncentracije Fe(III) u FRAP reakcijskoj smjesi

### 2.4.2. *Određivanje interakcijskog djelovanja*

Interakcija između testiranih smjesa fenolnih spojeva, određena FRAP metodom, opisana je kao razlika u antioksidacijskoj aktivnosti određenoj metodom FRAP i izračunata je preko jednadžbe:<sup>3</sup>

$$\text{Razlika (\%)} = [\text{Eksperimentalni FRAP} \times 100 / \text{Teorijski FRAP}] - 100$$

gdje je:

Eksperimentalni FRAP– eksperimentalno dobiven rezultat za testiranu smjesu dvaju ili više fenolna spoja.

Teorijski FRAP– vrijednost za smjese dobivena računskim zbrajanjem FRAP vrijednosti pojedinačnih spojeva smjese te podijeljena sa brojem spojeva koje smjesa sadrži.

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

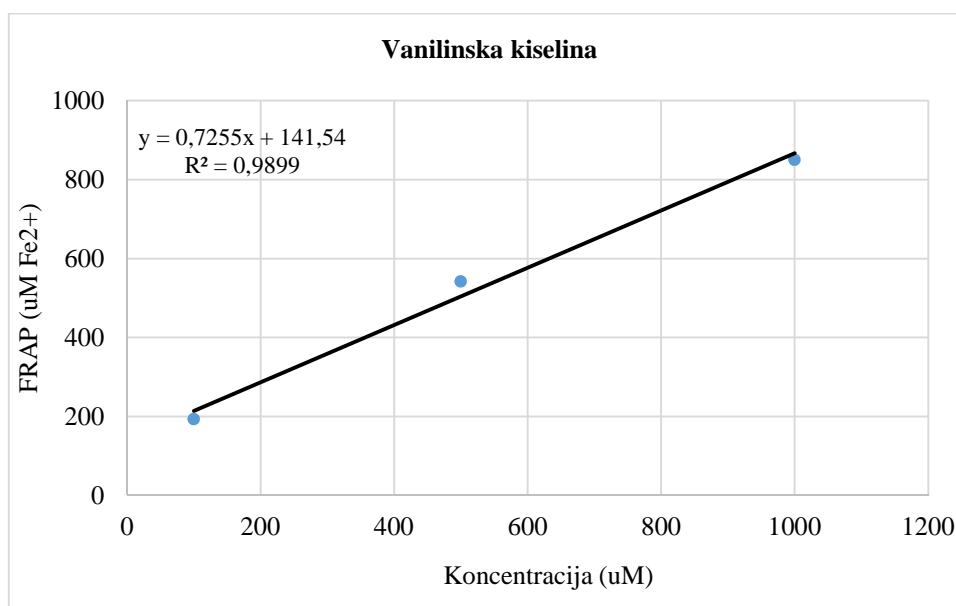


### 3. REZULTATI

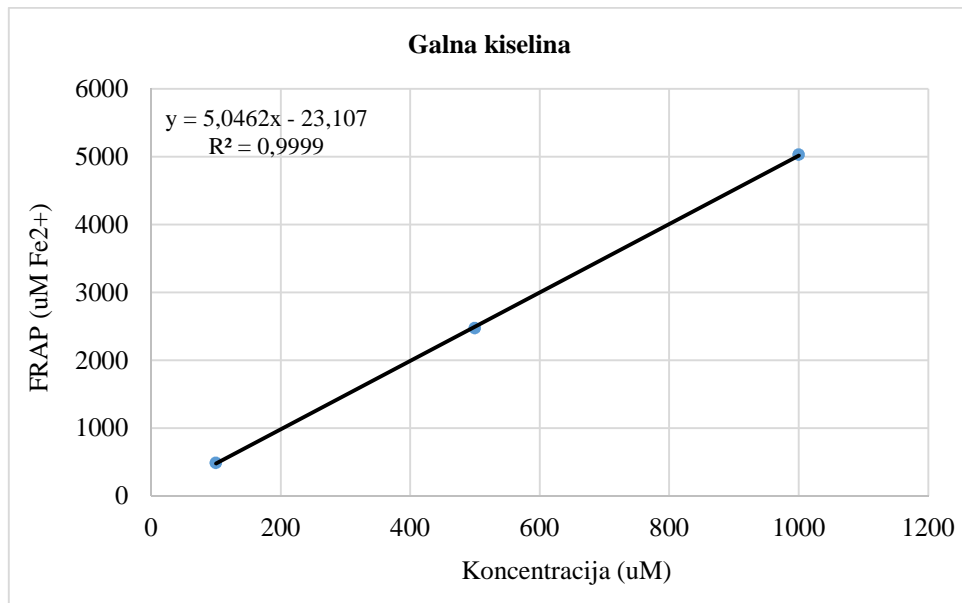
#### 3.1. Redukcijska aktivnost otopina fenolnih kiselina

**Tablica 6.** Vrijednosti FRAP za otopine istraživanih fenolnih kiselina pri različitim koncentracijama

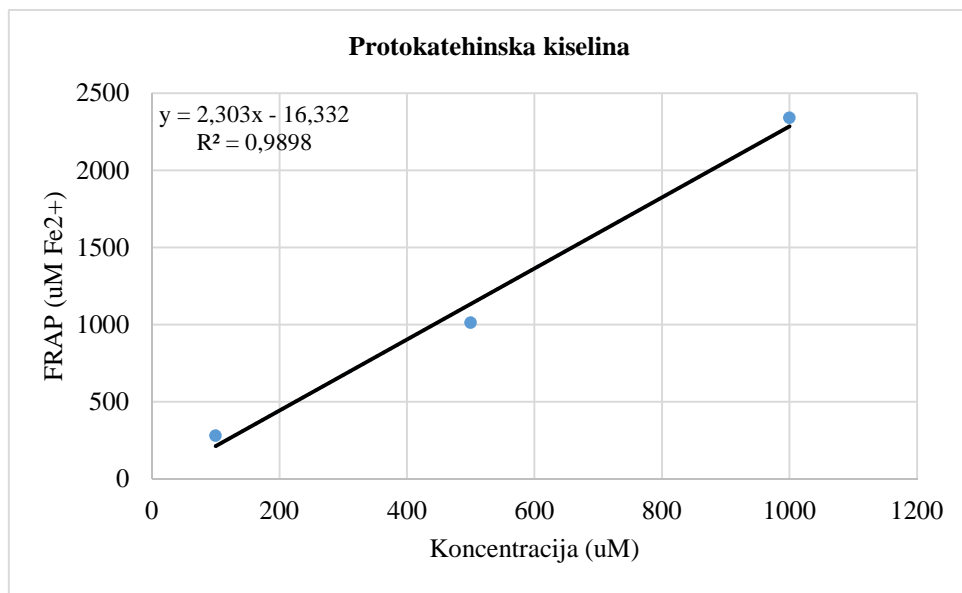
Fenolna kiselina	FRAP vrijednost ( $\mu\text{M Fe}^{2+}$ )		
	Konc. 100 $\mu\text{M}$	Konc. 500 $\mu\text{M}$	Konc. 1000 $\mu\text{M}$
Vanilinska	192,94 $\pm$ 1,92	542,39 $\pm$ 4,19	850,17 $\pm$ 13,02
Galna	493,78 $\pm$ 2,55	2477,94 $\pm$ 16,78	5032,94 $\pm$ 106,18
Protokatehinska	281,56 $\pm$ 4,81	1013,50 $\pm$ 14,24	2340,72 $\pm$ 32,03
Siriginska	245,31 $\pm$ 5,09	1513,50 $\pm$ 19,22	3207,39 $\pm$ 110,86
Gentisinska	293,78 $\pm$ 3,47	1710,44 $\pm$ 81,42	3185,72 $\pm$ 103,62



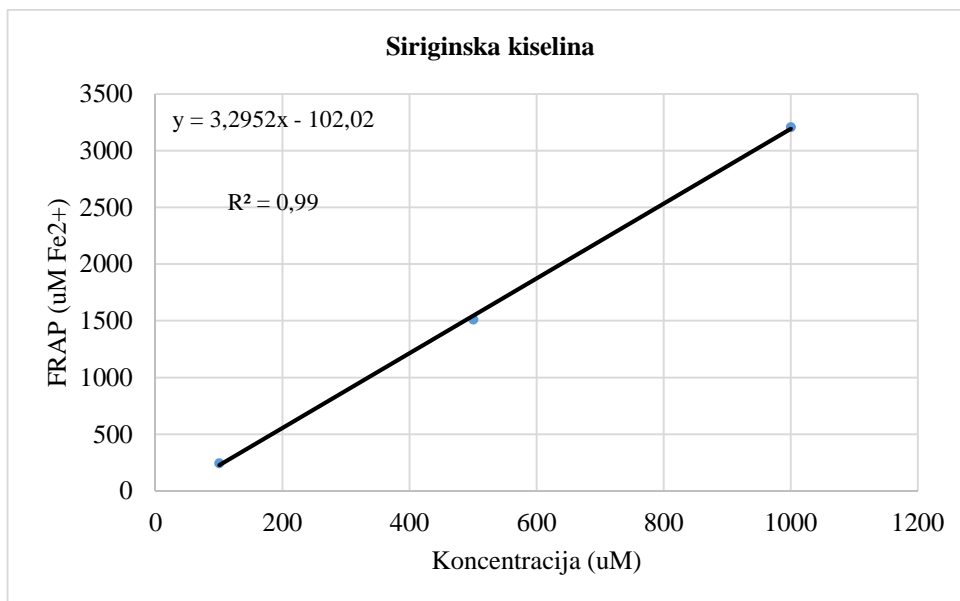
**Slika 9.** Grafički prikaz ovisnosti FRAP vrijednosti o koncentraciji vanilinske kiseline



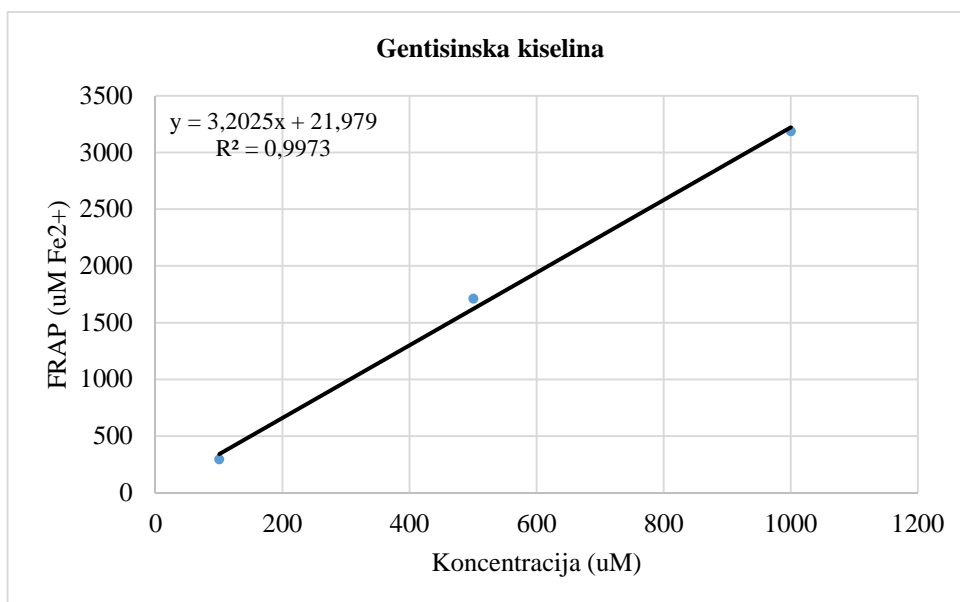
**Slika 10.** Grafički prikaz ovisnosti FRAP vrijednosti o koncentraciji galne kiseline



**Slika 11.** Grafički prikaz ovisnosti FRAP vrijednosti o koncentraciji protokatehinske kiseline



**Slika 12.** Grafički prikaz ovisnosti FRAP vrijednosti o koncentraciji siriginske kiseline

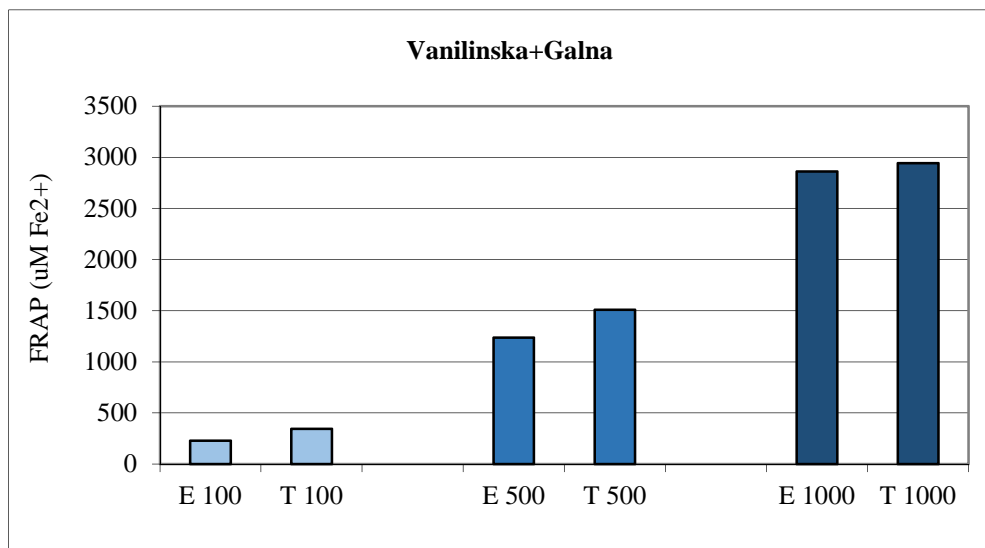


**Slika 13.** Grafički prikaz ovisnosti FRAP vrijednosti o koncentraciji gentisinske kiseline

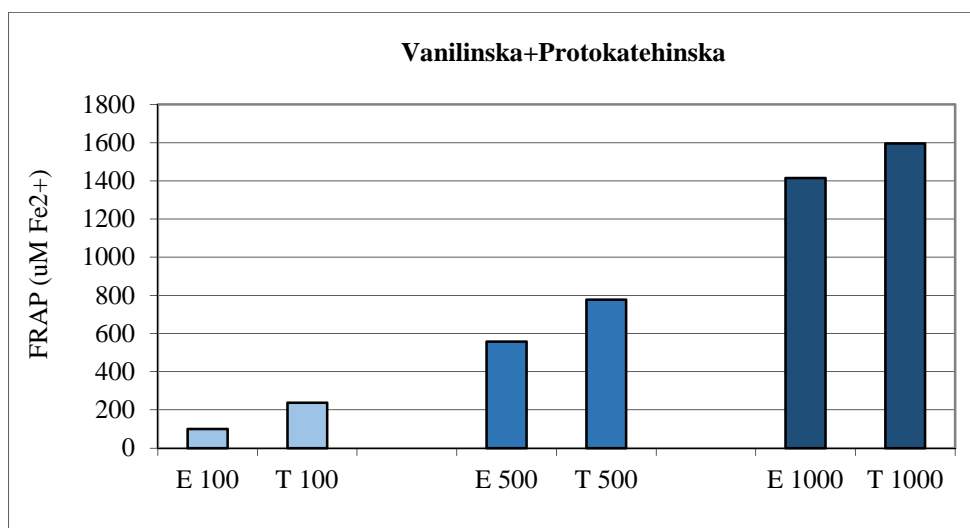
### 3.2. Redukcijska aktivnost ekvimolarnih smjesa dvije fenolne kiseline

**Tablica 7.** Vrijednosti FRAP za otopine istraživanih ekvimolarnih smjesa dviju fenolnih kiselina pri različitim koncentracijama

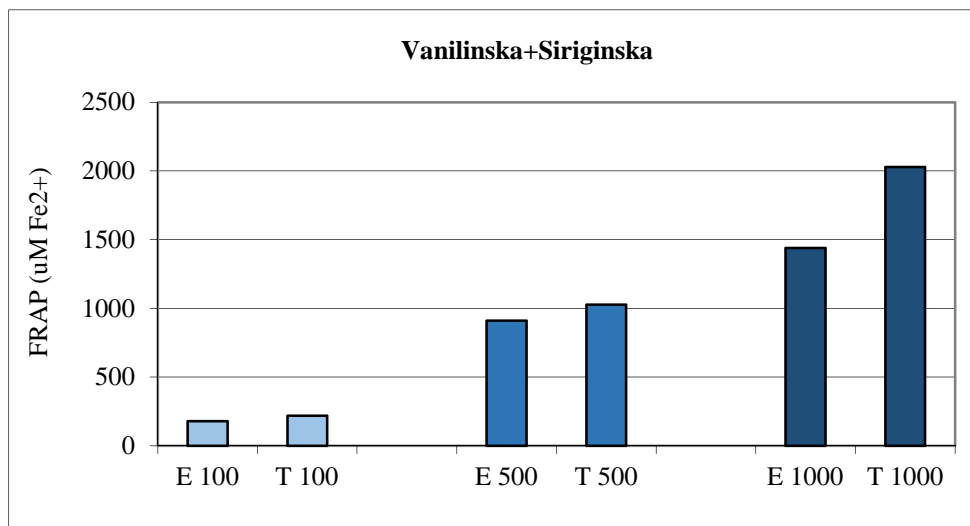
Smjesa fenolnih kiselina	FRAP vrijednost ( $\mu\text{M Fe}^{2+}$ )		
	Konc. 100 $\mu\text{M}$	Konc. 500 $\mu\text{M}$	Konc. 1000 $\mu\text{M}$
Vanilinska+Galna	229,06 $\pm$ 5,09	1236,83 $\pm$ 23,15	2860,71 $\pm$ 15,03
Vanilinska+Protokatehinska	100,72 $\pm$ 2,55	558,50 $\pm$ 2,89	1414,06 $\pm$ 7,88
Vanilinska+Siriginska	178,50 $\pm$ 0,00	909,61 $\pm$ 5,09	1440,17 $\pm$ 23,15
Vanilinska+Gentisinska	310,72 $\pm$ 2,55	825,17 $\pm$ 10,41	1440,17 $\pm$ 23,15
Galna+Protokatehinska	349,06 $\pm$ 6,74	2181,28 $\pm$ 16,19	3622,94 $\pm$ 6,74
Galna+Siriginska	275,17 $\pm$ 1,67	1813,50 $\pm$ 36,09	3599,06 $\pm$ 12,29
Galna+Gentisinska	546,28 $\pm$ 5,09	2034,06 $\pm$ 18,73	3936,83 $\pm$ 8,66
Protokatehinska+Siriginska	274,06 $\pm$ 5,09	1280,17 $\pm$ 18,93	2705,17 $\pm$ 10,14
Protokatehinska+Gentisinska	517,94 $\pm$ 1,92	1320,17 $\pm$ 14,53	2832,39 $\pm$ 22,38
Siriginska+Gentisinska	407,94 $\pm$ 2,55	2539,06 $\pm$ 3,47	2973,50 $\pm$ 2,89



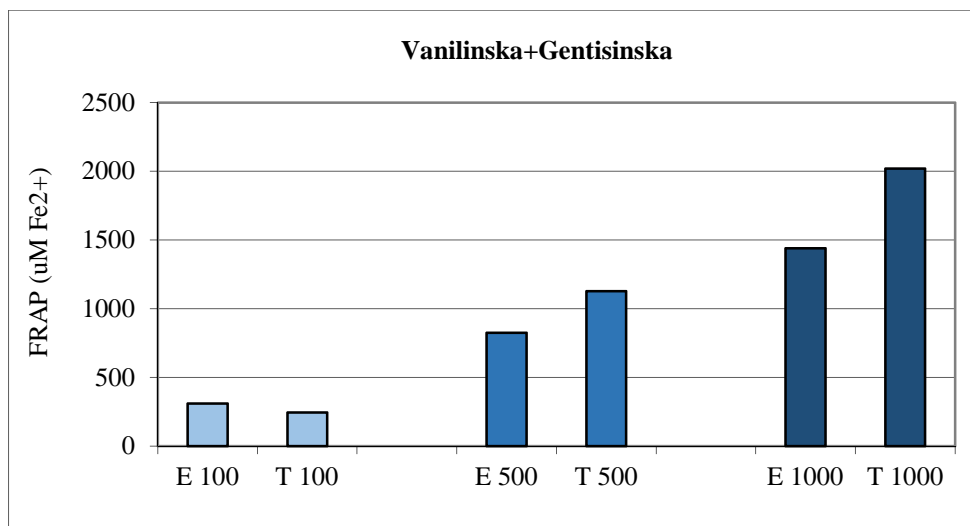
**Slika 14.** Usporedba eksperimentalne (E) i teoretske vrijednosti (T) FRAP za ekvimolarne smjese vanilinske i galne kiseline pri različitim koncentracijama (100, 500 i 1000 µM)



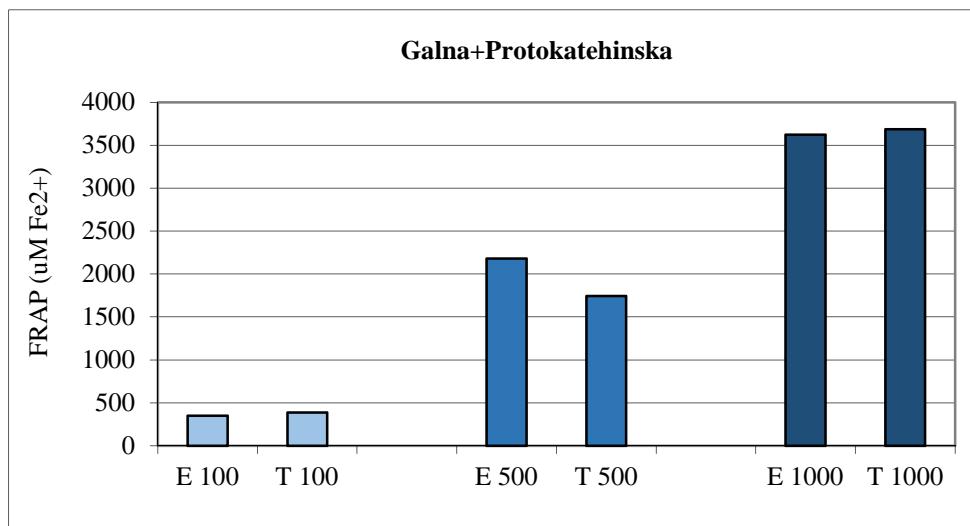
**Slika 15.** Usporedba eksperimentalne (E) i teoretske vrijednosti (T) FRAP za ekvimolarne smjese vanilinske i protokatehinske kiseline pri različitim koncentracijama (100, 500 i 1000 µM)



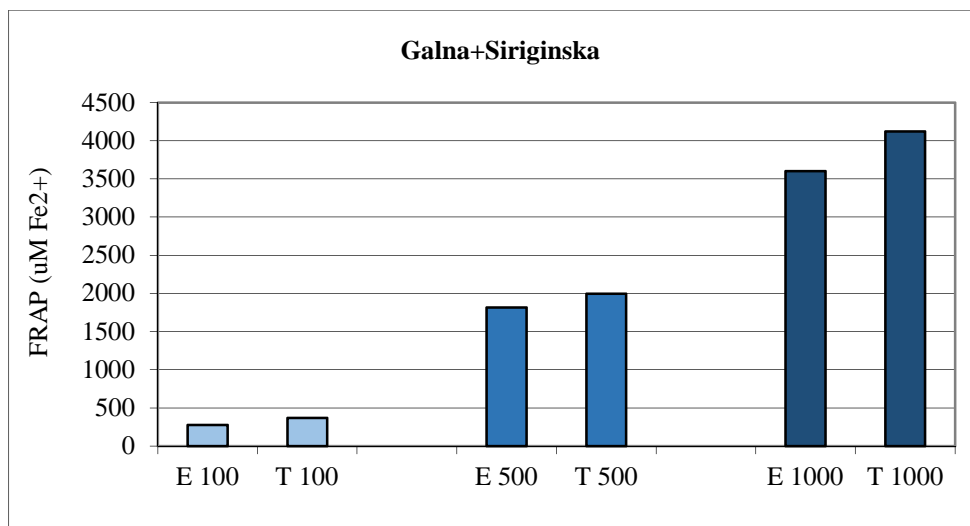
**Slika 16.** Usporedba eksperimentalne (E) i teoretske vrijednosti (T) FRAP za ekvimolarne smjese vanilinske i siriginske kiseline pri različitim koncentracijama (100, 500 i 1000 µM)



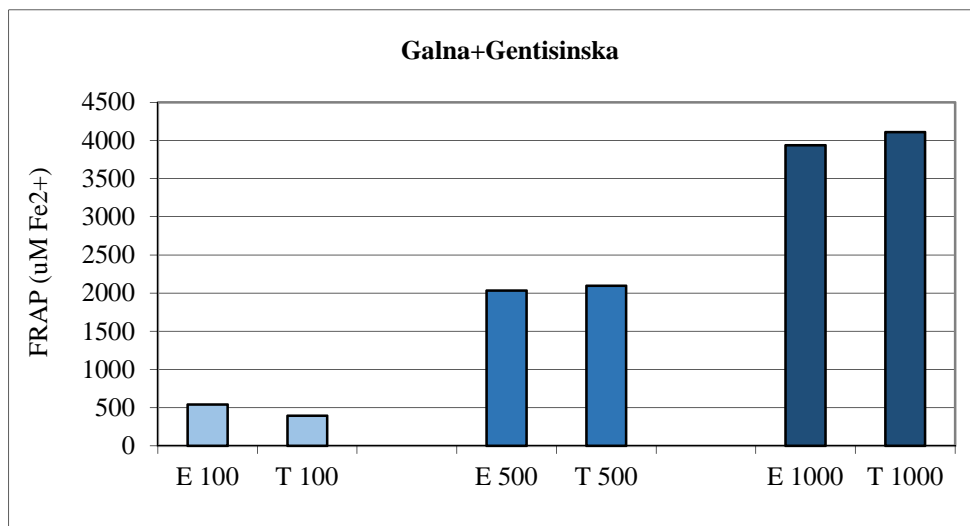
**Slika 17.** Usporedba eksperimentalne (E) i teoretske vrijednosti (T) FRAP za ekvimolarne smjese vanilinske i gentisinske kiseline pri različitim koncentracijama (100, 500 i 1000 µM)



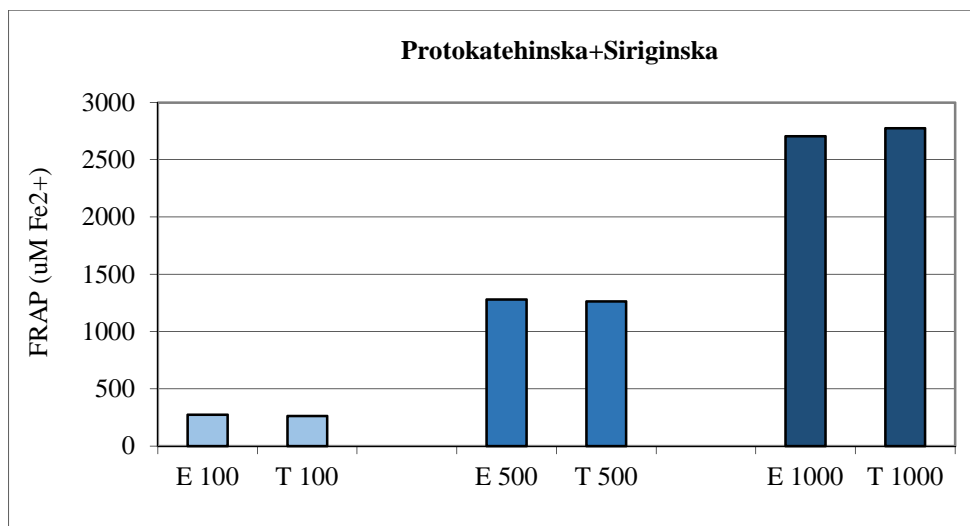
**Slika 18.** Usporedba eksperimentalne (E) i teoretske vrijednosti (T) FRAP za ekvimolarne smjese galne i protokatehinske kiseline pri različitim koncentracijama (100, 500 i 1000 μM)



**Slika 19.** Usporedba eksperimentalne (E) i teoretske vrijednosti (T) FRAP za ekvimolarne smjese galne i siriginske kiseline pri različitim koncentracijama (100, 500 i 1000 μM)

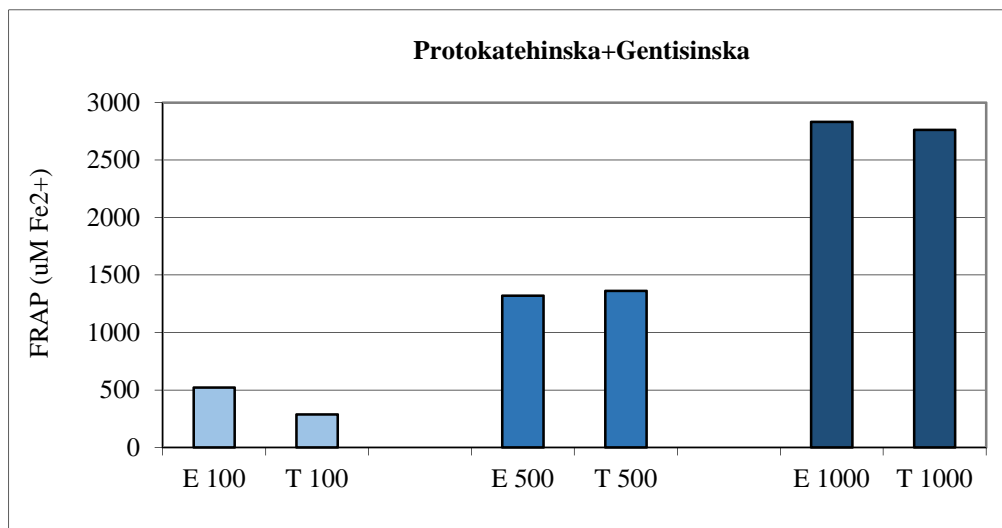


**Slika 20.** Usporedba eksperimentalne (E) i teoretske vrijednosti (T) FRAP za ekvimolarne smjese galne i gentisinske kiseline pri različitim koncentracijama (100, 500 i 1000  $\mu\text{M}$ )

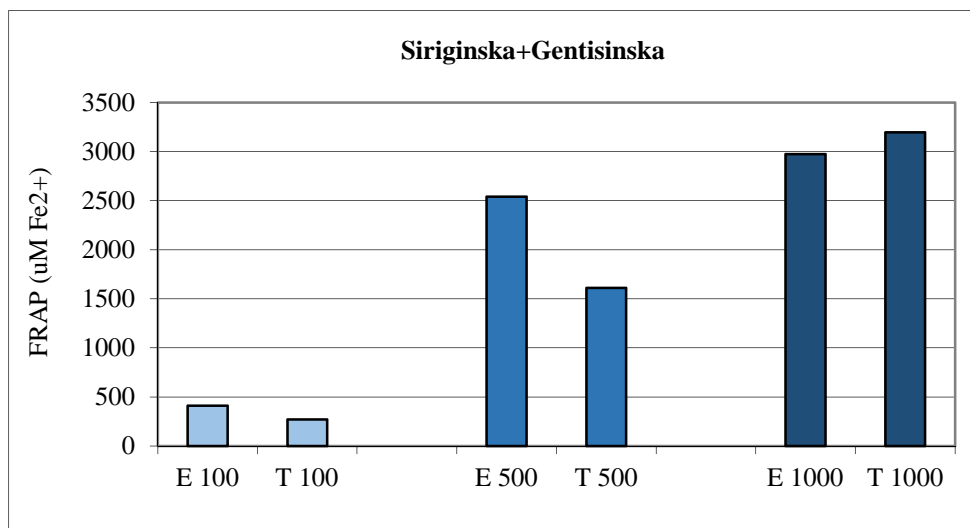


**Slika 21.** Usporedba eksperimentalne (E) i teoretske vrijednosti (T) FRAP za ekvimolarne smjese protokatehinske i siriginske kiseline pri različitim koncentracijama (100, 500 i 1000  $\mu\text{M}$ )





**Slika 22.** Usporedba eksperimentalne (E) i teoretske vrijednosti (T) FRAP za ekvimolarne smjese protokatehinske i gentisinske kiseline pri različitim koncentracijama (100, 500 i 1000 μM)

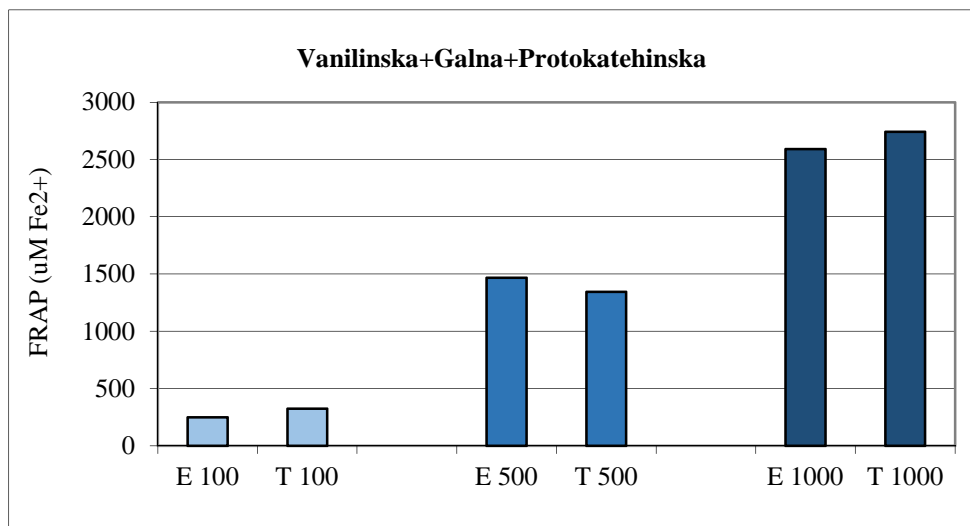


**Slika 23.** Usporedba eksperimentalne (E) i teoretske vrijednosti (T) FRAP za ekvimolarne smjese siriginske i gentisinske kiseline pri različitim koncentracijama (100, 500 i 1000 μM)

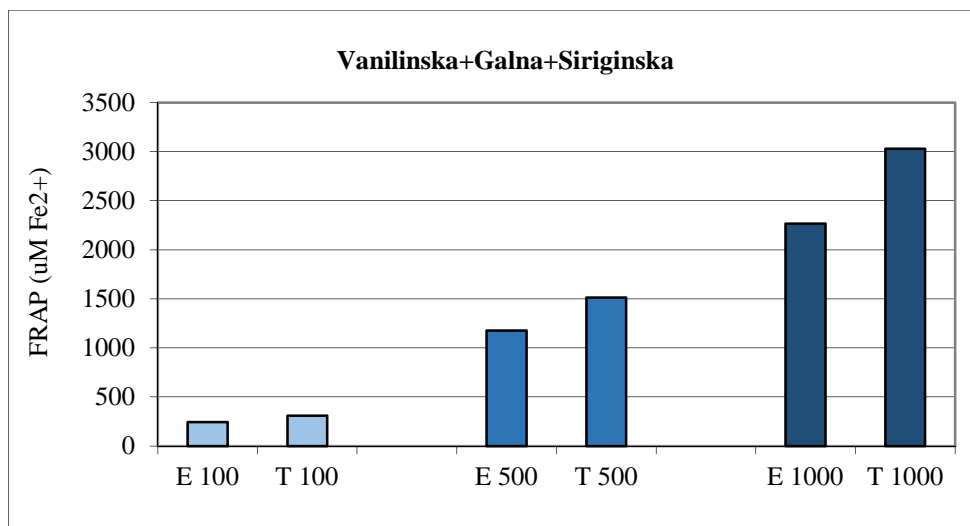
### 3.3. Redukcijska aktivnost ekvimolarnih smjesa tri fenolne kiseline

**Tablica 8.** Vrijednosti FRAP za otopine istraživanih ekvimolarnih smjesa tri fenolne kiseline pri različitim koncentracijama

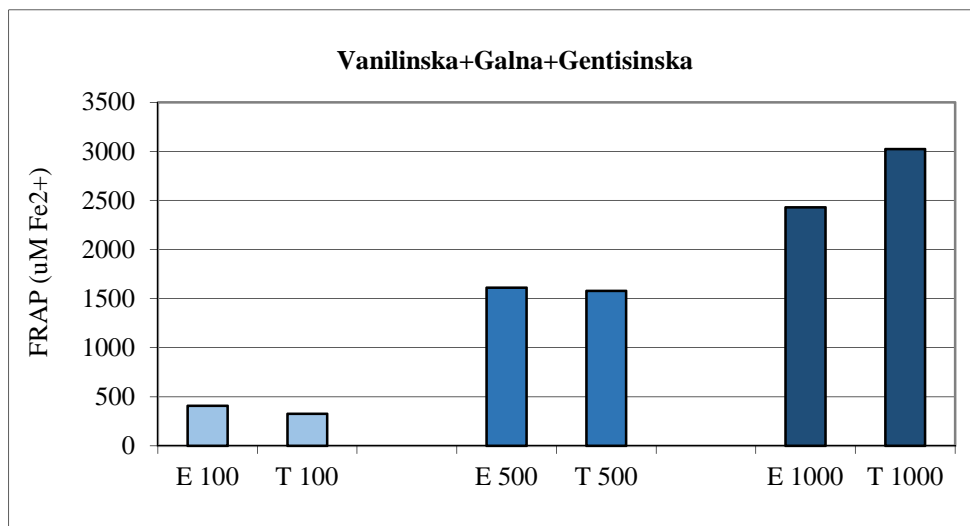
Smjesa fenolnih kiselina	FRAP vrijednost ( $\mu\text{M Fe}^{2+}$ )		
	Konc. 100 $\mu\text{M}$	Konc. 500 $\mu\text{M}$	Konc. 1000 $\mu\text{M}$
Vanilinska+Galna+Protokatehinska	247,92 $\pm$ 0,96	1467,94 $\pm$ 15,12	2590,72 $\pm$ 8,22
Vanilinska+Galna+Siriginska	244,61 $\pm$ 3,47	1176,83 $\pm$ 5,77	2264,61 $\pm$ 21,10
Vanilinska+Galna+Gentisinska	409,06 $\pm$ 2,55	1611,28 $\pm$ 7,70	2430,17 $\pm$ 7,64
Vanilinska+Protokatehinska+Siriginska	209,61 $\pm$ 1,92	946,83 $\pm$ 3,33	1785,72 $\pm$ 41,11
Vanilinska+Gentisinska+Siriginska	334,06 $\pm$ 3,47	1023,5 $\pm$ 5,77	2014,06 $\pm$ 6,94
Vanilinska+Protokatehinska+Gentisinska	315,17 $\pm$ 2,89	1337,39 $\pm$ 2,56	1870,72 $\pm$ 4,81
Protokatehinska+Siriginska+Gentisinska	747,94 $\pm$ 0,96	1509,06 $\pm$ 12,95	2880,72 $\pm$ 7,52
Protokatehinska+Siriginska+Galna	349,06 $\pm$ 6,30	1615,72 $\pm$ 8,39	2740,72 $\pm$ 50,15
Galna+Gentisinska+ Protokatehinska	165,72 $\pm$ 0,96	2198,50 $\pm$ 28,43	3810,72 $\pm$ 6,31
Siriginska+Gentisinska+Galna	516,28 $\pm$ 2,55	1822,39 $\pm$ 11,71	3294,06 $\pm$ 47,15



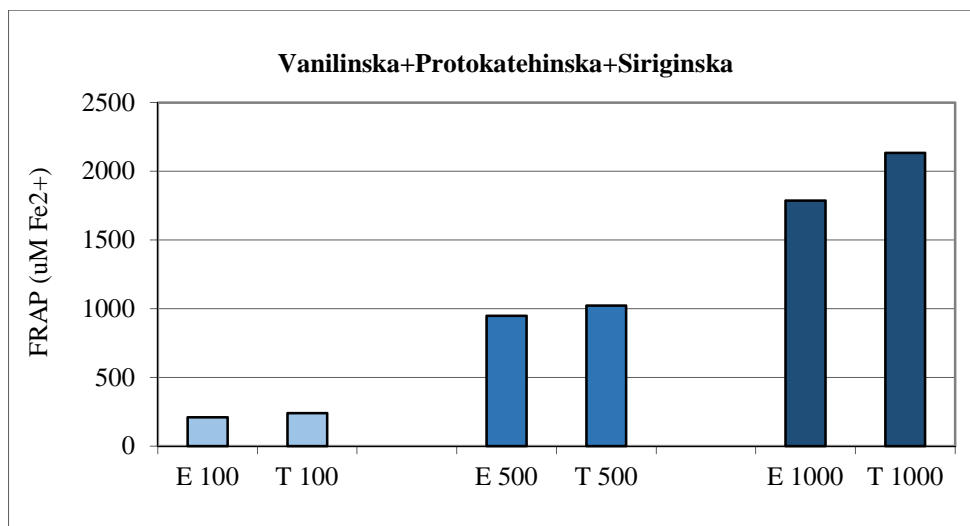
**Slika 24.** Usporedba eksperimentalne (E) i teoretske vrijednosti (T) FRAP za ekvimolarne smjese vanilinske, galne i protokatehinske kiseline pri različitim koncentracijama (100, 500 i 1000 µM)



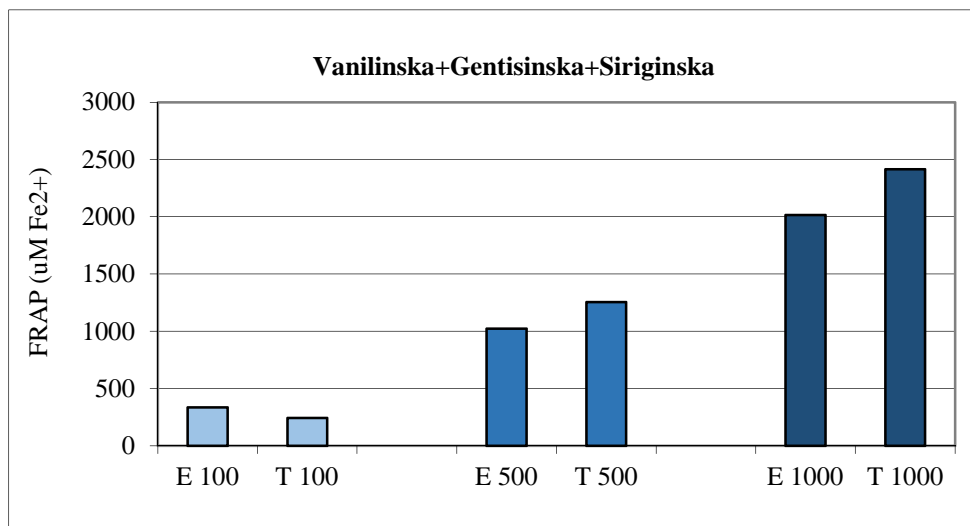
**Slika 25.** Usporedba eksperimentalne (E) i teoretske vrijednosti (T) FRAP za ekvimolarne smjese vanilinske, galne i siriginske kiseline pri različitim koncentracijama (100, 500 i 1000 µM)



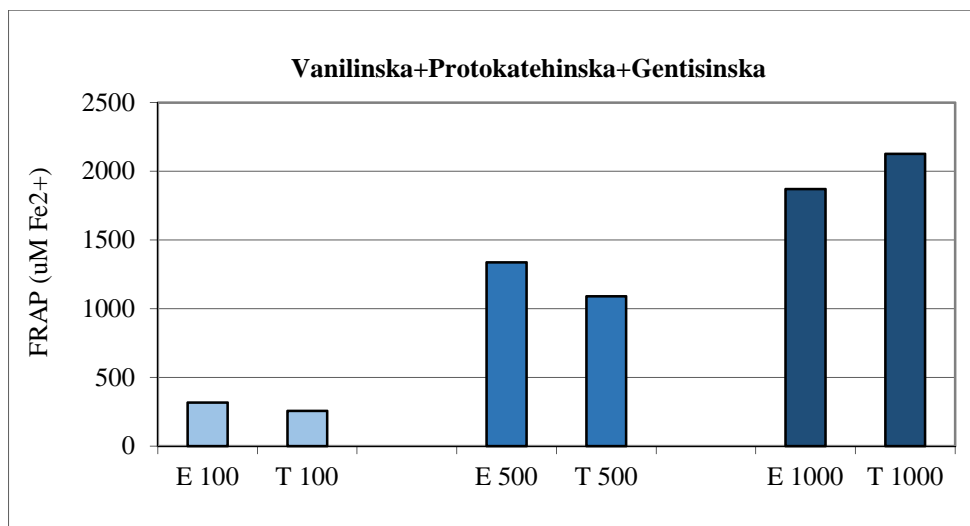
**Slika 26.** Usporedba eksperimentalne (E) i teoretske vrijednosti (T) FRAP za ekvimolarne smjese vanilinske, galne i gentisinske kiseline pri različitim koncentracijama (100, 500 i 1000 µM)



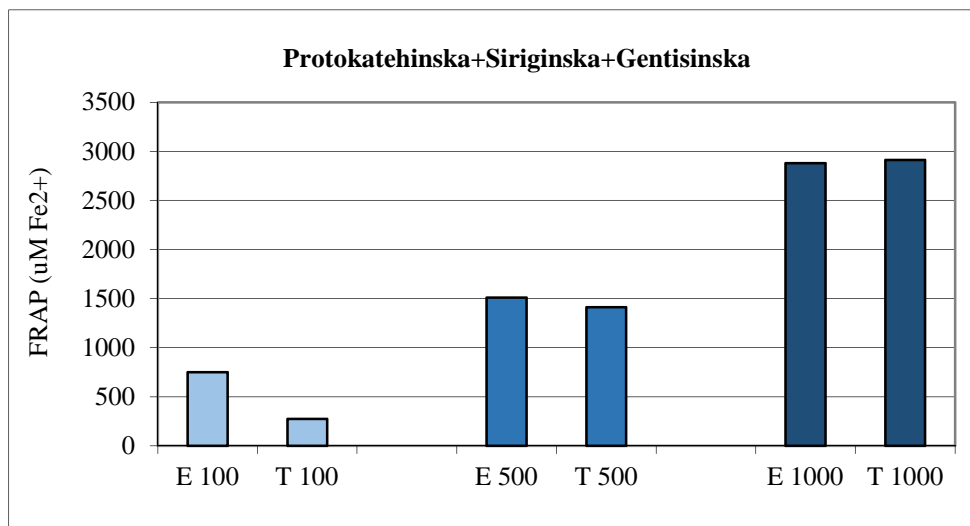
**Slika 27.** Usporedba eksperimentalne (E) i teoretske vrijednosti (T) FRAP za ekvimolarne smjese vanilinske, protokatehinske i siriginske kiseline pri različitim koncentracijama (100, 500 i 1000 µM)



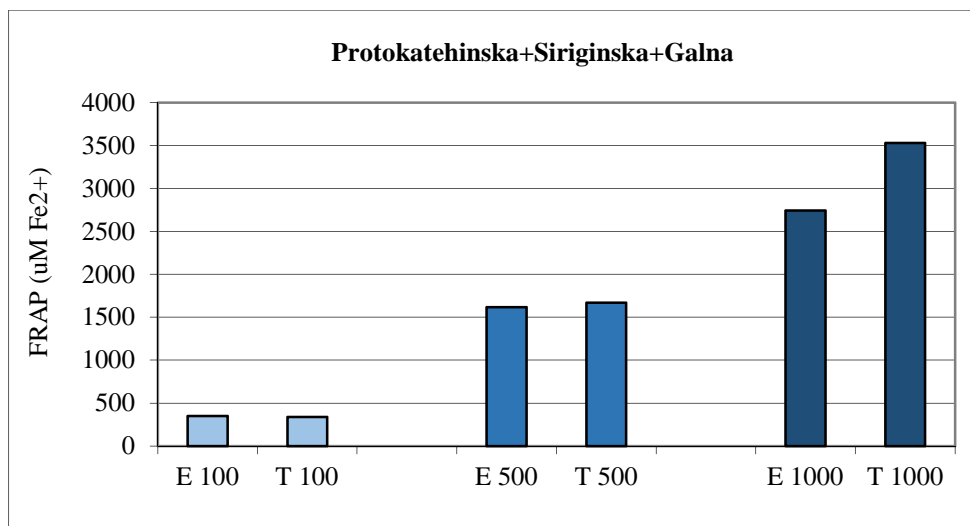
**Slika 28.** Usporedba eksperimentalne (E) i teoretske vrijednosti (T) FRAP za ekvimolarne smjese vanilinske, gentisinske i siriginske kiseline pri različitim koncentracijama (100, 500 i 1000 μM)



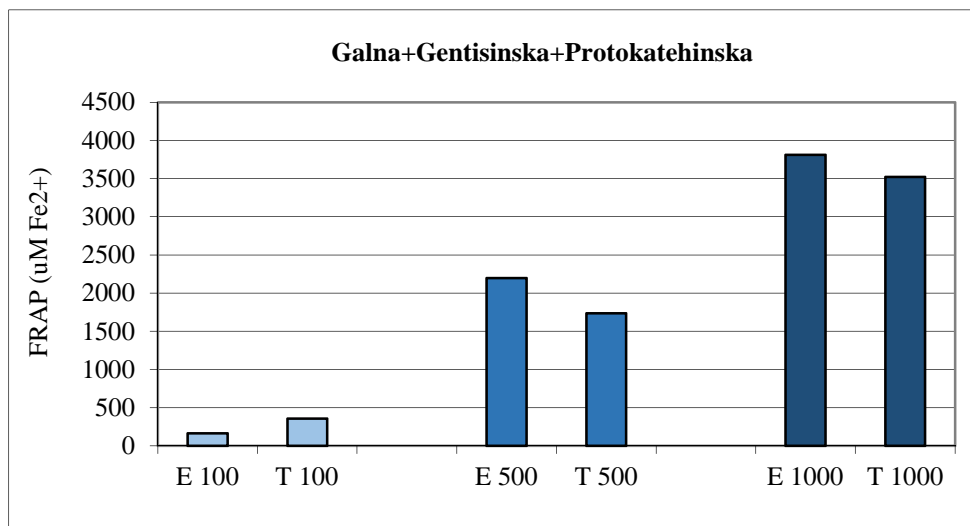
**Slika 29.** Usporedba eksperimentalne (E) i teoretske vrijednosti (T) FRAP za ekvimolarne smjese vanilinske, protokatehinske i gentisinske kiseline pri različitim koncentracijama (100, 500 i 1000 μM)



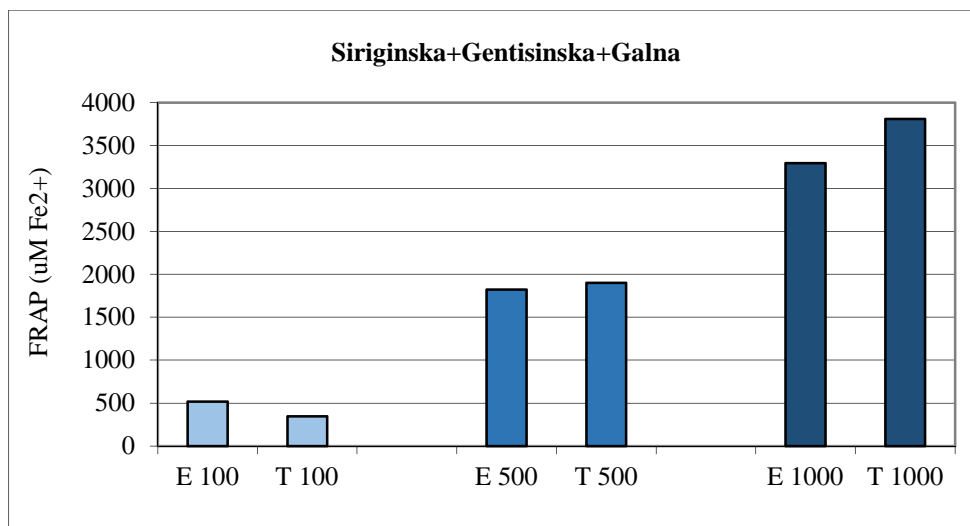
**Slika 30.** Usporedba eksperimentalne (E) i teoretske vrijednosti (T) FRAP za ekvimolarne smjese protokatehinske, siriginske i gentisinske kiseline pri različitim koncentracijama (100, 500 i 1000 μM)



**Slika 31.** Usporedba eksperimentalne (E) i teoretske vrijednosti (T) FRAP za ekvimolarne smjese protokatehinske, siriginske i galne kiseline pri različitim koncentracijama (100, 500 i 1000 μM)



**Slika 32.** Usporedba eksperimentalne (E) i teoretske vrijednosti (T) FRAP za ekvimolarne smjese galne, gentisinske i protokatehinske kiseline pri različitim koncentracijama (100, 500 i 1000 μM)

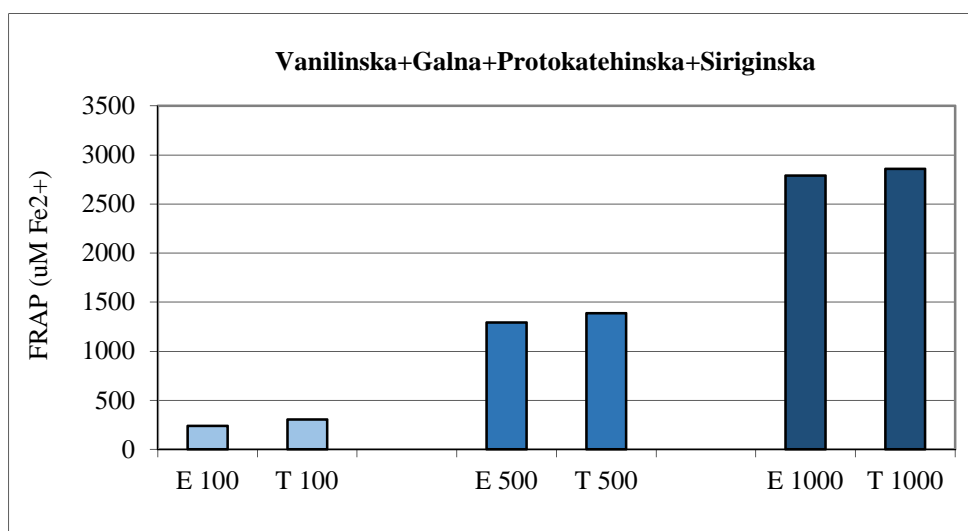


**Slika 33.** Usporedba eksperimentalne (E) i teoretske vrijednosti (T) FRAP za ekvimolarne smjese siriginske, gentisinske i galne kiseline pri različitim koncentracijama (100, 500 i 1000 μM)

### 3.4. Redukcijska aktivnost ekvimolarnih smjesa četiri fenolne kiseline

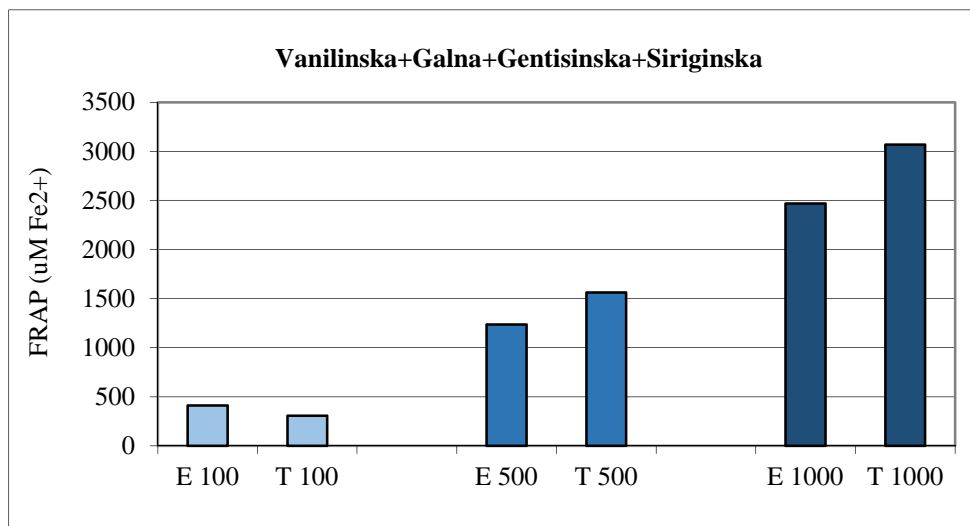
**Tablica 9.** Vrijednosti FRAP za otopine istraživanih ekvimolarnih smjesa četiri fenolne kiseline pri različitim koncentracijama

Smjesa fenolnih kiselina	FRAP vrijednost ( $\mu\text{M Fe}^{2+}$ )		
	Konc. 100 $\mu\text{M}$	Konc. 500 $\mu\text{M}$	Konc. 1000 $\mu\text{M}$
Vanilinska+Galna+Protokatehinska+Siriginska	235,50 $\pm$ 0,00	1291,28 $\pm$ 30,80	2788,5 $\pm$ 46,19
Vanilinska+Galna+Gentisinska+Siriginska	417,39 $\pm$ 4,81	1236,28 $\pm$ 1,92	2469,61 $\pm$ 26,94
Vanilinska+ Gentisinska+Protokatehinska+Siriginska	367,94 $\pm$ 0,96	955,72 $\pm$ 3,85	1956,28 $\pm$ 3,85
Vanilinska+Gentisinska+Galna+Protokatehinska	410,17 $\pm$ 2,89	1389,61 $\pm$ 1,92	2695,17 $\pm$ 20,21
Protokatehinska +Siriginska+Galna+Gentisinska	511,83 $\pm$ 5,00	1594,06 $\pm$ 15,40	3206,83 $\pm$ 43,30

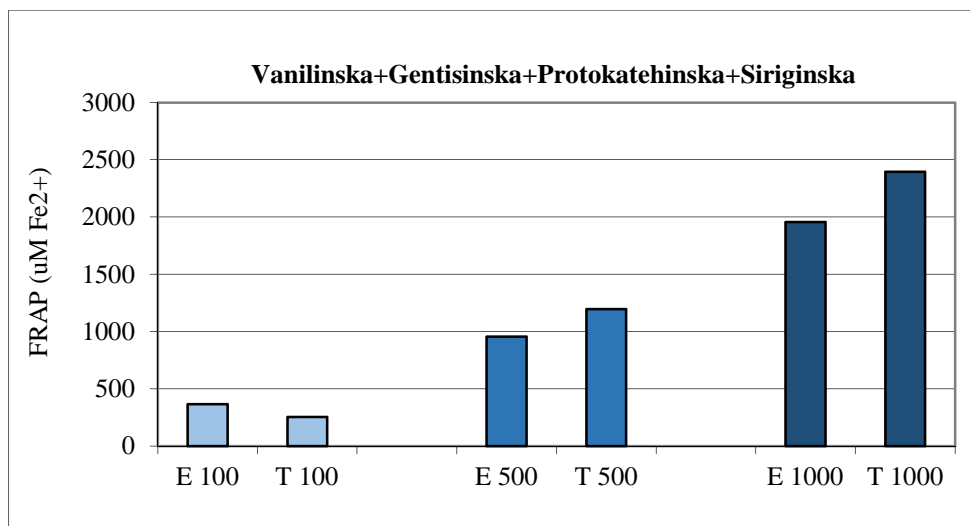


**Slika 34.** Usporedba eksperimentalne (E) i teoretske vrijednosti (T) FRAP za ekvimolarne smjese vanilinske, galne, protokatehinske i siriginske kiseline pri različitim koncentracijama (100, 500 i 1000  $\mu\text{M}$ )

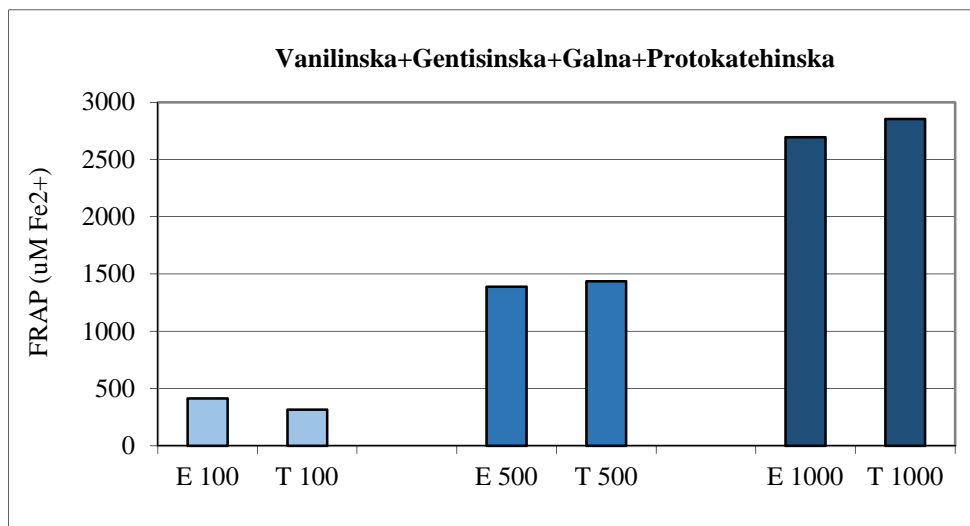




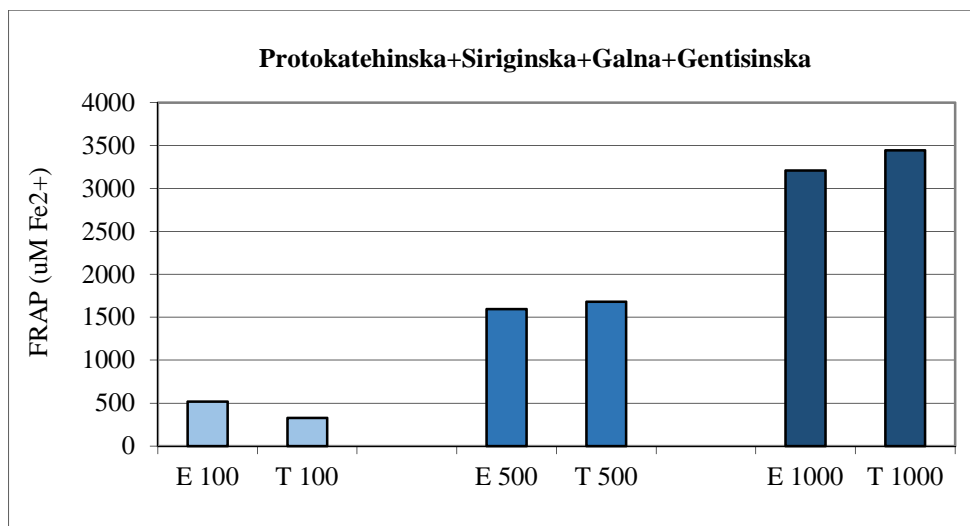
**Slika 35.** Usporedba eksperimentalne (E) i teoretske vrijednosti (T) FRAP za ekvimolarne smjese vanilinske, galne, gentisinske i siriginske kiseline pri različitim koncentracijama (100, 500 i 1000 µM)



**Slika 36.** Usporedba eksperimentalne (E) i teoretske vrijednosti (T) FRAP za ekvimolarne smjese vanilinske, gentisinske, protokatehinske i siriginske kiseline pri različitim koncentracijama (100, 500 i 1000 µM)



**Slika 37.** Usporedba eksperimentalne (E) i teoretske vrijednosti (T) FRAP za ekvimolarne smjese vanilinske, gentisinske, galne i protokatehinske kiseline pri različitim koncentracijama (100, 500 i 1000 µM)

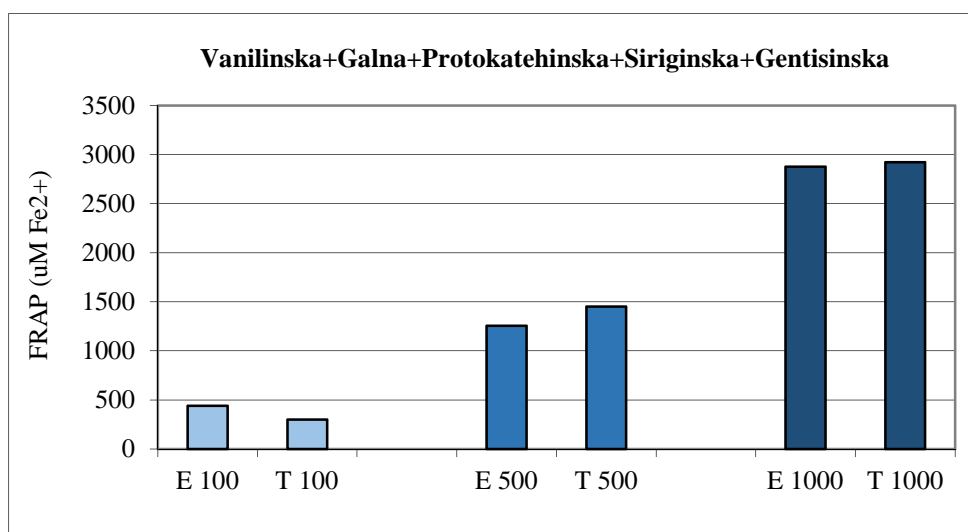


**Slika 38.** Usporedba eksperimentalne (E) i teoretske vrijednosti (T) FRAP za ekvimolarne smjese protokatehinske, siriginske, galne i gentisinske kiseline pri različitim koncentracijama (100, 500 i 1000 µM)

### 3.5. Redukcijska aktivnost ekvimolarnih smjese pet fenolnih kiselina

**Tablica 10.** Vrijednosti FRAP za otopine istraživanih ekvimolarnih smjese pet fenolnih kiselina pri različitim koncentracijama

Smjesa fenolnih kiselina	FRAP vrijednost ( $\mu\text{M Fe}^{2+}$ )		
	Konc. 100 $\mu\text{M}$	Konc. 500 $\mu\text{M}$	Konc. 1000 $\mu\text{M}$
Vanilinska+Galna+Protokatehinska+Siriginska+Gentisinska	439,06 $\pm$ 0,96	1256,83 $\pm$ 10,41	2876,28 $\pm$ 5,09



**Slika 39.** Usporedba eksperimentalne (E) i teoretske vrijednosti (T) FRAP za ekvimolarne smjese vanilinske, galne, protokatehinske, siriginske i gentisinske kiseline pri različitim koncentracijama (100, 500 i 1000  $\mu\text{M}$ )

### 3.6. Rezultati određivanja interakcijskog djelovanja ekvimolarnih fenolnih smjesa

**Tablica 11.** Usporedba teoretskih (T) i eksperimentalnih (E) FRAP vrijednosti te interakcijsko djelovanje ekvimolarnih fenolnih smjesa (% razlike) pri koncentraciji smjese 100  $\mu$ M.

	Razlika (%)
<b>Ekvimolarne smjese dvaju fenolnih kiselina</b>	
Vanilinska+Galna	-33,29
Vanilinska+Protokatehinska	-57,55
Vanilinska+Siriginska	-18,54
Vanilinska+Gentisinska	<b>27,45</b>
Galna+Protokatehinska	-9,96
Galna+Siriginska	-25,54
Galna+Gentisinska	<b>37,60</b>
Protokatehinska+Siriginska	<b>4,03</b>
Protokatehinska+Gentisinska	<b>80,82</b>
Siriginska+Gentisinska	<b>52,17</b>
<b>Ekvimolarne smjese tri fenolne kiseline</b>	
Vanilinska+Galna+Protokatehinska	-23,35
Vanilinska+Galna+Siriginska	-21,26
Vanilinska+Galna+Gentisinska	<b>24,99</b>
Vanilinska+Protokatehinska+Siriginska	-12,64
Vanilinska+Gentisinska+Siriginska	<b>37,36</b>
Vanilinska+Protokatehinska+Gentisinska	<b>23,72</b>
Protokatehinska+Siriginska+Gentisinska	<b>173,63</b>
Protokatehinska+Siriginska+Galna	<b>2,60</b>
Galna+Gentisinska+Protokatehinska	-53,65
Siriginska+Gentisinska+Galna	<b>50,60</b>
<b>Ekvimolarnih smjesa četiri fenolne kiseline</b>	
Vanilinska+Galna+Protokatehinska+Siriginska	-21,39
Vanilinska+Galna+Gentisinska+Siriginska	<b>34,39</b>
Vanilinska+Gentisinska+Protokatehinska+Siriginska	<b>44,77</b>
Vanilinska+Gentisinska+Galna+Protokatehinska	<b>31,06</b>
Protokatehinska +Siriginska+Galna+Gentisinska	<b>57,28</b>
<b>Ekvimolarna smjesa pet fenolnih kiselina</b>	
Vanilinska+Galna+Protokatehinska +Siriginska+Gentisinska	<b>45,64</b>

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

**Tablica 12.** Usporedba teoretskih i eksperimentalnih FRAP vrijednosti i interakcijsko djelovanje ekvimolarnih fenolnih smjesa (% razlike) pri koncentraciji smjese 500  $\mu$ M.

	<b>Razlika (%)</b>
<b>Ekvimolarne smjese dvaju fenolnih kiselina</b>	
Vanilinska+Galna	<b>-18,10</b>
Vanilinska+Protokatehinska	<b>-28,21</b>
Vanilinska+Siriginska	<b>-11,51</b>
Vanilinska+Gentisinska	<b>-26,74</b>
Galna+Protokatehinska	<b>24,95</b>
Galna+Siriginska	<b>-9,13</b>
Galna+Gentisinska	<b>-2,87</b>
Protokatehinska+Siriginska	<b>1,32</b>
Protokatehinska+Gentisinska	<b>-3,07</b>
Siriginska+Gentisinska	<b>57,51</b>
<b>Ekvimolarne smjese tri fenolne kiseline</b>	
Vanilinska+Galna+Protokatehinska	<b>9,17</b>
Vanilinska+Galna+Siriginska	<b>-22,13</b>
Vanilinska+Galna+Gentisinska	<b>2,18</b>
Vanilinska+Protokatehinska+Siriginska	<b>-7,46</b>
Vanilinska+Gentisinska+Siriginska	<b>-18,48</b>
Vanilinska+Protokatehinska+Gentisinska	<b>22,83</b>
Protokatehinska+Siriginska+Gentisinska	<b>6,84</b>
Protokatehinska+Siriginska+Galna	<b>-3,15</b>
Galna+Gentisinska+Protokatehinska	<b>26,80</b>
Siriginska+Gentisinska+Galna	<b>-4,12</b>
<b>Ekvimolarnih smjesa četiri fenolne kiseline</b>	
Vanilinska+Galna+Protokatehinska+Siriginska	<b>-6,90</b>
Vanilinska+Galna+Gentisinska+Siriginska	<b>-20,81</b>
Vanilinska+Gentisinska+Protokatehinska+Siriginska	<b>-20,02</b>
Vanilinska+Gentisinska+Galna+Protokatehinska	<b>-3,24</b>
Protokatehinska +Siriginska+Galna+Gentisinska	<b>-5,05</b>
<b>Ekvimolarna smjesa pet fenolnih kiselina</b>	
Vanilinska+Galna+Protokatehinska +Siriginska+Gentisinska	<b>-13,41</b>

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

**Tablica 13.** Usporedba teoretskih i eksperimentalnih FRAP vrijednosti i interakcijsko djelovanje ekvimolarnih fenolnih smjesa (% razlike) pri koncentraciji smjese 1000  $\mu\text{M}$

	<b>Razlika (%)</b>
<b>Ekvimolarne smjese dvaju fenolnih kiselina</b>	
Vanilinska+Galna	-2,75
Vanilinska+Protokatehinska	-11,37
Vanilinska+Siriginska	-29,01
Vanilinska+Gentisinska	-28,63
Galna+Protokatehinska	-1,73
Galna+Siriginska	-12,65
Galna+Gentisinska	-4,20
Protokatehinska+Siriginska	-2,48
Protokatehinska+Gentisinska	2,50
Siriginska+Gentisinska	-6,98
<b>Ekvimolarne smjese tri fenolne kiseline</b>	
Vanilinska+Galna+Protokatehinska	-5,49
Vanilinska+Galna+Siriginska	-25,26
Vanilinska+Galna+Gentisinska	-19,60
Vanilinska+Protokatehinska+Siriginska	-16,27
Vanilinska+Gentisinska+Siriginska	-16,58
Vanilinska+Protokatehinska+Gentisinska	-11,98
Protokatehinska+Siriginska+Gentisinska	-1,05
Protokatehinska+Siriginska+Galna	-22,29
Galna+Gentisinska+Protokatehinska	8,27
Siriginska+Gentisinska+Galna	-13,51
<b>Ekvimolarnih smjesa četiri fenolne kiseline</b>	
Vanilinska+Galna+Protokatehinska+Siriginska	-2,43
Vanilinska+Galna+Gentisinska+Siriginska	-19,53
Vanilinska+Gentisinska+Protokatehinska+Siriginska	-18,35
Vanilinska+Gentisinska+Galna+Protokatehinska	-5,51
Protokatehinska +Siriginska+Galna+Gentisinska	-6,82
<b>Ekvimolarna smjesa pet fenolnih kiselina</b>	
Vanilinska+Galna+Protokatehinska +Siriginska+Gentisinska	-1,61

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

#### 4. RASPRAVA

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti čistih fenolnih spojeva i fenolnih smjesa, u ovom radu korištena je metoda FRAP. Ova metoda se učestalo koristi za mjerenja redukcijske snage različitih uzorka i ubraja se u brze metode.<sup>32</sup> Osim što je FRAP metoda vrlo brza, ona je i iznimno jednostavna, reagensi nisu skupi, a rezultati su ponovljivi u velikom rasponu koncentracija. Kako je riječ o metodi u kojoj dolazi do redukcije  $\text{Fe}^{3+}$  iona u  $\text{Fe}^{2+}$  ione djelovanjem antioksidansa koji se dodaju u reakcijsku smjesu, kažemo da se FRAP metodom zapravo određuje redukcijski potencijal uzoraka.  
32,33

U ovom radu analizirana je i uspoređena antioksidacijska (redukcijska) aktivnost odabranih otopina fenolnih kiselina kao i njihovih smjesa (dvije i više fenolnih kiselina) pri različitim koncentracijama. Spojevi koji su analizirani su: vanilinska, galna, protokatehinska, siriginska i gentisinska kiselina. Ekvimolarne smjese navedenih kiselina pripravljene su 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), te u konačnici kombinacija (svih) pet kiselina (omjer 1:1:1:1:1). Čisti spojevi i sve fenolne smjese su testirane pri koncentracijama 100, 500 i 1000  $\mu\text{M}$ . Na osnovu dobivenih eksperimentalnih i teoretskih FRAP vrijednosti testiranih fenolnih smjesa određen je sinergijski, aditivni i/ili antagonistički učinak. Dobiveni rezultati prikazani su u tablicama 11-13 i na slikama 14-39.

Na slikama 9-13 je prikazana ovisnost FRAP vrijednosti o testiranoj koncentraciji spoja za istražene fenolne kiseline. Iz prikazanih rezultata je vidljiva linearna ovisnost između testirane koncentracije fenolnih kiselina i njihove redukcijske aktivnosti. Galna kiselina ima najveću FRAP vrijednost, dok je najslabija FRAP vrijednost dokazana za vanilinsku kiselinu. Vrijednost FRAP za galnu kiselinu pri koncentraciji 100  $\mu\text{M}$  iznosila je 494  $\mu\text{M Fe}^{2+}$ , dok je za vanilinsku kiselinu ta vrijednost bila samo 193  $\mu\text{M Fe}^{2+}$ . FRAP ostalih kiselina kretao se od 245 do 294  $\mu\text{M Fe}^{2+}$ . FRAP otopine galne kiseline koncentracije 500  $\mu\text{M}$  bio je 2477,94  $\mu\text{M Fe}^{2+}$ , a vanilinske 542  $\mu\text{M Fe}^{2+}$ , dok je pri koncentraciji 1000  $\mu\text{M}$  iznosio 5033  $\mu\text{M Fe}^{2+}$ , a za vanilinsku kiselinu 850  $\mu\text{M Fe}^{2+}$ ,

Najbolja antioksidacijska aktivnost galne kiseline je čak mogla biti očekivana obzirom da ova kiselina posjeduje u svojoj strukturi tri hidroksilne skupine (-OH), i to na položajima 3, 4 i 5, a poznato je da aktivnost ovisi prvenstveno o broju i rasporedu -OH i -CH<sub>3</sub> skupina u molekuli. Druga po jakosti je gentisinska kiselina odnosno 2,5-dihidroksibenzojeva kiselina, a slijedi je siriginska kiselina koja ima 3 supstituenta; na položajima 3 i 5 -OCH<sub>3</sub> skupinu, te -OH na položaju 4. Može se uočiti slabije djelovanje protokatehinske kiseline u odnosu na gentisinsku. Iako su oba spoja derivati benzojeve kiseline koji posjeduju dvije -OH skupine u svojoj strukturi, iz rezultata koji su dobiveni njihovim testiranjem može se zaključiti da je hidroksilacija na položajima 2 i 5 znatno učinkovitija nego li ista na položajima 3 i 4. Dok je hidroksilna skupina na *meta*- položaju odlika dobrog antioksidansa, vanilinska kiselina koja istu ima na položaju *para*- nije rezultirala značajnom redukcijском aktivnošću, čemu očito nije posebno pridonijela niti -OCH<sub>3</sub> skupina na položaju *meta*- koji ova kiselina posjeduje.

U tablici 7 prikazani su rezultati redukcijske aktivnosti ekvimolarnih smjesa dviju fenolnih kiselina. Najveću redukcijску aktivnost analiziranih smjesa, u slučaju kada smjesu čine dvije kiseline, pokazale su smjese galne i gentisinske kiseline pri koncentraciji 100 i 1000  $\mu\text{M}$  (546,28 odnosno 3936,83  $\mu\text{M Fe}^{2+}$ ), te kombinacija siriginske i gentisinske kiseline pri koncentraciji 500  $\mu\text{M}$  (2539,06  $\mu\text{M Fe}^{2+}$ ). Kombinacija vanilinske i protokatehinske kiseline pokazuje najslabiju antioksidacijsku aktivnost pri svim testiranim koncentracijama. Kod kombinacije tri kiseline, pri 100  $\mu\text{M}$  najveća redukcijška aktivnost dokazana je za smjesu protokatehinske, siriginske i gentisinske kiseline (747,94  $\mu\text{M Fe}^{2+}$ ), dok je pri višim koncentracijama najučinkovitija bila smjesa galne, gentisinske i protokatehinske kiseline

Zanimljivo je primijetiti da je najslabija redukcijška aktivnosti izmjerena za smjesu galne, gentisinske i protokatehinske kiseline pri koncentraciji 100  $\mu\text{M}$ , dok je smjesa ovih spojeva pri većim koncentracijama dala najbolje rezultate. Ovo je dokaz da je osim samog omjera spojeva u smjesi od izuzetne važnosti i njihova koncentracija. Pri većim koncentracijama najslabije redukcijško djelovanje je pokazala smjesa vanilinske, protokatehinske i siriginske kiseline. Svi navedeni rezultati prikazani su u tablici 8.

Prilikom kombiniranja četiri kiseline, najveća redukcijška aktivnost dokazana je za smjesu protokatehinske, siriginske, galne i gentisinske kiseline pri svim testiranim koncentracijama. Kod koncentracije 100  $\mu\text{M}$  FRAP vrijednost je iznosila 511,83  $\mu\text{M Fe}^2$ , kod 500  $\mu\text{M}$  1594,06  $\mu\text{M Fe}^2$ , dok je pri 1000  $\mu\text{M}$  FRAP bio 3206,83  $\mu\text{M Fe}^2$ .



Najniže FRAP vrijednosti su dobivene za smjesu vanilinske, galne, protokatehinske i siriginske koncentracije 100  $\mu\text{M}$  te smjesu vanilinske, gentisinske, protokatehinske i siriginske pri višim koncentracijama (tablica 9).

Vrijednosti FRAP za otopine istraživanih ekvimolarnih smjesa pet fenolnih kiselina različitih koncentracija prikazani su u tablici 10.

Vrlo je mali broj istraživanja proveden u svrhu određivanja mehanizma interakcijskog djelovanja fenolnih spojeva, točnije fenolnih kiselina koje su predmet ovog rada. Rezultati određivanja potencijalnog interakcijskog djelovanja ekvimolarnih fenolnih smjesa FRAP metodom prikazani su u tablicama 11-13. U konačnici je interakcijsko djelovanje prikazano kao razlika u antioksidacijskoj aktivnosti (%), uzevši u obzir da pozitivne vrijednosti upućuju na sinergijski, a negativne vrijednosti na antagonistički učinak fenolnih kiselina u testiranim smjesama. Također, aditivnim djelovanjem se smatrala interakcija kod koje se računski dobivena razlika kretala  $\pm 5\%$  (razlika teoretske i eksperimentalno dobivene FRAP vrijednosti). Iz navedenih rezultata vidljivo je da velik broj testiranih smjesa pokazuje lošiju antioksidacijsku aktivnosti u odnosu na teoretske vrijednosti što upućuje na antagonistički učinak spojeva u smjesi. S druge strane, pojedine fenolne smjese su pokazale značajan sinergistički učinak fenola u smjesi. U tablicama 11-13 prikazane su usporedbe teoretskih i eksperimentalnih FRAP vrijednosti i interakcijsko djelovanje ekvimolarnih fenolnih smjesa pri koncentracijama smjesa 100, 500 i 1000  $\mu\text{M}$ . Usporedni prikaz je također vidljiv i na slikama 14-39.

Tablica 11 prikazuje rezultate interakcijskog djelovanja smjese fenolnih kiselina u otopinama koncentracije 100  $\mu\text{M}$ . Kod kombinacije dvije fenolne kiseline najjače sinergijsko djelovanje imala je kombinacija protokatehinske i gentisinske kiseline (80,82 %), dok je kod smjese tri kiseline najveća sinergija potvrđena za kombinaciju protokatehinske, siriginske i gentisinske kiseline (173,63 % razlike). Kod kombinacije četiri kiseline sve smjese su pokazale sinergijski učinak, osim kombinacije vanilinske, galne, protokatehinske i siriginske kiseline koja je pokazala antagonistički učinak (razlika -21,39 %). Najjače sinergijsko djelovanje pokazala je smjesa protokatehinske, siriginske, gentisinske i galne kiseline (57,28 %). Prilikom kombiniranja svih pet kiselina dobiven je sinergijski učinak smjese te je razlika iznosila 45,64 %.

Pri koncentraciji smjese 500  $\mu\text{M}$  (tablica 12.) od testiranih smjesa dviju kiselina sinergija je dokazana za kombinacije siriginske i gentisinske kiseline (57,51 %), dok je dvostruko manju sinergiju pokazala smjesa galne i protokatehinske kiseline.

Kod smjesa tri fenolne kiseline najznačajnija sinergija je dokazana za smjesu vanilinske, protokatehinske i gentisinske kiseline (22,83 %) te galne, gentisinske i protokatehinske kiseline (26,80 %). Osim sinergije uočen je i značajan antagonizam kod smjesa vanilinske, galne i siriginske (-22,13 %) te vanilinske, gentisinske i siriginske (-18,48 %).

Kod smjesa četiri odnosno pet kiselina zabilježeno je antagonističko djelovanje kod svih testiranih smjesa osim za smjesu vanilinske, gentisinske, galne i protokatehinske kiseline gdje je uočeno aditivno djelovanje.

Rezultati interakcije fenolnih kiselina u smjesi pri koncentraciji 1000  $\mu\text{M}$  prikazani su u tablici 13 iz koje je vidljivo da gotovo sve smjese pokazuju aditivno i antagonističko djelovanje. Izuzetak je samo smjesa galne, gentisinske i protokatehinske kiseline koja je ipak pokazala blagi sinergijski učinak (8,27 %). Najjači antagonistički učinak pokazala je smjesa vanilinske i siriginske kiseline (-29,01 % razlike).

## 5. ZAKLJUČAK

- Rezultati ukazuju na razlike u antioksidacijskoj aktivnosti testiranih derivata hidroksibenzojevih kiselina kao i njihovih ekvimolarnih smjesa.
- Redukcijska aktivnost dokazana je za sve testirane kiseline, te je potvrđeno da ista ovisi o njihovoj strukturi, odnosno broju, vrsti i rasporedu funkcionalnih skupina.
- Najbolju aktivnost je očekivano pokazala galna kiselina koja posjeduje najveći broj hidroksilnih skupina, dok se najslabijom pokazala vanilinska kiselina koja s jednom –OH skupinu na položaju 4 i –OCH<sub>3</sub> skupinom na položaju 3.
- Potvrđene su razlike između eksperimentalno dobivenih FRAP vrijednosti za smjese fenolnih kiselina i teoretskih vrijednosti, što je potvrda interakcijskog djelovanja spojeva u smjesi (sinergijskog, antagonističkog ili aditivnog).
- Najveća sinergija je potvrđena za smjesu protokatehinske, siriginske i gentisinske kiseline koncentracije 100 μM, dok je pri istoj koncentraciji najveći antagonizam pokazala smjesa vanilinske i protokatehinske kiseline.
- Sinergijski, antagonistički ili aditivni učinak fenolnih spojeva u smjesama ne ovisi samo o spojevima koje smjesa sadrži već i o koncentracijama u kojima su navedeni spojevi u njima prisutni.

## 6. LITERATURA

1. Saxena M, Saxena J, Pradhan A. (2012) *Flavonoids and Phenolic Acids as Antioxidants in Plants and Human Health*. Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 16(2), 130-134
2. Chen Y, Xiao H, Zhen J, Liang G. (2015) *Structure-Thermodynamics-Antioxidant Activity Relationships of Selected Natural Phenolic Acids and Derivatives: An Experimental and Theoretical Evaluation*, PLoS One. 24, 10(3)
3. 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*. J. Food Comp. Anal. 38,13-18
4. Bravo L. (1998) *Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance*. Nutr. Rev., 56(11), 317-333
5. Balasundram N, Sundram K, Samman S. (2005) *Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses*, Food Chem. 99(1), 191-203
6. Robbins, R.J. (2003) *Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology*, J. Agric. Food Chem. 2003, 51 (10), 2866–2887
7. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. (2004) *Polyphenols: food sources and bioavailability*. Am J Clin Nutr. 79(5), 727-747
8. 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 Chem. 119, 715-723
9. Tsao R. (2010), *Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols*. Nutrients. 2, 1231-1246

10. Pandey K.B, Rizvi S.I. (2009) *Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Oxid Med Cell Longev. 2(5), 270–278
11. Kazazić, S.P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 4 (55), 279-290
12. URL: <https://bs.wikipedia.org/wiki/Fenoli>, Pristupljeno: 18.09.2017.
13. URL: [https://ro.wikipedia.org/wiki/\(E\)-stilben](https://ro.wikipedia.org/wiki/(E)-stilben), Pristupljeno: 18.09.2017.
14. URL: [https://sr.wikipedia.org/wiki/Gentizinska\\_kiselina](https://sr.wikipedia.org/wiki/Gentizinska_kiselina), Pristupljeno: 18.09.2017.
15. URL: <http://atelim.com/nutricionizam-kristina-greblo-5276n-antioksidativno-i-antimikr.html?part=3>, Pristupljeno: 18.09.2017.
16. Pietta P, Minoggio M, Bramati L. (2003) *Plant Polyphenols: Structure, Occurrence And Bioactivity*, 28, 258-294, Studies in Natural Products Chemistry, 28, Part I, 257-312
17. URL: [https://sh.wikipedia.org/wiki/Galna\\_kiselina](https://sh.wikipedia.org/wiki/Galna_kiselina), Pristupljeno: 18.09.2017.
18. URL: [https://sh.wikipedia.org/wiki/Vanilinska\\_kiselina](https://sh.wikipedia.org/wiki/Vanilinska_kiselina), Pristupljeno: 18.09.2017.
19. URL: <https://agroekonomija.wordpress.com/2011/01/18/fenolne-kiseline/>, Pristupljeno: 18.09.2017.
20. Macheix, J.J., Fleuriet, A., Billot, J. (1990) *Fruit Phenolics*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
21. URL: <http://www.mpbio.com/product.php?pid=02104797>, Pristupljeno: 18.09.2017.
22. URL: [https://sr.wikipedia.org/wiki/P-Kumarinska\\_kiselina](https://sr.wikipedia.org/wiki/P-Kumarinska_kiselina), Pristupljeno: 18.09.2017.
23. URL: [https://sh.wikipedia.org/wiki/Ferulinska\\_kiselina](https://sh.wikipedia.org/wiki/Ferulinska_kiselina), Pristupljeno: 18.09.2017.

24. URL: [https://sh.wikipedia.org/wiki/Sinapinska\\_kiselina](https://sh.wikipedia.org/wiki/Sinapinska_kiselina), Pristupljeno: 18.09.2017.
25. Shahidi F, Nacsck M. (1995) *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, and Application*; Technomic Publishing Company, Inc.: Lancaster, PA, 75-100
26. Maga J. A. (1978) Simple Phenol and Phenolic compounds in Food Flavor. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr.* 10(4), 323-372
27. Pereira D.M, Valentão P, Pereira H.A, Andrade P. (2009) *Phenolics: From Chemistry to Biology*, *Molecules*, 14(6), 2202-2211
28. N. Chandra, V. Lobo, A. Patil, A. Phatak (2010) *Free radicals, antioxidants and functional foods-impact on human health*, *Pharma. Rev.* 4, 118-126
29. Tolo I. (2015) *Sinergijski učinak katehina sa stilbenima*. Diplomski rad, Split, Kemijsko-tehnološki fakultet
30. Ghasemzadeh A, Ghasemzadeh N. (2011) *Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human*, *J. Med. Plants Res.* 5(31), 6697-6703
31. 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*, *Agric. Food Chem.* 53, 4290-4302
32. 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*, *Biochim Biophys*, 1721(1-3), 174-184
33. Benzie I.F, Strain J.J (1995) *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power"*, *Anal Biochem.* 15, 239(1), 70-76.