# Određivanje antioksidativnog karaktera odabranih boroničnih kiselina cuprac metodom

**Grubišić, Ena**

**Master's thesis / Diplomski 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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:532008

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-23**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**

**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

# ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG KARAKTERA ODABRANIH BORONIČNIH KISELINA CUPRAC METODOM

**DIPLOMSKI RAD**

**ENA GRUBIŠIĆ**

**Matični broj: 59**

**Split, listopad 2017.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**

**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**

**ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA**

# ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG KARAKTERA ODABRANIH BORONIČNIH KISELINA CUPRAC METODOM

**DIPLOMSKI RAD**

**ENA GRUBIŠIĆ**

**Matični broj: 59**

**Split, listopad 2017.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**

**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**

**GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY**

**ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY**

# DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CHARACTER OF SELECTED BORONIC ACIDS USING CUPRAC METHOD

**DIPLOMA THESIS**

**ENA GRUBIŠIĆ**

**Parent number: 59**

**Split, October 2017.**

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

**DIPLOMSKI RAD**

**Sveučilište u Splitu**
**Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu**
**Diplomski studij kemije, smjer Organska kemija i biokemija**

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti
**Znanstveno polje:** Kemija
**Tema rada** je prihvaćena na 21. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta
**Mentor:** Prof. dr. sc. Mladen Miloš
**Pomoć pri izradi:** Maja Marasović, mag. chem.

# ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG KARAKTERA ODABRANIH BORONIČNIH KISELINA CUPRAC METODOM

Ena Grubišić, 59

**Sažetak:** Oksidativni stres je štetan proces koji može biti važan posrednik oštećenja staničnih struktura i može uzrokovati razna stanja bolesti i starenja. Antioksidacijska mjerenja se provode za dijagnozu i liječenje bolesti povezanih s antioksidativnim stresom, za usporedbu hrane s obzirom na sadržaj antioksidansa i za kontrolu varijacija između proizvoda. Jedinstvena i svestrana reaktivnost i stabilnost boroničnih kiselina dovele su do upotrebe u brojnim područjima. Nekoliko jedinstvenih svojstava boroničnih kiselina, poput niske toksičnosti, čini ih prikladnim za biomedicinske primjene. U ovom radu su istraživani spojevi iz klase boroničnih kiselina i osnovni zadatak je bio testirati navedene spojeve kao potencijalne antioksidanse. Za određivanje antioksidativnog kapaciteta koristila se CUPRAC metoda koja je temeljena na redukciji Cu(II) kompleksa u prisutnosti antioksidansa. Mjerenja su se vršila na metil boroničnoj kiselini, fenil boroničnoj kiselini i 2,4,6-trifluor fenil boroničnoj kiselini. Metil boronična kiselina može biti antioksidans koji sporo reagira, ali jer ni nakon 60 minuta nije pokazao promjenu boje može se zaključiti da ne posjeduje primjetan antioksidativni potencijal. Iz rezultata može se zaključiti da 2,4,6-trifluor fenil boronična kiselina ima veći antioksidativni kapacitet od fenil boronične kiseline.

**Ključne riječi:** antioksidacija, boronična kiselina, CUPRAC, troloks

**Rad sadrži:** 42 stranice, 16 slike, 6 tablica, 12 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. Doc. dr. sc. Ivica Blažević - predsjednik
2. Doc. dr. sc. Franko Burčul - član
3. Prof. dr. sc. Mladen Miloš - član-mentor

**Datum obrane:**(27. listopada 2017.)

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

**BASIC DOCUMENTATION CARD**

**DIPLOMA THESIS**

**University of Split**
**Faculty of Chemistry and Technology Split**
**Graduate study of Chemistry**

**Scientific area:** Natural Sciences
**Scientific field:** Chemistry
**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 21.
**Mentor:** Mladen Miloš, PhD, Full Professor
**Technical assistance:** Maja Marasović, MChem

# DETERMINATION OF ANTIOXIDANT CHARACTER OF SELECTED BORONIC ACIDS USING CUPRAC METHOD

Ena Grubišić, 59

**Abstract:** Oxidative stress is a damaging process that can be an important mediator of damage to cell structures and can cause various disease states and ageing. Antioxidative measurements are conducted for the diagnosis and the treatment of diseases associated with antioxidative stress, for comparison of foods with respect to their antioxidant content and for controling variations between products. Unique and versatile reactivity and stability of boronic acids have led to the uses in many areas. Several unique properties of boronic acids, such as low toxicity, make them suitable for biomedical applications. This paper investigated the compounds of the class of boronic acids and the main task was to test these compounds as potential antioxidants. To determine the antioxidant capacity, a CUPRAC method was used which was based on the reduction of Cu (II) complexes in the presence of antioxidants. Measurements were performed on methyl boronic acid, phenyl boronic acid and 2,4,6-trifluorophenyl boronic acid. Methyl boronic acid can be a slow-reacting antioxidant, but since no change in color has occurred after 60 minutes it can be concluded that it does not have a noticeable antioxidative potential. From the results it can be concluded that 2,4,6-trifluorophenyl boronic acid has a higher antioxidative capacity than phenyl boronic acid.

**Keywords:** antioxidation, boronic acid, CUPRAC, trolox

**Thesis contains:** 42 pages, 16 figures, 6 tables, 12 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

| | |
|---|---|
| 1. Ivica Blažević - PhD, assistant prof. | chair person |
| 2. Franko Burčul - PhD, assistant prof. | member |
| 3. Mladen Miloš – PhD, full prof. | supervisor |

**Defence date:**( October 27 2017.)

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, RuđeraBoškovića 35.

*Završni rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom prof. dr. sc. Mladena Miloša i pod neposrednim vodstvom znanstvene novakinje Maje Marasović, mag. chem. u razdoblju od lipnja do listopada 2017. godine.*

Rad je financiran od strane HRZZ projekta BioActCom(IP-2014-09-6897)

*Zahvaljujem se mentoru prof. dr. sc. Mladenu Milošu na stručnoj pomoći i uputama koji su mi pomogli tijekom pisanja diplomskog rada.*

*Također se zahvaljujem znanstvenoj novakinji Maji Marasović, mag. chem. na pomoći, susretljivosti te strpljenju pri izradi eksperimentalnog dijela i korisnim savjetima.*

# ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- Zadatak ovog diplomskog rada je odrediti antioksidativni kapacitet odabranih boroničnih kiselina CUPRAC metodom
- Usporediti dobivene rezultate s poznatim antioksidansom, troloksom, kao referentnim uzorkom

# SAŽETAK

Oksidativni stres je štetno stanje koje može biti važan posrednik kod oštećenja staničnih struktura, nastanka raznih stanja bolesti te starenja. Antioksidacijska svojstva se ispituju u svrhu potencijalnog liječenja bolesti povezanih s oksidativnim stresom, kao i za usporedbu prehrambenih namirnica obzirom na sadržaj antioksidansa.

Jedinstvena i svestrana reaktivnost i stabilnost boroničnih kiselina dovele su do upotrebe u brojnim područjima. Nekoliko jedinstvenih svojstava boroničnih kiselina, poput niske toksičnosti, čini ih prikladnim za biomedicinske primjene. U ovom radu su istraživani spojevi iz klase boroničnih kiselina i osnovni zadatak je bio testirati odabrane spojeve kao potencijalne antioksidanse.

Za određivanje antioksidativnog kapaciteta koristila se CUPRAC metoda koja je temeljena na redukciji Cu(II) kompleksa u prisutnosti antioksidansa. Mjerenja su se vršila na metil boroničnoj kiselini, fenil boroničnoj kiselini i 2,4,6-trifluor fenil boroničnoj kiselini. Metil boronična kiselina može biti antioksidans koji sporo reagira, ali jer ni nakon 60 minuta nije pokazao promjenu boje može se zaključiti da ne posjeduje primjetan antioksidativni potencijal. Iz rezultata može se zaključiti da 2,4,6-trifluor fenil boronična kiselina ima veći antioksidativni kapacitet od fenil boronične kiseline.



**Ključne riječi:** antioksidacija, boronična kiselina, CUPRAC, troloks

## SUMMARY

Oxidative stress is a damaging process that can be an important mediator of damage to cell structures and can cause various disease states and ageing. Antioxidative measurements are conducted for the diagnosis and the treatment of diseases associated with antioxidative stress, for comparison of foods with respect to their antioxidant content and for controling variations between products.

Unique and versatile reactivity and stability of boronic acids have led to the uses in many areas. Several unique properties of boronic acids, such as low toxicity, make them suitable for biomedical applications. This paper investigated the compounds of the class of boronic acids and the main task was to test these compounds as potential antioxidants.

To determine the antioxidant capacity, a CUPRAC method was used which was based on the reduction of Cu (II) complexes in the presence of antioxidants. Measurements were performed on methyl boronic acid, phenyl boronic acid and 2,4,6-trifluorophenyl boronic acid. Methyl boronic acid can be a slow-reacting antioxidant, but since no change in color has occurred after 60 minutes it can be concluded that it does not have a noticeable antioxidative potential. From the results it can be concluded that 2,4,6-trifluorophenyl boronic acid has a higher antioxidative capacity than phenyl boronic acid.

**Keywords:** antioxidation, boronic acid, CUPRAC, trolox

# SADRŽAJ

**UVOD** .....1
**1. OPĆI DIO** .....2
1.1. ANTIOKSIDANSI.....2
1.2. MEHANIZAM DJELOVANJA ANTIOKSIDANSA.....2
1.3. REAKTIVNE VRSTE KISIKA (ROS).....5
1.3.1.OKSIDATIVNI STRES.....6
1.3.1.1. Rak.....7
1.3.1.2. Kardiovaskularne bolesti.....8
1.3.1.3. Ishemijska/Reperfuzijska ozljeda.....9
1.3.1.4. Reumatoidni artritis.....9
1.3.1.5. Dijabetes.....9
1.3.1.6. Neurološki poremećaji.....10
1.3.1.6.1. Alzheimerova bolest.....10
1.3.1.6.2. Parkinsonova bolest.....10
1.3.1.7. Starenje.....11
1.4. MJERENJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI/KAPACITETA.....12
1.4.1. CUPRAC test.....14
1.4.1.1. Prednosti CUPRAC testa i njegovih modifikacija.....16
1.5. SPEKTROFOTOMETRIJA.....18
1.5.1. APSORBANCIJA.....19
1.6. BORONIČNE KISELINE.....20
1.6.1. PRIMJENA BORONIČNIH KISELINA U MEDICINI.....24
1.6.1.1. Inhibicija lipaze.....24
1.6.1.2. Inhibicija HIV-a.....25
1.6.1.3. Dijabetes.....25
1.6.1.4. Očitavanje dopamina.....26
**2. EKSPERIMENTALNI DIO**.....27
2.1. APARATURA.....27

2.2. KEMIKALIJE....28
2.3. PRIPREMA KEMIKALIJA....29
2.4. POSTUPAK MJERENJA....31
2.4.1. UTJECAJ KONCENTRACIJE....31
**3. REZULTATI**....32
3.1. PRVI UZORCI....32
3.2. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG KAPACITETA CUPRAC METODOM.33
**4. RASPRAVA**....38
**5. ZAKLJUČAK**....40
**6. LITERATURA**....41

## UVOD

Antioksidansi su privukli značajnu pozornost u svezi s radikalima i oksidativnim stresom, profilaksom i terapijom raka, kao i dugovječnosti. Preporuke utemeljene na epidemiološkim istraživanjima su takve da voće, povrće i manje prerađena osnovna hrana osiguravaju najbolju zaštitu od razvoja bolesti uzrokovanih oksidativnim stresom, poput raka, koronarne srčane bolesti, pretilosti, dijabetesa tipa 2 i hipertenzije.[4]

Oksidativni stres je patološko stanje u kojem reaktivne vrste kisika preplavljuju antioksidacijske obrane organizma, što dovodi do oksidativne modifikacije bioloških makromolekula (lipida, proteina, DNA), ozljede tkiva i ubrzane stanične smrti kao temelja mnogih bolesti.[1]

Voćni sokovi, pića i topli napitci sadrže velike količine antioksidansa, poput polifenola, vitamina C, vitamina E, $\beta$-karotena i likopena. Njihova potrošnja je smanjila morbiditet i smrtnost uzrokovanu degenerativnim bolestima. Zbog raznolikosti kemijskih spojeva s antioksidacijskom aktivnošću prisutnom u prehrambenim proizvodima, još uvijek nisu dostupne potpune baze podataka antioksidativnih sadržaja. Osim toga, razina pojedinačnih antioksidansa u prehrambenim proizvodima ne odražava nužno njihov ukupni antioksidativni potencijal. Ukupni antioksidativni potencijal ovisi i o sinergijskoj i redoksnoj interakciji između različitih molekula prisutnih u hrani.[4]

Boronične kiseline sadrže trovalentne atome bora vezane na jedan alkil/arilni supstituent i dvije hidroksilne skupine. Jedinstvena i svestrana reaktivnost i stabilnost boroničnih kiselina dovele su do upotrebe u brojnim područjima, uključujući stvaranje C-C veze, kiselinsku katalizu, asimetričnu sintezu, ugljikohidratnu analizu, metalkatalizu, molekularnu osjetljivost kao i terapeutska sredstva, inhibitori enzima i novi materijali. Nekoliko jedinstvenih svojstava boroničnih kiselina, poput niske toksičnosti, čini ih prikladnim za biomedicinske primjene. Ohrabrujući znak za primjenu boroničnih kiselina u medicini je nedostatak očitih toksičnosti ili *in vivo* nestabilnosti.[5]

# 1. OPĆI DIO

## 1.1. ANTIOKSIDANSI

Antioksidansi su spojevi sposobni da odgode ili inhibiraju oksidacijske procese koji se javljaju pod utjecajem atmosferskog kisika ili reaktivnih vrsta kisika. Koriste se za stabilizaciju polimernih proizvoda, petrokemikalija, prehrambenih proizvoda, kozmetike i lijekova. Uključeni su u obrambeni mehanizam organizma protiv patologija povezanih s napadima slobodnih radikala.[4]

Endogeni antioksidansi su enzimi, poput superoksid dismutaze, katalaze, glutation-peroksidaze ili neenzimski spojevi, kao što su mokraćna kiselina, bilirubin, albumin, metalotioneini. Kada endogeni čimbenici ne mogu osigurati strogu kontrolu i potpunu zaštitu organizma od reaktivnih vrsta kisika, javlja se potreba za egzogenim antioksidansima kao prehrambenim dodatcima ili farmaceutskim sredstvima. Najznačajniji egzogeni antioksidansi su vitamin E, vitamin C, $\beta$-karoten, flavonoidi i minerali Se koji su dobro poznati, ali i vitamin D i vitamin K3.[4]

Egzogeni antioksidansi mogu potjecati iz prirodnih izvora (vitamini, flavonoidi, antocijanini, neki mineralni spojevi), ali mogu biti i sintetički spojevi, poput butilhidroksianisola, butilhidroksitoluena, galata itd.[4]

Postoji sve veći interes za antioksidanse, posebno za one koji su namijenjeni spriječavanju pretpostavljenih štetnih učinaka slobodnih radikala u ljudskom tijelu, kao i razgradnju masti i drugih sastojaka prehrambenih proizvoda.[4]

## 1.2. MEHANIZAM DJELOVANJA ANTIOKSIDANSA

Antioksidansi niske molekulske mase (engl. *Low Molecular Weight Antioxidants*, LMWA) su male molekule koje često infiltriraju stanice, akumuliraju se (u visokim koncentracijama) u specifičnim odjeljcima povezanim s oksidativnim oštećenjem, a zatim ih stanica regenerira. U ljudskim tkivima, stanični se LMWA-ovi dobivaju iz različitih izvora. Glutation, nikotinamid adenin dinukleotid (reducirani oblik) i karnozin su

sintetizirani od strane stanica, mokraćna kiselina i bilirubin su otpadni proizvodi staničnog metabolizma, a askorbinska kiselina i polifenoli su antioksidansi dobiveni iz prehrane. Posebna pažnja posvećena je istraživanju antioksidativnog mehanizma djelovanja.[4]

Višak slobodnih radikala koji cirkuliraju u tijelu oksidiraju lipoproteine niske gustoće (engl. *Low Density Lipoptotein*, LDL), što ih čini potencijalno smrtonosnim. Suvišni slobodni radikali također mogu ubrzati proces starenja i povezani su s drugim vrlo ozbiljnim patologijama kao što su moždani udar, dijabetes, reumatoidni artritis, Parkinsonova bolest, Alzheimerova bolest i rak. Fiziološki, oksigenirani slobodni radikali su među najvažnijim radikalnim vrstama. Reaktivne vrste kisika (engl. *Reactive Oxyhen Species*, ROS) čine vrste s jakom oksidacijskom tendencijom, bilo da su to radikali (superoksidni radikal, hidroksilni radikal) ili ne-radikali (ozon, vodikov peroksid).[4]

Niz kemijskih i fizikalnih pojava mogu inicirati oksidaciju, koja se odvija kontinuirano u prisutnosti prikladnog supstrata, sve dok se ne pojavi blokirajući obrambeni mehanizam. Osnovne značajke oksidacije putem lančane reakcije posredovane slobodnim radikalima su inicijacija, propagacija, grananje i terminacija. Postupak se može pokrenuti djelovanjem vanjskog utjecaja kao što su toplina, svjetlo, ionizirajuće zračenje ili kemijska inicijacija koja uključuje metalne ione.[4]

**Inicijacija**

$LH + R\cdot \rightarrow L\cdot + RH$

LH predstavlja molekulu supstrata, na primjer, lipid, koji reagira s R· kao inicijalnim oksidirajućim radikalom. Oksidacija lipida proizvodi visoko reaktivni alkilni radikal (L·) koji može brzo reagirati s kisikom da bi formirao lipidni peroksilni radikal (LOO·).[4]

**Propagacija**

$L\cdot + O_2 \rightarrow LOO\cdot$

$LOO\cdot + LH \rightarrow L\cdot + LOOH$

Peroksilni radikali mogu dalje oksidirati lipid, stvarajući lipidne hidroperokside (LOOH), koji se zatim razgrađuju na širok spektar spojeva, uključujući alkohole, aldehide, ketone, ugljikovodike, i radikale, uključujući alkoksilni radikal (LO·).[4]

**Grananje**

$LOOH \rightarrow LO\cdot + HO\cdot$

$2LOOH \rightarrow LOO\cdot + LO\cdot + H_2O$

Razgradnja lipidnih hidroperoksida često uključuje katalizu prijelaznim metalima u reakcijama sličnim onima koji uključuju vodikov peroksid, dajući lipidni peroksil i lipidne alkoksilne radikale.[4]

**Terminacija**

Reakcije terminacije uključuju kombinaciju radikala radi stvaranja ne-radikalnih produkata:

$LOO\cdot + LOO\cdot \rightarrow LOOL + O_2$ (inertni produkt)

$L\cdot + L\cdot \rightarrow L\text{-}L$

$L\cdot + LOO\cdot \rightarrow LOOL$

Primarni antioksidansi, AH, kada su prisutni u tragovima, mogu odgoditi ili inhibirati inicijaciju reagirajući s lipidnim radikalom ili inhibiraju propagaciju reagirajući s peroksilnim ili alkoksilnim radikalima.[4]

$L\cdot + AH \rightarrow LH + A\cdot$

$LOO\cdot + AH \rightarrow LOOH + A\cdot$

$LO\cdot + AH \rightarrow LOH + A\cdot$

Sekundarni ili preventivni antioksidansi su spojevi koji usporavaju brzinu oksidacije. To se može postići na više načina, uključujući uklanjanje supstrata.[4]

## 1.3. REAKTIVNE VRSTE KISIKA (ROS)

Uzroci štetnih svojstava kisika su bili nejasni sve do objavljivanja Gershmanove teorije o toksičnosti kisika preko slobodnih radikala 1954. godine, koja navodi da se toksičnost kisika događa zbog djelomično reduciranih oblika kisika. Nakon Gershmana, Harmanovo istraživanje slobodnih radikala u biološkim sustavima rezultira tvrdnjom da slobodni radikali igraju ulogu u procesu starenja. Ovaj je rad postupno potaknuo intenzivno istraživanje na području slobodnih radikala u biološkim sustavima. Drugo razdoblje istraživanja slobodnih radikala u biološkim sustavima započelo je 1969. godine kada su McCord i Fridovich otkrili enzim superoksid-dismutazu (SOD) i time pružili uvjerljive dokaze o važnosti slobodnih radikala u živim sustavima, dok treće razdoblje istraživanja slobodnih radikala u biološkim sustavima započinje 1977. godine kada su Mittal i Murad dali dokaze da hidroksilni radikal stimulira aktivaciju gvanilat-ciklaze i stvaranje "drugog glasnika", cikličkog gvanozin monofosfata. Od tada je prikupljen veliki broj dokaza da se životni sustavi ne prilagođavaju samo suživotu sa slobodnim radikalima već da su razvili i razne mehanizme za upotrebu slobodnih radikala u različitim fiziološkim funkcijama.[3]

ROS su proizvodi normalnog staničnog metabolizma. Te su prepoznatljivi u obje uloge, i kao štetna i kao korisna vrsta za životne sustave. Korisni učinci ROS-a se javljaju pri niskim / umjerenim koncentracijama i uključuju fiziološke uloge u staničnim odgovorima na povredu, kao na primjer u obrani od infektivnih sredstava i u funkciji brojnih staničnih signalnih sustava.[3]

Slobodni radikali se mogu definirati kao molekule ili molekularni fragmenti koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u atomskim ili molekularnim orbitalima. Takav nespareni elektron obično daje značajan stupanj reaktivnosti slobodnom radikalu. Radikali koji potječu od kisika predstavljaju najvažniju skupinu radikalnih vrsta koji nastaju u živim sustavima. Molekularni kisik ima jedinstvenu elektronsku konfiguraciju, i sam je po sebi radikal. Dodavanje jednog elektrona dikisiku tvori superoksidni anionski radikal ($O_2^{\cdot -}$). Superoksidni anion, koji proizlazi kroz metaboličke procese ili nakon aktivacije kisika fizikalnim zračenjem, smatra se "primarnim" ROS-om i može dalje reagirati s drugim molekulama pri čemu nastaju "sekundarni" ROS, bilo izravno ili pretežno putem enzima ili metalima kataliziranih procesa.[3]

Proizvodnja superoksida javlja se uglavnom unutar mitohondrija stanice. Mitohondrijski lanac prijenosa elektrona je glavni izvor ATP u stanicama sisavaca, i stoga je neophodan za život. Tijekom prijenosa energije, mali broj elektrona prerano prelazi na kisik, stvarajući radikal superoksid oslobođen kisika, koji je uključen u patofiziologiju različitih bolesti. Mjerenja na submitohondrijskim česticama upućuju na gornju granicu preranog prelaska svih elektrona u transportnom lancu kako bi se stvorio superoksid od 1-3% [3]

Pri visokim koncentracijama, ROS mogu biti važan posrednik kod oštećenja staničnih struktura, nukleinskih kiselina, lipida i proteina. Poznato je da hidroksil radikal reagira sa svim komponentama molekule DNA, oštećujući i baze purina i pirimidina, kao i deoksiribozni kostur. Trajna modifikacija genetskog materijala koja proizlazi iz ovakvih "oksidativnih oštećenja" predstavlja prvi korak koji uključuje mutagenezu, karcinogenezu i starenje.[3]

### 1.3.1. OKSIDATIVNI STRES

Štetni učinak slobodnih radikala koji uzrokuju moguću biološku štetu naziva se oksidativni stres. To se događa u biološkim sustavima kada postoji prekomjerna proizvodnja ROS-a s jedne strane, i nedostatak enzimskih i neenzimskih antioksidansa s druge strane. Drugim riječima, oksidativni stres proizlazi iz metaboličkih reakcija koje koriste kisik i predstavlja poremećaj u ravnotežnom statusu antioksidativnih reakcija u živim organizmima. Višak ROS-a može oštetiti stanične lipide, proteine ili DNA koji inhibiraju njihovu normalnu funkciju. Zbog toga je oksidativni stres povezan s brojnim ljudskim bolestima kao i s procesom starenja. Delikatna ravnoteža između korisnih i štetnih učinaka slobodnih radikala je vrlo važan aspekt živih organizama.[3]

Izloženost slobodnim radikalima iz raznih izvora potakla je organizme da razviju niz obrambenih mehanizama. Obrambeni mehanizmi protiv oksidativnog stresa izazvanog slobodnim radikalima uključuju:

- preventivne mehanizme,
- mehanizme popravka,

- fizičku obranu,
- antioksidacijsku obranu.[3]

Oksidativni stres je impliciran u raznim patološkim stanjima uključujući kardiovaskularne bolesti, rak, dijabetes, neurološke poremećaje, ishemiju, i starenje te druge bolesti. Ove bolesti spadaju u dvije skupine:

- prva skupina uključuje bolesti karakterizirane prooksidansima koji premještaju tiol / disulfid redoks stanje i oštećuju toleranciju glukoze - tzv. "mitohondrijski oksidativni stres" (karcinom i dijabetes),
- druga skupina uključuje bolesti karakterizirane "upalnim oksidativnim uvjetima" i pojačanim djelovanjem bilo NAD(P)H-oksidaze (koja dovodi do ateroskleroze i kronične upale) ili stvaranje ROS-a preko ksantin-oksidaze (implicirano u ishemiji i reperfuzijskoj ozljedi).[3]

Proces starenja velikim je dijelom uzrokovan štetnim posljedicama djelovanja slobodnih radikala (lipidna peroksidacija, oštećenje DNA, oksidacija proteina). Uvjerljivi dokazi o povezanosti oksidativnog stresa i akutnih i kroničnih bolesti leže na potvrđenim biomarkerima oksidativnog stresa. Takvi biomarkeri moraju se objektivno mjeriti i procijeniti na zdravim i oboljelim osobama kroz dulje vrijeme. [3]

#### 1.3.1.1. Rak

Oksidativni stres potiče staničnu redoksnu neravnotežu koja je prisutna u različitim stanicama raka u usporedbi s normalnim stanicama. Redoksna neravnoteža može biti povezana s onkogenom stimulacijom. Trajna modifikacija genetskog materijala nastala zbog "oksidativnog oštećenja" predstavlja prvi korak koji uključuje mutagenezu, karcinogenezu i starenje. Mutacija DNA je kritičan korak u karcinogenezi. Povišene razine oksidativnih DNA lezija uočene su kod različitih tumora, snažno implicirajući takvu štetu u etiologiji raka. Oštećenje DNA inducirano ROS-om uključuje uništavanje jedno- ili dvolančane DNA, modifikicije purina, pirimidina ili deoksiriboze, te DNA-križne veze. Oštećenje DNA može dovesti do zaustavljanja ili indukcije transkripcije, indukcije putova

prijenosa signala, pogrešaka replikacije i genomske nestabilnosti, a svi su povezani s karcinogenezom. Najčešće proučavana DNA lezija je formiranje 8-OH-G. Ova lezija je važna jer se relativno lako formira, kao i zbog mutagenosti zbog čega može služiti kao potencijalni biomarker karcinogeneze. Oštećenje DNA, mutacije i promjena ekspresije gena ključni su faktori u procesu karcinogeneze, a uključenost oksidansa izgledan je zajednički nazivnik svih tih događaja.[3]

Čini se da su mnogi biološki učinci antioksidansa povezani s njihovom sposobnošću, ne samo da uklanjaju štetne slobodne radikale nego i moduliraju puteve stanične signalizacije. Tako modulacija puteva stanične signalizacije antioksidansima može potencijalno pomoći spriječiti rak bilo:

- očuvanjem regulacije normalnog staničnog ciklusa,
- inhibiranjem proliferacije i induciranjem apoptoze,
- inhibiranjem tumorske invazije i angiogeneze,
- suzbijanjem upale.[3]

#### 1.3.1.2. Kardiovaskularne bolesti

Oksidativni stres uzrokovan ROS-om u srčanim i vaskularnim miocitima povezan je s ozljedom kardiovaskularnog tkiva. Bez obzira na izravne dokaze, veze između oksidativnog stresa i kardiovaskularnih bolesti, oksidativni stres induciran ROS-om igra ulogu u raznim kardiovaskularnim bolestima kao što su ateroskleroza, ishemijska bolest srca, hipertenzija, kardiomiopatija, srčana hipertrofija i kongestivno zatajenje srca. Glavni izvori oksidativnog stresa u kardiovaskularnom sustavu uključuju:

- enzim ksantin-oksidoreduktazu (XOR),
- enzim NAD(P)H-oksidazu,
- NOS-sintetazu,
- mitohondrijske citokrome,
- i hemoglobin.[3]

#### 1.3.1.3. Ishemijska/reperfuzijska ozljeda

Ishemijska/reperfuzijska ozljeda je klinički relevantan problem koji nastaje kao oštećenje miokarda nakon restrukturiranja krvi poslije kritičnog razdoblja koronarne okluzije. Velika količina ROS-a koja se vidi tijekom reperfuzije može potjecati iz različitih staničnih izvora za razliku od one koja se vidi tijekom ishemije. Masivna proizvodnja ROS-a tijekom ishemije/reperfuzije zauzvrat dovodi do ozljede tkiva, uzrokujući tako ozbiljne komplikacije kod transplantacije organa, moždanog udara i infarkta miokarda.[3]

#### 1.3.1.4. Reumatoidni artritis

Reumatoidni artritis je autoimuna bolest koja uzrokuje kroničnu upalu zglobova i tkiva oko zglobova infiltracijom makrofaga i aktiviranih T-stanica. Patogeneza ove bolesti pretežno je povezana sa stvaranjem slobodnih radikala na mjestu upale. Oksidativna ozljeda i upalni status u raznim reumatskim bolestima potvrđena je povećanom razinom izoprostana i prostaglandina u serumu i sinovijalnoj tekućini.[3]

#### 1.3.1.5. Dijabetes

Relativno mali broj (10%) pacijenata koji pate od dijabetesa imaju tip 1 ili dijabetes ovisan o inzulinu. Međutim, većina pacijenata s dijabetesom nije ovisna o inzulinu i sposobna ga je barem inicijalno proizvoditi, ali su manjkavi u njihovom staničnom odgovoru. Ova vrsta dijabetesa je dijabetes tipa 2 i najčešći je oblik dijabetesa. Smanjenje unosa glukoze u mišićno i masno tkivo dovodi do kronične ekstracelularne hiperglikemije koja rezultira oštećenjem tkiva i patofiziološkim komplikacijama, uključujući bolesti srca, aterosklerozu, oštećenje perifernog živca, retinopatiju i druge. Smatra se da je povećanje oksidativnog stresa jedan od glavnih uzroka dijabetičkih komplikacija izazvanih hiperglikemijom. Ti izvori uključuju oksidacijsku fosforilaciju, autooksidaciju glukoze, NAD(P)H oksidazu, lipooksigenazu, citokrom P450 monooksigenazu i sintazu dušikovog oksida (NOS).[3]

#### 1.3.1.6. Neurološki poremećaji

Mozak je posebno ranjiv na oksidativno oštećenje zbog svog visokog iskorištenja kisika, visokog sadržaja oksidirajućih polinezasićenih masnih kiselina i prisutnosti redoks-aktivnih metala (Cu, Fe). Oksidativni stres se povećava s dobi i zbog toga se može smatrati važnim uzročnikom u nekoliko neurodegenerativnih bolesti.[3]

##### 1.3.1.6.1. Alzheimerova bolest

Mozak bolesnika s Alzheimerovom bolešću (engl. *Alzheimer's disease*, AD) pokazuje značajnu količinu oksidativnog oštećenja povezanog s nakupljanjem amiloid-$\beta$ peptida (A$\beta$), kao i taloženje neurofibrilnih čvorova i neurofilnih niti. A$\beta$ je glavni sastojak senilnih plakova i cerebrovaskularnih amiloidnih naslaga kod pacijenata s AD.[3]

##### 1.3.1.6.2. Parkinsonova bolest

Parkinsonova bolest (engl. *Parkinson's disease*, PD) uključuje selektivni gubitak neurona u području srednjeg mozga pod nazivom *substantia nigra*. Stanice *substantia nigra* koriste dopamin da komuniciraju sa stanicama u drugom području mozga pod nazivom *stratium*. Dakle, reduciranje razine nigralnog dopamina rezultira smanjenjem strijatalnog dopamina za koji se vjeruje da uzrokuje simptome PD. [3]

Većina studija istražuje učinak oksidativnog stresa koji doprinosi kaskadi događaja koji dovode do degeneracije dopaminske stanice u PD. Pojava oksidativnog stresa u PD potpomognuta je i *postmortem* studijama i studijama koje pokazuju potencijal oksidativnog stresa da potakne degeneraciju nigralnih stanica.[3]

Budući da oksidativni stres predstavlja dio kaskade biokemijskih promjena koje dovode do dopaminergičke smrti, jedan od glavnih problema u razumijevanju patogeneze PD-a je odvajanje učinka i opsega oksidativnog stresa od ostalih komponenata kaskade koje same mogu igrati primarnu ulogu u pokretanju ROS-a.[3]

### 1.3.1.7. Starenje

Proces starenja može se definirati kao progresivni pad fizioloških funkcija organizma nakon reproduktivne faze života. Teorija slobodnih radikala starenja prvi put je uvedena 1956. godine od strane Denham Harmana koji je predložio koncept slobodnih radikala koji igraju ulogu u procesu starenja. Općenito, postoje dvije glavne teorije koje opisuju proces starenja: teorije akumulacije oštećenja i genetske teorije. Teorija akumulacije oštećenja uključuje "teoriju slobodnih radikala", "teoriju glikacije", "teoriju membrane", "entropijsku teoriju" i druge, među kojima je "teorija slobodnih radikala" vjerojatno najsloženiji pristup za objašnjavanje procesa starenja. "Teorija slobodnih radikala" temelji se na činjenici da slučajni štetni učinci slobodnih radikala proizvedenih tijekom aerobnog metabolizma uzrokuju oštećenje DNA, lipida i proteina i nakupljaju se tijekom vremena.[3]

Geneza starenja počinje s kisikom, zauzimajući krajnji položaj u lancu transporta elektrona. Čak i u idealnim uvjetima, neki elektroni "cure" iz lanca elektronskog transporta. Takvi propušteni elektroni reagiraju s kisikom pri čemu nastaju superoksidni radikali. U fiziološkim uvjetima oko 1-3% molekula kisika u mitohondrijima pretvori u superoksid. Primarno mjesto oštećenja radikalnog kisika iz superoksidnog radikala je mitohondrijska DNA (mtDNA). Stanica popravlja velik dio oštećenja na nuklearnoj DNA (nDNA), ali mtDNA se ne može lako popraviti. Zbog toga se velika oštećenja mtDNA akumuliraju tijekom vremena i isključuju mitohondrije, uzrokujući staničnu smrt i starenje organizma.[3]

Akumulacija oštećenja izazvanih slobodnim radikalima ilustrirana je dobnim porastom razine serumskog 8-OH-dG kod osoba bez bolesti, u dobi od 15-91 godina. Aktivnost popravaka opada s dobi. Međutim, nekoliko istraživanja na životinjama pokazalo je da povećanje 8-OH-dG, povezano s dobi, u nuklearnoj i mitohondrijskoj DNA je zbog povećanja osjetljivosti tkiva na oksidacijsko oštećenje, a ne zbog smanjenja sposobnosti popravka s godinama. Zanimljivo je da se antioksidativni status ne mijenja značajno s dobi. Ljudska istraživanja pokazala su da se usporedba razina SOD-a, GSH, katalaze i ceruloplazmina među dobnim skupinama od 35-39, 50-54 i 65-69 godina nije promijenila.[3]

## 1.4. MJERENJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI/KAPACITETA

Termini antioksidativna aktivnost i antioksidativni kapacitet imaju različita značenja: antioksidativna aktivnost bavi se kinetikom reakcije između antioksidansa i prooksidansa ili radikala kojeg reducira ili veže, dok antioksidativni kapacitet mjeri učinkovitost termodinamičke konverzije uzorka oksidansa za vrijeme trajanja reakcije s antioksidansom.[11]

Mjerenje antioksidativne aktivnosti/kapaciteta bioloških tekućina i hrane provodi se za dijagnozu i liječenje bolesti povezanih s oksidativnim stresom u kliničkoj biokemiji, za značajnu usporedbu hrane s obzirom na sadržaj antioksidansa i za kontrolu varijacija unutar ili između proizvoda. Antioksidativna mjerenja još nisu prilagođena standardnim protokolima u medicinskoj dijagnozi i liječenju unatoč dokazanim promjenama antioksidativnog kapaciteta seruma u određenim bolestima (npr. ukupni antioksidativni kapacitet (engl. *Total Antioxidant Capacity*, TAC) humanog seruma povećan je u bolesnika s dijalizom kroničnog zatajenja bubrega uslijed visokih vrijednosti urata, ali je došlo do značajne redukcije nakon kemodijalize; antioksidativna aktivnost (AOA) seruma bila je znatno niža kod akutnog infarkta miokarda i kroničnih bolesnika s limfocitnom leukemijom u usporedbi s kontrolnim skupinama). Dakle, idealno bi trebalo biti u stanju otkriti neke bolesti uzrokovane oksidativnim stresom i pratiti tijek medicinskih tretmana s obzirom na promjene u TAC vrijednostima unutarstaničnih tekućina i krvne plazme/seruma određenog pojedinca mjereno standardiziranim metodama. Složenost hrane i fiziološke primjene antioksidansa, odvojeno i kombinirano, zahtijevaju strogu analizu i analizu svih aspekata kemije i reakcijskih mehanizama u različitim testnim sustavima, kao i pažljivu i preciznu kvantitativnost svih uključenih reaktanata i produkata. Sadašnja literatura jasno navodi da nema široko prihvaćenog "ukupnog antioksidativnog parametra" kao nutritivnog indeksa dostupnog za označavanje hrane i bioloških tekućina zbog nedostatka standardiziranih metoda kvantitativnosti. Stoga je poželjno uspostaviti i standardizirati metode koje mogu mjeriti razinu TAC-a izravno iz ekstrakata biljne hrane i bioloških tekućina.[1]

Glavna podjela antioksidativnih ispitivanja temelji se na tipu reakcije:

- Ispitivanja bazirana na prijenosu vodikovog atoma (engl. *hydrogen atom transfer* (HAT)-*based assay*),
- Ispitivanja bazirana na prijenosu elektrona ( engl. *electron transfer* (ET)-*based assays*).[11]

HAT-temeljena ispitivanja mjere sposobnost antioksidansa da deaktivira slobodni radikal doniranjem vodikovog atoma. Ispitivanja koja se temelje na HAT mehanizmu uključuju:

- ORAC (engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*),
- TRAP (engl. *Total Radical Trapping Antioxidant Parametar*),
- Metoda izbjeljivanja krocina (engl. *Crocin bleachng assay*),
- Metoda izbjeljivanja *β*-karotena (engl. *β-carotene bleaching assay*).[11]

ET-temeljena ispitivanja većinom se baziraju na reakciji antioksidansa s fluorescentim ili obojenim supstratom (oksidirajući agens) umjesto s peroksilnim radikalom. Spektrofotometrijske ET-metode mjere kapacitet antioksidansa u redukciji oksidansa, koji pri tom mijenja boju. ET-temeljena ispitivanja uključuju:

- ABTS/TEAC (engl. *2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)/Troloks equivalent antioxidant capacity*),
- DPPH (engl. *2,2-di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl*),
- Folin-Ciocalteu metoda,
- FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*),
- CUPRAC ( engl. *CUPric Reducing Antioxidant Capacity*).[11]

U idealnom slučaju, sporazum o standardiziranim metodama za ispitivanje antioksidacijom zahtijeva:

- Opće smjernice za primjenu testova, uključujući točan opis ispitnih uvjeta, eksperimentalne aparature i stabilnost reagensa,
- Sve nove metode da budu valjano validirane unutar njihovog okvira, povezane s internom i međulaboratorijskom provjerom valjanosti, standardizacijom, unutarnjom kontrolom kvalitete, provjeravanjem sposobnosti i analitičkim osiguranjem kvalitete,

- Rezultati koji omogućuju razumnu usporedbu sadržaja antioksidansa u hrani, lijekovima i drugim komercijalnim proizvodima,
- Pružanje mjera za zadovoljavanje potreba standarda kvalitete za regulatorna pitanja i zdravstvene tvrdnje.[1]

Nedavno su razvijeni novi pristupi kao što je CUPRAC TAC analiza (uvedena u svjetskoj literaturi 2004. godine). Trenutni smjer CUPRAC metodologije može se najbolje opisati kao samodostatan i integrirani slijed mjerenja koji pružaju koristan "antioksidativni i antiradikalni testni paket".[1]

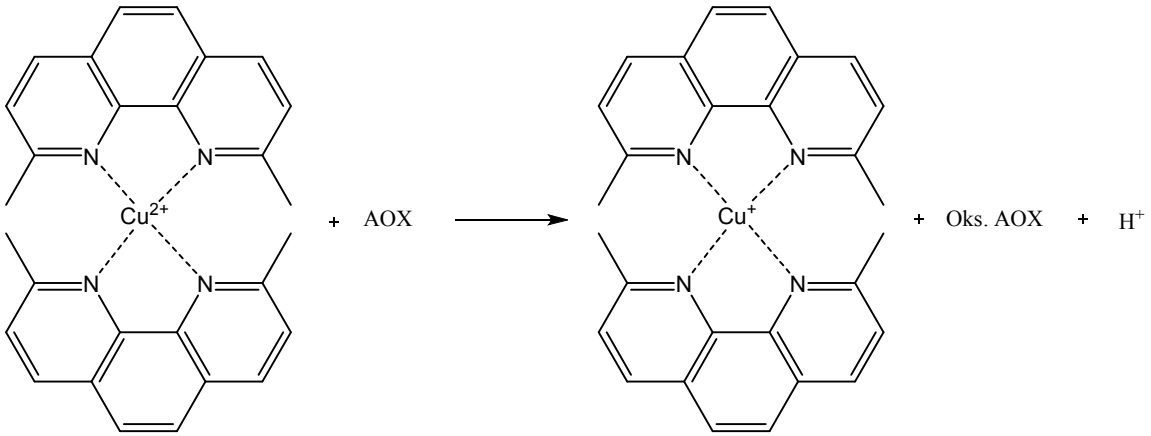
Složenost i raznolikost ispitivanih istraživačkih tema doveli su do razvoja mnoštva testova, ali nažalost nijedan nije stekao univerzalno prihvaćanje. Dakle, jedan od glavnih izazova u testiranju antioksidansa je znati koja je metoda najprikladnija za određenu primjenu. Budući da antioksidansi mogu izvršiti svoj učinak kroz različite mehanizme, potrebno je pojasniti koja se funkcija antioksidansa mjeri i, prema tome se metoda analize antioksidansa treba odabrati.[1]

### 1.4.1. CUPRAC test

Potrebno je razviti relativno objektivno ispitivanje antioksidansa kako bismo omogućili precizno, reproducibilno mjerenje TAC-a raznih prehrambenih proizvoda i bioloških tekućina, čime se omogućuje razvrstavanje hranjivih tvari u odnosu na njihove antioksidacijske vrijednosti i pokazuju dobre izglede da budu korisni širokom rasponu znanstvenika koji se bave oksidativnim stresom. Taj je zahtjev bio bitan cilj razvoja CUPRAC testa koji je razvijen u analitičkim kemijskim laboratorijima Sveučilišta u Istanbulu.[2]

CUPRAC Test određivanja TAC-a je star samo 13 godina, ali je razgranat u različite modificirane metode mjerenja antioksidativnog kapaciteta/aktivnosti koja je povezana s Cu(II)-Cu(I) redukcijom u prisutnosti selektivnog Cu(I)-stabiliziranog liganda, neokuproina (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin). Također je primijenjen na različite matrice koje sadrže i hidrofilne i lipofilne antioksidanse.[1]

Metoda se temelji na mjerenju apsorbancije CUPRAC kromofora, Cu(I)-neokuproin (Nc) kelata, nastalog kao posljedica redoks reakcije antioksidansa s CUPRAC reagensom, bis(neokuproin)bakar(II) kationom [Cu(II)-Nc], gdje se apsorbancija bilježi pri valnoj duljini od 450 nm.[1]




Slika 1. CUPRAC reakcija i kromofor: Cu(I)-Nc kelatni kation.[1]

Kromogeni oksidativni reagens razvijene CUPRAC metode, reagira s n-elektron redukcijskim antioksidansima (AOX), sukladno jednadžbi:

$nCu(Nc)_2^{2+}$ + n-elektron reducens ↔ $nCu(Nc)_2^{+}$ + n-elektron oksidirani produkt + $nH^+$

Reaktivne grupe antioksidansa oksidiraju, dok se Cu(II)-Nc reducira u žuto-narančastog Cu(I)-Nc kelata. Iako je koncentracija $Cu^{2+}$ iona u stehiometrijskom suvišku u odnosu na Nc u CUPRAC reagensu, za pomicanje ravnoteže redoks reakcije u desno, stvarni oksidans je $Cu(Nc)_2^{2+}$, a ne isključivo $Cu^{2+}$, jer je standardni redoks potencijal Cu(II/I)-Nc 0.6 V, koji je mnogo veći od $Cu^{2+}/Cu^{+}$ para (0.17 V). Razlog tome je što je Cu(I)-Nc savršen tetraedar zbog $d^{10}$-elektronske konfiguracije Cu(I) koji ima $sp^3$ hibridizaciju, dok dvije molekule neokuproina daju iskrivljenu tetraedarsku strukturu Cu(II) koja ima $d^9$-konfiguraciju, time selektivno stabilizira Cu(I) prije Cu(II). Kao rezultat, antioksidansi se

oksidiraju mnogo brže i učinkovitije s Cu(II)-Nc nego s $Cu^{2+}$, a količina obojenog produkta (npr. Cu(I)-Nc kelata) koja se pojavljuje na kraju redoks reakcije je ekvivalentan s izreagiranim Cu(II)-Nc.[1]

Zbog povoljnog redoks potencijala u neutralnom mediju, CUPRAC metoda ima veću priliku za simulacijom fiziološki važnih redoks reakcija antioksidativnih spojeva, uključujući serumske antioksidanse. U normalnoj CUPRAC metodi ($CUPRAC_N$), oksidacijske reakcije većine hranjivih/bioloških antioksidansa u suštini su gotove unutar 30 minuta. Antioksidansi sa sporijim reagiranjem mogu trebati inkubaciju na povišenoj temperaturi kako bi dovršili svoju oksidaciju s CUPRAC reagensom. Iako je po protokolu vremenski period CUPRAC testa postavljen na 30 minuta, nekoliko antioksidansa s visokim redoksnim potencijalima ne mogu tako lako doseći zasićenje apsorpcije.[1]

#### 1.4.1.1. Prednosti CUPRAC testa i njegovih modifikacija

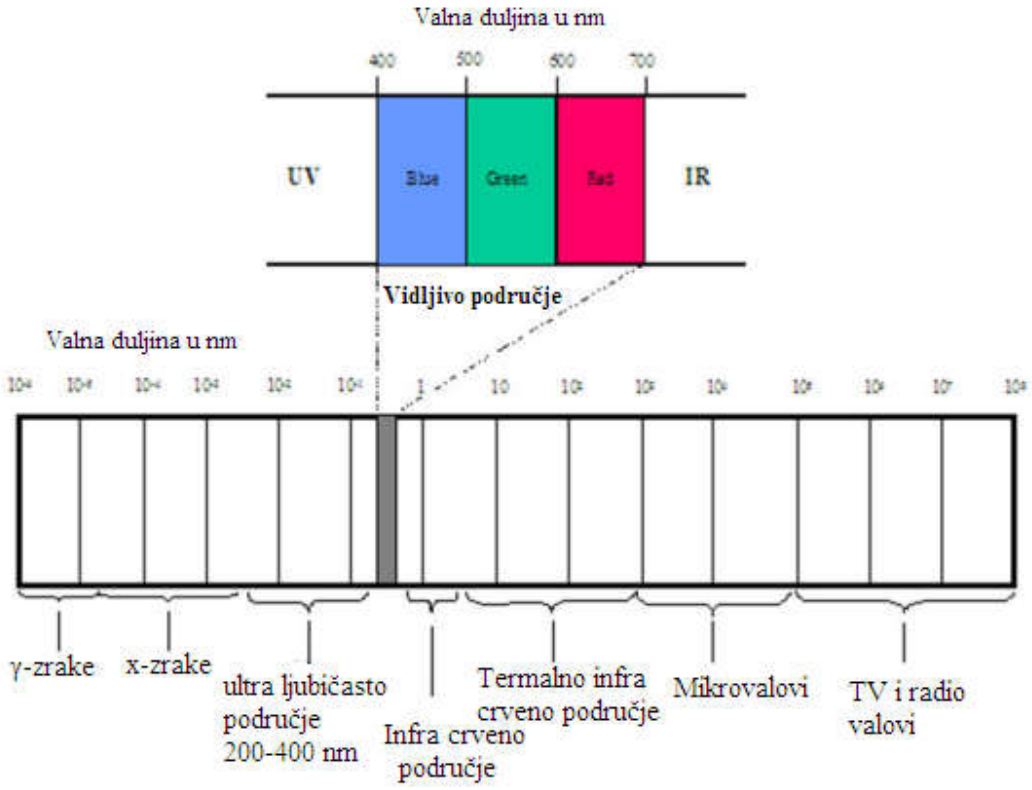
Prednosti CUPRAC metode mogu se sažeti kako slijedi:

- CUPRAC reagens može brzo oksidirati antioksidanse tiolnog tipa, dok ET-metode na osnovi željeza(III) kao što je FRAP mogu samo mjeriti ograničene tiole kao što je GSH s ozbiljnom negativnom pogreškom.[1]
- Reagens je selektivan, jer ima niži redoksni potencijal od Fe(III)/Fe(II) para u prisutnosti orto-fenantrolin tipa. Standardni potencijal Cu(II, I)-Nc redoks parova je 0.6 V, blizu onom kod $ABTS^{\cdot+}$/ABTS ($E°=0.86$ V) i kod FRAP-a ($E°=0.70$ V). Jednostavni šećeri i limunska kiselina ne oksidiraju s CUPRAC reagensom.[2]
- Reagens je mnogo stabilniji i lako dostupan od kromogenih radikal reagensa (npr. ABTS i DPPH).[1]
- CUPRAC metoda pokazuje svestranost za određivanje hidrofilnih i lipofilnih antioksidansa, jer CUPRAC kromofor, bis(neokuproin)-Cu(I) kelat, ima unipozitivan naboj pa ima manje ion-dipol interakcija s vodom, a kelatni prstenovi su u suštini hidrofobni. Tako je kompatibilan s vodenim i organskim otapalima (alkohol, aceton, diklormetan, itd.) i mješavinama alkohol-voda.[1]

- Redoks reakcija koja dovodi do Cu(I)-Nc kromofora relativno je neosjetljiva na niz parametara (npr. zrak, sunčeva svjetlost, vlažnost i, do određene mjere pH) koji negativno utječu na radikalne reagense kao što je DPPH.[1]
- CUPRAC reagens može se adsorbirati na membranu kation izmjenjivača perfluor-sulfonata, čime se omogućuje proizvodnja senzora antioksidansa s niskom cijenom, linearnog odgovora. CUPRAC je također prilagodljiv za online HPLC aplikacije uz upotrebu postkolumnog reaktora, što omogućuje osjetljivo određivanje antioksidansa pojedinačno.[1]
- CUPRAC obično daje savršene krivulje odnosa apsorbancije i koncentracije ($r \approx 0.999$) u širokom rasponu koncentracija, za razliku od nekih drugih metoda koje daju polinomne krivulje.[1]
- CUPRAC spektrofotometrijska metoda poštuje Beerov zakon po pitanju aditivnosti apsorbancija zbog pojedinačnih sastojaka antioksidansa jer se nakon redukcije CUPRAC reagensa s antioksidansima formira jedan kromofor, Cu-neokuproin. Slijedom toga, CUPRAC-TAC vrijednosti antioksidansa u složenim smjesama savršeno su aditivne.[1]
- CUPRAC djeluje pri gotovo fiziološkom pH (pH 7 amonijevog acetatnog pufera) za razliku od nerealnih kiselih uvjeta (pH 3,6) FRAP-a ili bazičnih uvjeta (pH 10) koji su potrebni za fenole da disociraju protone u Folin-Ciocalteu testu.[1]
- CUPRAC metoda je nedavno uvedena u mikroposude, omogućujući *in vitro* procjenu antioksidativnog kapaciteta endogenih i dijetalnih molekula, kao i određivanje TAC-a ljudskih bioloških uzoraka.[1]

## 1.5. SPEKTROFOTOMETRIJA

Već generacijama nakon što su Gustav Kirchhoff i Robert Bunsen zaključili da gotovo sve molekule u prirodi apsorbiraju i emitiraju svjetlo na različitim valnim duljinama, znanstvenici su koristili ovo znanje o spektroskopiji u mnogim znanstvenim disciplinama. Kao rezultat toga, spektroskopski instrumenti koji mjere apsorpciju svjetlosti imaju glavnu ulogu u biološkim i kemijskim laboratorijima diljem svijeta.[7]



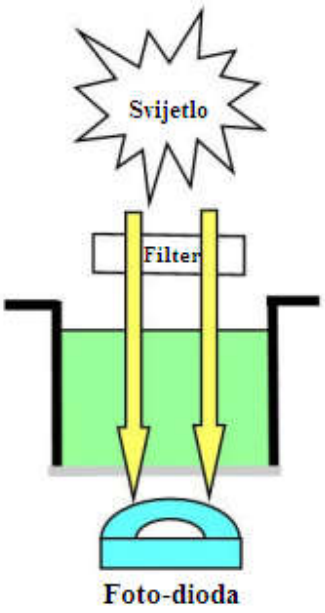

Slika 2. Shematski prikaz elektromagnetskog spektra.[8]

U spektrofotometrijske tehnike spadaju:

- Apsorpcija,
- Emisija,
- Raspršivanje,
- Ultraljubičasta i vidljiva apsorpcijska spektroskopija,
- Dvosmjerni UV/VIS spektrofotometar,
- Fluorescentna spektroskopija.[9]

### 1.5.1. APSORBANCIJA

Apsorbancija je mjerenje količine svjetlosti apsorbirane tijekom prolaska kroz uzorak. Izvor svjetlosti odabrane valne duljine osvjetljava uzorak dok detektor mjeri količinu neapsorbirane svjetlosti.[8]



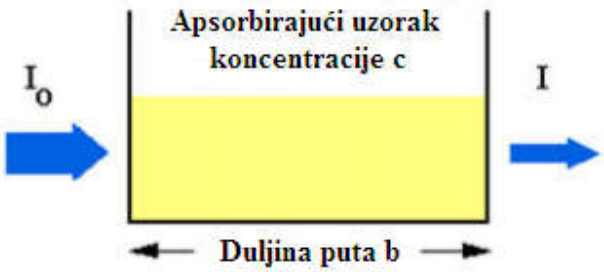

Slika 3. Pojednostavljena detekcija apsorbancije.[8]

Kada atomi ili molekule apsorbiraju svjetlost, dolazna energija potiče kvantiziranu strukturu na višu razinu energije. Vrsta ekscitacije ovisi o valnoj duljini svjetla. Elektroni se promoviraju u više orbite ultraljubičastom ili vidljivom svjetlošću, vibracije su pobuđene infracrvenim svjetlom, a mikrovalovi potiču rotacije. Apsorpcijski spektar je apsorpcija svjetla kao funkcija valne duljine. Spektar atoma ili molekule ovisi o energijskoj razini strukture, a apsorpcijski spektri korisni su za identifikaciju spojeva. Mjerenje koncentracije apsorbirajuće vrste u uzorku postiže se primjenom Beer-Lambertova zakona.[8]

Beer-Lambertov zakon je linearni odnos između apsorbancije i koncentracije apsorbirane vrste. Općenito, Beer-Lambertov zakon se piše: $A=a(\lambda)*b*c$ ; gdje je A izmjerena apsorpcija, $a(\lambda)$ je apsorpcijski koeficijent ovisan o valnoj duljini, b je duljina puta, a c je koncentracija analita. Prilikom rada u koncentracijskim jedinicama molarnosti, Beer-Lambertov zakon napisan je kao: $A = \varepsilon*b*c$; gdje je $\varepsilon$ koeficijent molarne apsorpcije

ovisan o valnoj duljini s jedinicama $M^{-1}$ $cm^{-1}$. Eksperimentalna mjerenja obično se rade u smislu transmisije (T), što je definirano kao $T = I/I_o$; gdje je I intenzitet svjetlosti nakon što prođe kroz uzorak i $I_o$ je početni intenzitet svjetlosti.[9]

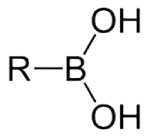
Odnos između A i T je: $A = -\log T = -\log(I/I_o)$.[8]




Slika 4. Shematski prikaz Beer-Lambertova zakona.[8]

## 1.6. BORONIČNE KISELINE

Strukturno gledajući, boronične kiseline su trovalentni organski spojevi koji sadrže atom bora. Posjeduju jedan alkilni supstituent, R, te dvije hidroksilne skupine koje popunjavaju preostale valencije atoma bora. Sa samo šest valentnih elektrona i posljedičnim nedostatkom dva elektrona, $sp^2$ hibridizirani atom bora posjeduje slobodnu p orbitalu. Ta orbitala niže energije je ortogonalna trima supstituentima koji su orjentirani u trigonalnu planarnu geometriju. Za razliku od karboksilnih kiselina, njihovih ugljikovih analoga, boronične kiseline nisu nađene u prirodi. Ovi abiotski spojevi su dobiveni sintetskim putem iz primarnih izvora bora. Prvu pripremu i izolaciju boronične kiseline predstavio je Frankland 1860. godine. Boronične kiseline su proizvodi dvostruke oksidacije borana.[6]

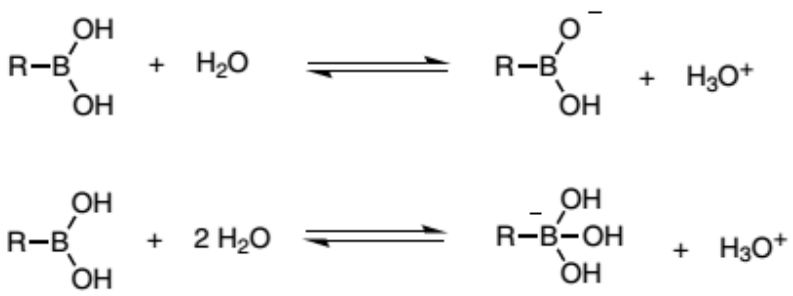



Slika 5. Opća struktruna formula boronične kiseline.[6]

Njihova jedinstvena svojstva i reaktivnost kao blage organske Lewisove kiseline, zajedno s njihovom stabilnošću i jednostavnim rukovanjem, čini boroničnu kiselinu atraktivnom. Štoviše, zbog njihove niske toksičnosti i krajnje degradacije u bornu kiselinu, boronične kiseline se mogu smatrati "zelenim" (ekološki prihvatljivim) spojevima. One su krute tvari i obično postoje kao smjese oligomernih anhidrida. U proteklih nekoliko godina impresivni su napreci postignuti u primjeni boroničnih kiselina u molekularnom prepoznavanju, znanosti o materijalima i katalizi. Odobrenje sredstava protiv raka Velcade®, prvi lijek stavljen na tržište koji sadrži boroničnu kiselinu dodatno potvrđuje rastući status boroničnih kiselina kao važnu klasu spojeva u kemiji i medicini.[6]

Većina boroničnih kiselina su bijele, kristalne tvari kojima se može rukovati na zraku bez posebnih mjera predostrožnosti. Na sobnoj temperaturi, boronične kiseline su kemijski stabilne i većina pokazuju stabilnost kroz dulje vremensko razdoblje. Nakon izlaganja zraku, suhi uzorci boroničnih kiselina mogu biti skloni brzom raspadu pa je često bolje držati boronične kiseline u lagano vlažnom stanju. Smatra se da koordinacija vodenih ili hidroksidnih iona u boru štiti boronične kiseline od djelovanja kisika. Komercijalni uzorci obično sadrže mali postotak vode koji može pomoći u dugoročnom očuvanju. Zbog njihove jednostavne dehidracije, boronične kiseline imaju tendenciju da daju ponešto nepouzdane vrijednosti tališta.[6]

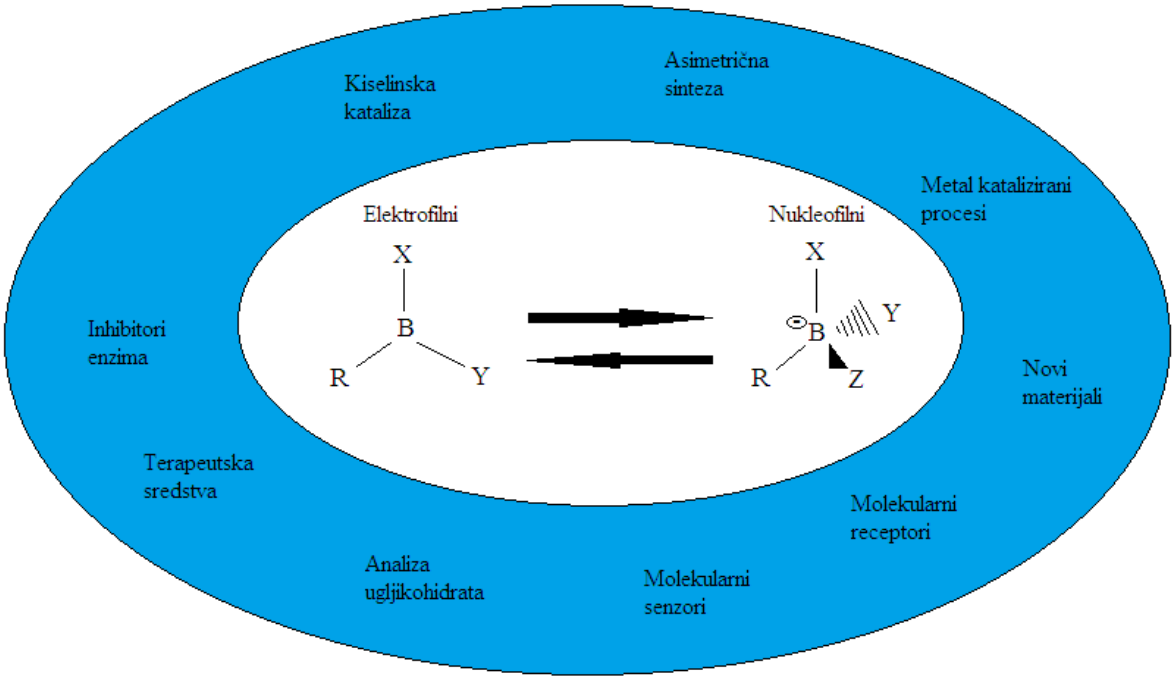
Zbog svoje oskudne valencije, boronične kiseline posjeduju praznu p-orbitalu. Ova karakteristika daje im jedinstvena svojstva kao klasu organskih Lewisovih kiselina sposobnih za koordiniranje osnovnih molekula. Pri tome, dobiveni tetraedarski adukti dobivaju konfiguraciju poput ugljika. Dakle, usprkos prisutnosti dviju hidroksilnih skupina, kiselinski karakter većine boroničnih kiselina nije onaj od Brønstedove kiseline, već od Lewisove kiseline.[6]



Slika 6. Ionizacijska ravnoteža boroničnih kiselina u vodi.[6]

Prazna p-orbitala na boru dovodi do jednostavne interkonverzije od $sp^2$ do $sp^3$ hibridizacije u prisutnosti Lewisovih baza. U vodenim medijima ova interkonverzija se lako može provesti reakcijom s vodom, tako da se neutralni i trigonalni bor pretvori u anionsku tetraedarsku geometriju. pH pri kojem se ova reakcija pojavljuje za 50% skupina boronične kiseline definira se kao pKa, a većina boroničnih kiselina ima pKa = 4,5-10. Veliki broj polimernih boroničnih kiselina opisanih u literaturi sadrži dijelove fenilboronične kiseline (-PhB$(OH)_2$). Dodavanje različitih supstituenata na fenilni prsten omogućuje podešavanje pKa tako da se polimeri boronične kiseline mogu koristiti u fiziološki relevantnom pH području.[5]

Možda je najvažnija kemijska karakteristika koja je dovela do pronalaska korisnosti boroničnih kiselina u mnoštvu biomedicinskih primjena jest mogućnost formiranja reverzibilnih kovalentnih kompleksa s 1,2- ili 1,3-diolima. U vodenim sustavima, boronične kiseline postoje u ravnoteži između nedisociranog neutralnog trigonalnog oblika i disociranog anionskog tetraedarskog oblika.[5]




Slika 7. Različite namjene boronične kiseline.[5]

Reaktivnost i svojstva boroničnih kiselina ovise o prirodi R supstituenta, odnosno o tipu ugljikove skupine direktno vezane na atom bora. Prema funkcionalnim skupinama koje sadrže, boronične kiseline se dijele na alkilne, alkenilne, alkinilne i arilne.[6]

Boronične kiseline tipično se sintetiziraju putem organometalnih međuprodukata. Godine 1931. Johnson je optimizirao sintezu boroničnih kiselina iz metilborata i Grignardovih reagensa. Vrijednost ove metode je njezina svestranost. Ranija iteracija ove reakcije iz 1909. godine bilo je dodavanje metilborata fenilmagnezij bromidu. U toj reakciji, difenilboronična kiselina bila je glavni proizvod, gdje je željena fenilboronična kiselina imala vrlo nisko iskorištenje. Optimizacija koju je kasnije proveo Johnson nastojala je neutralizirati visoku reaktivnost Gringardova reagensa dodavanjem otopine Grignarda u otopinu metilborata kap po kap pri -12 °C, što je uvelike poboljšalo iskorištenje fenilboronične kiseline. Snižavanjem temperature ispod -50 °C dovodi do još većeg iskorištenja.[12]

1983. godine, Brown i Cole objavili su poboljšanu metodu sinteze boronične kiseline. Umjesto Grignardovih reagensa, korišteni su razni organolitijski reagensi, kao i niz alkoksiborana da bi se pokušao kontrolirati broj adicija na bor.[12]

Iako su učinkoviti za jednostavne sustave, ove starije metode koje koriste organolitijev ili organomagnezijev reagens zahtijevaju vrlo specifične uvjete za optimalno iskorištenje. Visoka reaktivnost organometalnih međuprodukata sprječava postojanje elektrofilnih funkcijskih skupina, dok zahtijeva inertne anhidridne uvjete pri niskim temperaturama. Svi ovi čimbenici ograničavaju opseg reakcija, osobito u velikom ili industrijskom okruženju.[12]

Budući da su boronične kiseline postale popularnije u literaturi, pojavile su se nove metode rješavanja mnogih prethodno spomenutih nedostataka. Značajno poboljšanje sinteze tih spojeva je objavljeno 1995. godine kada su Miyaura i suradnici uspješno sintetizirali arilpinakolboronat preko paladij kataliziranog križnog vezanja aril bromida, jodida i triflata. U ovim transformacijama se često koristi diboronil ester bis(pinakolat)diboron ($B_2pin_2$).[12]

Jedna od najpoznatijih primjena boroničnih kiselina je reakcija Suzuki-Miyaura. Istaknuvši korisnost tih spojeva u procesima stvaranja veza između atoma ugljika, obilježio je početak eksponencijalnog rasta istraživanja i razvoja boroničnih kiselina i estera kao bitnih alata u organskoj sintezi. Suzuki reakcija smatra se jednim od najkorisnijih reakcija u farmaceutskoj sintezi ugljik-ugljik veza.[12]

### 1.6.1. PRIMJENA BORONIČNIH KISELINA U MEDICINI

Spojevi boronične kiseline su korisni u različitim biomedicinskim primjenama.[5]

#### 1.6.1.1. Inhibicija lipaze

Pretilost, definirana kao abnormalna ili prekomjerna masnoća koja se nagomila u mjeri koja može imati negativan utjecaj na zdravlje, glavni je problem, osobito u razvijenom svijetu.[5]

Probavni trakt mora hidrolizirati prehrambene masti prije apsorpcije. Lipaze su enzimi odgovorni za hidrolizu netopljivih hidrofobnih lipida. Lipaze hidroliziraju lipide kako bi omogućile njihovu apsorpciju preko probavnog trakta. Fenilboronične kiseline pokazale su se kao inhibitori hidrolaza (uključujući lipaze) i proteaza. Općenito se pretpostavlja da je inhibicijsko djelovanje posljedica prelaska trigonalne boronične kiseline u negativno nabijen tetraedalni kompleks sa serin-hidroksilnim grupama u aktivnom mjestu lipaza. Afinitet enzima prema boroničnim kiselinama mnogo je veći nego za tipične lipidne supstrate. Inhibitori lipaze mogu se upotrijebiti za sprečavanje hidrolize lipida i time smanjiti apsorpciju masti u probavnom traktu. Neprobavljeni trigliceridi i digliceridi se zatim uklanjaju iz tijela bez značajne apsorpcije.[5]

#### 1.6.1.2. Inhibicija HIV-a

HIV je virus koji uzrokuje sindrom stečene imunodeficijencije (SIDA). Istraživanja u svrhu liječenja ove bolesti dovela su do saznanja o potencijalnoj biomedicinskoj primjeni boronične kiseline čije skupine i dioli mogu formirati dinamički ukriženo povezan hidrogel u fiziološkim pH rasponima. Dakle, polimeri boronične kiseline stvaraju reverzibilne kovalentne interakcije s dijelovima salicil hidroksamične kiseline (SHA) na drugom polimeru. Fenilboronične kiseline tvore stabilne komplekse s diolima u neutralnom ili alkalnom okruženju. Međutim, pokazalo se da SHA također tvori stabilne komplekse s fenilboroničnom kiselinom pri blago kiselim pH vrijednostima. Hidrogelovi mogu poslužiti kao pH-osjetljivi vaginalni mikrobicidi. Kao takvi sprječavaju napad virusa na stanice, ali postoje i druge moguće primjene kao što su lizosomalni i želučani sustavi za isporuku lijeka.[5]

#### 1.6.1.3. Dijabetes

Dijabetes je kronična bolest gdje tijelo ne proizvodi ili koristi inzulin učinkovito. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) procjenjuje da je 180 milijuna ljudi oboljelo od dijabetesa, a očekuje se da će se taj broj udvostručiti do 2030. godine. Kontrola glukoze u krvi obično

se postiže putem inzulinske terapije, prakse koja je korištena još od 1921. godine. Budući da se inzulin mora podkožno ubrizgavati nekoliko puta dnevno, vrijednosti šećera u krvi moraju se redovito kontrolirati. Postoji značajan interes za razvoj sustava za očitavanje glukoze i isporuke inzulina temeljene na čisto sintetičkim komponentama. Zbog njihove sposobnosti da se kovalentno vežu s diolima (npr. šećerima), polimeri boronične kiseline pokazuju potencijal u tom pogledu.[5]

### 1.6.1.4. Očitavanje dopamina

Dopamin je katekolaminski neuroprijenosnik koji sudjeluje u stvaranju osjećaja zadovoljstva. Također igra ulogu u regulaciji kretanja, a abnormalne razine dopamina povezane su s neurološkim poremećajima kao što su shizofrenija, Huntingtonova bolest i Parkinsonova bolest. Prisutnost drugih lako oksidiranih spojeva, kao što je askorbinska kiselina, često prisutna u većim koncentracijama u uzorcima tekućina iz mozga dodatno komplicira precizna mjerenja. To je rezultiralo primjenom boroničnih kiselina i njihove jedinstvene sposobnosti vezanja s diolima da bi se povećala selektivnost elektroda za mjerenje koncentracija dopamina.[5]

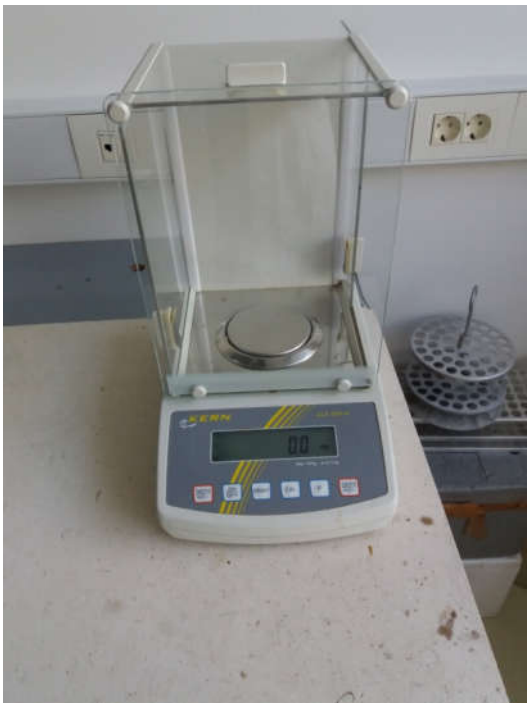
S obzirom na prilično jedinstvenu sposobnost boroničnih kiselina da se vežu na saharide u biološkim sustavima i korist od iskorištavanja ovog fenomena na više načina, ostaje značajan broj neistraženih primjena specifične za polimere boronične kiseline. Mnoge biološke primjene boroničnih kiselina oslanjaju se na interakcije s diolima (npr. šećerima). Međutim, postoje dva specifična izazova na kojih se mora obraditi pažnja pri izradi novih biomaterijala boronične kiseline koje djeluju s diolima. Većina fenilboroničnih kiselina ima pKa vrijednosti koje su značajno više od fiziološkog pH. Drugo, kompleksi između boroničnih kiselina i diolnih spojeva često pokazuju ograničenu specifičnost. Potrebni su novi pristupi za povećanje specifičnosti. Unatoč ovim izazovima, polimeri boronične kiseline pokazali su veliko obećanje za primjene u raznim biološkim primjenama.[5]

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. APARATURA

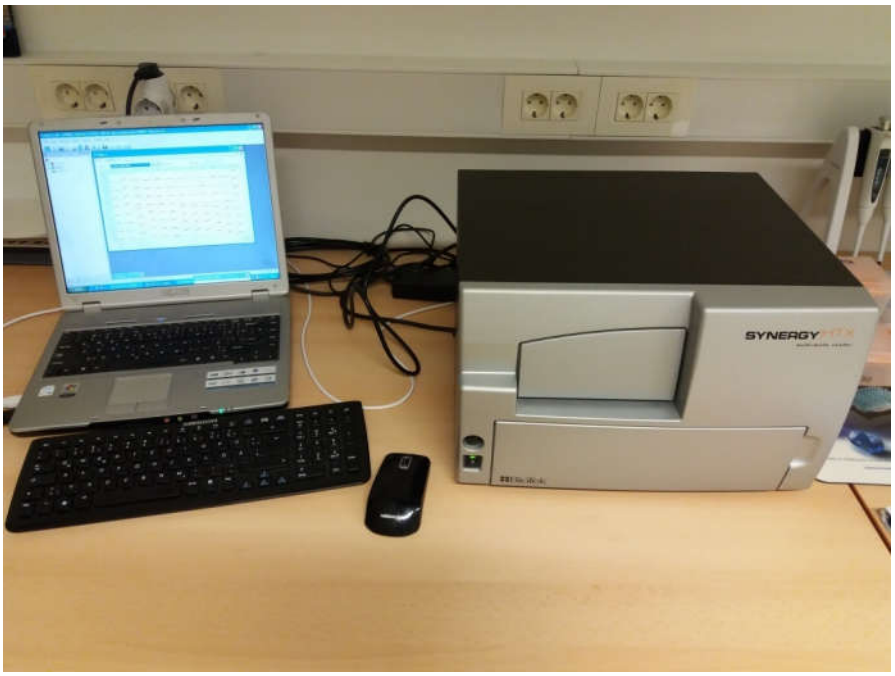
Za eksperimentalna mjerenja korišteni su:

- Digitalna vaga (Kern ALS 120-4), Slika 8.



Slika 8. Digitalna vaga (Kern ALS 120-4).

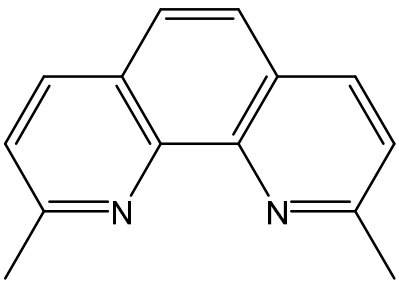
- Spektrofotometar Synergy HTX S1LFA, BioTek, Winooski, USA, Slika 9.



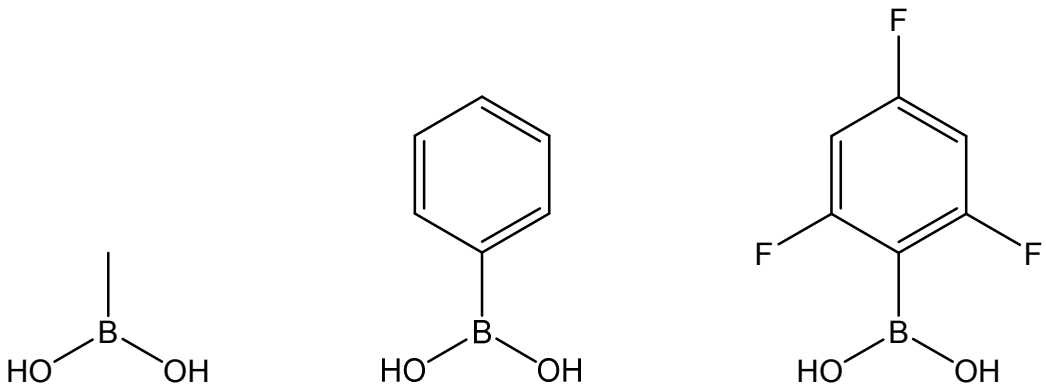

Slika 9. Spektrofotometar Synergy HTX S1LFA, BioTek, Winooski, USA.

## 2.2. KEMIKALIJE

- Bakrov(II) klorid ($CuCl_2$) 10 mM
- 2,9-Dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin, Nc) 7,5 mM
- Fosfatni pufer pH 7 40 mM




Slika 10. Neokuproin




a) b) c)

Slika 11. Strukture boroničnih kiselina: a) metil boronična kiselina, b) fenil boronična kiselina, c) 2,4,6-trifluor fenil boronična kiselina

## 2.3. PRIPREMA KEMIKALIJA

Priprema otopina za analizu:

Tablica 2.1. Prikaz s osnovnim podacima za ispitivane spojeve

| **Spoj** | **Metil boronična kiselina** | **Fenil boronična kiselina** | **2,4,6-trifluor fenil boronična kiselina** |
|---|---|---|---|
| **Molarna masa** | 59,86 g/mol | 121,93 g/mol | 175,90 g/mol |
| **Agregatno stanje** | Kruto | Kruto | Kruto |
| **Gustoća** | 0,965 g/cm$^3$ | 1,139 g/cm$^3$ | 1,44 g/cm$^3$ |
| **Topljivost** | MeOH/$H_2O$ | MeOH/EtOH | MeOH/EtOH |
| **Boja** | Bijelo do žuti prah | Žuti do bijeli prah | Bijeli prah |
| **Talište** | 91-94°C | 216-219°C | 236°C |
| Spojevi su komercijalno dostupni i postoje službeni podaci | | | |

Svi uzorci su pripremljeni u koncentraciji od 0,1 M (mol/dm$^3$), pomiješane s metanolom. U daljnjem tekstu uzorak A predstavlja metil boroničnu kiselinu, uzorak B fenil boroničnu kiselinu, a uzorak C 2,4,6-trifluor fenil boroničnu kiselinu.

*Uzorak A*: 0,0599 g u 10 mL metanola – 0,1 M otopina

*Uzorak B*: 0,1216 g u 10 mL metanola – 0,1 M otopina

*Uzorak C*: 0,1759 g u 10 mL metanola – 0,1 M otopina

Postupak razrjeđenja početnih otopina za analizu:

500 μL 0,1 M + 500 μL metanola – 0,05 M tj. 50 mM

100 μL 0,1 M + 900 μL metanola – 0,01 M tj. 10 mM

100 μL 0,1 M + 1900 μL metanola – 0,005 M tj. 5 mM

25 μL 0,1 M + 1000 μL metanola – 0,00243 M tj. 2,43 mM

Priprava otopina:

*Otopina bakrova(II) klorida*. Otopina bakrova(II) klorida (10 mM) pripremljena je otapanjem 0,336 g bakrova(II) klorida u vodi i nadopunjeno do oznake u odmjernoj tikvici od 250 mL.

*Otopina neokuproina*. Otopina neokuproina (7,5 mM) pripremljena je otapanjem 0,039 g neokuproina u 25 mL 96%-tnog etanola u odmjernoj tikvici.

*Otopina 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Troloks)*. Početna otopina troloksa (10 mM) je pripravljena otapanjem 0,0129 g troloksa u 5,15 mL 96%-tnog etanola. Konačne koncentracije korištene za krivulju umjeravanja su: 976, 732, 488, 244, 122, 49 μM.

## 2.4. POSTUPAK MJERENJA

Sva mjerenja su provedena pomoću čitača mikrotitarskih pločica Synergy HTX S1LFA, BioTek, Winooski, USA. pri valnoj duljini od 450 nm. Uvjeti mjerenja su: 30 s miješanje netom nakon umetanja pločice u instrument, a zatim 15 s miješanja prije svakog mjerenja, mjerenja se vrše svake dvije minute,a ukupno vrijeme mjerenja je 60 min (30 mjerenja), sobna temperatura.

### 2.4.1. UTJECAJ KONCENTRACIJE

U slijedećim eksperimentima je praćen utjecaj koncentracije pojedine boronične kiseline na antioksidativnu aktivnost i to pri pet različitih koncentracija. Konačne koncentracije ispitivanih spojeva u sustavu bile su redom: 9760, 4880, 976, 488, 237 μM.

Tablica 2.2. Smjesa otopina za mjerenje

| Redni broj | Otopina | Slijepa proba (μL) | Standard/uzorak (μL) |
|---|---|---|---|
| 1. | Cu(II) | 50 | 50 |
| 2. | Nc | 50 | 50 |
| 3. | Pufer | 105 | 85 |
| 4. | uzorak | - | 20 |

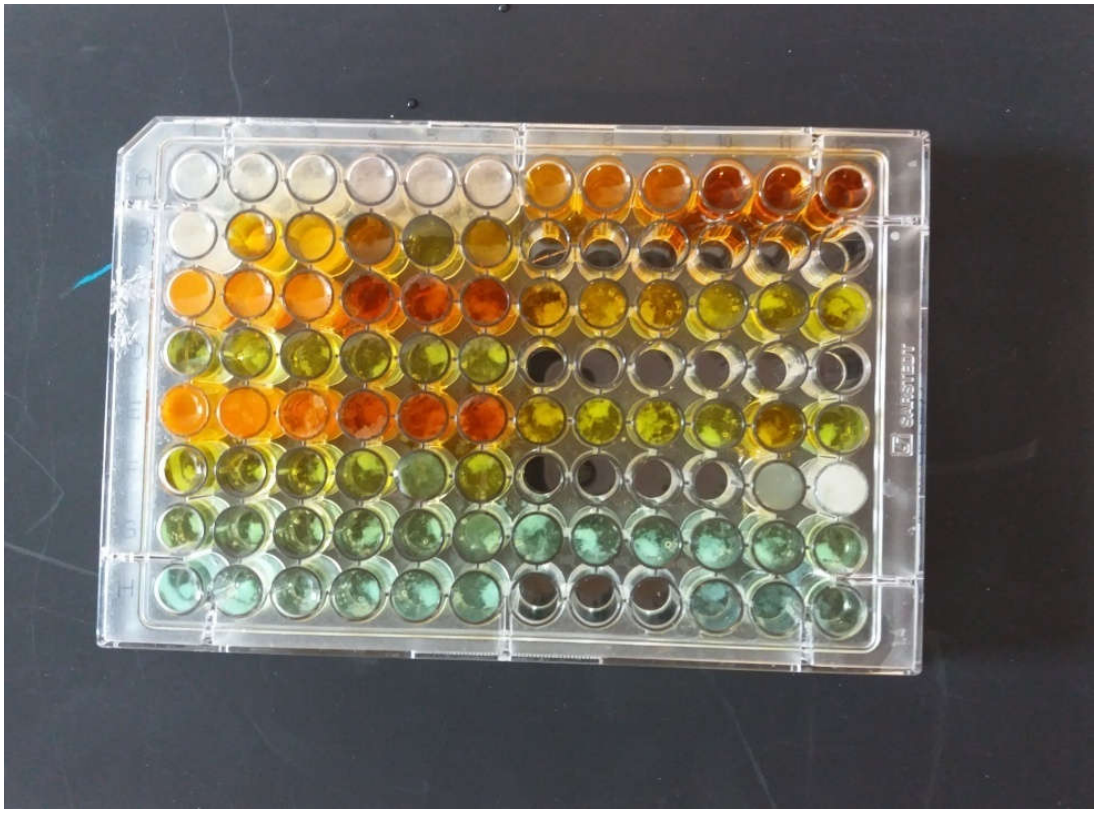
Napomena: Važno je dodavati otopine redoslijedom naznačenim u gornjoj tablici da ne bi došlo do redukcije Cu(II) prije nego se kompleksira s Nc.

# 3. REZULTATI

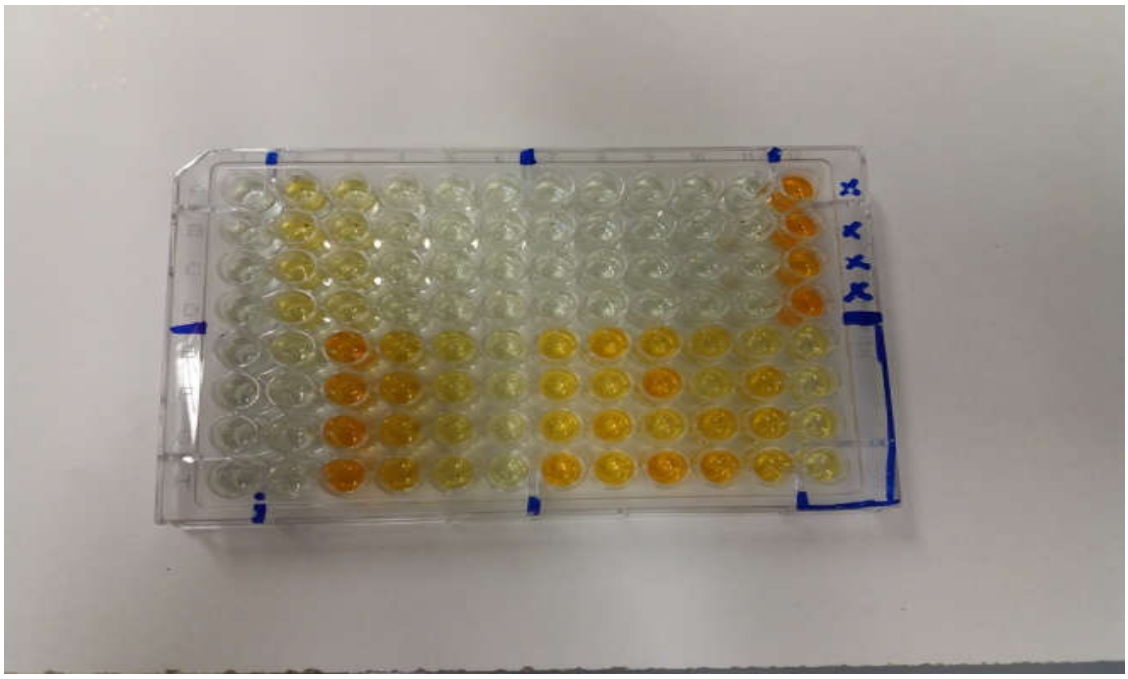
## 3.1. PRVI UZORCI

Prvo su se mjerili ispitivani spojevi, ali s većim konačnim koncentracijama koje su redom bile: 244000, 24400, 2440, 1220, 244, 122 μM. To je rezultiralo pojavom taloga u pojedinim jažicama, što se može vidjeti na slici 12. Iz tog razloga ponovljeno je mjerenje, ali s manjim koncentracijama ispitivanih spojeva koje su navedene u prethodnom poglavlju.

Razrjeđivanje se odabire kao strategija za smanjenje učinka smetnji koji mogu ometati stvarni antioksidacijski kapacitet.[13]



Slika 12. Mikrotitarska pločica s ispitivanim spojevima



a)

b)

Slika 13. Mikrotitarska pločica s uzorcima: a) prije mjerenja i b) poslije mjerenja;

U sve jažice su stavljeni redom $CuCl_2$,Nc, pufer. U prvom stupcu je ostala samo slijepa proba, od 2A-6D se dodala fenil boronična kiselina, od 7A-11D se dodala metil boronična kiselina, u stupcu 12 od A-D i jažicama od 3E-6H se dodala 2,4,6-trifluorfenil boronična kiselina i od 7E-12H se dodao troloks. Svi su uzorci dodavani u različitim koncentracijama. U prvim stupcima su dodane veće koncentracije i išlo se prema manjim.

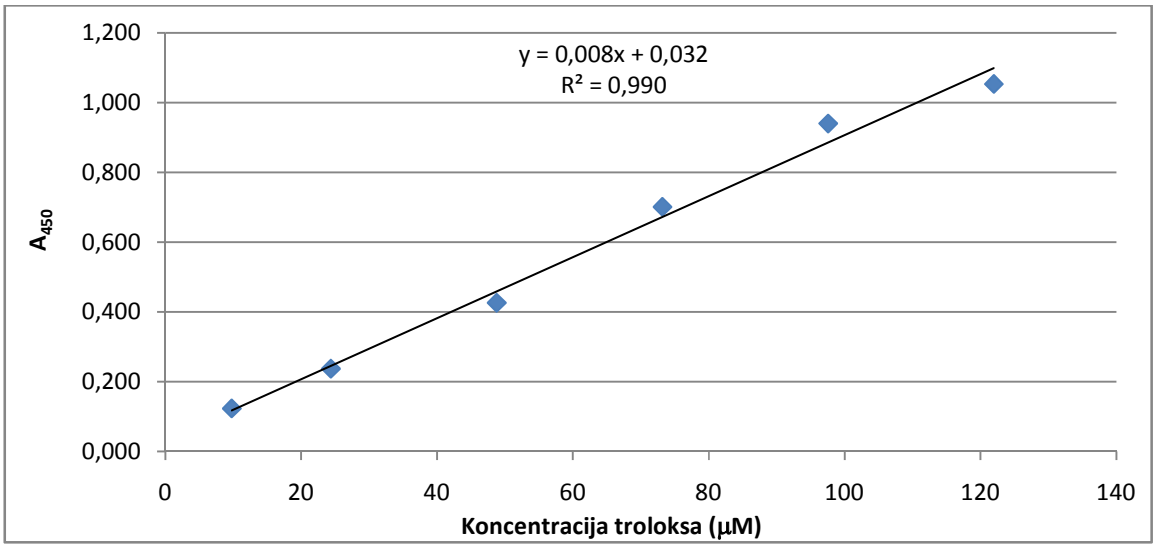
## 3.2. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA CUPRAC METODOM

Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina) je u vodi topljiv analog α-tokoferola. Prednost troloksa u odnosu na α-tokoferol jest njegova topljivost u lipofilnom mediju, što omogućava njegovu ugradnju i u vodenim i u lipidnim odjeljcima stanica.[9]

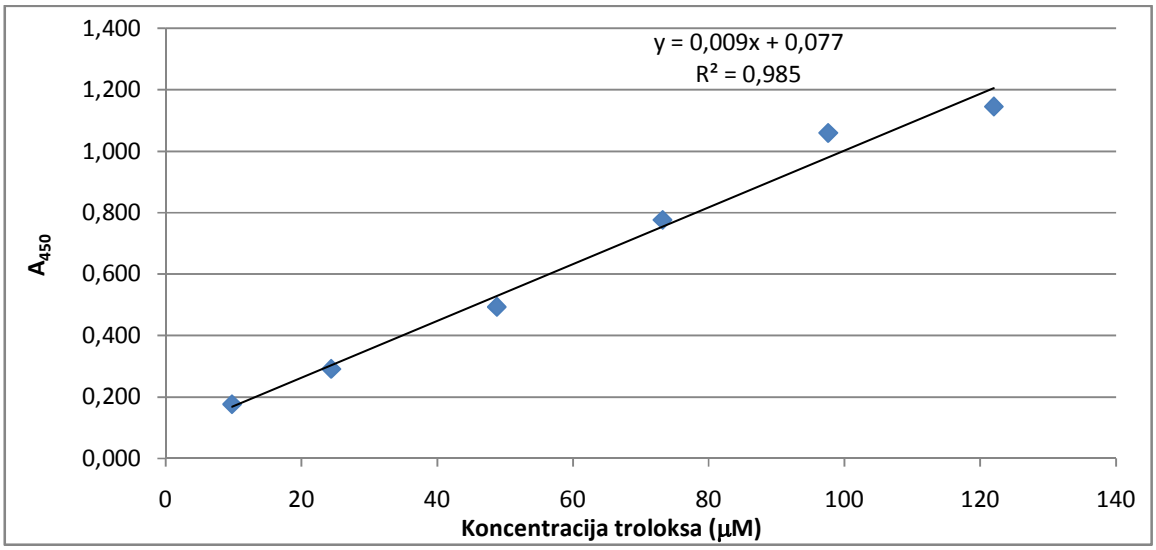
Troloks se koristiti kao standard za mjerenje antioksidativnog kapaciteta. I radi se standardni umjerni pravac troloksa ucrtavanjem poznate koncentracije troloksa u odnosu na apsorbanciju pri 450 nm.

Tablica 3.1. Koncentracije otopine troloksa i dobivene apsorbancije

| Koncentracija otopine Troloxa (μM) | Apsorbancija nakon 30 min | Apsorbancija nakon 60 min |
|---|---|---|
| 122 | 1,052 | 1,145 |
| 97,6 | 0,940 | 1,059 |
| 73,2 | 0,701 | 0,776 |
| 48,8 | 0,426 | 0,493 |
| 24,4 | 0,237 | 0,291 |
| 9,8 | 0,123 | 0,176 |




Slika 14. Umjerni pravac troloksa nakon 30 minuta




Slika 15. Umjerni pravac troloksa nakon 60 minuta

Iz dobivene umjerne krivulje određene su koncentracije troloks ekvivalenta ($C_{TE}$) za svaki pojedini uzorak.

A – srednja vrijednost apsorbancije pri 450 nm

$C_{TE}$ – koncentracija troloks ekvivalenta za svaki uzorak u μM

Tablica 3.2. Tablični prikaz apsorbancija i koncetracija troloks ekvivalenta za uzorak A

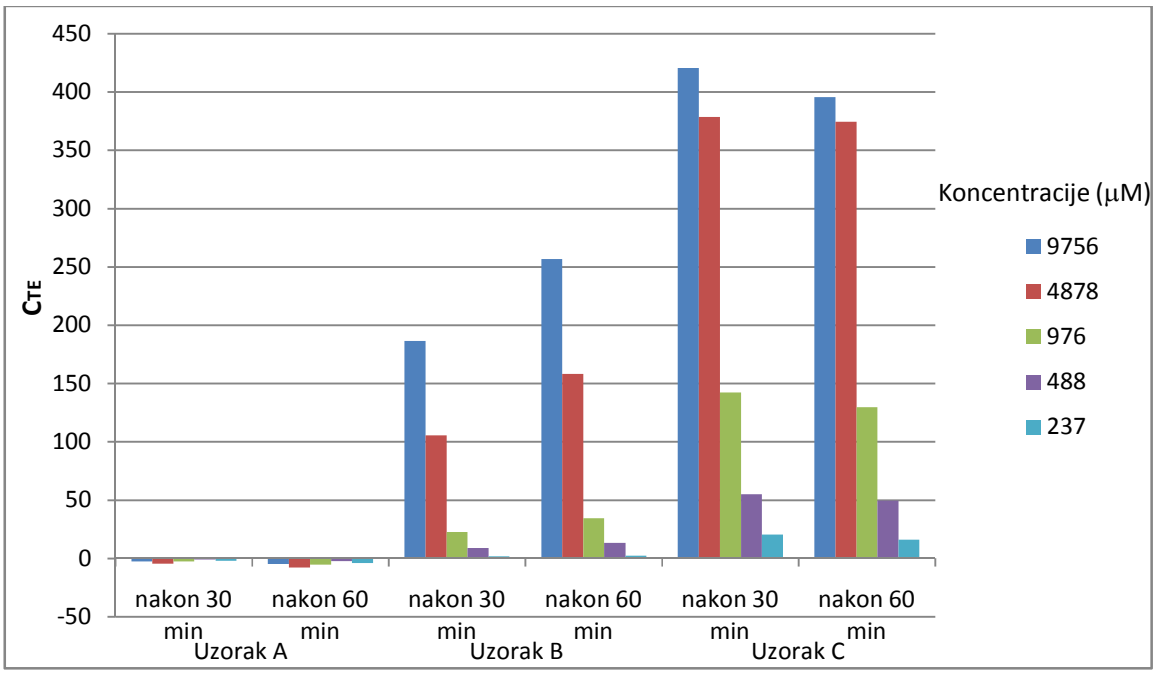
| Uzorak A (metil boronična kiselina) | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Koncentracija (μM) | A nakon 30 min | A nakon 60 min | $C_{TE}$ nakon 30 min | $C_{TE}$ nakon 60 min |
| 9756 | 0,011 | 0,033 | -2,46 | -4,88 |
| 4878 | -0,007 | 0,005 | -4,53 | -7,92 |
| 976 | 0,011 | 0,028 | -2,46 | -5,42 |
| 488 | 0,026 | 0,057 | -0,74 | -2,27 |
| 237 | 0,016 | 0,043 | -1,89 | -3,79 |

Tablica 3.3. Tablični prikaz apsorbancija i koncetracija troloks ekvivalenta za uzorak B

| Uzorak B (fenil boronična kiselina) | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Koncentracija (μM) | A nakon 30 min | A nakon 60 min | $C_{TE}$ nakon 30 min | $C_{TE}$ nakon 60 min |
| 9756 | 1,653 | 2,442 | 186,28 | 256,97 |
| 4878 | 0,949 | 1,534 | 105,36 | 158,27 |
| 976 | 0,230 | 0,395 | 22,71 | 34,47 |
| 488 | 0,110 | 0,200 | 8,92 | 13,27 |
| 237 | 0,048 | 0,100 | 1,79 | 2,40 |

Tablica 3.4. Tablični prikaz apsorbancija i koncetracija troloks ekvivalenta za uzorak C

| Uzorak C (2,4,6-trifluorfenil boronična kiselina) | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Koncentracija (μM) | A nakon 30 min | A nakon 60 min | $C_{TE}$ nakon 30 min | $C_{TE}$ nakon 60 min |
| 9756 | 3,692 | 3,716 | 420,64 | 395,45 |
| 4878 | 3,326 | 3,523 | 378,57 | 374,47 |
| 976 | 1,271 | 1,272 | 142,37 | 129,79 |
| 488 | 0,511 | 0,534 | 55,01 | 49,58 |
| 237 | 0,212 | 0,227 | 20,64 | 16,21 |




Slika 16. Promjena $C_{TE}$ za sve uzorke pri različitim koncentracijama nakon 30 i 60 minuta

## 4. RASPRAVA

Svako mjerenje je korigirano za slijepu probu koja je sadržavala $CuCl_2$, Nc i pufer, dakle sve osim uzorka. Mjerenja su se vršila pri 450 nm nakon 30 i 60 minuta.

Kod metil boronične kiseline moglo se odmah primijetiti pri dodavanju uzoraka da nema promjene boje niti nakon završetka mjerenja, vidljivo na slici 13. Njena apsorbancija ne odstupa mnogo od apsorbancije slijepe probe, iako lagano raste nakon 60 minuta jer je uzorak mogao duže reagirati, što se vidi u tablici 3.2.

Kod fenil boronične kiseline odmah se primijetila promjena boje kod dvije najveće koncentracije uzorka, a nakon mjerenja se promjena vidi i kod ostalih koncentracija, vidljivo na slici 13. Apsorbancija smanjenjem koncentracije uzorka opada i pri 30 i pri 60 minuta, ali se može vidjeti da nakon 60 minuta apsorbancija lagano raste pri svim koncentracijama, što se može primijetiti u tablici 3.3.

Kod 2,4,6-trifluorfenil boronične kiseline obojenje je odmah bilo vidljivo pri svim koncentracijama. Brže se odvijalo nego kod fenil boronične kiseline. Pri višim koncentracijama je obojenje bilo jače, a slabilo je sa smanjenjem koncentracije uzorka, vidljivo na slici 13. Apsorbancija opada smanjenjem koncentracije uzorka i nakon 60 minuta lagano raste pri svim koncentracijama, što se vidi u tablici 3.4.

Za mjeru antioksidativnog kapaciteta koristio se troloks kao dobar antioksidans čije će vrijednosti biti uspoređivane s vrijednostima ostalih spojeva. Dobivene koncentracije troloks ekvivalenta $C_{TE}$ nam govore o antioksidativnom kapacitetu pojedinog uzorka.

Za metil boroničnu kiselinu, $C_{TE}$ su negativne, dakle ne nalaze se u linearnom dinamičkom području standardne krivulje troloksa, što ukazuje na to da metil boronična kiselina ne pokazuje antoksidativnu aktivnost.

Kod fenil boronične kiseline, $C_{TE}$ se linearno smanjuje u skladu sa smanjenjem koncentracije, ali se može vidjeti da je nakon 60 minuta $C_{TE}$ veći od onog nakon 30 minuta, što je jasno vidljivo na slici 16. Fenil boronična kiselina, za razliku od metil boronične, posjeduje bolju antioksidacijsku aktivnost, te joj je antioksidacijska aktivnost pri kocentraciji od 488 μM gotovo jednaka najvećoj aktivnosti troloksa.

2,4,6-Trifluorfenil boronična kiselina također pokazuje linearnu ovisnost $C_{TE}$ o koncentraciji , ali se za razliku od fenil boronične kiseline, $C_{TE}$, nakon 60 minuta, smanjio u odnosu na $C_{TE}$ pri 30 minuta. Usporedbom rezultata (odnos koncentracija i $C_{TE}$ vrijednosti) fenil boronične i 2,4,6-trifluorfenil boronične kiseline može se vidjeti da je 2,4,6-trifluorfenil boronična kiselina višestruko bolji antioksidans što se lijepo vidi na slici 16. i u tablicama 3.3 i 3.4.

Ako se razmotre strukture ispitivanih spojeva i njihova antioksidativna aktivnost (slike 11. i 16.) vidljivo je da metil boronična kiselina, kao najjednostavniji spoj od ova tri ne posjeduje aktivnost, odnosna da su fenil boronična i 2,4,6-trifluorfenil boronična kiselina znanto aktivnije, što bi moglo upućivati na to da se antioksidativna aktivnost boroničnih kiselina povećava dodatkom fenilne skupine.

Uzimajući u obzir da je 2,4,6-trifluorfenil boronične kiselina višestruko aktivnija od fenil boronične kiseline može se zaključiti da naknadno fluoriranje fenilne skupine u položajima 2,4,6 kod fenil boronične kiseline ima povoljan i pojačavajući učinak na antioksidativnu aktivnost.

## 5. ZAKLJUČAK

CUPRAC test je temeljen na redukciji Cu(II) kompleksa u prisutnosti antioksidansa, dakle što je jači antioksidans to će se više Cu(II) kompleksa reducirati u Cu(I) kompleks, što možemo pratiti spektrofotometrijski kao promjenu apsorbancije pri 450 nm.

Metil boronična kiselina bi mogla biti antioksidans koji sporo reagira, ali budući da ni nakon 30, a ni nakon 60 minuta nije pokazala primjetnu aktivnost može se zaključiti da ne posjeduje primjetan antioksidativni potencijala.

Usporedbom $C_{TE}$ rezultata fenil boronične kiseline i 2,4,6-trifluor fenil boronične kiseline, vidljivo je da je $C_{TE}$ kod 2,4,6-trifluor fenil boronične kiseline višestruko veći uzimajući u obzir odgovarajuću koncentraciju, a time i bolji antioksidans.

Također se može zaključiti da je 2,4,6-trifluorfenil boronične kiselina antioksidans koji brzo reagira, što je bilo vidljivo već prilikom dodatka uzorka u pločice gdje je trenutno došlo do promjene obojenja.

Ako se razmotre strukture ispitivanih spojeva i njihova antioksidacijska aktivnost vidljivo je da je 2,4,6-trifluorfenil boronična kiselina najaktivnija. Što bi moglo upućivati na to da se antioksidativna aktivnost boroničnih kiselina povećava dodatkom fenilne skupine, te fluoriranjem iste.

2,4,6-Trifluorfenil boronična kiselina pokazuje najbolju antioksidativnu aktivnost te predstavlja potencijal za buduća ispitivanja aktivnosti boroničnih kiselina.

## 6. LITERATURA


1. R. Apak, M. Ozyurek, K. Guclu, E. Capanoglu, Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET) – Based Assays, *J. Agr. Food Chem.*, **64** (2016) 997-1027

2. M. Ozyurek, K. Guclu, R. Apak, The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement, *Trends in Analytical Chemistry*, **30**(4) (2011)

3. M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int. J. Biochem. Cell B.*, **39** (2007) 44-84

4. A. M. Pisoschi, G. P. Negulescu, Methods for total antioxidant activity determination: a review, *Biochem. & Anal. Biochem*, **1** (2011)

5. J. N. Cambre, B. S. Sumerlin, Biomedical applications of boronic acid polymers, *Polymer*, **52** (2011) 4631-4643

6. D. G. Hall, Boronic Acids: Preparation and Applications in Organic Synthesis, Medicine and Materilas, 2nd ed., Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KgaA, Weinheim, Germany, 2011

7. E. J. Dell, Microplate reader absorbance assay, Genetic Engineering & Biotechnology News, **31** (14) (2011)

8. E. Jones, S. Michael, G. S. Sittampalam, *Basics of Assay Equipment and Instrumentation for High Throughput Screening*, in: G. S. Sittampalam, N. P. Coussens, H. Nelson *et al.* (Eds.), *Assay Guidance Manual*, Eli Lilly &Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD); 2017. 1037-1053.

(Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/)(23.10.2017.)

9. I. Hamad, N. Arda, M. Pekmez, S. Karaer, G. Temizkan, Intracellular scavenging activity of Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) in the fission yeast, Schizosaccharomyces pombe, *J. Nat. Sci. Biol. Med.*, **1** (2010) 16-21

10. Apak R, Gorinstein S, Böhm V, Schaich KM, Özyürek M, Güçlü K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity, Pure Appl. Chem., **85**(5) (2013) 957-998

11. C. L. W. Murphy, Synthesis of Boronic Acids and Esters from Pinacolborane and Aminoborane Under Ambient Magnesium-, Iodine-, and Zinc-Mediated Conditions, theses and dissertation, University of California, Santa Cruz, 2016.

12. S. S. Marques, L. M. Magalhaes, I. V. Toth, M. A. Segundo, Insights on Antioxidant Assays for Biological Samples Based on the Reduction of Copper Complexes-The Importance of Analytical Conditions, *Int. J. Mol. Sci.*, **15** (2015) 11387-11402