

Razvoj i validacija novog tipa HPLC detektora za određivanje bioaktivnih sastojaka u hrani

Mandić, Vedrana

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:219408>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2017

Vedrana Mandić
838/USH

**RAZVOJ I VALIDACIJA NOVOG
TIPA HPLC DETEKTORA ZA
ODREĐIVANJE BIOAKTIVNIH
SASTOJAKA U HRANI**

Rad je izrađen u Laboratoriju za opću i anorgansku kemiju i elektroanalizu Zavoda za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Damira Ivekovića te uz pomoć poslijedoktorandice dr. sc. Marine Palčić.

Želim se zahvaliti svom mentoru, izv. prof. dr. sc Damiru Ivekoviću na izvrsnoj ideji, te uloženom trudu i vremenu u ovaj rad, kao i prenesenom znanju tijekom izrade istog. Žao mi je što profesora takvog znanja, ideja i vještina nisam imala prilike slušati duže tijekom studija.

Veliko hvala poslijedoktorandici, dr.sc. Marini Palčić za pomoć prilikom izrade ovog rada, za preneseno znanje, savjete, strpljenje, podršku. Također, hvala na pozitivnom stavu i svom vremenu izdvojenom za mene.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za opću i anorgansku kemiju i elektroanalizu

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

RAZVOJ I VALIDACIJA NOVOG TIPA HPLC DETEKTORA ZA ODREĐIVANJE BIOAKTIVNIH SASTOJAKA U HRANI

Vedrana Mandić 838/USH

Sažetak: Cilj ovog istraživanja bio je razviti i validirati novi tip HPLC detektora za određivanje bioaktivnih sastojaka u hrani, u ovom slučaju antioksidansa. Kromatografski sustav dizajniran je na način da se "T-spojnicom" i posebno izrađenom reakcijskom petljom povezao spektrometrijski (DAD) detektor HPLC sustava s elektrokemijskim biamperometrijski detektorom. Kako bi se utvrdila korelacija signala DAD detektora sa signalom biamperometrijskog detektora, istovremeno su bilježeni odzivi s oba detektora. Princip rada razvijenog elektrokemijskog detektora temeljio se na reakciji polifenola separiranih na HPLC koloni s jako obojenim ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) radikalom te biamperometrijskom mjerenju smanjenja koncentracije ABTS radikala uslijed spomenute reakcije. Odzivni signali oba detektora pokazali su se visoko linearni i korelirani. Primjenjivost razvijenog detektora u analizi realnih uzoraka ispitana je na primjeru određivanja polifenolnih antioksidansa u ekstra djevičanskom maslinovom ulju. Na temelju dobivenih rezultata dane su smjernice za daljnji razvoj biamperometrijskog detektora.

Ključne riječi: HPLC detektor, antioksidansi, biamperometrijski detektor, ABTS, polifenoli

Rad sadrži: 51 stranica, 27 slika, 7 tablica, 62 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je tiskan i u elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Damir Iveković

Pomoć pri izradi: dr. sc. Marina Palčić, poslijedoktorandica

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Dubravka Škevin
2. izv. prof. dr. sc. Damir Iveković
3. doc. dr. sc. Marina Krpan
4. doc. dr. sc. Antonela Ninčević Grassino (zamjena)

Datum obrane: 20. srpanj 2017

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for General and Inorganic Chemistry and Electroanalysis

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF NEW TYPE OF HPLC DETECTOR FOR DETERMINATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN FOOD

Vedrana Mandić, 838/USH

Abstract: The aim of this study was to develop and validate a new type of HPLC detector for determination of bioactive compounds in food, particularly antioxidants. The chromatographic system was designed by connecting the spectrophotometric (DAD) detector of the HPLC system with a biamperometric detector through a "T-coupler" and custom designed reaction loop. In order to correlate the signals from DAD and biamperometric detector, data from both detectors were recorded simultaneously. The operating principle of the developed biamperometric detector relied on the reaction between polyphenols separated on the HPLC column and highly-colored ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzotiazolin-6-sulfonic acid)) radicals, concentration of which was monitored biamperometrically. Signal responses from both detectors were found to be highly linear and well correlated. The applicability of the developed biamperometric detector in analysis of real samples was tested by the determination of polyphenolic antioxidants in extra virgin olive oil. Based on the results obtained in this work, some guidelines for further development of biamperometric detector were given.

Keywords: HPLC detector, antioxidant, biamperometric detector, ABTS, polyphenol,

Thesis contains: 51 pages, 27 pictures, 7 table, 62 literary citation

Original in: Croatian

Graduate thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *Damir Iveković, PhD*, Associate Professor

Technical support and assistance : *Marina Palčić, PhD.*, postdoctoral researcher

Rewievers:

1. PhD. *Dubravka Škevin*, Full Professor
2. PhD. PhD. *Damir Iveković*, Associated Professor
3. PhD. *Marina Krpan*, Assistant Professor
4. PhD. *Antonela Ninčević Grassino*, Assistant Professor (substitute)

Thesis defended: 20. July 2017

Sadržaj

1.UVOD	1
2.TEORIJSKI DIO	2
2.1. Antioksidansi u hrani.....	2
2.2.Klasifikacija antioksidansa.....	2
2.2.1.Vitamini.....	2
2.2.2.Karotenoidi.....	3
2.2.3.Polifenoli.....	4
2.3. Mehanizmi antioksidansa u sprječavanju oksidativnih promjena u hrani.....	6
2.3.1.Uklanjanje slobodnih radikala.....	6
2.3.2.Keliranje metala.....	7
2.3.3.Uklanjanje singletnog kisika.....	8
2.3.4.Inaktivacija fotosenzibilizatora.....	8
2.3.5.Inaktivacija lipooksigenaze.....	9
2.4.Metode za određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta.....	9
2.4.1. ORAC.....	11
2.4.2 . TRAP.....	11
2.4.3. Test obezbojenja β -karotena ili krocina.....	12
2.4.4. TEAC.....	13
2.4.5. DPPH metoda.....	13
2.4.6. FRAP metoda.....	14
2.4.7. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu reagensom.....	14
2.5. On-line HPLC određivanje antioksidativne aktivnosti.....	15
2.5.1 Metode koje se temelje na interakciji sa ROS.....	16
2.5.1.1. Singletni kisik kao ROS.....	16
2.5.1.2. Vodikov peroksid i/ili superoksidni anion kao ROS.....	16
2.5.2. Metode koje se temelje na reakciji s DPPH ili ABTS radikalom.....	17
2.6. Osnove biamperometrije.....	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO	19
3.1. MATERIJALI.....	19
3.1.1. Kemikalije.....	19
3.1.2. Uzorci.....	20
3.1.3. Instrumentacija.....	20
3.2 METODE RADA.....	20
3.2.1. HPLC s biamperometrijskom detekcijom.....	21
3.2.2. Ekstrakcija polifenola iz djevičanskog maslinovog ulja.....	22

4. REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1. Preliminarna elektrokemijska mjerenja	23
4.1.1. Odabir pufera za mjerenje antioksidativne aktivnosti HPLC eluata	25
4.2. HPLC mjerenja	27
4.2.1. Korelacije odziva HPLC (DAD) detektora i biamperometrijskog detektora	29
4.3. Toplinska obrada realnog uzorka	43
5. ZAKLJUČCI	45
6. LITERATURA	46

1. UVOD

Definicija antioksidansa koja se široko primjenjuje jest da je antioksidans "sintetska ili prirodna tvar koja se dodaje proizvodima kako bi se spriječilo ili odgodilo njihovo uništavanje kisikom iz zraka". Glavne skupine prirodnih spojeva s antioksidativnom aktivnosti su vitamini, karotenoidi i polifenoli. Antioksidansi imaju razne esencijalne uloge u biljkama. Uključeni su u regulaciju fotosinteze, biosintezu hormona, rasta i razvoja cijele biljke, kao i preživljavanje biljaka u uvjetima abiotičkog i biotičkog stresa. U hrani pak, sprječavaju kemijsko kvarenje te značajno umanjuju štetan utjecaj reaktivnih vrsta na normalne fiziološke funkcije kod ljudi.

Analitičke metode koje se koriste za određivanje antioksidativne aktivnosti mogu se podijeliti u tri skupine. Prve se temelje na upotrebi reaktivnih vrsta kisika (ROS), no njih je teško kontrolirati i pratiti. Drugu skupinu čine metode temeljene na elektrokemijskoj detekciji koje su mnogo praktičnije, no imaju ograničenu praktičnu uporabu, dok je najpopularnija treća skupina metoda, koja se temelji na reakciji antioksidansa sa stabilnim, jako obojenim radikalima, kao što su npr. radikali DPPH ili ABTS, te spektrofotometrijskoj ili elektrokemijskoj detekciji smanjenja njihove koncentracije (Koleva, 2001). Iako su te metode brze i jednostavne, ne daju informacije o antioksidativnoj aktivnosti pojedinog spoja, nego uzorka u cjelini. S druge strane, za određivanje pojedinačnih antioksidansa u kompleksnim uzorcima razvijen je velik broj kromatografskih (HPLC) metoda, koje pak ne daju informacije o antioksidativnoj aktivnosti pojedinog spoja, nego samo o njegovoj koncentraciji.

U literaturi je opisana kombinacija oba analitička pristupa, pri čemu se nakon kromatografskog (HPLC) razdvajanja pojedinih antioksidansa, eluat miješa s ABTS ili DPPH radikalom, nakon čega se spektrofotometrijski prati smanjenje apsorbancije radikala i na temelju toga zaključuje o antioksidativnoj aktivnosti pojedine komponente uzorka. Takvo mjerenje zahtijeva HPLC sustav s dva spektrofotometrijska detektora ili je mjerenje za isti uzorak potrebno provoditi dva puta (prvi put radi određivanja koncentracije spoja, drugi put radi određivanja njegove antioksidativne aktivnosti). Budući da su spektrofotometrijski detektori relativno skupi, u ovom radu je istražena primjena jeftinijeg i jednostavnijeg biamperometrijskog detektora, čime je omogućena simultana HPLC kvantifikacija antioksidansa, kao i određivanje njegove antioksidativnih aktivnosti.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Antioksidansi u hrani

Antioksidansi u hrani su heterogena skupina molekula (Tuberoso i sur., 2012). To su komponente ili sustavi koji mogu sigurno reagirati sa slobodnim radikalima i prekinuti lančanu reakciju prije nego što vitalne biološke molekule budu oštećene. Antioksidativni učinak može se temeljiti na različitim mehanizmima: poticanju peroksidacije, keliranju metalnih iona (čime se onemogućuje tvorba reaktivnih vrsta ili reakcija s peroksidima uz pokretanje lančane Fentonove reakcije), reduciranju O_2 do vode (čime se sprječava formiranje peroksida), prekidanju (terminaciji) autooksidacijskih lančanih reakcija, i/ili smanjenju lokaliziranih povišenih koncentracija O_2 (Asimi i sur., 2013). Antioksidativni utjecaj antioksidansa ovisi o njihovim kemijskim karakteristikama i lokaciji u hrani (tj. jesu li blizu membrane fosfolipida, emulzija ili vodene faze) (Watanabe i sur., 2000).

2.2. Klasifikacija antioksidansa

Glavne skupine spojeva s antioksidativnom aktivnosti su: vitamini (vitamin C i vitamin E), karotenoidi (karoteni i ksantofili) i polifenoli (flavonoidi, flavonoli, flavoni, antocijanini, izoflavoni, fenolne kiseline, tanini, stilbeni i lignani).

2.2.1. Vitamini

Iz skupine vitamina, dva se izdvajaju svojim antioksidativnim djelovanjem: vodotopljivi vitamin C i lipofilni vitamin E.

Vitamin C (askorbinska kiselina) jedinstven je među svim ostalim vitaminima iz nekoliko razloga. Smatra se najvažnijim hidrofilnim antioksidansom (Lykkesfeldt, 2000) koji je učinkovit u uklanjanju superoksidnih radikalnih aniona, hidroksilnih radikala, vodikovog peroksida, reaktivnih dušičnih vrsta i singlet kisika. Može se ponašati kao reaktivni kisik (ROS) (>1000 mg/kg) i inhibirati oksidaciju, ili u manjim koncentracijama (<100 mg/kg) može katalizirati oksidaciju (u mišićnom tkivu) (Ahn i sur., 2007). U strukturi ima 4-OH

skupine koje može donirati vodik ili oksidiranom sustavu (Brewer, 2011). Prirodni izvori vitamina C su jabuke, banane, brokule, češnjak, kruške..

Vitamin E kao pojam obuhvaća grupu kemijskih tvari izvedenih od tokoferola i tokotrienola. Generalno je prihvaćen kao primarni liposolubilni antioksidans kod ljudi, koji djeluje kao antioksidans preko dva osnovna mehanizma: mehanizam razaranja lanca elektron-donora i mehanizam razaranja lanca elektron-akceptora. Analizirana antioksidativna aktivnost (Thoo i sur. 2013), pokazala je da im aktivnost ovisi o kuhanju, skladištenju (Pascual i sur. 2013) i genotipu (Beltran i sur., 2010). Strukturu im čine četiri tokoferola i četiri tokotrienola, s tim da tokoferolska skupina pokazuje antioksidativnu aktivnost (Van Acker i sur. 1993). Prirodni izvori vitamina E su žitarice, zeleni čaj i uljarice.

2.2.2. Karotenoidi

Od karotenoidnih antioksidansa svojom se aktivnošću i zastupljenošću ističu β -karoten, likopen i ksantofili.

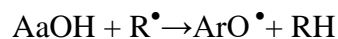
β -karoten je liposolubilni provitamin vitamina A i jedan je od najjačih antioksidansa, koji može blokirati singletni kisik i inhibirati lipidnu oksidaciju. Prirodni izvori β -karotena su tamno zeleno lisnato povrće, maslinovo ulje, crvene mrkve.

Likopen, terpen s jedanaest konjugiranih i 2 nekonjugirane dvostruke veze, najučinkovitiji je u reduciranju singletnog kisika i prirodnih karotenoida (Kaiser i sur., 2013). Velik broj konjugiranih dvostrukih veza likopen čine snažnim antioksidansom, a ta aktivnost je još i pojačana njegovom mogućnošću da neutralizira peroksidne radikale. Prirodni izvori likopena su marelice, grejp, lubenica, mrkve, rajčice.

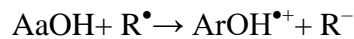
Hidroksi-karotenoidi (ksantofili) su oksidirani karotenoidi koji su sintetizirani unutar plastida i uglavnom se nalaze kao žuti pigmenti lišća (Pasaporte i sur. 2014). Prirodni izvori ksantofila su špinat, mrkve, kukuruz.

2.2.3. Polifenoli

Polifenoli su kao biološka komponenta sveprisutni u biljnim organizmima, tako da čine sastavni dio ljudske prehrane. U posljednjem dijelu dvadesetog stoljeća interes za njima je narastao zahvaljujući njihovoj antioksidativnoj aktivnosti, odnosno sposobnosti neutraliziranja (zasićivanja) slobodnih radikala (Bravo, 1998). Polifenoli također pokazuju značajnu zaštitu od oksidativnog stresa *in vitro* (Weichselbaum i Buttriss, 2010). Mogu se razlikovati dva mehanizma djelovanja antioksidansa. Prvi je da molekula antioksidansa (AaOH) reagirajući sa slobodnim radikalom R, donira svoj atom vodika:



Drugi je da u reakciji slobodni radikal R donira elektron antioksidansu:



Reakcijski produkti oba mehanizma su bezopasni, zasićena vrsta RH, stabilniji radikal izveden od antioksidansa AaO[•], stabilniji radikal-kation AaOH^{•+} te energijski stabilnija i manje reaktivna vrsta R⁻.

Najzastupljenije skupine prirodnih spojeva koje se ističu svojim antioksidativnim djelovanjem navedene su i ukratko opisane u nastavku.

FLAVONOIDI su kao biljni pigmenti jako zastupljeni u prirodi. Dijelev se u nekoliko podskupina, od kojih su najzastupljeniji: flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanoli, antocijanidini i izoflavoni. Osnovu strukture čini prsten od 15 C atoma, specifični sustav od 3 prstena, gdje je središnji oksidirani piranski prsten (C prsten) u različitim oksidacijskim stanjima. Piranski prsten je fuziran na aromatski prsten (A prsten) preko jedne veze, i dodan na drugi aromatski prsten preko jednostruke veze (B prsten). Prirodni izvori flavonoida su žitarice, med, naranče.

Flavonole karakterizira alkoholna skupina u C-prstenu, a često su glikozirani (glukozom, ramnozom, galaktozom i arabinozom). Široko su zastupljeni kod voća i povrća, a sadržaj im varira jer ovisi o faktorima rasta, klime, skladištenja, svjetlosti i obrade. Najvažniji predstavnik je kvercetin i njegovi derivati, prisutni uglavnom u lišću, no i drugim dijelovima biljaka, kod kojih su jedna ili više šećernih grupa povezane na fenolnu jezgru preko glikozidne veze. Šećerna grupa vezana je na poziciju 3. prstena, a uglavnom je riječ o glukozu,

rijeđe galaktozi ili ramnozi (Wach i sur. 2007). Prirodni izvori flavanola su primjerice zeleni čaj i vino.

Flavone karakterizira izostanak 3-OH skupine. Zbog velikog broja modifikacija osnovne strukture, skupina flavona broji velik broj članova. Pronađeni su u svim dijelovima biljaka, ispod i iznad zemlje, povrću te generativnim organima. Prirodni izvori flavona su primjerice kora citrusa i kukuruz.

Flavanoni se pojavljuju kao O- ili C-glikozidi i posebno su prisutni kod citrusnog voća, primjerice naringenin u narančama i grejpu (Bravo, 1998).

Antocijanidini su najveća grupa biljnih pigmenata u prirodi, odgovorna za boju voća i cvijeća, a od ostalih flavonoida razlikuju se činjenicom da se pojavljuju u obliku kationa. Kad na poziciji 3 aglikonskog prstena sadrže jednu ili više glikozidnih jedinica (u α ili β položaj), nazivaju se **antocijanini**. Molekula antocijanina je nestabilna i lako se razgrađuje pod utjecajem temperature, pH, svjetlosti, kisika, otapala, metalnih iona, sulfita i enzima (Osorio i sur., 2012). Prirodni izvori antocijanidina su bobičasto voće, grejp, rajčice, šipak, zelena zrnca kave, crveni kupus.

Izoflavoni su grupa oksidiranih heterocikličnih spojeva koji pripadaju skupini fitoestrogena. Najpoznatiji su daidzein, genistein i glicitein koji prevladavaju u leguminozama, pogotovo u soji (Balisteiro i sur., 2013). Osnovni oblici izoflavona u biljkama su glikozidi sa šećerom (glukoza, galaktoza, ramnoza..). Prirodni izvori izoflavanona su primjerice zelene, žute i crvene leće te grah.

FENOLNE KISELINE druga su velika skupina prirodnih antioksidansa. Mogu se podijeliti u dvije grupe, ovisno o njihovoj strukturi, pa se tako razlikuju derivati benzojeve kiseline ili derivati cinamične kiseline. Najvažnije hidroksibenzojeve kiseline su galna, *p*-hidroksibenzojeva, vaniliska i siringinska kiselina. Najvažnije hidroksicinamične kiseline su kafeinska, ferulna, *p*-kumarinska i sinapinska kiselina (Bravo, 1998). Prirodni izvori fenolnih kiselina su primjerice, osušeni đumbir, žitarice, zelena zrnca kave, sok od naranče, začini.

Osim jednostavnih fenolnih kiselina, antioksidacijsko djelovanje pokazuju i njihovi kondenzacijski produkti, nastali kondenzacijom nekoliko fenolnih jedinica, od kojih su najznačajniji tanini, stilbeni i lignani.

Tanini su sekundarni biljni metaboliti s molekulskom masom većom od 30000, koji također pokazuju antioksidativno djelovanje (Winkel-Shirley, 2001). Prema njihovoj strukturi mogu se podijeliti u dva razreda makromolekula: hidrolizabilni tanini i kondenzirani tanini. Hidrolizabilni tanini imaju molekulsku masu između 500 i 5000 te imaju vrlo izraženu antioksidativnu aktivnost (Arapsitas, 2012).

Stilbeni su fenolne komponente s dva aromatska prstena povezana etanskim mostom, a javljaju se kao monomeri (npr. rezervatol) ili oligomeri (npr. dimeri, trimeri ili polimeri rezervatola)

Lignani su grupa fenolnih komponenata koji se u visokim koncentracijama nalaze kod lana i ostalih sjemenki, korijena, lišća, voća, te drvenastih dijelova blijaka (Ekiert i sur., 2013). Lančaste su strukture koju karakteriziraju ponavljajuće *n*-propilbenzenske jedinice, u kojima se izmjenjuju C3 i C6 podjedinice.

2.3.Mehanizmi antioksidansa u sprječavanju oksidativnih promjena u hrani

Antioksidansi usporavaju oksidativne promjene u hrani mehanizmom uklanjanja slobodnih radikala, keliranjem metala, reduciranjem singletnog kisika i fotosenzibilizatora te inaktivacijom lipoksigenaze.

2.3.1.Uklanjanje slobodnih radikala

Antioksidansi uklanjanju slobodne radikale u hrani tako što im predaju vodik, nakon čega dolazi do nastajanja relativno stabilnog radikala antioksidansa s niskim standardnim redukcijskim potencijalom, manjim od 500 mV (Choe i Min, 2005). Tipični predstavnici antioksidansa koji pokazuju takav mehanizam djelovanja su fenolne komponente (tokoferoli, butilirani hidroksitoluen, butilirani hidroksianisol, lignani, flavonoidi, fenolne kiseline..) (Hwang i sur., 2007). Učinkovitost antioksidansa u uklanjanju slobodnih radikala ovisi o energiji disocijacije veze između kisika i fenolnog vodika, konstantni disocijacije kiseline (ako se antioksidans ponaša kao kiselina) te redukcijskom potencijalu i delokalizaciji elektrona u radikal u izvedenom od antioksidansa (Litwinienko i Ingold, 2003). Prijenos vodika od antioksidansa do peroksi- ili alkil-radikala u hrani je termodinamički povoljniji kad

je energija disocijacije veze O-H niska. Energija disocijacije veze za O-H fenolnih antioksidansa otprilike je 70-80 kcal/mol (Berkowits i sur., 1994). Na energiju disocijacije veze O-H fenolnih antioksidansa utječe priroda otapala, tako da je ona veća u polarnom otapalu, kao što su voda, acetonitril ili *t*-butil alkohol, nego u nepolarnom otapalu, primjerice heksanu (Lucarini i sur., 2002). Polarna otapala smanjuju sposobnost antioksidansa u uklanjanju radikala zbog intermolekularnog vezanja vodika između kisika ili dušika u polarnom otapalu i OH grupe kod fenolnog antioksidansa. Što je niža energija disocijacije veze O-H, to je stabilniji radikal antioksidansa, te je taj antioksidans bolji i učinkovitiji donor vodika (Amorati i sur., 2007). Antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina ovisi o pH. Fenolne kiseline nisu učinkoviti antioksidansi pri niskom pH, no pri pH između 7 i 8 antioksidativna aktivnost im je jako izražena (Mukai i sur., 1997).

Što je niži redukcijski potencijal radikala antioksidansa, te što je veća razlika između tog potencijala i redukcijskog potencijala reaktivne radikalske vrste s kojom antioksidans reagira, to antioksidans lakše donira vodik. Redukcijski potencijali hidroksi-, alkil-, alkoksi-, alkilperoksi- i superoksidnih radikala su približno 2,30, 0,60, 1,60, 1,00 i 0,94 V prema standardnoj vodikovoj elektrodi. Radikali izvedeni od tokoferola, askorbinske kiseline i kvercetina imaju redukcijske potencijale od približno 0,50, 0,33 i 0,30 V (Steenken i Neta, 1982), što je znatno niže u odnosu na predhodno navedene reaktivne radikale, i upravo ta razlika omogućuje da tokoferol i askorbinska kiselina mogu predati vodik peroksi-, alkoksi- i alkil- radikalima kako bi usporili formiranje radikala u hrani.

2.3.2. Keliranje metala

Metali u hrani djeluju kao prooksidansi jer reduciraju energiju aktivacije oksidacije, pogotovo u koraku inicijacije u mehanizmu oksidacije lipida (Jadhav i sur., 1996). Također, metalni ioni mogu kompleksirati ili na drugi način reagirati s prirodno prisutnim antioksidansima, umanjujući njihovo djelovanje. Primjerice, ioni Fe^{3+} smanjuju oksidativnu stabilnost maslinovog ulja zbog kompleksiranja i oksidacije fenolnih antioksidansa, npr. kafeinske kiseline (Keceli i Gordon, 2002). Jedan od načina umanjivanja prooksidativnog djelovanja metala je njihovo keliranje, tj. vezanje u stabilan kompleks s tzv. metalnim kelatorima. Time se mijenjaju oksidacijsko-redukcijska svojstva metala, formiraju netopljivi metalni kompleksi ili stvaraju steričke smetnje između metala i komponenata hrane, odn. njihovih oksidiranih međuprodukata (Graf i Eaton, 1990). EDTA i limunska kiselina su najčešći metalni kelatori u

hrani. Fosfolipidi, flavonoidi, lignani, polifenoli, askorbinska kiselina i amino kiseline također mogu funkcionirati kao kelatori metala.

2.3.3. Uklanjanje singletnog kisika

Singletni kisik ($^1\text{O}_2$) za 93,6 kJ manje je stabilan nego tripletni kisik ($^3\text{O}_2$) te stoga brže reagira s lipidima. Tokoferoli, karotenoidi, fenoli i askorbati mogu ukloniti singletni kisik (Lee i Min, 1992). To uklanjanje može biti fizikalno ili kemijsko. Fizikalno uklanjanje uključuje deaktivaciju singletnog kisika prijenosom energije ili naboja te njegovo prevođenje u tripletni kisik (Min i sur., 1988). U tom slučaju ne dolazi ni do potrošnje kisika, ni do nastajanja štetnih produkata. Uklanjanje singletnog kisika prijenosom energije moguće je samo u slučajevima kad je energija tvari koja reagira sa singletnim kisikom vrlo bliska energiji singletnog kisika, ili manja od nje. Kemijsko uklanjanje singletnog kisika uključuje oksidaciju tvari koja stupa u kemijsku interakciju sa singletnim kisikom, pri čemu u uzorku zaostaju nastali produkti oksidacije. Primjeri, tvari koje se lako oksidiraju singletnim kisikom su β -karoteni, tokoferoli, askorbinska kiselina, neke amino kiseline (histidin, cistein, metionin) i peptidi, te su svi oni kemijski uklanjivači singletnog kisika (Foote, 1976). Potrebno je napomenuti da sposobnost karotenoida da uklanjaju singletni kisik ovisi o broju konjugiranih dvostrukih veza u njihovoj strukturi, pri čemu je optimalno da molekula karotenoida posjeduje devet ili više konjugiranih dvostrukih veza (Buettner, 1993).

2.3.4. Inaktivacija fotosenzibilizatora

Hrana sadrži fotosenzibilizatore kao što su klorofili i riboflavin koji se pobuđuju ("aktiviraju") pomoću vidljive svjetlosti (Jung i sur., 1989). Pobuđeni senzibilizatori prenose energiju do atmosferskog (tripletnog) kisika otopljenog u hrani, pri čemu se on pobuđuje u singletni kisik, ili reduciraju tripletni kisik do superoksidnog aniona. U oba slučaja nastaju reaktivne vrste koje mogu reagirati s komponentama hrane i uzrokovati njihovu oksidativnu degradaciju (Min i Lee, 1988). Svaka od ranije spomenutih tvari koja može efikasno preuzeti energiju od pobuđenog senzibilizatora, ili je u stanju brzo reagirati s nastalim singletnim kisikom, odn. superoksidnim anionom ponašat će se kao antioksidans i štitit će komponente hrane od oksidativne degradacije.

2.3.5. Inaktivacija lipoksigenaze

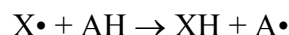
Lipoksigenaza je enzim u oksidaciji lipida koji se inaktivira kaljenjem. Obradom zrna soje pri 100 °C, dvije minute, smanjuje aktivnost lipooksigenaze za 80-100%, uz smanjenje sadržaja peroksida, što poboljšava senzorsku kvalitetu neobrađenog sojinog ulja (Engeseth i sur., 1987).

2.4. Metode za određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta

Antioksidativni kapacitet je povezan s koncentracijom komponenata uzorka koje su sposobne zaštititi biološki sustav od štetnih učinaka procesa ili reakcija koje uključuju reaktivne kisikove ili dušikove vrste (ROS ili RNS). Antioksidativni kapacitet i antioksidativna aktivnost su dva pojma koja se često koriste kao sinonimi, što je u određenoj mjeri pogrešno, kako je dokazano brojnim istraživanjima (MacDonald-Wicks i sur., 2006). "Antioksidativna aktivnost"neke tvari je kinetički pojam i odnosi se na brzinu kojom promatrana tvar reagira s nekom reaktivnom kisikovom ili dušikovom vrstom. U tom kontekstu, razmatrati antioksidativnu aktivnost bez navođenja specifičnih reakcijskih uvjeta, kao što su tlak, temperatura ili pH, nije smisleno. "Antioksidativni kapacitet" daje informaciju o kumulativnom svojstvu uzorka da neutralizira (ukloni) određenu količinu reaktivnih kisikovih vrsta u specificiranom vremenu, no ne daje informaciju o brzini kojom pojedina komponenta uzorka reagira s reaktivnim vrstama (Roginsky i Lissi, 2005). S obzirom da različite metode mjerenja antioksidativnog kapaciteta koriste različite reaktivne vrste te da se sve odvijaju u nekom konačnom vremenu, isti uzorak dat će različite vrijednosti antioksidativnog kapaciteta, ovisno o korištenoj metodi. Stoga je vrlo bitno za pojedinu metodu mjerenja antioksidativnog kapaciteta točno navesti sve faktore koji utječu na njen rezultat, od kojih su najvažniji inicijator oksidacije, reakcijski uvjeti (temperatura, pH...) te način određivanja krajnje (završne) točke mjerenja (Laguerre i sur., 2007).

Metode za određivanje ukupnog antioksidativnog kapaciteta u grubo se mogu podijeliti u dvije kategorije: 1) metode temeljene na reakciji prijenosa atoma vodika (HAT) i 2) metode temeljene na reakciji prijenosa elektrona (SET). Ovisno o metodi, HAT i SET se mogu odvijati i paralelno, a koji će mehanizam u datom sustavu prevladati ovisi o strukturi i svojstvima antioksidansa (od kojih su najbitniji energija disocijacije veze s vodikom i standardni potencijal antioksidansa), topljivosti, koeficijentu raspodjele i svojstvima otapala.

HAT metode mjere mogućnost antioksidansa u uklanjaju radikala doniranjem atoma vodika i mogu se simbolički prikazati jednadžbom:



u kojoj je AH bilo koji antioksidans koji se ponaša kao donor vodika. U reakcijskom mehanizmu generator slobodnih radikala oksidira probnu tvar, a antioksidans se s probnom tvari natječe za slobodne radikale. Relativna reaktivnost ovdje ovisi o energiji disocijaciji veze H-donirajuće grupe potencijalnom antioksidansu. HAT reakcije su neovisne o otapalu i pH vrijednosti, i uglavnom su brze, u trajanju od nekoliko sekundi do nekoliko minuta. Prisutnost reducirajućih tvari, uključujući i katione metala, može predstavljati interferenciju pri HAT analizi, te može dovesti do pogrešno velikih vrijednosti za izmjereni antioksidativni kapacitet. Metode koje se temelje na HAT mehanizmu, a najčešće se koriste su: ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), TRAP (*Total Radical Trapping Antioxidant Parameter*) i metoda izbjeljivanja krocina (*Crocin bleaching assay*) (Flanjak, 2012.).

SET metode temelje se na određivanju mogućnosti antioksidansa da prijenosom elektrona reduciraju neku oksidativnu vrstu, uključujući katione metala, karbonile i reaktivne slobodne radikale. U reakciji probna tvar, koja je ujedno i oksidans, prima elektron od antioksidansa i kao rezultat dolazi do promjene boje probne tvari, čiji je intezitet proporcionalan koncentraciji antioksidansa. Relativna reaktivnost ovdje ovisi o deprotoniranju i standardnom potencijalu reaktivne funkcionalne grupe. Stoga su SET reakcije pH ovisne jer općenito, vrijednosti standardnog potencijala opadaju s porastom pH. SET reakcije su uglavnom spore i zahtijevaju duže vremena za odvijanje, stoga su mjerenja antioksidativnog kapaciteta uglavnom temeljena na mjerenju prirasta produkta, a ne na mjerenju kinetike reakcije. SET reakcije su vrlo osjetljive na interferencije, od kojih su najznačajnije reduktivne organske kiseline (askorbinska, mokraćna) te tragovi metala, što rezultira njihovom slabom ponovljivošću te visokom varijabilnošću rezultata (Prior i sur., 2005). Metode temeljene na SET koje se najčešće koriste za mjerenje antioksidativnog kapaciteta su: FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), DPPH (redukcija 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil radikala) i TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) metoda (Flanjak, 2012.).

2.4.1. ORAC

ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) je standardizirana metoda temeljena na HAT reakcijskom mehanizmu koja se koristi za određivanje antioksidacijskog kapaciteta raznih prehrambenih proizvoda. Tipična reakcijska smjesa u ORAC eksperimentu sadrži izvor peroksidnih radikala, fluorescentnu probu (oksidabilni proteinski supstrat), te standard ili uzorak kojem je potrebno odrediti antioksidacijski kapacitet. Izvor radikala je azo-spoj 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid (AAPH), koji se raspada na temperaturi od 37°C konstantnom brzinom te tako generira peroksidne radikale. Uslijed reakcije slobodnih radikala i fluorescentne probe, proba se oksidira i prelazi u nefluorescentni oblik, što se očituje kao pad intenziteta fluorescencije. Ukoliko se u reakcijsku smjesu dodaju antioksidansi, dolazi do usporavanja ove reakcije, budući da antioksidansi reagiraju sa slobodnim radikalima (Prior i sur., 2003). U testu se kao standardna otopina koristi sintetski antioksidans Trolox. Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksilna kiselina) je u vodi topljivi analog vitamina E. To je antioksidans poput vitamina E i koristi se u više bioloških ili biokemijskih testova za mjerenje oksidativnog stresa i oštećenja. U ORAC testu se izmjereni antioksidacijski kapacitet izražava kao Trolox-ekvivalent (TE), primjerice kao $\mu\text{mol TE po } 100 \text{ g uzorka}$. Prednosti ORAC testa su što se pokazao prikladnim za antioksidanse koji pokazuju lag fazu, kao i za one koji to ne pokazuju. Obično se koristi za uzroke koji imaju višestruke sastojke i složene reakcijske mehanizme. Fluorescentna proba je jeftina, a za očitavanje rezultata većeg broja uzoraka može se koristiti automatski čitač mikroploča, što ovaj test čini jednostavnim i učinkovitim (Huang i sur., 2002). Također, u testu se mogu koristiti različiti generatori slobodnih radikala ili oksidansi. ORAC je jedina metoda koja kombinira stupanj inhibicije i trajanje inhibicije oksidacije u jednu vrijednost, te daje informacije o zaštitnom učinku antioksidansa u dužem vremenskom periodu (Apak i sur., 2004). Nedostatci ORAC metode su relativno velika pH osjetljivost fluorescentne probe, zbog čega se pH tijekom mjerenja mora održavati u vrlo uskim granicama, limitiranost metode na peroksidne i hidroksilne radikale, potreba za posebnim mjerenjima u lipofilnoj i hidrofilnoj frakciji, te dugo trajanje reakcije (od pola sata do nekoliko sati).

2.4.2. TRAP

TRAP (*Total Radical Trapping Antioxidant Parameter*) je standardizirana metoda temeljena na HAT reakcijskom mehanizmu koja bilježi sposobnost antioksidansa u ometanju reakcije

između peroksidnog radikala generiranog iz AAPH ili ABAP i ciljane fluorescentne probe. Kao fluorescentnu probu TRAP test koristi R-fikoeritrin (R-PE), a reakcija između R-PE i AAPH se bilježi fluorometrijski (pri 495–575 nm). Prisutnost antioksidativnih komponenti sprječava pojavu signala fluorescencije (Schlesier i sur., 2002). Prednosti TRAP testa su što uključuje inicijaciju lipidne peroksidacije generiranjem hidrofilnih peroksidnih radikala koji su osjetljivi na sve poznate antioksidanse koji terminiraju lančane reakcije, stoga je taj koncept vrlo koristan za kvantifikaciju i usporedbu antioksidativnog kapaciteta. Nedostaci testa su rezultat njegove popularnosti i široke rasprostranjenosti, zbog čega postoje različite inačice testa koje se razlikuju u metodi određivanja završne točke mjerenja, pa su usporedbe rezultata među laboratorijima nesigurne. Pored toga, metoda je relativno kompleksna, dugotrajna te zahtijeva iskustvo u interpretaciji rezultata. Izračunavanje antioksidativnog kapaciteta na temelju određivanja samo lag faze, koja odgovara inhibiciji pojave fluorescencije, također nije bez nedostataka, jer nema svaki antioksidans jasno izraženu lag fazu, a i zbivanja u uzorku poslije te faze se zanemaruju.

2.4.3. Test obezbojenja β -karotena ili krocina

Metode koje se temelje na obezbojenju β -karotena ili karotenoida krocina također su standardizirane metode koje se temelje na HAT mehanizmu, u kojima se karotenoidi obezbojavaju autooksidacijom induciranom svjetlom, toplinom ili peroksidnim radikalima (npr. AAPH ili oksidiranim lipidima). Dodatak uzorka koji sadrži antioksidans u reakcijsku smjesu uzrokuje inhibiciju obezbojavanja β -karotena (Laguerre i sur., 2007). Test mjeri smanjenje brzine raspada β -karotena ili krocina uzrokovano prisutnošću antioksidansa. Gubitak boje prati se spektrometrijski, mjerenjem apsorbancije pri 443 nm, u fosfatnom puferu pri pH 7. Brzina obezbojenja postaje linearna otprilike prve minute nakon dodavanja AAPH i prati se deset minuta (Huang i sur., 2005). Prednosti testa su što kinetički pristup dozvoljava određivanje ukupnog inhibirajućeg učinka i osigurava mnogo precizniju procjenu učinkovitosti antioksidativnog utjecaja (Roginsky i Lissi, 2005). Nedostaci su što se dva neovisna parametra, reaktivnost antioksidansa i antioksidativni kapacitet ne mogu odrediti odvojeno. Također, češće se za probu umjesto β -karotena koristi krocina, jer se obezbojavanje β -karotena može događati zbog različitih utjecaja, što otežava interpretaciju rezultata. To ograničava uporabu testa jer krocina nije komercijalno dostupan, nego se mora ekstrahirati iz šafrana, što može rezultirati slabijom reproducibilnošću između testova.

2.4.4. TEAC

TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) je metoda temeljena na SET mehanizmu, koja je široku primjenu našla u određivanju antioksidativnog kapaciteta u uzorcima prehrambenih proizvoda. ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) je kosupstrat peroksidaze, kojeg peroksidaza u prisutnosti H_2O_2 oksidira do metastabilnog radikal-kationa, koji je intenzivno obojen i čija se koncentracija može pratiti spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije pri 600-750 nm. Nastali ABTS radikal-kation reagira s antioksidansima prisutnima u uzorku i pritom se obezbojuje. Stoga se kod TEAC metode antioksidativni kapacitet uzorka dovodi u vezu sa smanjenjem apsorbancije otopine uslijed smanjenja koncentracije ABTS radikal-kationa. Rezultati testa izražavaju se relativno prema Troloxu, kao Trolox-ekvivalent (Roginsky i Lissi, 2005). Prednosti TEAC metode su što je ABTS topljiv i u vodenom, i u organskom mediju, pa se test može koristiti za određivanje i hidrofilnih, i lipofilnih antioksidansa (pod uvjetom da se provodi u primjenom otapalu). Također, test je jednostavan i dopušta testiranje u širokom rasponu pH, iako se najčešće koristi pH 7.4 (Ozgen i sur., 2006). Nedostatci TEAC testa su činjenica, test određuje samo reaktivnost prema ABTS radikal-kationu, a ne inhibiciju oksidativnog procesa. Također, neki polifenoli sporo reagiraju s ABTS radikal-kationom, pa mjerenje može biti vremenski dugotrajno. Neki autori kao zamjerku navode i činjenicu da se ABTS radikal-kation, koji se koristi kao oksidans u TEAC testu, nepojavljuje u biološkim sustavima te da po svojoj strukturi i reaktivnosti nije sličan radikalima koji se tamo nalaze (MacDonald-Wicks i sur., 2006).

2.4.5. DPPH metoda

DPPH metoda temelji se na SET mehanizmu. DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) radikal je jedan od rijetkih organskih dušikovih radikala koji je vremenski stabilan, intenzivno (ljubičasto) obojen i komercijalno dostupan. U reakciji s antioksidansima, DPPH radikal se reducira u blijedo žuti hidrazinski oblik. Sposobnost antioksidansa da reduciraju DPPH radikal prati se mjerenjem promjene apsorbancije pri 515-528 nm (Prior i sur., 2005.). Antioksidativni kapacitet uzorka izračunava se na temelju postotka obezbojenja DPPH radikala. Drugi način izražavanja antioksidativnog kapaciteta nekog uzorka jest preko IC50. To je koncentracija antioksidansa (ili količina uzorka) koja je potrebna za smanjenje početne koncentracije DPPH radikala za 50 %. Veće vrijednosti IC50 znači manji antioksidativni

kapacitet uzorka. Prednosti DPPH testa su njegova jednostavnost, brzina, jednostavna instrumentacija (UV-Vis spektrofotometar). Za analizu velikog broja uzoraka se mogu koristiti automatski čitači mikroploča. Nedostaci testa su topljivost DPPH radikala samo u organskim otapalima (najčešće se koriste niskomolekulski alkoholi), pa je test ograničene primjenjivosti pri određivanju hidrofилnih antioksidansa. Također, apsorpcija DPPH radikala pri 517 nm osim zbog reakcije s antioksidansom može se smanjivati i zbog utjecaja svjetlosti. Prisutnosti vode u otapalu može dovesti do pogrešnih rezultata jer dolazi do agregacije ili koagulacije DPPH radikala, zbog čega postaje teže dostupan za reakciju s antioksidansima. Brzina reakcije DPPH radikala s antioksidansa nije linearno proporcionalna koncentraciji DPPH, stoga korištenje vrijednosti IC50 za izražavanje antioksidativnog kapaciteta nije dobra praksa.

2.4.6. FRAP metoda

FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) metoda temelji se na sposobnosti antioksidansa da doniranjem elektrona u kiselom mediju (pH 3,6) reduciraju žuti kompleks željeza(III) sa 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazinom (TPTZ) u plavo obojeni kompleks Fe^{2+} -TPTZ, pri čemu se spektrofotometrijski mjeri intenzitet nastale plave boje pri 593 nm. Intenzitet boje je proporcionalan redukcijskoj sposobnosti antioksidansa. Između TEAC i FRAP testa nema velike razlike, jedino što se TEAC test odvija pri neutralnom pH, a FRAP test pri kiselom pH (Huang i sur., 2005). Prednosti FRAP testa su jednostavnost, brzina, robusnost i pristupačnost – test nije skup i ne zahtjeva nikakvu specijalnu opremu, osim spektrofotometra (Prior i sur., 2005). Nedostatak FRAP metode je taj što će svaka komponenta, neovisno o tome ima li antioksidativnu sposobnost ili ne, a posjeduje niži standardni potencijal od redoks-para (Fe^{3+} -TPTZ)/(Fe^{2+} -TPTZ), dovest do redukcije kompleksa i tako povećati FRAP vrijednost uzorka (tj. dat će lažno veće rezultate).

2.4.7. Određivanje ukupnih fenola Folin-Ciocalteu reagensom

Spektrofotometrijska metoda s Folin-Ciocalteu reagensom koristi se za određivanje udjela ukupnih fenola u različitim vrstama namirnica. Folin-Ciocalteu reagens se sastoji od fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline. Spomenute se kiseline, u reakciji s fenolnim komponentama, reduciraju u plavo obojene okside. Intenzitet plavog obojenja je

proporcionalan koncentraciji fenolnih komponenata, a promjena boje se prati na valnim duljinama od 745 nm do 765 nm (Prior i sur., 2005., Flanjak, 2012.). Fenolne komponente reagiraju s FC reagensom u lužnatim uvjetima (pH 10). Dobiveni rezultat pored ukupnih fenola uključuje i druge reducirajuće nefenolne komponente u uzorku, a kao referentni standard se koristi galna kiselina (Prior i sur.,2005). Prednosti testa su jednostavnost i reproducibilnost. Nedostaci su što metoda nije standarizirana (primjerice, ne koristi se samo galna kiselina kao referentni polifenol), što FC reagens nije specifičan za fenolne komponente i može biti reduciran od strane mnogih nefenolnih komponenata uzorka, te što se test provodi isključivo u vodenoj fazi pa nije prikladan za lipofilne polifenolne antioksidanse.

2.5. On-line HPLC određivanje antioksidativne aktivnosti

Za određivanje sastava antioksidansa u kompleksnim realnim uzorcima kao što je hrana redovito se koriste visokorezolucijske separacijske analitičke tehnike, prvenstveno tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). Kako bi se osim pojedinačnih antioksidansa odredila i njihova antioksidativna aktivnost, u posljednjih je nekoliko godina načinjeno nekoliko pokušaja kombiniranja HPLC separacije s on-line određivanjem antioksidativne aktivnosti antioksidansa detektiranih u uzorku. On-line HPLC metode određivanja antioksidativne aktivnosti mogu se podijeliti u tri glavne skupine. Prvu skupinu čine metode koje se temelje na reakciji antioksidansa s reaktivnim kisikovim vrstama (ROS). Te metode daju najrealističniju mjeru antioksidativne aktivnosti, no međutim vrlo su teške za provesti, stoga od otkrića nisu naišle na širu primjenu. Drugu skupinu čine metode temeljene na izravnom elektrokemijskom određivanju (elektrokemijskoj oksidaciji) antioksidansa u protočnoj elektrokemijskoj ćeliji. Elektrokemijske metode vrlo su praktične, no zahtijevaju skupi i ne toliko uobičajeni elektrokemijski detektor, pa također nisu šire prihvaćene. Treću skupinu metoda za on-line HPLC određivanje antioksidativne aktivnosti čine metode koje se temelje na korištenju reagensa kao što su npr. DPPH ili ABTS radikali. Te su metode najpopularnije zbog relativno jednostavne realizacije i mogućnosti spektrofotometrijskog praćenja koncentracije radikala.

2.5.1. Metode koje se temelje na interakciji s ROS

U ovu kategoriju ubrajaju se metode koje se temelje na reakciji antioksidansa sa singletnim kisikom, superoksidnim anionom i vodikovim peroksidom. Sve tri metode temelje se na konkurenciji između reakcije ROS s probom dodanom u uzorak i antioksidansima prisutnima u uzorku.

2.5.1.1. Singletni kisik kao ROS

Singletni kisik generira se prijenosom energije od fotosenzibilizatora do molekularnog kisika u otopini u protočnom fotokemijskom reaktoru. Reagens sa singletnim kisikom miješa se s eluatom iz HPLC kolone uz istovremeno doziranje probe, 1,2-dietoksietena, koji reagira sa singletnim kisikom dajući 3,4-dietoksi-1,2-dioksietan. Ta je reakcija praćena kemiluminescencijom, pa se nastajanje 3,4-dietoksi-1,2-dioksietana može pratiti mjerenjem intenziteta emitirane svjetlosti. Ako eluat iz kolone sadrži antioksidans, antioksidans će reagirati sa singletnim kisikom i intenzitet kemiluminescencije će se smanjiti. Na taj način smanjenje intenziteta kemiluminescencije pokazuje kolika je antioksidativna aktivnost određenog antioksidansa. Iako zahtjeva nekomercijalnu opremu i kemikalije, što rezultira visokom cijenom ove metode, ona se ipak pokazala kao vrijedan alat u procjeni antioksidativne aktivnosti.

2.5.1.2. Vodikov peroksid i/ili superoksidni anion kao ROS

Ovu skupinu metoda karakterizira to što se temelje na kemiluminescenciji do koje dolazi kad se luminol u u lužnatom mediju oksidira s jakim oksidansom, kao što je vodikov peroksid ili superoksidni ion. Izvedba metode gotovo je identična prethodno opisanoj (uz razlike u korištenom reagensu), a kao mjera antioksidativne aktivnosti pojedine komponente uzorka uzima se smanjenje kemiluminescencije luminola. U odnosu na ostale metode temeljena na ROS, ova metoda daje donekle šire maksimume, što rezultira njenom slabijom osjetljivošću. također, metoda je složena i zahtjeva skupe reagense (Dapkevicius i Beek, 1999).

2.5.2. Metode koje se temelje na reakciji s DPPH ili ABTS radikalom

Osnova ovih metoda su ABTS i DPPH tekstovi opisani ranije u ovom poglavlju. Izvedba im je relativno jednostavna: u tok eluata iz HPLC kolone pumpom se dozira reagens koji sadrži ABTS ili DPPH radikal, smjesa se provodi kroz reakcijsku petlju koja omogućuje miješanje eluata s reagensom te osigurava vrijeme zadržavanja potrebno za odvijanje reakcije, nakon čega ulazi u spektrometrijski detektor, u kojem se bilježi smanjenje apsorbancije smjese uslijed reakcije radikala s antioksidansima prisutnima u eluatu. Obje metode su jednostavne za izvesti, stoga su korištene u većem broju istraživanja (Bartasiute i sur., 2005).

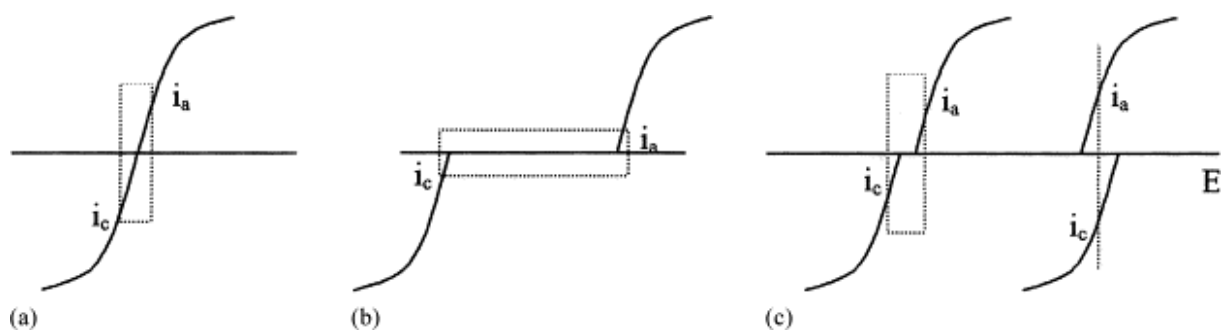
Granica detekcije i granica određivanja za HPLC-ABTS metodu osjetno su niže nego kod HPLC-DPPH metode, pa je HPLC-ABTS metoda osjetljivija nego HPLC-DPPH analiza. ABTS radikal je hidrofilniji nego DPPH radikal, stoga se analize s ABTS radikalom češće koriste za određivanje hidrofilnih antioksidansa (Koleva, 2001).

2.6. Osnove biamperometrije

Biamperometrija je elektrokemijska tehnika koja se temelji na mjerenju struje između dvije inertne elektrode uronjene u uzorak, na koje je narinuta mala i konstantna razlika potencijala. Osnova za analitičku primjenu biamperometrije je činjenica da u analiziranom sustavu mora biti prisutan i oksidirani i reducirani oblik reverzibilnog ili kvazi-reverzibilnog para (analita), kako bi između elektroda protjecala mjerljiva struja. Struje na svakoj elektrodi su iznosom jednake, samo su suprotnog smjera. Ako otopina sadrži oksidirani i reducirani oblik nekog redoks-para u različitim koncentracijama, maksimalna struja koja može protjecati između elektroda bit će određena koncentracijom onog oblika redoks-para, kojeg ima manje. Stoga se biamperometrijski analit može odrediti na dva načina. Kod izravnog biamperometrijskog mjerenja analit u određenom oksidacijskom stanju (npr. u reduciranom obliku) dodaje se u otopinu koja sadrži suvišak analita u drugom oksidacijskom stanju (npr. u oksidiranom obliku). U danom primjeru, rezultirajuća struja bit će određena koncentracijom reduciranog oblika analita. Selektivnost izravnog biamperometrijskog mjerenja određena je razlikom potencijala narinutom na elektrode i to je veća, što je ta razlika potencijala manja. S obzirom da je za postizanje zadovoljavajućih struja kod biamperometrije elektrode potrebno polarizirati na to manju razliku potencijala, što je reverzibilnost redoks-para analita veća

(slika 1), izravno biamperometrijsko mjerenje to je selektivnije, što je analit elektrokemijski reverzibilniji.

Drugi način biamperometrijskog određivanja je tzv. indirektna biamperometrija. Kod indirektnog biamperometrijskog mjerenja analit se dodaje u otopinu koja sadrži reagens koji reagira s analizom, dajući reverzibilan redoks-par. Primjerice, na taj se način može odrediti sulfid, dodatkom u zakiseljenu otopinu I_2 , pri čemu reakcijom HSO_3^- s I_2 nastaje reverzibilni redoks par I_2/I^- . Selektivnost indirektna biamperometrije uglavnom ovisi o selektivnosti homogene reakcije (Lingane, 1958.)



Slika 1: Shematski prikaz ovisnosti struje i narinutog potencijala kod biamperometrijske detekcije analita s različitim stupnjem elektrokemijske reverzibilnosti: (a) reverzibilan redoks-par; (b) ireverzibilan redoks-par i (c) kvazi-reverzibilan redoks-par.

Velika prednost biamperometrijskih detektora u usporedbi s mnogo češćim amperometrijskim ili kulometrijskim detektorima je njihova selektivnost, jednostavnost i robusnost te činjenica da za njihov rad nije potrebna treća, referentna elektroda (Tougas, 1984). Nedostatak im je činjenica da se mogu upotrijebiti samo za detekciju analita koji se elektrokemijski ponašaju reverzibilno ili kvazi-reverzibilno, odn. koji u reakciji s nekom tvari daju elektrokemijski reverzibilan ili kvazireverzibilan redoks-par.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Sve kemikalije korištene u ovom radu bile su *p.a* čistoće i korištene su bez daljnjeg pročišćavanja. Za pripremu otopina i HPLC mobilnih faza korištena je deionizirana voda dodatno pročišćena u uređaju Millipore Synergy (SAD).

Dijamonijeva sol ABTS-a dobavljena je od proizvođača Sigma-Aldrich (SAD) i bila je čistoće 98 %. Kao standardi fenolnih antioksidansa korišteni su sinapinska kiselina proizvođača Chemika (Australija), katehin hidrat proizvođača Chemika (Australija), kafeinska kiselina proizvođača Sigma-Aldrich (SAD), ferulna kiselina proizvođača Sigma-Aldrich (SAD), galna kiselina proizvođača Riedel-de Haën (Njemačka) te siringinska kiselina proizvođača Acros Organics (Belgija). Svi navedeni standardi bili su deklarirane čistoće 98 %. Sve ostale kemikalije korištene u radu bile su *p.a.* čistoće i korištene su u obliku kako su dobavljene.

Za pripremu HPLC mobilnih faza korišteni su metanol i acetonitril HPLC čistoće, proizvođača Panreac (Španjolska) te koncentrirana fosforna kiselina, $w(\text{H}_3\text{PO}_4) = 0,85$, HPLC čistoće, proizvođača Merck (Njemačka).

Za prelimenarna ispitivanja i cikličku voltometriju korišten je fosfatni pufer, koncentracije $c = 0,1 \text{ mol/dm}^3$, pripremljen dodatkom zasićene otopine NaOH u otopinu NaH_2PO_4 , $c(\text{NaH}_2\text{PO}_4) = 0,1 \text{ mol/dm}^3$, do postizanja $\text{pH} = 7,0$.

Otopina ABTS radikal-kationa pripremljena je oksidacijom ABTS-a peroksidisulfatnim ionom. U tu je svrhu u 25 mL predhodno opisanog fosfatnog pufera otopljeno 14 mg ABTS-a i 68 mg $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$. Zbog spore kinetike oksidacije ABTS-a otopina je pripremana najmanje 12 sati prije izvođenja mjerenja. Između mjerenja otopina je skladištena pri temperaturi od 4°C u mraku. Pri tim uvjetima otopina ABTS radikal-kationa stabilna je najmanje 48 sati.

Otopina ABTS reagensa za HPLC mjerenja pripremljena je na način da se vodena otopina ABTS, koncentracije $c(\text{ABTS}) = 1 \text{ mmol/dm}^3$, pomiješa s acetatnim puferom, priređenim polaganim dodavanjem ledene octene kiseline u vodenu otopinu amonijeva acetata,

$c(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 1,5 \text{ mol/dm}^3$, u omjeru $V(\text{ABTS}) : V(\text{ABTS radikal}) : V(\text{H}_2\text{O}) : V(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 1 : 1 : 1,3 : 0,7$ do postizanja $\text{pH} = 4,5$.

Standardi polifenola za HPLC mjerenja priređeni su u koncentraciji od 5 mmol/dm^3 , otapanjem pojedinog polifenola u smjesi vode i metanola, $\varphi(\text{CH}_3\text{OH}) = 0,80$. Otopine standarda čuvane su pri temperaturi od -18°C do mjerenja, no nisu skladištene duže od tri dana. Neposredno prije mjerenja, otopine standarda razrijeđene su do željene koncentracije smjesom vode i metanola, $\varphi(\text{CH}_3\text{OH}) = 0,80$.

3.1.2. Uzorci

U ovom radu korišteno je djevičansko maslinovo ulje, za analize ustupljeno ljubaznošću malog obiteljskog gospodarstva Dujmović (Brač, Hrvatska).

3.1.3. Instrumentacija

Za elektrokemijska mjerenja korišten je potenciostat–galvanostat VoltaLab PST050 (Radiometer Analytical, Francuska). Voltometrijska mjerenja provedena su u klasičnoj elektrokemijskoj ćeliji troelektrodnog tipa, koja se sastojala od radne disk-elektrode ($d = 3 \text{ mm}$) načinjene od staklastog ugljika, platinske pomoćne elektrode i kalomelove ($3,5 \text{ M KCl}$) referentne elektrode.

Za biamperometrijska mjerenja korišten je potenciostat PAR 174A (Princeton Applied Research Inc., SAD). Za HPLC biamperometrijsku detekciju korištena je protočna tankoslojna ćelija volumena $5 \mu\text{L}$, proizvođača Cambria Ltd. (Ujedinjeno Kraljestvo).

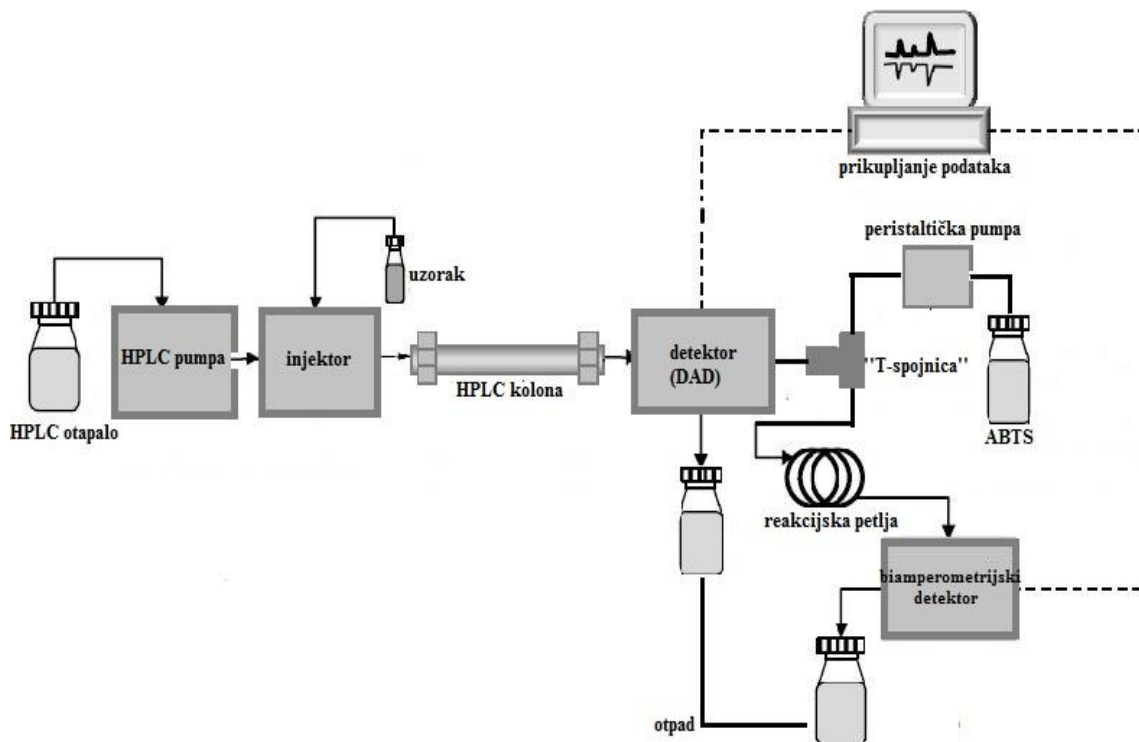
Za spektrofotometrijska mjerenja u UV i Vis području korišten je dvozračni spektrofotometar Specord 200 proizvođača AnalytikJena (Njemačka).

Za HPLC analize korišten je kromatograf HP1090 (HP/Agilent, SAD) opremljen automatskim uzorkivačem i spektrofotometrijskim (DAD) detektorom.

3.2 Metode rada

3.2.1. HPLC s biamperometrijskom detekcijom

Za biamperometrijskoodređivanje antioksidativne aktivnosti pojedinih komponenata uzorka korišten je HPLC sustav shematski prikazan na sljedećoj slici:



Slika 2: Korišteni HPLC sustav za biamperometrijsko određivanje antioksidativne aktivnosti.

Prvi dio korištenog HPLC sustava čini klasični HPLC uređaj sa spektrofotometrijskim (DAD) detektorom, koji detektira polifenole koji se eluiraju iz HPLC kolone. Izlaz iz spektrofotometrijskog detektora spojen je na jedan ulaz "T-spojnice", dok je na drugi ulaz spojen tok ABTS radikala, koji se transportira peristaltičkom pumpom uz protok od 0,25 mL/min. Izlaz iz "T-spojnice" spojen je na ulaz reakcijske petlje, koja se sastoji od 3 m teflonske kapilare, unutarnjeg promjera 0,5 mm, po cijeloj duljini serpentinasto isprepletene s radijusom zavoja od otprilike 3 mm. Izlaz iz reakcijske petlje spojen je na protočnu biamperometrijsku ćeliju, spoјenu na računalom upravljani potencijostat. Uz protok mobilne

faze kroz HPLC uređaj od 1 mL/min i protok ABTS radikala od 0,25 mL/min, vrijeme zadržavanja eluensa i reagensa s ABTS radikalom u reakcijskoj petlji iznosilo je 30 s.

HPLC analize provedene su uz gradijentnu eluciju, pri čemu je kao otapalo A korištena vodena otopina fosforne kiseline, $w(\text{H}_3\text{PO}_4) = 0,1 \%$, a kao otapalo B smjesa metanola i acetonitrila, $V(\text{metanol}) : V(\text{acetonitril}) = 1 : 1$. Gradijentna elucija provedena je prema programu prikazanom u tablici 1.

Tablica 1. Sastav mobilne faze pri gradijentnoj eluciji.

t / min	$Q / \text{ml min}^{-1}$	$\varphi(\text{A}) / \%$	$\varphi(\text{B}) / \%$
0	1,0	96	4
40	1,0	50	50
45	1,0	40	60
60	1,0	0	100
70	1,0	0	100
72	1,0	96	4
82	1,0	96	4

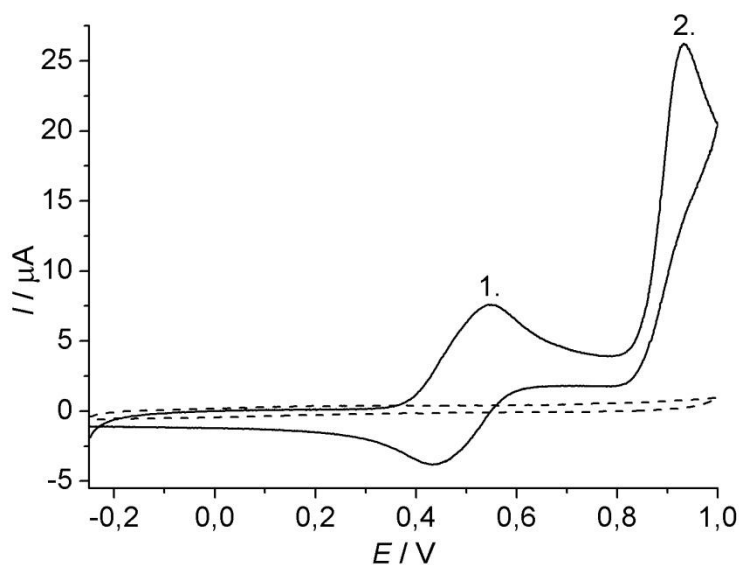
3.2.2. Ekstrakcija polifenola iz djevičanskog maslinovog ulja

Za ekstrakciju je uzeto 2,0 g ulja i prebačeno u plastičnu kivetu volumena 10 mL. U kivetu je potom otpipetiran 1 mL standarda siringinske kiseline, te je sadržaj kivete miješan na vorteks-mješalici tijekom 30 s. Potom je u kivetu pipetom dodano 5 mL otopine vode i metanola, $\varphi(\text{CH}_3\text{OH}) = 0,80$, te je kiveta miješana na vorteks mješalici 1 min, nakon čega je stavljena u ultrazvučnu kupelj na 15 min. Potom je sadržaj kivete centrifugiran pri 4000 okr/min tijekom 25 min. Alikvot supernatanta uzet je iz kivete pomoću plastične šprice s iglom te profiltriran kroz teflonski filter veličine pora od 0,45 μm izravno u staklenu bočicu HPLC uređaja.

4. REZULTATI I RASPRAVA

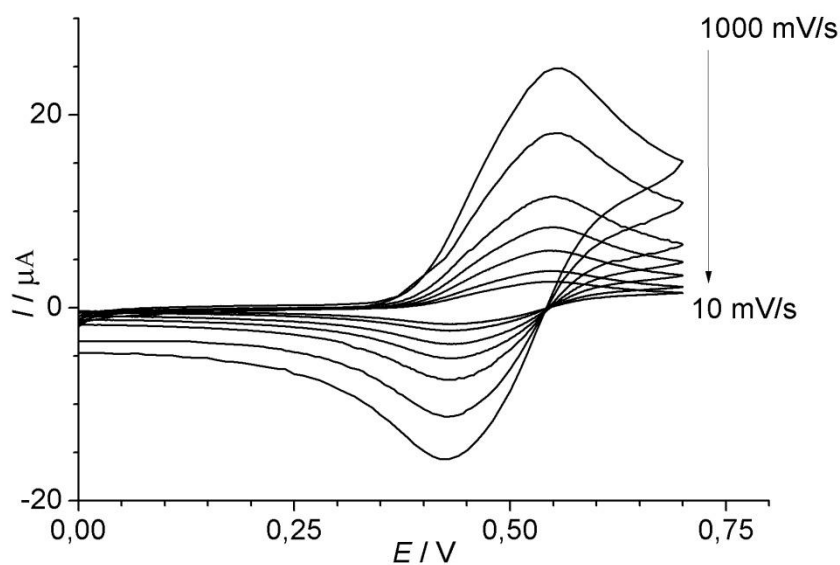
4.1. Preliminarna elektrokemijska mjerenja

Kako bi se dobio uvid u općenito elektrokemijsko ponašanje ABTS-a u vodenoj otopini, snimljen je ciklički voltamogram ABTS-a u 0,1 M fosfatnom puferu, pH = 7,0. Dobiveni voltamogram prikazan je na slici 3.

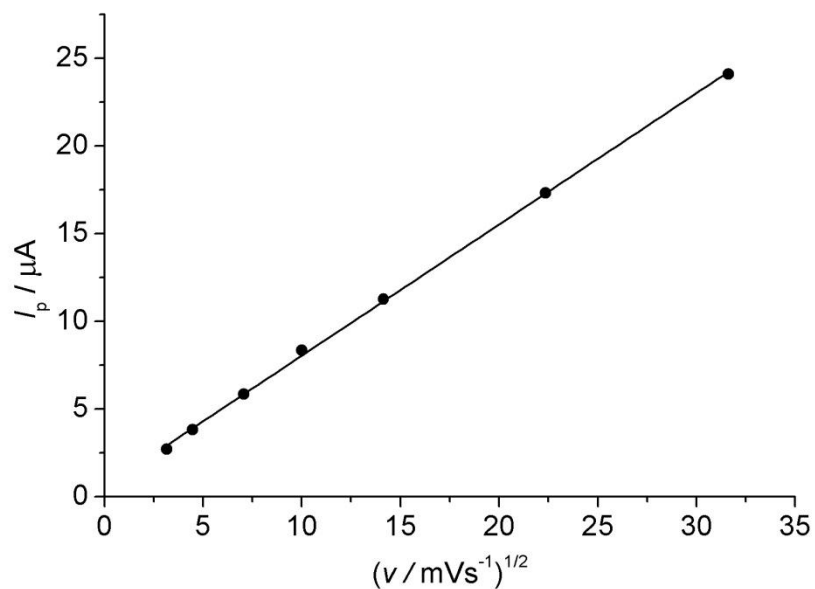


Slika 3. Ciklički voltamogram ABTS. Uvjeti: $c(\text{ABTS}) = 1 \text{ mmol/dm}^3$; osnovni elektrolit: 0,1 M fosfatni pufer, pH = 7,0; brzina promjene potencijala: 100 mV/s. Isprekidanom crtom prikazana je osnovna struja pri istim uvjetima mjerenja.

Na voltamogramu se uočavaju dva anodna (oksidacijska) vala, od kojih se prvi pojavljuje pri 545 mV, a drugi pri 930 mV, te jedan katodni (redukcijski) val, pri 440 mV. S obzirom na svoju poziciju, taj je katodni val očito povezan s redukcijom tvari nastale oksidacijom ABTS-a pri 545 mV. S obzirom da na voltamogramu nije uočen nikakav katodni val koji bi bio povezan s redukcijom tvari koja nastaje oksidacijskim procesom pri 930 mV, očito je da je produkt te oksidacije nestabilan i brzo se raspada pri uvjetima pri kojima je provedeno mjerenje. Kako bi se dobio bolji uvid u narav prvog oksidacijskog procesa, snimljeni su ciklički voltamogrami ABTS-a pri različitim brzinama promjene potencijala, prikazani na slici 4.



Slika 4. Ciklički voltamogrami ABTS-a pri različitim brzinama promjene potencijala. Uvjeti: $c(\text{ABTS}) = 1 \text{ mmol/dm}^3$; osnovni elektrolit: 0,1 M fosfatni pufer, $\text{pH} = 7,0$; brzina promjene potencijala 10, 20, 50, 100, 200, 500 i 1000 mV/s.



Slika 5. Linearnost struje vrha oksidacijskog vala ABTS pri promjenama brzine potencijala od 10, 20, 50, 100, 200, 500 i 1000 mV/s.

Jednadžba pravca: $I_p / \mu\text{A} = (0,748 \pm 0,007) \cdot (v / \text{mV s}^{-1})^{1/2} + (0,6 \pm 0,1)$

Na svakom voltamogramu uočava se i katodni, i anodni val, pri čemu struja vrha vala raste s povećanjem brzine promjene potencijala. Taj je porast linearan s korijenom iz brzine promjene potencijala ($r = 0,9998$), kako to prikazuje slika 5. Linearna ovisnost struje vrha vala o korijenu iz brzine promjene potencijala upućuje na zaključak da je elektrodni proces povezan s oksidacijom ABTS-a pri potencijalu od 545 mV elektrokemijski reverzibilan.

S obzirom na elektrokemijsko ponašanje ABTS-a (Pellegrini i sur., 1999), elektrokemijski procesi uočeni na cikličkim voltamogramima mogu se pripisati reverzibilnoj oksidaciji ABTS-a do ABTS radikal-kationa (proces pri 545 mV), te daljnjoj oksidaciji ABTS radikal-kationa do ABTS biradikala (Bourbonnais i sur., 1998). S obzirom da je ABTS biradikal u vodenoj otopini nestabilan (Brand-Williams i sur., 1995) i brzo hidrolizira, u povratnom dijelu ciklusa ne pojavljuje se val redukcije ABTS biradikala do ABTS radikal-kationa, kako je i uočeno na cikličkom voltamogramu prikazanom na slici 3.

4.1.1. Odabir pufera za mjerenje antioksidativne aktivnosti HPLC eluata

Da bi se odabrao odgovarajući puferški sustav u kojem će se pripremati otopina ABTS radikal-kationa kao reagensa za biamperometrijsku detekciju antioksidativne aktivnosti pojedine vrste u HPLC eluatima, provedeni su eksperimenti u kojima su ispitivani puferški sustavi pomiješani s HPLC mobilnom fazom. Eksperimenti su rađeni u omjeru volumena koji odgovara pretpostavljenom omjeru volumena mobilne faze i ABTS reagensa pri HPLC detekciji. Cilj provedenih eksperimenata bio je ustanoviti kojem se puferškom sustavu pri miješanju s mobilnom fazom ne mijenja drastično pH, te koji se ne zamućuje zbog stvaranja emulzije. Provedeni eksperimenti sumirani su u tablici 2 zajedno s opažanjima tijekom eksperimenta.

Tablica 2. Opažanja tijekom ispitivanja mješivosti mobilne faze i pufera za pripremu reagensa s ABTS radikalom te njegova puferškog kapaciteta. Oznake: A = vodena otopina H_3PO_4 , $w(H_3PO_4) = 0,1\%$; B = smjesa metanola i acetonitrila, $V(\text{metanol}) : V(\text{acetonitril}) = 1 : 1$; c = 0,1 M fosfatni pufer, pH = 7,0; D₁, D₂ = amonijev acetat, pH = 7,07; E = 1,5 M acetatni pufer pH = 4,8.

SASTAV	OPAŽANJE
2 mL A + 0,4 mL C	• pH = 2,6 – nema zamućenja
2 ml B + 0,4 ml C	• vidljivo zamućenje
2 mL A + 0,4 mL D ₁ (0,5 M)	• pH = 4,8 – nema zamućenja
2 ml B + 0,4 ml D ₁ (0,5 M)	• nema zamućenja
2 mL A + 0,4 mL D ₂ (0,75 M)	• pH = 5,2 – nema zamućenja
2 ml B + 0,4 ml D ₂ (0,75 M)	• nema zamućenja
2 mL A + 0,4 mL E	• pH = 4,3 – nema zamućenja
2 ml B + 0,4 ml E	• nema zamućenja

Kod miješanja fosfatnog pufera (C) s mobilnom fazom (A), koja sadrži H_3PO_4 , uočen je drastičan pad pH vrijednosti (s $pH = 7$ na $pH = 2,6$), što je daleko izvan puferskog kapaciteta i nepoželjno je prilikom HPLC mjerenja, dok je kod miješanja s mobilnom fazom (B), koja sadrži smjesu metanola i acetonitrila, opaženo stvaranje emulzije. Koristeći podatke iz tablice 2., izračunati su volumni udjeli i množine komponenata A i C u otopini, te analizirajući te podatke [$\varphi(\text{fosfatni pufer}) = 0,17$, $\varphi(H_3PO_4) = 0,83$, $n(\text{fosfatni pufer}) = 4 \cdot 10^{-5}$ mol, $n(H_3PO_4) = 2 \cdot 10^{-2}$ mol] zaključeno je da se u fosfatni pufer dodaje znatna količina H_3PO_4 , koja mijenja njegov sastav, a samim time i pH. Fosfatni pufer se zbog svega navedenog izuzeo iz daljnjeg odabira kao neprikladan, te je kao alternativni puferski sustav testiran amonijev acetat. Kod miješanja amonijevog acetata (D1,D2) s mobilnom fazom (A) uočen je pad pH vrijednosti, s $pH = 7,07$ na $pH = 4,8$ u prvom slučaju, odnosno $pH = 5,2$ u drugom slučaju, što nije zadovoljavajuće. Kod miješanja amonijevog acetata (D1,D2) s mobilnom fazom (B) nije uočeno zamućenje. Čisti amonijev acetat se zbog svega navedenog u daljnjim eksperimentima zamijenio amonijačnim puferom, u kojem je zbog svoje dobre topljivosti u organskoj fazi ipak zadržan amonijev acetat. Kod miješanja acetatnog pufera (E) s mobilnom fazom A uočen je samo blagi pad pH vrijednosti, s $pH = 4,8$ na $pH = 4,3$, dok kod miješanja s mobilnom fazom B nije uočeno stvaranje emulzije. Na temelju rezultata provedenih istraživanja zaključeno je da je optimalan pufer za pripremu reagensa s ABTS radikal kationom acetatni pufer pripremljen iz ledene octene kiseline i vodene otopine amonijeva acetata, na način

prethodno opisan u eksperimentalnom dijelu. Pri miješanju s kiselim ili organskom mobilnom fazom takav pufer ne pokazuje značajniju promjenu pH, niti dolazi do pojave zamućenja uslijed stvaranja emulzije.

4.2. HPLC mjerenja

Za određivanje redoslijeda eluiranja, napravljene su otopine polifenola koncentracije 5 mmol/dm³ u smjesi vode i metanola, $\varphi(\text{CH}_3\text{OH}) = 0,80$.

Od otopina pojedinog standarda uzet je alikvot od 200 μL , a ostatak je nadopunjen otopinom vode i metanola, $\varphi(\text{CH}_3\text{OH}) = 0,80$ do željenog volumena.

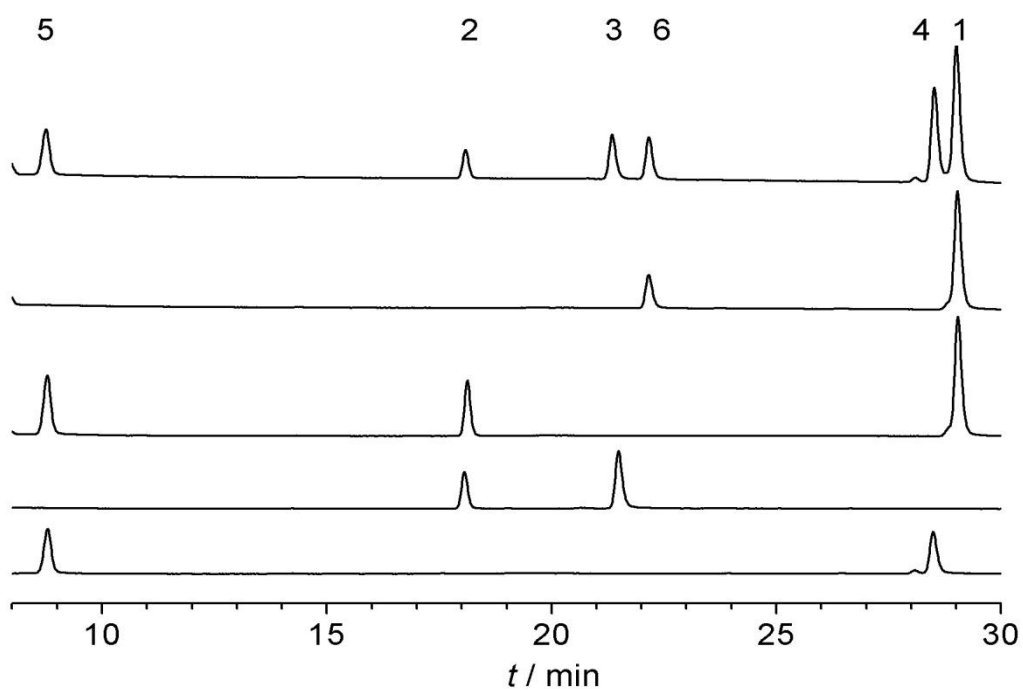
Sastav priređenih standarda prikazan je u tablici 3, dok je na slici 6, prikazan raspored njihovog eluiranja. Standardi su označeni numerički od broja 1 do 6.

Tablica 3. Priređene smjese polifenola za određivanje redoslijeda eluiranja. Oznake:

1 - sinapinska kiselina; 2 - katehin hidrat; 3 - kafeinska kiselina; 4 - ferulna kiselina; 5 - galna kiselina; 6 - siringinska kiselina.

	V / μL						
	sinapinska kiselina	katehin hidrat	kafeinska kiselina	ferulna kiselina	galna kiselina	siringinska kiselina	voda - metanol
S1	200	200	200	200	200	200	0
S2	200	0	0	0	0	200	800
S3	200	200	0	0	200	0	600
S4	0	200	200	0	0	0	800
S5	0	0	0	0	200	200	800

Korištenjem podataka iz tablice 3, te vizualnom usporedbom kromatograma na slici 6, ustanovljen je redoslijed eluiranja polifenola. Pikovi su označeni pripadajućim brojem pojedinog polifenola, iz čega proizlazi sljedeći raspored eluiranja u tablici 4.



Slika 6. Integrirani kromatogrami standardnih otopina polifenola za određivanje redoslijeda eluiranja polifenola

Tablica 4. Redoslijed eluiranja polifenola

redoslijed eluiranja	eluirani polifenol
1.	galna kiselina
2.	katehin hidrat
3.	kafeinska kiselina
4.	siringinska kiselina
5.	ferulna kiselina
6.	sinapinska kiselina

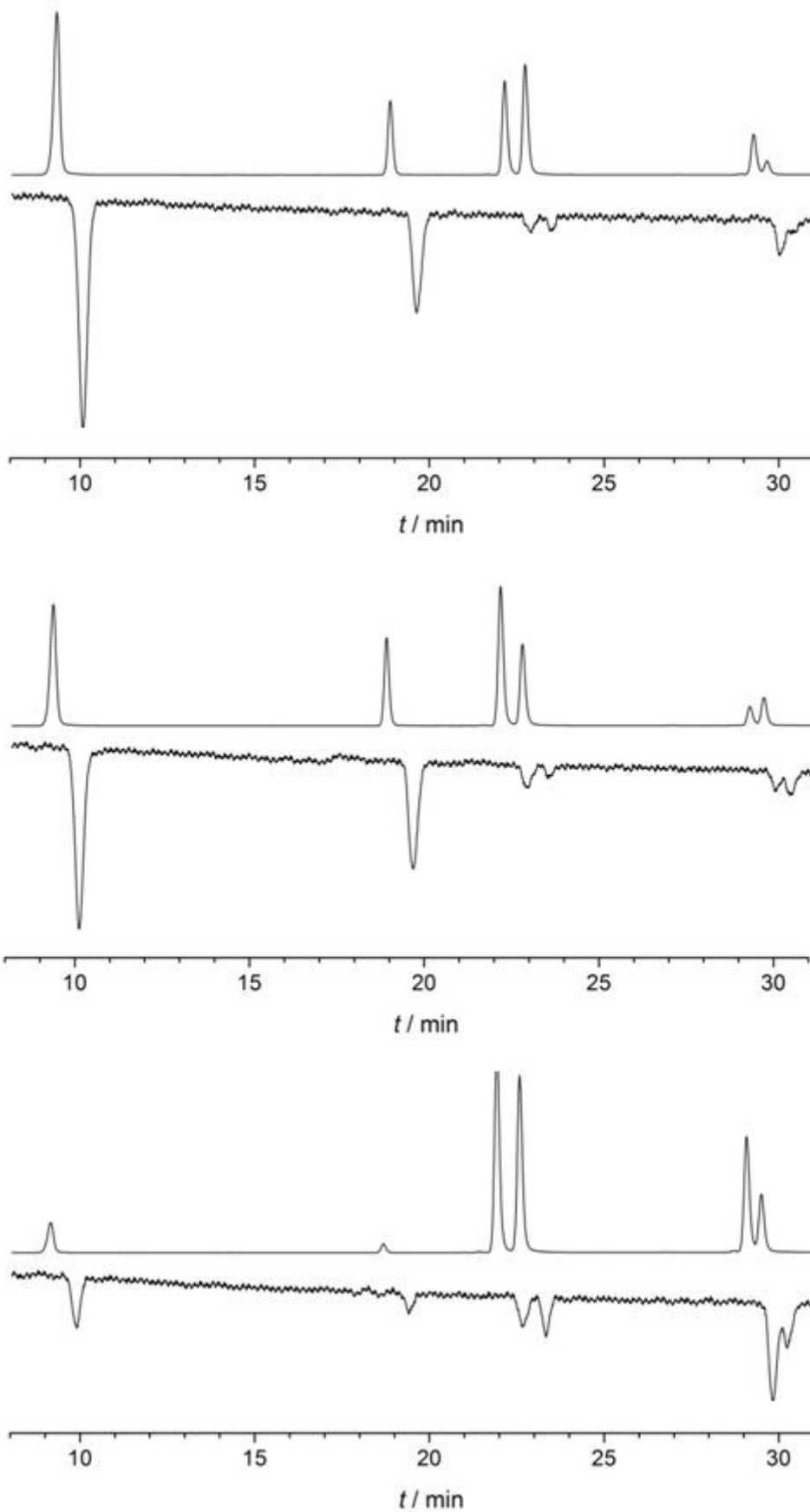
Pikovi određenih polifenola su uglavnom bili nepromjenjivi na svim kromatogramima, što je olakšalo vizualnu usporedbu te detekciju istih zahvaljujući poznatim sastavima standardnih otopina iz tablice 4.

4.2.1. Korelacije odziva HPLC (DAD) detektora i biamperometrijskog detektora

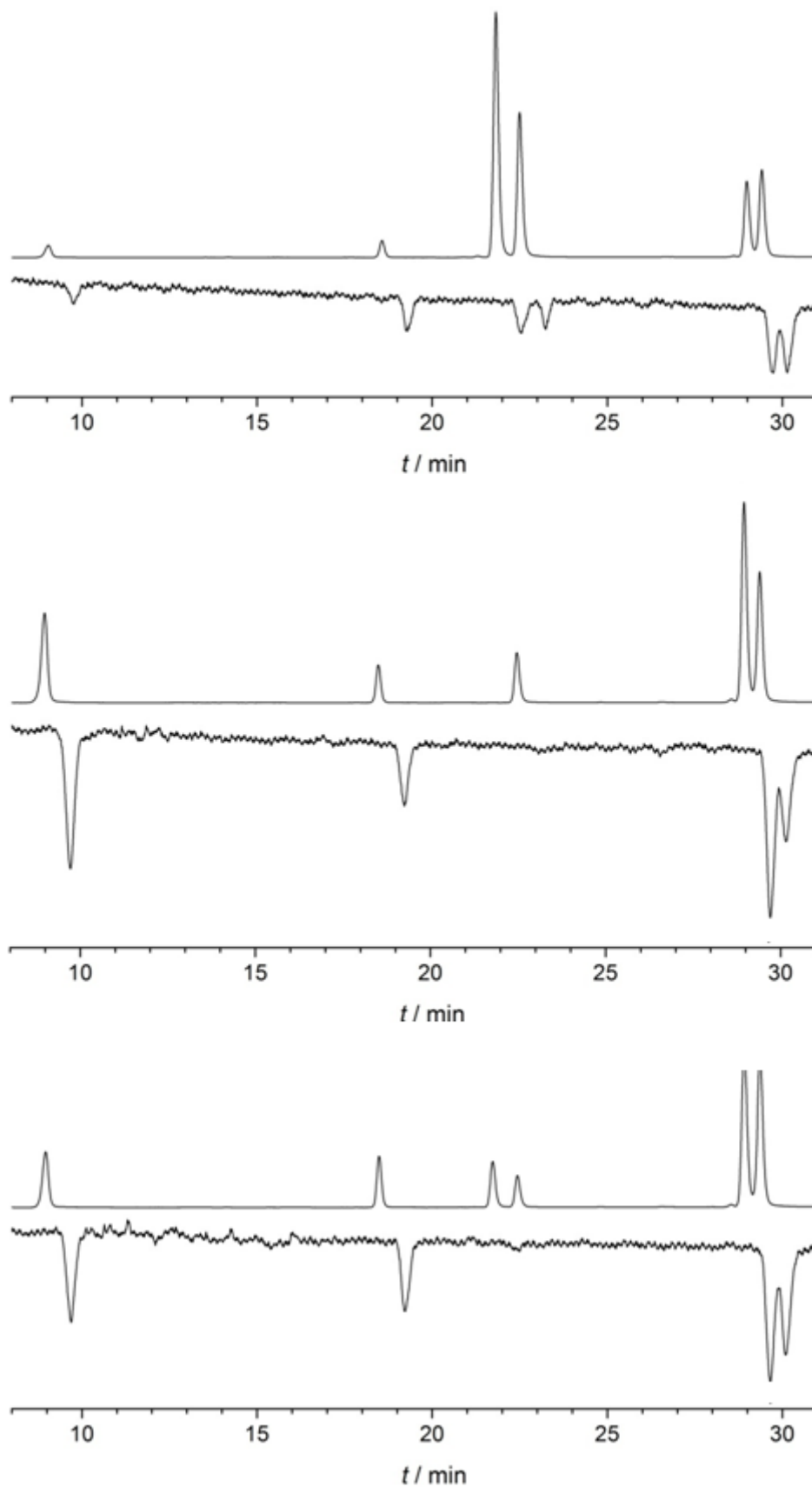
Kako bi se usporedili odzivi HPLC (DAD) i biamperometrijskog detektora, smjese standarda polifenola su razdvajane HPLC sustavom prikazanim na slici 1, uz istovremeno snimanje odziva na oba detektora. Za obradu podataka s oba detektora nužno je bilo u sustav staviti "T-spojnica" i posebno napravljenu reakcijsku petlju, kako bi došlo do miješanja eluata iz HPLC kolone s ABTS radikal-kationom. Kromatogrami s oba detektora su obrađeni i integrirani, radi lakše usporedbe odziva na oba detektora, te su isti prikazani na slikama 7 i 8.

Vizualnom usporedbom kromatograma uočava se da maksimumi na biamperometrijskom detektoru kasne za DAD detektorom, te također da se neki polifenoli vidljivi na DAD detektoru, ne vide na biamperometrijskom detektoru. Kašnjenje se može objasniti zadržavanjem eluata u reakcijskoj petlji, dok je izostanak odziva pojedinih polifenola na biamperometrijskom detektoru očito rezultat njihove spore reakcije s ABTS radikalom, ili ti polifenoli pri danim uvjetima s ABTS radikalom uopće ne reagiraju. Iz opisanih kromatograma, izvedeni su baždarni dijagrami određenih polifenola u rasponu koncentracije od 10,4 do 104,2 μM .

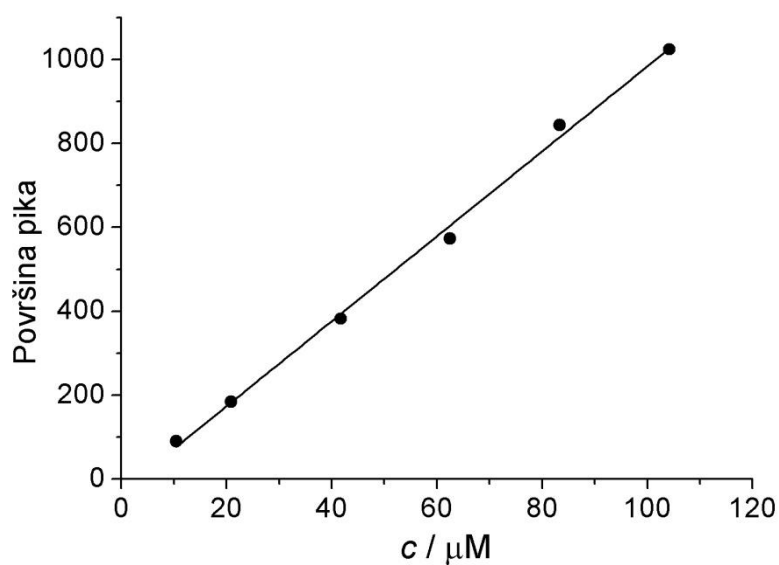
Za baždarne dijagrame standarda polifenola (slike 9–14) snimljenih u rasponu koncentracije od 10,4 do 104,2 μM DAD detektorom možemo konstatirati da su za sve standarde linearni, što proizlazi iz vrlo visokih vrijednosti koeficijenta korelacije, koji su u rasponu $0,997 \leq r \leq 0,999$, izuzev siringinske kiseline kod koje je $r = 0,992$.



Slika 7. Usporedba kromatograma snimljenih DAD (gornji kromatogram u paru) i biamperometrijskim detektorom za smjese standardnih otopina uzoraka 1, 2 i 3.

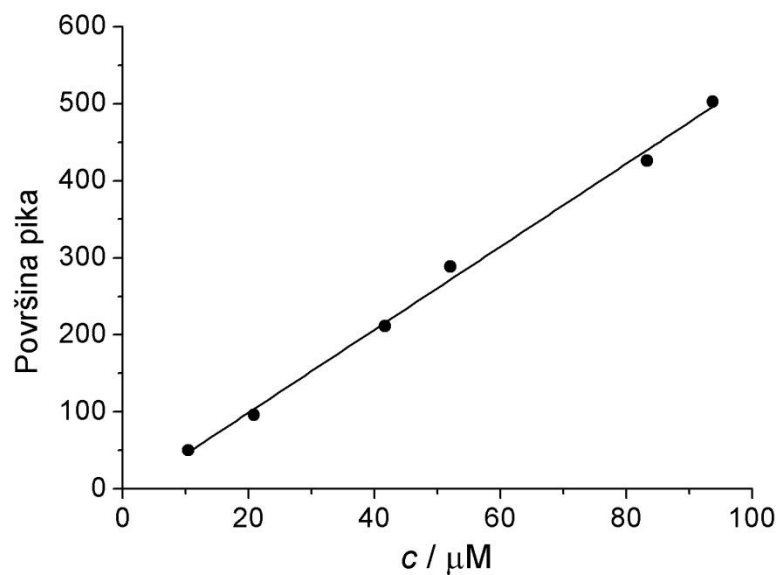


Slika 8. Usporedba kromatograma snimljenih DAD (gornji kromatogram u paru) i biamperometrijskim detektorom za smjese standardnih otopina uzoraka 4, 5 i 6.



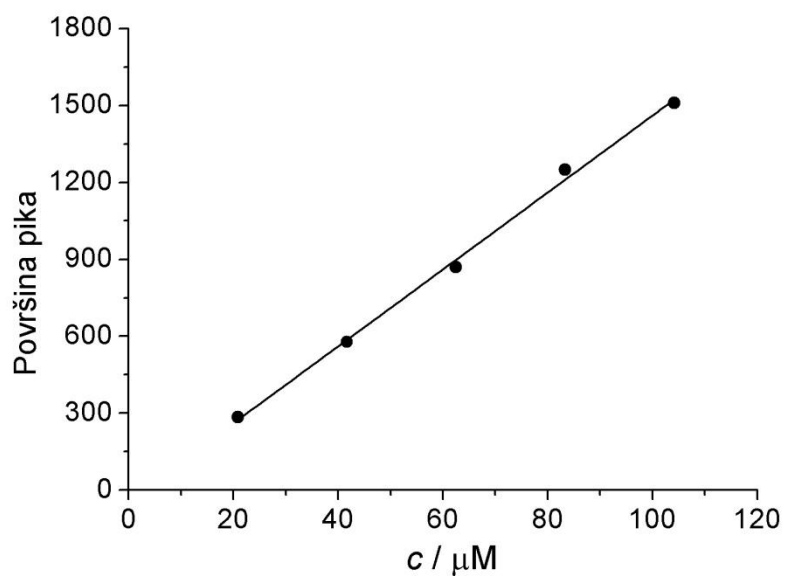
Slika 9. Baždarni dijagram sinapinske kiseline snimljen DAD detektorom ($r = 0,998$)

$$\text{Površina pika} = (10,15 \pm 0,28) \cdot c \text{ (sinapinske kiseline / } \mu\text{M)} + (-28,72 \pm 17,72)$$



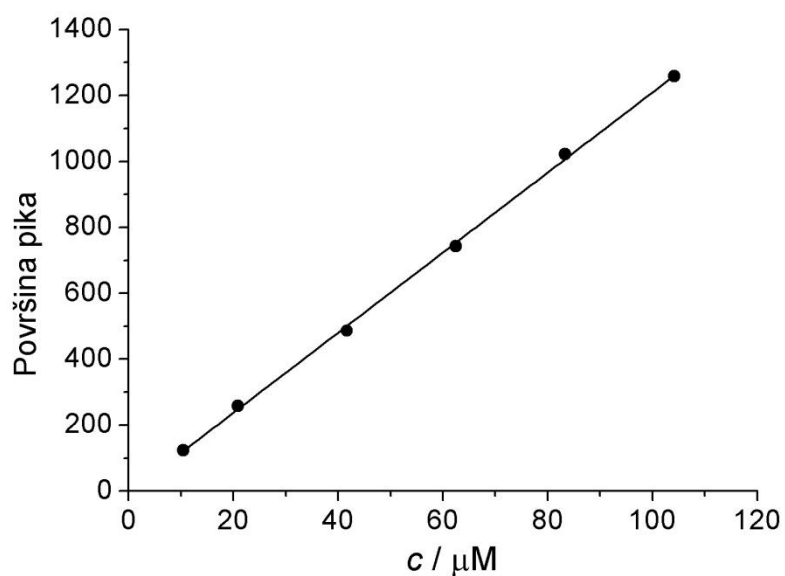
Slika 10. Baždarni dijagram katehin hidrata snimljen DAD detektorom ($r = 0,998$)

$$\text{Površina pika} = (5,38 \pm 0,17) \cdot c \text{ (katehin hidrata / } \mu\text{M)} + (-8,5 \pm 9,6)$$



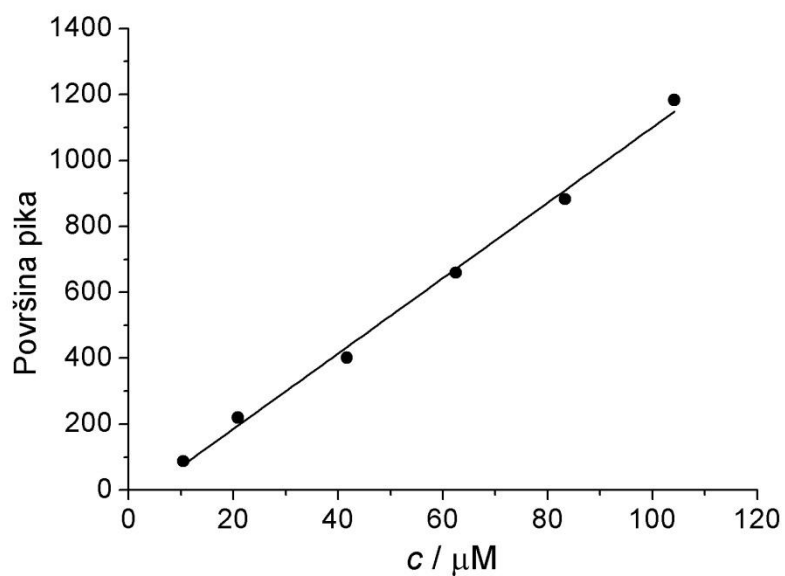
Slika 11. Baždarni dijagram kafeinske kiseline snimljen DAD detektorom ($r = 0,998$)

$$\text{Površina pika} = (15 \pm 0,45) \cdot c \text{ (kafeinske kiseline / } \mu\text{M)} + (-39 \pm 31,2)$$



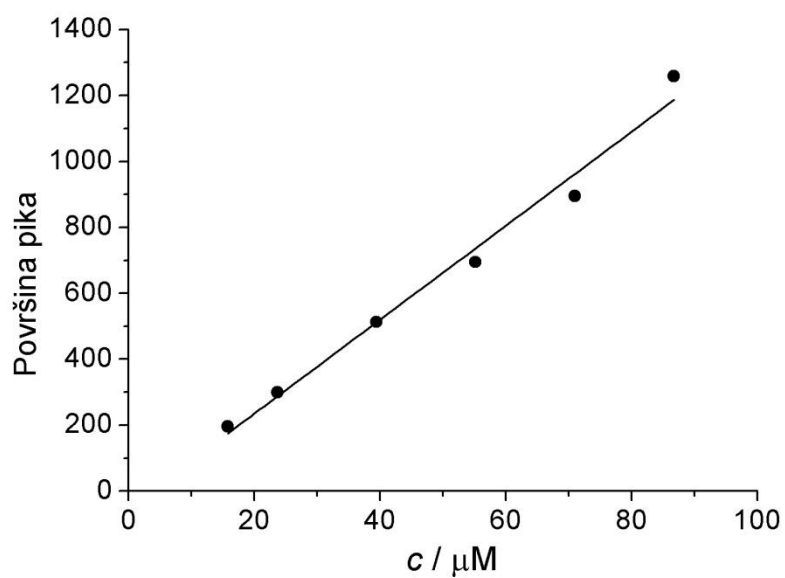
Slika 12. Baždarni dijagram ferulne kiseline snimljen DAD detektorom ($r = 0,999$)

$$\text{Površina pika} = (12,15 \pm 0,16) \cdot c \text{ (ferulne kiseline / } \mu\text{M)} + (-5,2 \pm 10,2)$$



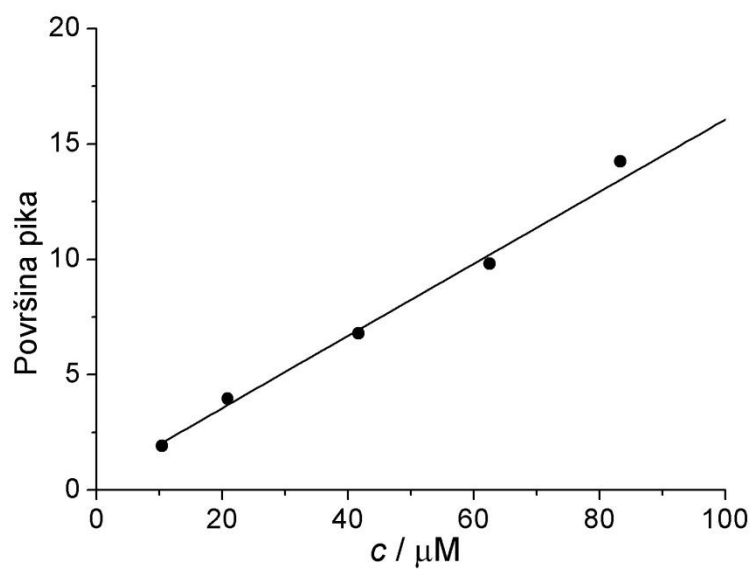
Slika 13. Baždarni dijagram galne kiseline snimljen DAD detektorom ($r = 0,997$)

$$\text{Površina pika} = (11,5 \pm 0,4) \cdot c (\text{galne kiseline} / \mu\text{M}) + (-43 \pm 24,5)$$



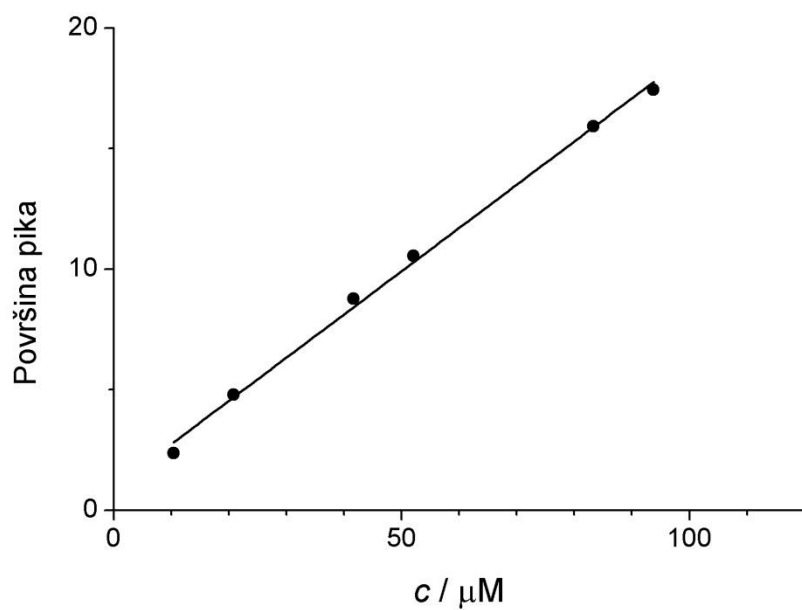
Slika 14. Baždarni dijagram siringinske kiseline snimljen DAD detektorom ($r = 0,992$)

$$\text{Površina pika} = (14,25 \pm 0,9) \cdot c (\text{siringinske kiseline} / \mu\text{M}) + (-50,2 \pm 48,6)$$



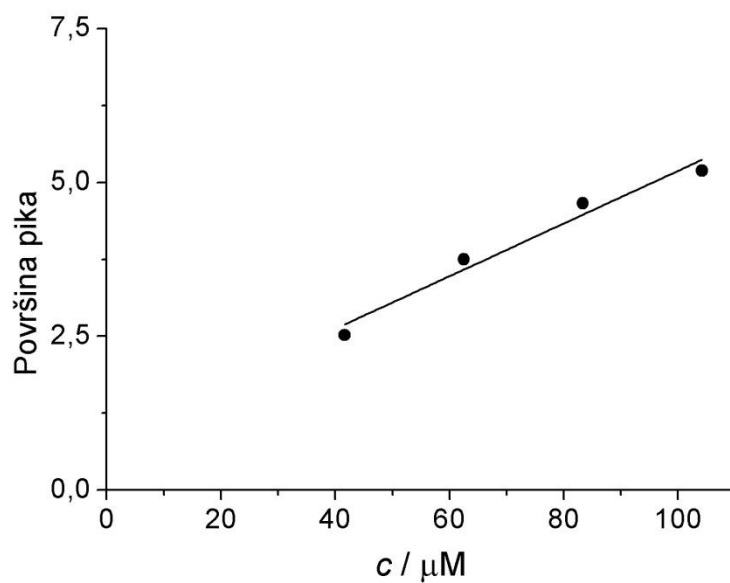
Slika 15. Baždarni dijagram sinapinske kiseline snimljen BIAMP detektorom ($r = 0,996$)

$$\text{Površina pika} = (0,16 \pm 0,01) \cdot c (\text{sinapinske kiseline} / \mu\text{M}) + (4,3 \pm 0,4)$$



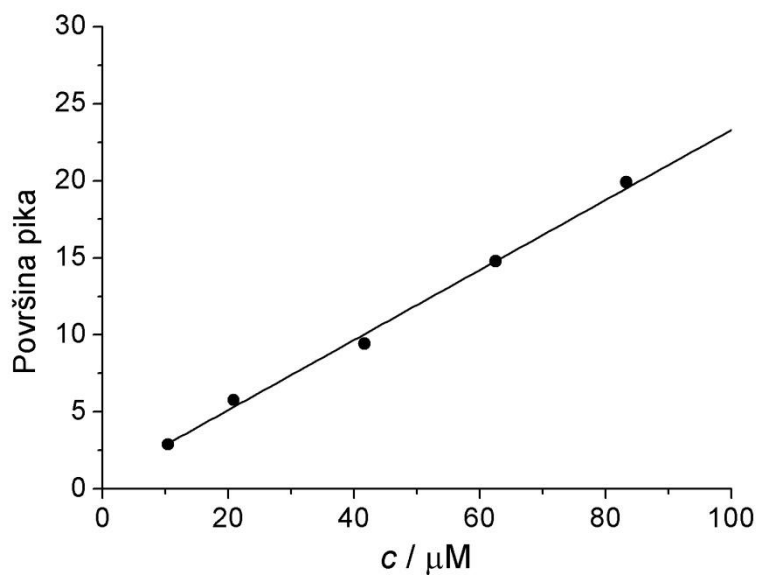
Slika 16. Baždarni dijagram katehin hidrata snimljen BIAMP. detektorom ($r = 0,998$)

$$\text{Površina pika} = (0,18 \pm 0,01) \cdot c (\text{katehin hidrata} / \mu\text{M}) + (-0,95 \pm 0,3)$$



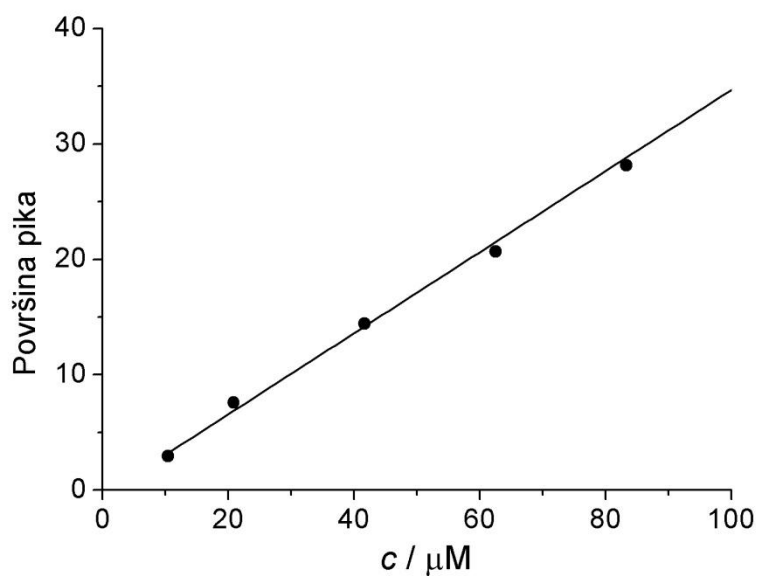
Slika 17. Baždarni dijagram kafeinske kiseline snimljen BIAMP detektorom ($r = 0,984$)

$$\text{Površina pika} = (0,05 \pm 0,005) \cdot c \text{ (kafeinske kiseline / } \mu\text{M)} + (0,9 \pm 0,4)$$



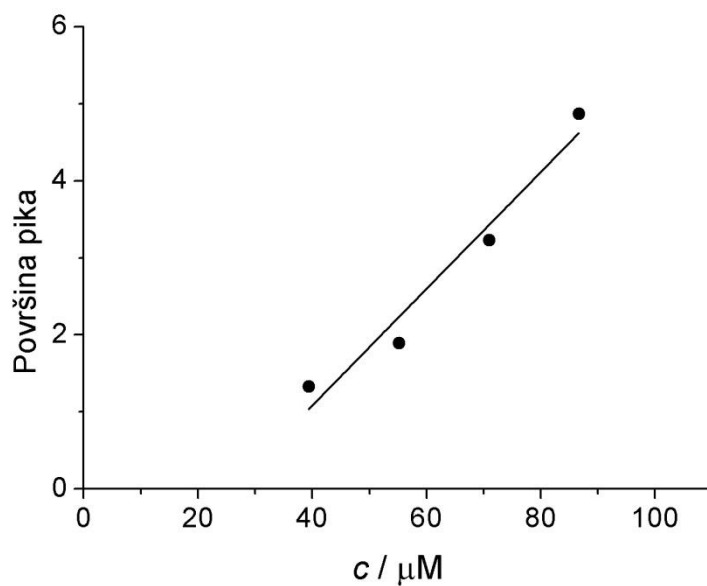
Slika 18. Baždarni dijagram ferulne kiseline snimljen BIAMP detektorom ($r = 0,998$)

$$\text{Površina pika} = (0,25 \pm 0,01) \cdot c \text{ (ferulne kiseline / } \mu\text{M)} + (0,6 \pm 0,4)$$



Slika 19. Baždarni dijagram galne kiseline snimljen BIAMP. detektorom ($r = 0,998$)

$$\text{Površina pika} = (0,35 \pm 0,01) \cdot c \text{ (galne kiseline / } \mu\text{M)} + (-0,45 \pm 0,6)$$



Slika 20. Baždarni dijagram siringske kiseline snimljen BIAMP. detektorom ($r = 0,979$)

$$\text{Površina pika} = (0,1 \pm 0,01) \cdot c \text{ (siringske kiseline / } \mu\text{M)} + (-1,95 \pm 0,75)$$

Za baždarne dijagrame standarda polifenola snimljenih u rasponu koncentracije od 10,4 do 104,2 μM biamperometrijskim detektorom (slike 15–20) možemo konstatirati da su linearni, kako je vidljivo iz visokih vrijednosti koeficijenta korelacije, koji se kreće u rasponu $0,996 \leq r \leq 0,998$. Izuzetak su siringinska kiselina, kod koje je $r = 0,979$, dosta niži u odnosu na koeficijent korelacije za isti standard kod DAD detektora, te kafeinska kiselina, kod koje je $r = 0,984$. Lošiji koeficijenti linearne korelacije kod ta se dva spoja mogu pripisati nesigurnosti pri integraciji njihovih kromatografskih pikova zbog malog odziva zabilježenog na biamperometrijskom detektoru. Isto je razlog i pojavi odsječka na y-osi kod baždarnih dijagrama tih spojeva (slike 17 i 20).

Kako bi se ustanovilo jesu li signali pojedinog spoja na DAD i biamperometrijskom detektoru linearno povezani, korelirane su površine ispod pikova na oba detektora, prikazane u tablici 5.

Tablica 5. Korelacije signala izmjerenih HPLC (DAD) i biamperometrijskim detektorom.

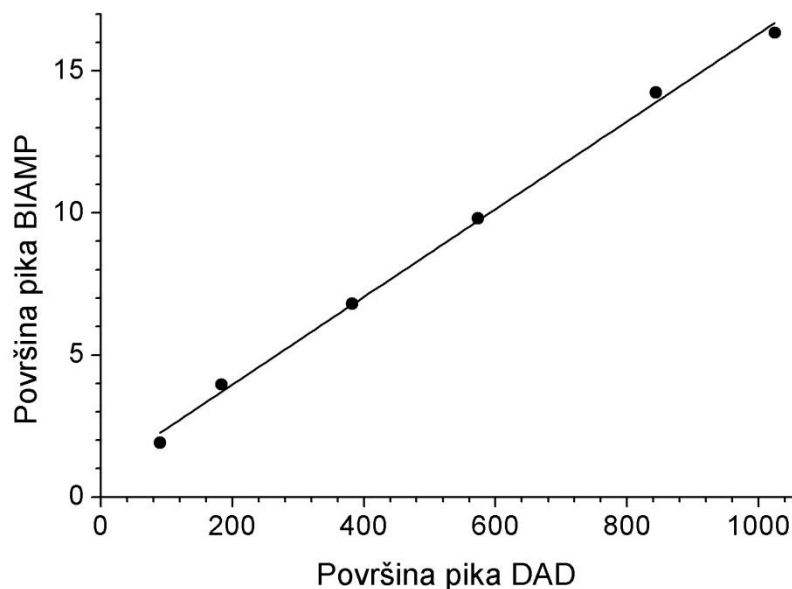
UZORAK	sinapinska kiselina			katehin hidrat			kafeinska kiselina		
	$c/\mu\text{M}$	DAD	BIAMP	$c/\mu\text{M}$	DAD	BIAMP	$c/\mu\text{M}$	DAD	BIAMP
1.	10,4	90,1	1,91	83,3	426,2	15,93	41,7	577,9	2,52
2.	20,8	183,8	3,96	93,8	502,5	17,44	62,5	870,2	3,75
3.	41,7	382,1	6,8	10,4	50,2	2,37	83,3	1249,6	4,66
4.	62,5	573,7	9,81	20,8	96,3	4,79	104,2	1510,1	5,19
5.	83,3	844,0	14,24	41,7	211,5	8,77	0	--	--
6.	104,2	1024,3	16,34	52,1	288,4	10,55	20,8	283,7	n.d.

Tablica 5.(nastavak) Korelacije signala izmjerenih HPLC (DAD) i biamperometrijskim detektorom.

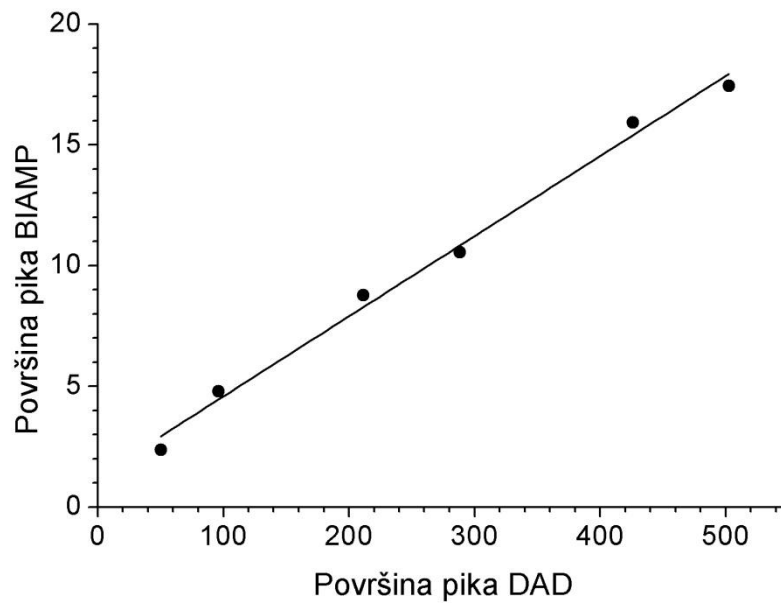
UZORAK	ferulna kiselina			galna kiselina			siringinska kiselina		
	<i>c</i> /μM	DAD	BIAMP	<i>c</i> /μM	DAD	BIAMP	<i>c</i> /μM	DAD	BIAMP
1.	20,8	258,5	5,77	104,2	1184,1	36,95	55,2	695,1	1,89
2.	10,4	123,0	2,88	83,3	882,6	28,16	39,4	512,9	1,33
3.	62,5	743,1	14,77	20,8	219,8	7,59	86,7	1258,7	4,87
4.	41,7	486,7	9,42	10,4	87,3	2,92	71,0	895,7	3,23
5.	104,2	1258,0	24,1	62,5	659,6	20,69	23,7	299,2	n.d.
6.	83,3	1022,3	19,9	41,7	401,4	14,44	15,8	196,1	n.d.

n.d. – nije identificirano

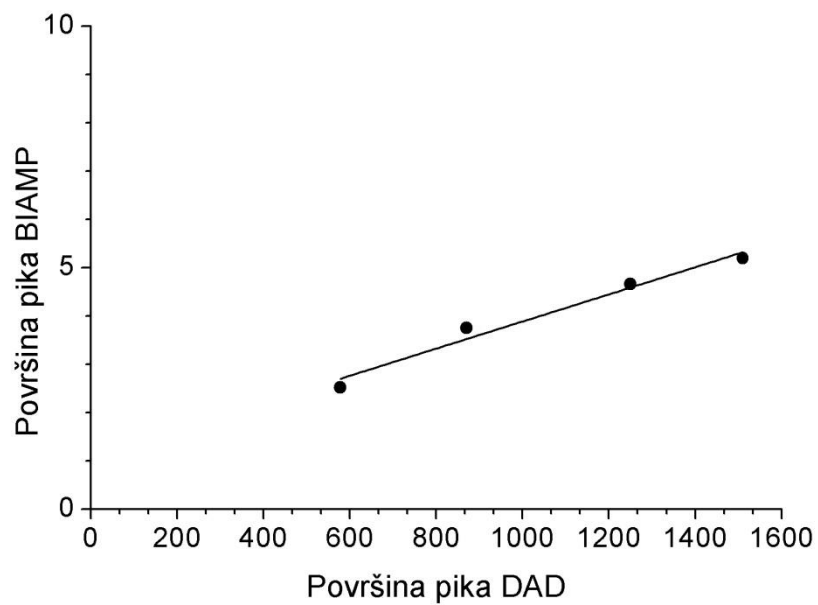
Pomoću podataka iz tablice 5 napravljeni su korelacijski dijagrami koji u međusobni odnos stavljaju signal pojedinog polifenola izmjeren na DAD detektoru i biamperometrijskom detektoru (slike 21–26).



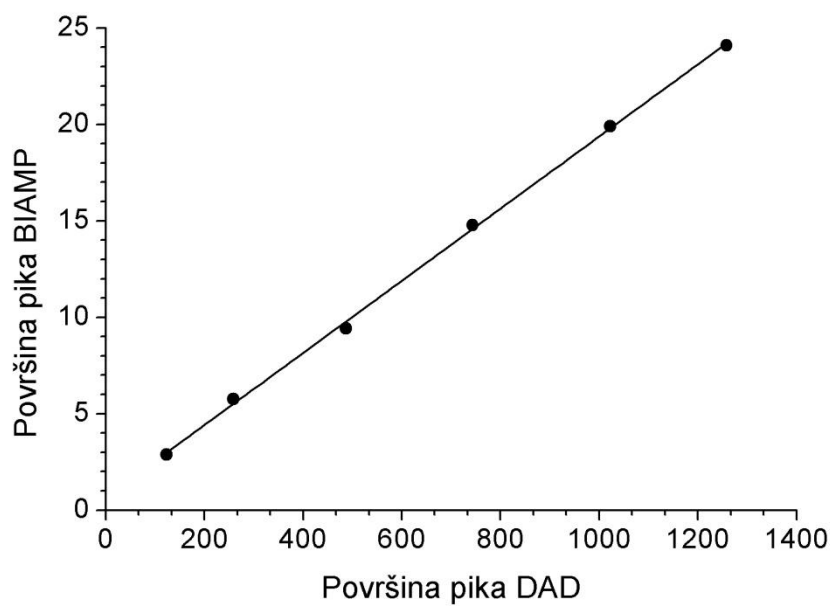
Slika 21. Korelacijski dijagram odziva sinapinske kiseline na DAD i biamperometrijskom detektoru.



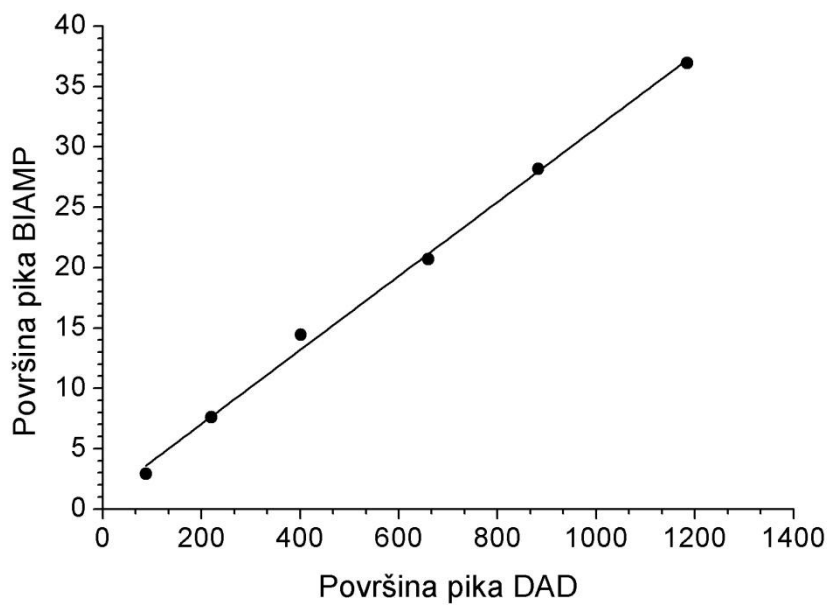
Slika 22. Korelacijski dijagram odziva katehin hidrata na DAD i biamperometrijskom detektoru.



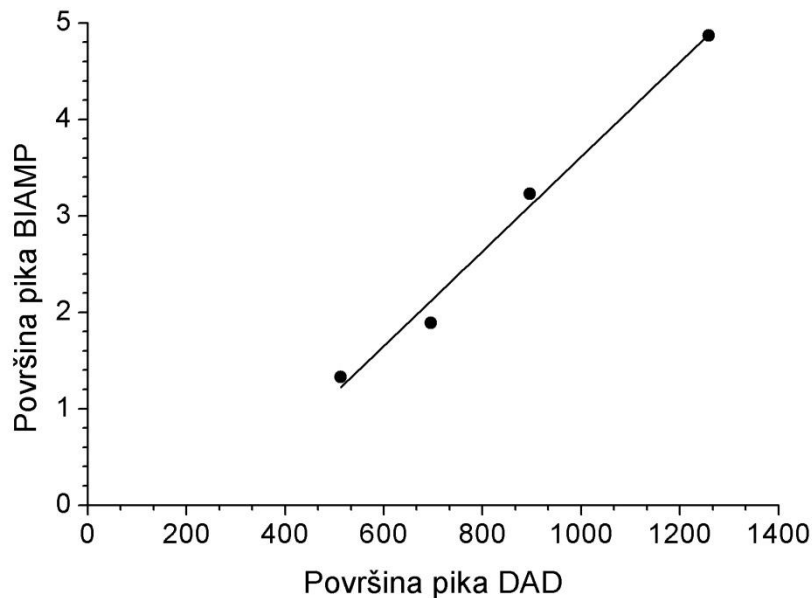
Slika 23. Korelacijski dijagram odziva kafeinske kiseline na DAD i biamperometrijskom detektoru.



Slika 24. Korelacijski dijagram odziva ferulne kiseline na DAD i biamperometrijskom detektoru.



Slika 25. Korelacijski dijagram odziva galne kiseline na DAD i biamperometrijskom detektoru.



Slika 26. Korelacijski dijagram odziva siringinske kiseline na DAD i biamperometrijskom detektoru.

Nagibi korelacijskih pravaca i pripadajuće vrijednosti korelacijskih koeficijenata prikazane su u tablici 6.

Tablica 6. Vrijednosti korelacijskih koeficijenata i nagiba korelacijskih pravaca odziva na DAD i biamperometrijskom detektoru.

	nagib korelacijskog pravca	<i>r</i>
sinapinska kiselina	0,0154	0,998
katehin hidrat	0,0331	0,996
kafeinska kiselina	0,0028	0,986
ferulna kiselina	0,0187	0,999
galna kiselina	0,0306	0,998
siringinska kiselina	0,0049	0,994

Vrijednosti koeficijenata korelacije upućuju da su odzivi na oba detektora visoko korelirani te međusobno linearno ovisni.

4.3. Toplinska obrada realnog uzorka

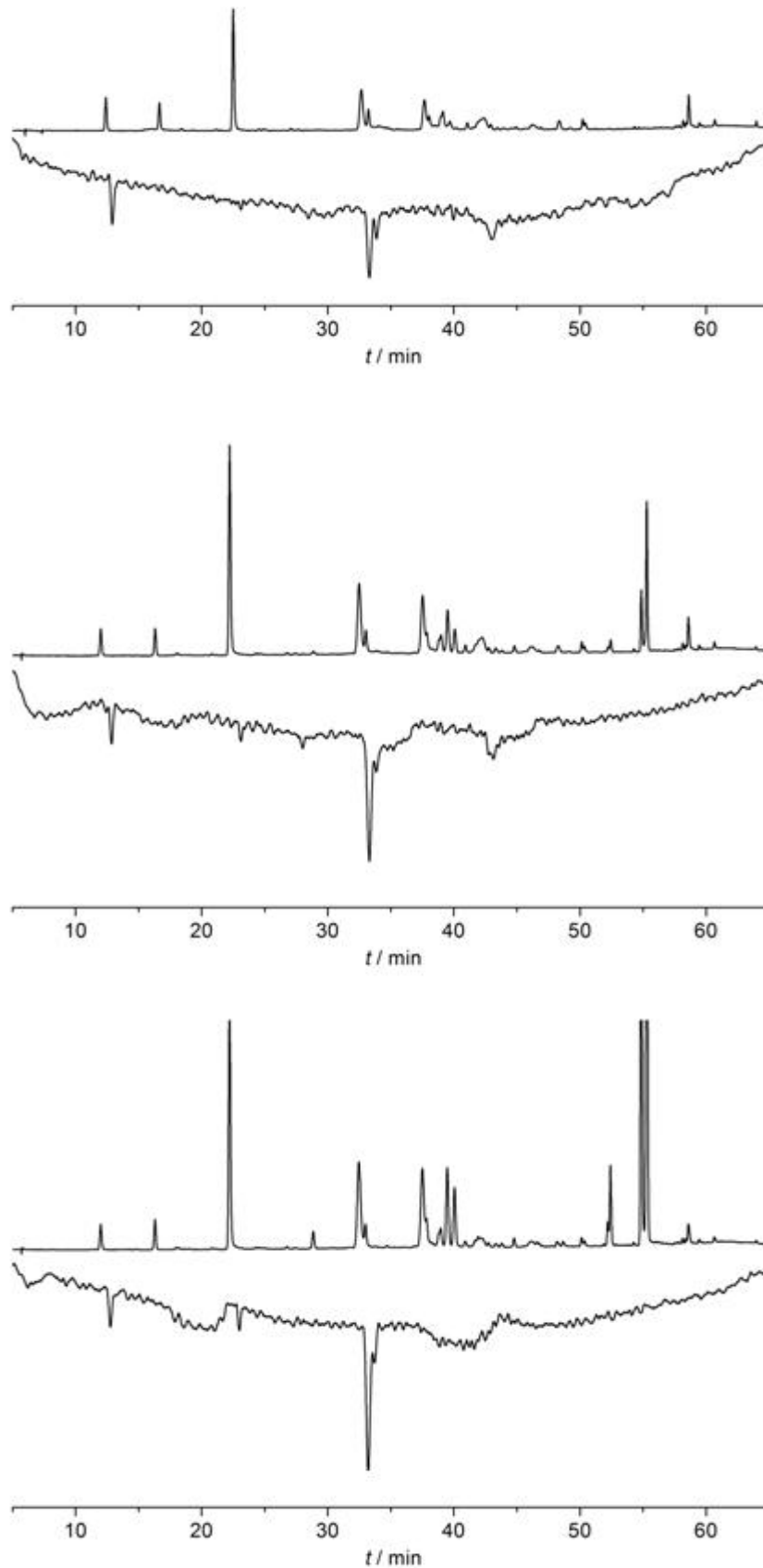
Razvijeni biamperometrijski detektor testiran je i na realnom uzorku – ekstra djevičanskom maslinovom ulju iz kojeg su polifenoli ekstrahirani u smjesu vode i metanola te razdavajani HPLC metodom opisanom u eksperimentalnom dijelu. Dobiveni kromatogrami prikazani su na slici 27.

Vizualnim pregledom integriranih kromatograma te analizom kvantitativnih rezultata prikazanih u tablici 7. zaključeno je da su pojedini polifenoli iz ekstra djevičanskog maslinovog ulja na DAD detektoru vidljivi, dok se na biamperometrijskom ne uočavaju, ili im je signal nerazlučiv od šuma, što ukazuje na činjenicu da neki polifenoli pri ovim uvjetima mjerenja ne reagiraju s ABTS radikalom.

Ti rezultati ujedno upućuju na oprez pri tumačenju i komparaciji rezultata dobivenih primjenom klasičnih ABTS testova za određivanje antioksidativne aktivnosti uzorka, koji mjere samo kumulativno svojstvo uzorka, bez informacija o antioksidativnoj aktivnosti pojedine komponente. Rezultati dobiveni u ovom radu ukazuju na potrebu bolje procjene antioksidativne aktivnosti pojedinih komponenata uzorka korištenjem spergnutih metoda HPLC razdvajanja i kvantifikacije antioksidativnog učinka. Također, potrebno je dalje unaprijediti razvijenu metodu, u smislu pronalaženja boljih puferskih sustava za pripremu reagensa s ABTS radikalom, koji bi omogućili provođenje biamperometrijske detekcije antioksidativne aktivnosti komponenata eluata u neutralnom području pH, radi bolje usporedivosti uvjeta mjerenja i dobivenih rezultata s rezultatima klasičnih ABTS (TEAC) testova.

Tablica 7. Integrali površina ispod kromatografskih maksimuma kromatograma ekstra djevičanskog maslinovog ulja snimljenim HPLC sustavom s biamperometrijskim detektorom

uzorak	pik 1		interni standard		pik 2		pik 3	
	DAD	BIAMP	DAD	BIAMP	DAD	BIAMP	DAD	BIAMP
hladno ulje	96,8	4,49	362,1	n.d.	214,5	8,19	58,4	1,99
grijano ulje – 180 °C	82,5	3,36	619,7	n.d.	383	15,15	67,8	2,49
grijano ulje – 215 °C	76,1	3,18	735,5	n.d.	473	18,26	71,9	4,03



Slika 27. Kromatogrami snimljeni na HPLC DAD detektoru i biamperometrijskom detektoru za uzorke termički neobrađenog ekstra djevičanskog maslinovog ulja (gornji kromatogram) te ekstra djevičanskog maslinovog ulja termički obrađenog pri 180 i 215 °C (srednji i donji kromatogram).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju istraživanja provedenih u ovom radu može se zaključiti:

- Elektrodni proces povezan s oksidacijom ABTS-a pri potencijalu od 545 mV elektrokemijski je reverzibilan, što omogućuje primjenu ABTS radikal kationa kao reagensa za biamperometrijsku detekciju antioksidansa.
- Kao puferski sustav za pripremu reagensa s ABTS radikal kationom, koji se može koristiti u kombinaciji s HPLC mobilnim fazama koje sadrže fosforu kiselinu u udjelu do $w(\text{H}_3\text{PO}_4) = 0,2 \%$ te organska otapala (acetonitril i metanol) u volumnom udjelu između 4 i 100 %, prikladan je acetatni pufer priređen kao smjesa octene kiseline i vodene otopine amonijeva acetata, $c(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 1 \text{ mol/L}$, čiji pH iznosi 4,5. Pri miješanju tog pufera s mobilnim fazama opisanog sastava ne dolazi do značajne promjene pH-vrijednosti reagensa, do isoljavanja komponenti pufera, ili stvaranja emulzija.
- Za simultano razdvajanje, kvantifikaciju i određivanje antioksidativnog kapaciteta pojedinih komponenti uzorka s uspjehom se može koristiti HPLC sustav koji u seriju s DAD detektorom ima spojen biamperometrijski elektrokemijski detektor, u koji se uvodi smjesa eluata i reagensa s ABTS radikal kationom. Korelacijom odziva biamperometrijskog detektora s odzivom DAD detektora za seriju od šest standarda polifenola pokazano je da su odzivi oba detektora visoko korelirani i linearni.
- Primjenom razvijene HPLC metode za određivanje antioksidativnog kapaciteta spojeva prisutnih u sviježem i grijanom ekstra djevičanskom maslinovom ulju ustanovljeno je da neki od prisutnih fenolnih spojeva s ABTS radikal kationom reagiraju slabo, ili uopće ne reagiraju, što upućuje na oprez pri tumačenju i komparaciji podataka o kumulativnom antioksidativnom kapacitetu uzoraka određenom klasičnim testovima obezbojenja ABTS radikala.

6. LITERATURA

Ahn, J., Grün, I. U., Mustapha, A. (2007) Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. *Food Microbiol.* **24**, 7-14.

Amorati R., Cavalli A., Fumo M. G., Masetti M., Menichetti S., Pagliuca C., Pedulli G. F., Viglianisi C. (2007) Kinetic and thermochemical study of the antioxidant activity of sulfur-containing analogues of vitamin E. *Chem. Eur. J.* **13**, 8223–30.

Apak R. , Guclu K. G. , Ozyurek M. , Karademir S. E. (2004) Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric iron reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agric. Food Chem.* **52**, 7970-7977.

Arapitsas, P. (2012) Hydrolyzable tannin analysis in food. *Food Chem.* **135**, 1708-1717.

Asimi, O. A., Sahu, N. P., Pal, A. K. (2013) Antioxidant capacity of crude water and ethylacetate extracts of some Indian species and their antimicrobial activity against *Vibrio vulnificus* and *Micrococcus luteus*. *J. Med. Plant. Res.* **7**, 1907-1915.

Balisteiro, D. M., Rombaldi, C. V., Genovese, M. I. (2013) Protein, isoflavones, trypsin inhibitory and in vitro antioxidant capacities: Comparison among conventionally and organically grown soybeans. *Food Res. Int.* **51**, 8-14.

Bartasiute A., Westerink B.H.C., Verpoorte E., Niederlander H.A.G. (2005) Towards biological relevance and better understanding of the mechanism involved in HPLC-DPPH and HPLC-ABTS methods for assessing antioxidant activity. *Free Radic. Biol. Med.* **39** S12-S12.

Beltrán, G., Jimenez, A., del Rio, C., Sanchez, S., Martinez, L., Uceda, M., Aguilera, M. P., (2010) Variability of vitamin E in virgin olive oil by agronomical and genetic factors, *J. Food Compos. Anal.* **23**, 633-639.

Berkowits J, Ellison GB, Gutman D. (1994) Three methods of measure RH bond energies. *J. Phys. Chem.* **98**, 2744–65.

Bourbonnais, R., Leech, D., Paice, M.(1998) Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. *Biochim. Biophys. Acta.* **1379**, 381–390.

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C.(1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* **28**, 25-30.
- Bravo, L. (1998), Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317–333.
- Brewer, M. S. (2011) Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **10**, 221-247.
- Buettner G. R. (1993) The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 535–43.
- Chimi H., Cillard J., Cillard P., Rahmani M. (1991) Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **68**, 307–12.
- Choe E., Min D. B. (2005) Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *J. Food Sci.* **70**, 142–59.
- Dapkevicius A., van Beek T.A., Niederlander H.A.G., de Groot A. (1999) On-line detection of antioxidative activity in high-performance liquid chromatography eluates by chemiluminescence. *Anal. Chem.* **71**, 736-744.
- Ekiert, R. J., Szopa, A., Ekiert, H., Krzek, J., Dzik, E. (2013) Analysis of lignans in *Schisandra chinensis* fruits, leaves, biomasses from in vitro cultures and food supplements. *J. Funct. Food* **5**, 1576-1581.
- Engeseth N. J., Klein B. P., Warner K. (1987) Lipoxygenase isoenzymes in soybeans: effects on crude oil quality. *J. Food. Sci.* **52**, 1015–1019.
- Flanjak I, Primorac Lj, Kenjerić D, Bilić B (2012) Physicochemical characteristics and antioxidant capacity of everlasting (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) honey. U Zbornik sažetaka, 48. hrvatski i 8. međunarodni simpozij agronoma, Osijek, str. 261.
- Foote, C.S. (1976) Photosensitized oxidation and singlet oxygen: Consequences in biological systems. *Free radicals in biology.* **2**, 85–133.
- Graf, E. , Eaton, J.W. (1990) Antioxidant functions of phytic acid. *Free Radical Biol. Med.* **8**, 61–9.

- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill M., Flanagan, J.A., Deemer, E. K. (2002b) High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 4437-4446.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Deemer, E. K. (2002a) Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1815-1822.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 841-850.
- Hwang, I.G., Woo, K.S., Kim, D.J., Hong, J.T., Hwang, B.Y., Lee, Y.R.(2007) Isolation and identification of an antioxidant substance from heated garlic (*Allium sativum* L.). *Food Sci. Biotechnol.* **16**, 963–966.
- Jadhav, S.J., Nimbalkar, S. S., Kulkarni, A.D., Madhavi, D. L. (1996) Lipid oxidation in biological and food systems. U: Food antioxidants (ed. Madhavi, D.L., Deshpande, S.S., Salunkhe, D. K.) New York : Marcel Dekker Inc., str. 5–64.
- Kaiser, A., Carle, R., Kammerer, D. R. (2013) Effects of blanching on polyphenol stability of innovative paste-like parsley (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nym ex AW Hill) and marjoram (*Origanum majorana* L.) products. *Food Chem.* **138**, 1648-1656.
- Keceli, T, Gordon, M.H. (2002) Ferric ions reduce the antioxidant activity of the phenolic fraction of virgin olive oil. *J. Food Sci.* **67**, 943–947.
- Koleva I.I., Niederlander, H.A.G., van Beek, T.A.,(2001) Application of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC eluates. *Anal. Chem.* **73** 3373.
- Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P. (2007) Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Prog. Lipid Res.* **46**, 244.
- Lee, E.C., Min, D.B. (1992) Interaction effects of chlorophyll, beta-carotene and tocopherol on the photooxidative stabilities of soybean oil. *Food Sci. Biotechnol.* **1**, 104–10.

- Lingane, J. J. (1958) *Electroanalytical Chemistry*, 2. izd, Why: New York. Str. 280-294.
- Litwinienko, G., Ingold, K. U. (2003) Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstraction. 1. The reactions of phenols with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH •) in alcohols. *J. Org. Chem.* **68**, 3433–8.
- Lucarini, M, Mugnaini V, Pedulli G.F. (2002) Bond dissociation enthalpies of polyphenols: the importance of cooperative effects. *J. Org. Chem.* **67**, 928–31.
- Lykkesfeldt, J. (2000) Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in biological samples by high-performance liquid chromatography using subtraction methods: reliable reduction with tris [2-carboxyethyl] phosphine hydrochloride. *Anal. Biochem.* **282**, 89-93.
- MacDonald-Wicks, L.K., Wood, L.G., Garg, M.L. (2006) Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *J. Sci. Food Agric.* **86**, 2046.
- Milbury P.E., Chen C.Y., Dolnikowski G.G., Blumberg, J.B., (2006) Electrochemical analysis. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 5027.
- Min, D.B., Lee, E.C. (1988) Factors affecting the singlet oxygen oxidation of soybean oil. *Frontiers of flavor*. Str. 473–98.
- Min, D.B., Lee, S.H., Lee, E.C. (1989) Singlet oxygen oxidation of vegetable oil. U.: Flavor chemistry of lipid foods (ured. Min, D. B., Smouse, T.H.) AOCS Press. Str. 57–97.
- Mukai, K., Oka, W., Watanabe, K., Egawa, Y., Nagaoka, S., Terao, J. (1997) Kinetic study of free-radical scavenging action of flavonoids in homogeneous and aqueous Triton X-100 micellar solutions. *J. Phys. Chem. A* **101**, 3746–53.
- Niki, E., Noguchi, N. (2000) Evaluation of antioxidant capacity. What capacity is being measured by which method? *Life* **50**, 323–9.
- Oroian, M., Escriche, I. (2015), Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis, *Food Res. Int.* **74**, 10–36.
- Osorio, C., Hurtado, N., Dawid, C., Hofmann, T., Heredia-Mira, F. J., Morales, A. L. (2012) Chemical characterisation of anthocyanins in tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) and Andes berry (*Rubus glaucus* Benth.) fruits. *Food Chem.* **132**, 1915-1921.

- Ozgen, M., Reese, R.N., Tulio, A.Z., Scheerens, J.C., Miller, R. (2006) Modified ABTS method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and DPPH methods. *J. Agric Food Chem.* **54**, 1151.
- Pasaporte, M. S., Rabayam, F. J., Toleco, M., Flores, D. M., (2014). Xanthophyll content of selected vegetables commonly consumed in the Philippines and the effect of boiling, *Food Chem.* **158**, 35-40.
- Pascual, C. D. S. C. I., Massaretto, I. L., Kawassaki, F., Barros, R. M. C., Noldin, J. A., Marquez, U. M. L. (2013) Effects of parboiling, storage and cooking on the levels of tocopherols, tocotrienols and γ -oryzanol in brown rice (*Oryza sativa* L.). *Food Res.Int.* **50**, 676-681.
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 3101–3113.
- Prior, R.L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., Jacob, R. (2003) Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC FL) of plasma and other biological and food samples. *J, Agric, Food Chem* **51**, 3273.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.* **26**, 1231-1237.
- Roginsky, V., Lissi, E. A. (2005) Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food. *Food Chem.* **92**, 235.
- Schlesier, K., Harwat, M., Bohm, V., Bitsch, R. (2002) Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radic. Res.* **36**, 177.
- Steenken, S., Neta, P. (1982) One-electron redox potentials of phenols. Hydroxy- and aminophenols and related compounds of biological interest. *J. Phys. Chem.* **86**, 3661–7.
- Thoo, Y. Y., Abas, F., Lai, O. M., Ho, C. W., Yin, J., Hedegaard, R. V., Tan, C. P. (2013) Antioxidant synergism between ethanolic *Centella asiatica* extracts and α -tocopherol in model systems. *Food Chem.* **138**, 1215-1219.

- Tougas, T. P., Jannetti, J. M.; Collier, W. G. (1985) *Anal. Chem.* **57**, 1377–1381.
- Tuberoso, C. I. G., Boban, M., Bifulco, E., Budimir, D., Pirisi, F. M. (2013) Antioxidant capacity and vasodilatory properties of Mediterranean food: The case of Cannonau wine, myrtle berries liqueur and strawberry-tree honey. *Food Chem.* **140**, 686-691.
- Van Acker, S. A., Koymans, L. M., Bast, A. (1993) Molecular pharmacology of vitamin E: structural aspects of antioxidant activity. *Free Radical Bio. Med.* **15**, 311-328.
- Wach, A., Pyrzyńska, K., Biesaga, M. (2007) Quercetin content in some food and herb samples. *Food Chem.* **100**, 699-704.
- Watanabe, A., Noguchi, N., Fujisawa, A., Kodama, T., Tamura, K., Cynshi, O., Niki, E. (2000) Stability and reactivity of aryloxy radicals derived from a novel antioxidant BO-653 and related compounds. Effects of substituent and side chain in solution and membranes. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 5438-5442.
- Weichselbaum, E., Buttriss, J. L. (2010) Polyphenols in the diet. *Nutrition Bulletin*, **35**, 157-164.
- Winkel-Shirley, B. (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* **126**, 485-493.
- Wright, J.S., Johnson, E. R., DiLabio, G. A. (2001) Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 1173–83.