

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ SANITARNOG INŽENJERSTVA

Lidija Šimić

SINERGISTIČKO – ANTAGONISTIČKI UTJECAJ IZOMERA VITAMINA E NA
KINETIKU NESTANKA DPPH RADIKALA U ULJIMA EKSTRAHIRANIH IZ KOŠTICA
GROŽĐA (CABERNET SAUVIGNON I CABERNET FRANC)

Diplomski rad

Rijeka, 2016.

Mentor rada: doc. dr. sc. Dalibor Broznić, dipl. san. ing

Diplomski rad obranjen dana _____ u / na _____.

Pod povjerenstvom u sastavu:

1. doc.dr.sc. Ivana Gobin, dipl.san.ing.

2. izv.prof.dr.sc. Marin Tota, mr.ph.

3. doc.dr.sc. Dalibor Broznić, dipl.san.ing.

Rad ima 55 stranica, 17 slika, 13 tablica, 23 literaturna navoda.

Zahvala

Veliko Hvala dugujem svom mentoru doc. Daliboru Brozniću koji me pratio i vodio kroz ove godine studija, najprije kod izrade završnog rada zatim i kod diplomskog rada... zbog vaših savjeta, vašeg znanja i stručnosti, zbog vašeg strpljenja i vremena uloženog u naš rad sve je postalo moguće!

Hvala svim djelatnicima Zavoda za kemiju i biokemiju, svim profesorima i asistentima, zbog vas sam zavoljela znanost!

Također, zahvaljujem svojim prijateljima... Dina, Monika i Marko... vi ste uvijek bili uz mene, dijelili sreću i tugu i bili podrška za sve moje ideje i zamisli!

Zahvaljujem svojoj ljubavi... na strpljenju i ohrabljivanju! Hvala što vjeruješ u mene!

Na kraju, najveću zaslugu za to kakva sam osoba postala, dugujem svojoj obitelji, svojim sestrama i svojim roditeljima... HVALA vam što ste bili uz mene, što me neizmjereno volite, podržavate i upućujete na pravi put!

Veliko hvala svima!

1	SAŽETAK.....	1
2	SUMMARY	2
3	UVOD	4
3.1	<i>Vitis vinifera</i>	4
3.2	Ulje koštica grožđa	5
3.3	Vitamini	6
3.4	Slobodni radikali.....	7
3.5	Antioksidansi	9
3.6	Vitamin E.....	11
4	ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA	14
4.1	DPPH metoda	14
4.2	Kemijska kinetika	15
4.3	Matematički modeli kemijskih reakcija	16
5	CILJ ISTRAŽIVANJA	19
6	Materijali i metode	20
6.1	Kemikalije	20
6.2	INSTRUMENTI	21
6.1	EKSTRAKCIJA ULJA IZ KOŠTICA GROŽĐA SUPERKRITIČNIM FLUIDOM	22
6.2	PRIPREMA UZORAKA - EKSTRAKCIJA VITAMINA E IZ ULJA KOŠTICA GROŽĐA	22
6.3	PRIPREMA UZORAKA ZA HPLC ANALIZU	23
6.4	KROMATOGRAFSKA ANALIZA.....	24
6.6	IZRADA BAŽDARNE KRIVULJE (TROLOX EKVIVALENT).....	26
6.7	STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA.....	28
7	REZULTATI.....	29
7.1	Udio izomera vitamina E u ekstraktu iz ulja CS i CF	29

7.2	Antioksidacijska aktivnost ekstrakta vitamina E iz ulja CS i CF izražena kao TEAC	
	31	
7.3	Utjecaj različitih udjela izomera vitamina E u ekstraktima ulja CS i CF na kinetiku nestanka DPPH radikala.....	36
8	RASPRAVA.....	46
9	ZAKLJUČAK	51
10	ŽIVOTOPIS	55

1 SAŽETAK

U ovom istraživanju ispitivano je međudjelovanje pojedinih izomera vitamina E (α -, γ - i δ -tokoferol) dodanih u različitim volumenima i kombinacijama iz standardnih otopina i izomera ekstrakta vitamina E dobivenog iz ulja koštica grožđa dvaju sorti, Cabernet sauvignon (uzorak CS) i Cabernet franc (uzorak CF) s područja Slavonije. Također analiziran je i utjecaj izomera na brzinu reakcije s radikalima te uključenost izomera u pojedine faze brzine kemijske reakcije.

U ekstrakte vitamina E dodani su određeni volumeni standardnih otopina pojedinih izomera α -, γ - i δ -tokoferola i to u različitim kombinacijama (prva tri uzorka sadržavala su samo po jedan izomer, četvrti, peti i šesti sadržavali su kombinacije dvaju izomera dok je posljednji sedmi sadržavao kombinaciju sva tri izomera). Antioksidacijska aktivnost uzoraka prikazana je gubitkom signala DPPH radikala u odnosu na koncentraciju izračunatom metodom TEAC („Trolox equivalent antioxidant capacity“). Rezultati ukazuju da porastom udjela antioksidansa raste i antioksidativna aktivnost. Nadalje utvrđeno je da kombinacije dodanih α -, γ - i δ -tokoferola u ekstrakt vitamina E iz ulja CS i CF imaju antagonistički utjecaj osim uzorka CS6 u kojem je dodana kombinacija izomera γ - i δ -tokoferola.

Za opisivanje kinetike nestanka radikala korišteno je pet monofaznih i bifaznih matematičkih modela. Dobiveni rezultati pokazali su da se reakcija odvija u dva stupnja, brža reakcija u početnih 4 do 6 minuta, nakon čega slijedi sporija i monotonija reakcija. Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti da je bifazna kinetika nestanka DPPH radikala posljedica niza složenih reakcija koje se odvijaju različitim mehanizmima, a u kojima sudjeluju pojedini izomeri tokoferola.

Ključne riječi: vitamin E, tokoferoli, TEAC, DPPH radikal, kinetika, matematički modeli

2 SUMMARY

In the present study the effects and interactions of α -, γ - and δ -tocopherols added into the vitamin E extract obtained from the two oil grape seeds cultivars (Cabernet sauvignon, CS; Cabernet franc, sample CF) were examined. α -, γ - and δ -tocopherols were added at different volumes and combinations from the standard tocopherol solutions. The effect of tocopherol isomers on the rate of chemical reaction with radicals as well as involvement of individual tocopherol isomers in different phases of the chemical reaction were analyzed.

At the vitamin E extracts, α -, γ - and δ -tocopherol standard solutions at different volumes and combinations were added, the three samples contained only the one of the isomer, the other three contained the combination of two isomers and last one contained the combinations of all three isomers. The antioxidant sample activity was shown by losing the signal of DPPH radical in the relation to the concentration calculated from TEAC method („Trolox equivalent antioxidant capacity“). The results indicate that the increasing antioxidants amount , increase the antioxidant activity of the sample. Furthermore, it was found that the combinations of α -, γ - and δ -tocopherol solutions added into the vitamin E of CS and CF extracts, showed the antagonistic effect, except for the sample CS6 where a combination of γ - and δ -tocopherol isomers was added.

For description of the radical disappearance kinetics five mathematical models (mono- and biphasic) were used. The results showed that the reaction takes place in the two phases; first rapid phase during the initial 4 – 6 minutes of the reaction when follow the second much slower and monotonous phase. Results of the study pointed that the biphasic kinetics of DPPH disappearance is a consequence of the complexity of reactions that involve different tocopherol isomers and proceed through different chemical pathways.

Keywords: Vitamin E, tocopherols, TEAC, DPPH radical, kinetics, mathematical models

3 UVOD

3.1 *Vitis vinifera*

Sve više pažnje se posvećuje hrani. Hrana generalno nije „loša“ ili „dobra“, postoji samo „loša“ ili „dobra“ prehrana. Pravilna prehrana jedan je od čimbenika koji utječe na ljudsko zdravlje. Naziv „funkcionalna hrana“ podrazumjeva svu hranu s biološki aktivnim djelovanjem, koja pomaže očuvanju zdravlja i utječe na pojedine tjelesne funkcije.

Namjena funkcionalne hrane nije da utaži glad niti da ljudskom organizmu osigura potrebne tvari, već da spriječi nastanak bolesti te poboljša fizičko i psihološko stanje čovjeka. Među funkcionalnom hranom važno mjesto je pronašlo i grožđe.

Grožđe je plod biljke koja se latinski naziva *Vitis vinifera*. Ova biljka uspjeva od Dalekog Istoka sve do Srednje Europe. Uzgaja se u Aziji, Europi, Africi, Južnoj i Sjevernoj Americi, Novom Zelandu, Australiji a može se pronaći čak i u nekim južnim dijelovima Sibira.

Postoje razne sorte grožđa, najčešće su to stolna grožđa te grožđa za proizvodnju vina. Bobica grožđa je hrskave teksture i slatkog, suhog ili oporog okusa. Prozirno meso obavija glatka kožica. Prema boji kožice stroga podjela grožđa je na bijelo ili crno grožđe (slika 1.)



Slika 1 *Vitis vinifera* (preuzeto s: http://allbeautynhealth.com/index.php?route=product/product&product_id=101)

Plod loze, grožđe, predstavlja namirnicu velike nutritivne i dijetetske vrijednosti, te je dobar izvor hranjivih tvari za naše tijelo. U 100 g svježeg voća sadržano je 69 kcal ili 288 kJ energije, 0,72 g proteina, 0,16 g masti, 18,10 g ugljikohidrata, 0,9 g dijetetskih vlakana i 15,48 g šećera. Grožđe je dobar izvor vitamina C (11 g, što je 14 % preporučenog dnevnog unosa). Sadrži fosforu kiselinu, sve vitamine B, osim B12 te od minerala magnezij, mangan i kalij. Flavonoidima se pripisuje antioksidacijsko, protuupalno i antialergijsko djelovanje. (1)

Osim njegove uloge kao prehrambene namirnice te uloge u proizvodnji vina, još je jedan dio ploda grožđa od iznimne vrijednosti. Koštice grožđa dugo su se smatrale nusproduktom u proizvodnji vina no zbog njihovih nutritivnih vrijednosti u svijetu se proizvodi ulje koštica grožđa.

3.2 Ulje koštica grožđa

Ulje sjemenki grožđa (slika 2.) dobiva se, kako sam naziv kaže, iz koštica grožđa koje su se dugo vremena smatrale nusproduktom u proizvodnji vina, odnosno velikim ekonomskim i ekološkim problemom. No njegove blagodati pokazale su suprotno. Ono obiluje vitaminima i mineralima, sadrži značajne količine antioksidanasa, te je jako bogato nezasićenim masnim kiselinama: linolnom ili ω -6 masnom kiselinom (oko 54 %), zatim oleinskom ili ω -3 masnom kiselinom (oko 36 %), palmitinskom (oko 5 %) i stearinskom (oko 2,5 %).



Slika 2 Ulje koštica grožđa (preuzeto s: <http://www.terra-organica.hr/ulje-sjemenki-grozdja-kostica-grozdja-oleotherapy-vitis-vinifera.html>)

Ovo ulje ima dva osnovna područja primjene: u kozmetičkoj industriji te u kulinarstvu. Ulje koštica grožđa posjeduje važne prednosti za zdravlje. Dobar je izvor masnih kiselina i vitamina E. Iz tog razloga mnoge istraživačke skupine potaknute su na dublje analize ovog proizvoda. Cilj je utvrditi što precizniji i točniji sastav ulja, odrediti njegova svojstva te ono zbog čega je najviše zanimljivo, njegovu antioksidativnu sposobnost.

3.3 Vitamini

Vitamini su esencijalni nutrijenti koje organizam čovjeka ne može sam sintetizirati već ih je potrebno uzimati hranom. Vitamini se dijele na dvije skupine, vitamini topljivi u vodi te vitamini topljivi u mastima. Među njima se izdvajaju vitamini koji imaju ulogu antioksidanasa: vitamin A (β -karoten), vitamin C (djeluje zajedno s vitaminom E), vitamin D (sintetizira se pomoću sunčeve svjetlosti) te vitamin K (uloga koagulacije krvi). (2)

Nastanak kardiovaskularnih i malignih bolesti se pripisuju oštećenju bioloških struktura izazvanim slobodnim radikalima. Mnoga epidemiološka i klinička istraživanja pokazuju povezanost između dugotrajnog povećanog unosa α -tokoferola i β -karotena sa smanjenom oksidacijom lipoproteina niske gustoće (LDL – „Low density lipoprotein“), prema tome i

manju smrtnost od kardiovaskularnih bolesti. Veliko je zanimanje za moguću ulogu ovih vitamina koji su se pokazali kao prirodni antioksidansi u prevenciji bolesti.

U različitim istraživanjima vitamini su korišteni u 10 puta većim dozama od propisane preporučene dnevne vrijednosti (RDA – „Recommended Daily/Dietary Allowances). Istraživanja pokazuju da povećan unos određenih vitamina može koristiti u prevenciji određenih bolesti. Posljedično tome zabilježen je i porast uzimanja vitaminskih pripravaka. Češće se rabe multivitaminski pripravci dok nešto rjeđe monokomponentni. (3)

Obzirom da su vitamini i suplementi stavljeni u kategoriju prehrambenih tvari a ne lijekova onda oni ne prolaze istu preciznu i temeljitu kontrolu kao ostale farmaceutske formulacije.

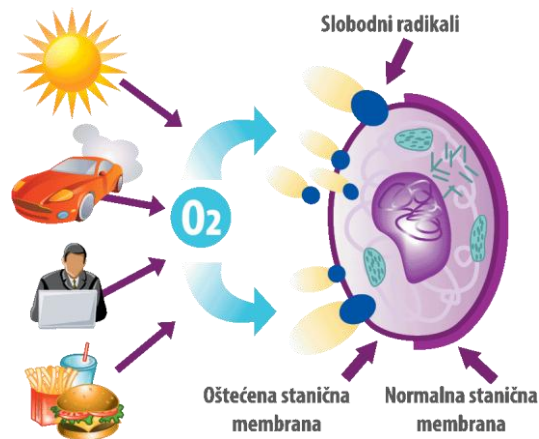
Oštećenja slobodnim radikalima, nastala tijekom oksidacijskog stresa uključena su u patofiziologiju različitih bolesti. Mnoge akutne i kronične bolesti zapravo su posljedica neravnoteže između oksidativnoga stresa i antioksidacijskih obrambenih mehanizama.

3.4 Slobodni radikali

Slobodni radikali su kemijski spojevi s jednim ili više nesparenih elektrona u vanjskoj ljusci. Zbog nesparenog elektrona slobodni radikali imaju vrlo veliku kemijsku reaktivnost s niskom specifičnošću za reaktante. U kemijskoj reakciji, koja se naziva oksidacija, dolazi do brzog i nepredvidivog spajanja slobodnih radikala s bilo kojim bliskim proteinom, lipidom, ugljikohidratom ili nukleinskom kiselinom. Vezivanjem slobodnih radikala na organske molekule nastaju novi spojevi sa svojstvima radikala, pa time imaju mogućnost pokretanja novog niza neenzimskih lančanih reakcija. (3)

Slobodni radikali s obzirom na izvor dijele se na endogene i egzogene. Endogeni slobodni radikali nastaju u organizmu kao posljedica metabolizma kisika, apoptoze, koagulacije, fagocitoze, kemoataksije, koagulacije, hipoksije ili hiperoksije. Egzogeni izvori slobodnih

radikala dolaze iz naše okoline, to može biti dim cigarete, lijekovi, prehrana, pesticidi, radioaktivno zračenje, UV zračenje...(Slika 3.)



Slika 3 Utjecaj slobodnih radikala na stanicu (preuzeto s: <http://matuzalem.hr/o-antioksidansima/>)

Slobodni radikali koji nastaju u organizmu čovjeka jesu superoksidni anion, perhidroksilni radikal i hidroksilni radikal. Njihova uloga nije uvijek štetna za ljudski organizam, ponekad u nekim fiziološkim reakcijama i staničnim funkcijama imaju ulogu vjesnika.

Uloga slobodnih kisikovih radikala jedno je vrlo značajno područje medicinske znanosti. Slobodni kisikovi radikali imaju određenu ulogu u ljudskom organizmu, u mnogim unutarstaničnim procesima, signalizaciji, apoptozi, proliferaciji te imunološkom odgovoru. Fagocistične stanice proizvode kisikove radikale kao dio mehanizma za uništavanje mikroorganizama nakon fagocitoze. (4)

Smatra se da su odgovorni za nastanak mnogih akutnih i kroničnih oboljenja, poput akutne i kronične upale (ateroskleroza, hipertenzija) te malignih bolesti. Svim tim stanjima zajedničko je oštećenje bioloških molekula procesom oksidacije. Prisutnost slobodnih kisikovih radikala (tablica 1) može uzrokovati i citotoksično djelovanje, što dovodi do smrti stanica, nastanka mutacija i kromosomskih aberacija, te karcinogeneze. (4)

Tablica 1. Reaktivni kisikovi spojevi (4)

REAKTIVNI KISIKOVI SPOJEVI	
SLOBODNI RADIKALI	ČESTICE KOJE NISU SLOBODNI RADIKALI
Superoksidni, $O_2^{\cdot -}$	Vodikov peroksid, H_2O_2
Hidroksilni, OH^{\cdot}	Hipokloritna kiselina, $HClO$
Peroksilni, ROO^{\cdot}	Ozon, O_3
Aloksilni, RO^{\cdot}	Singletni kisik, 1O_2
Hidroperoksilni, HO_2^{\cdot}	

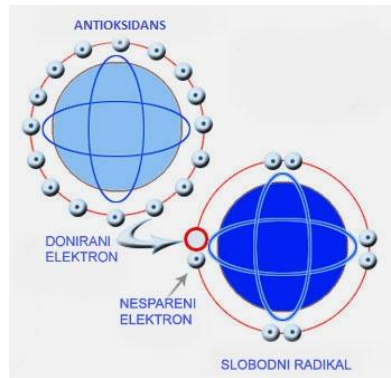
Izračunato je da se u molekuli DNK svake humane stanice svakodnevno događa oko 10 000 oksidacijskih „udara“. Taj podatak ukazuje na to da je oksidacijski stres svugdje prisutan, i u zdravih i u bolesnih osoba što opet pak pokazuje da ljudski organizam raspolaže izvrsnim prirodnim mehanizmima obrane. Sve te reakcije oksidacije na biološkim molekulama u čovjeku, organizam sam obrani, i one su samo prolazne. Međutim ako je oksidacijski stres prevelik i stalan, obrambeni mehanizam postaje preopterećen, dolazi do neispravnih mutacija DNK, narušava se homeostaza organizma, nagomilavanja štetnih produkata oksidacije te naposljetku i do nastanka bolesti.

3.5 Antioksidansi

U prirodnom antioksidacijskom mehanizmu obrane sudjeluju endogeni antioksidansi: vitamini K, A, C i E, koenzim Q, tiolne molekule (cistein, cistamin, metionin, glutation), ubikvinon, glukoza, bilirubin, urati te katabolički peptidi u stanici.

Antioksidansi se dijele u dvije velike skupine; „antioksidansi u biološkim tekućinama“ i „antioksidansi u prehrani“. (3) To znači na one koji se prirodno nalaze u ljudskom organizmu i sprječavaju oksidaciju bioloških molekula te na one koji se unose u organizam putem hrane

te se tako značajno smanjuju štetna djelovanja reaktivnog kisika i/ili dušika na normalne fiziološke funkcije. S obzirom na sve veći porast kardiovaskularnih bolesti, malignih oboljenja i infarkta, razumljiv je veliki znanstveni interes usmjeren upravo na detaljnija istraživanja prirodnih antioksidanasa unešenih hranom u prevenciji i liječenju tih bolesti.



Slika 4. Djelovanje antioksidansa (preuzeto s : <http://www.val-znanje.com/modem/zdravlje-tekstovi-sungit.html>)

Da bi se razumjelo djelovanje slobodnih radikala na biološke molekule potrebno je prikazati mehanizam lipidne peroksidacije koja se odvija kroz tri faze: inicijacija, propagacija te terminacija. Peroksidacijski niz u lipidnom sustavu započinje napadom slobodnih kisikovih radikala koji su sposobni odvojiti atom vodika iz metilenske skupine. Time započinje lančani niz štetnog utjecaja radikala. (5)

INICIJACIJA: slobodni radikal $R\cdot$

PROPAGACIJA: $R\cdot + O_2 \rightarrow ROO\cdot$

$ROO\cdot + RH \rightarrow ROOH + R\cdot$

TERMINACIJA: $ROO\cdot + ROO\cdot \rightarrow$ neaktivni produkt

Pri čemu je:

$ROO\cdot$ - peroksilni radikal

$ROOH$ - hidroperoksil.

3.6 Vitamin E

1925. godine vitamin E je službeno priznat kao peti otkriveni vitamin. Nekoliko godina kasnije dobio je naziv tokoferol, iz grčkih riječi „toc“ (dijete) i „phero“ (nositi, izvesti), što je opisivalo njegovu ulogu kao bitne tvari u prehrani za razvoj fetusa a kasnije i u razvoju djeteta. Godine 1969. Agencija za hranu i lijekove (FDA – „Food and Drug administration“) je službeno priznala vitamin E kao bitan nutrijent za ljudsku populaciju. (6)

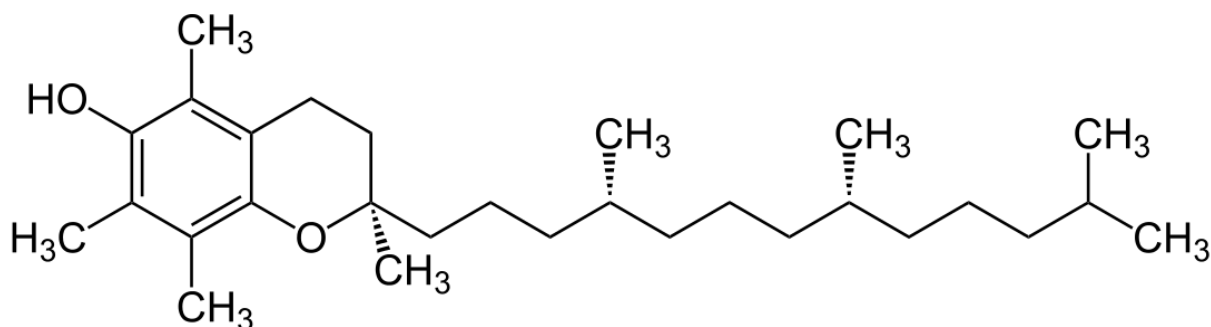
Vitamin E se nalazi u različitim vrstama hrane, uključujući ulje, meso, jaja i lisnato povrće. Oblik koji je najpoznatiji po svojoj ulozi za ljudsko zdravlje je α -tokoferol (slika 6.), kojim obiluju ulje masline i suncokreta te prevladava u prehrani europskog kontinenta. γ -tokoferol (slika 7.) je oblik kojim obiluje ulje soje i kukuruza te prevladava u prehrani američkog kontinenta. (6)



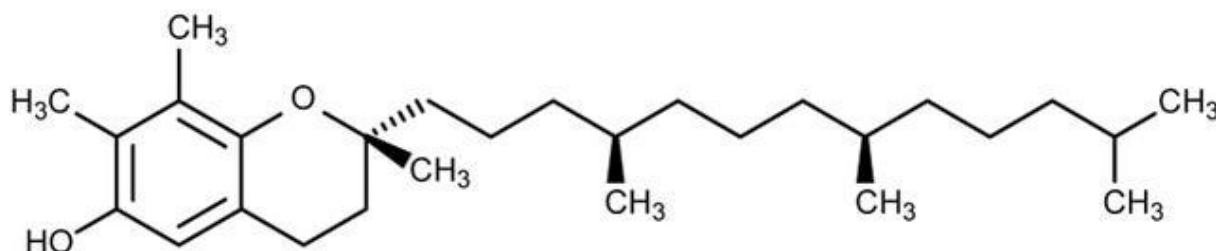
Slika 5 Ulja u ljudskoj prehrani (preuzeto s: <http://www.healthyfoodhouse.com/herbal-oils-for-skin-care/>)

Vitamin E je najobilniji liposolubilni antioksidans i pripada mu uloga u zaštiti staničnih membrana od oksidativnog stresa. Prema istraživanjima *in vitro*, vitamin E je smješten u membranama i lipoproteinima, gdje može prekinuti lančanu reakciju oksidacije LDL potaknutu slobodnim radikalima i preventivno djelovati na membrane stanica.

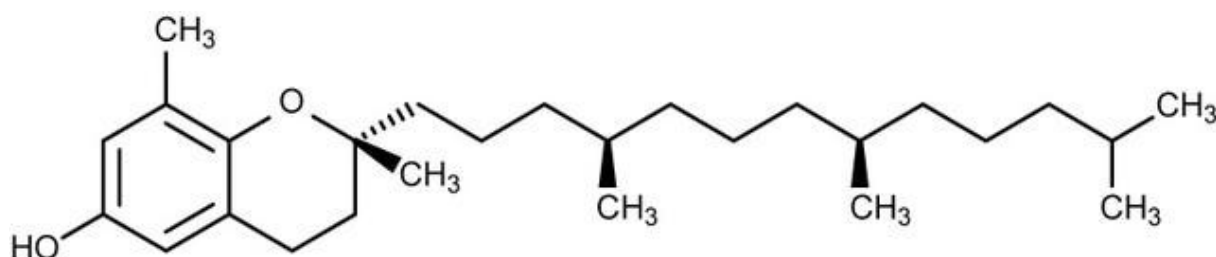
Vitamin E postoji u 8 različitih izomera: 4 tokoferola (α -, β -, γ - i δ -) (slike 6, 7 i 8) te 4 tokotrienola (α -, β -, γ - i δ -).



Slika 6. α -tokoferol (preuzeto s: https://de.wikipedia.org/wiki/Tocopherol#/media/File:Alpha-Tocopherol_Structural_Formulae_V.1.svg)



Slika 7. γ -tokoferol (preuzeto s: <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---T/Delta-Tocopherol.htm#step-heading>)

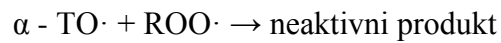
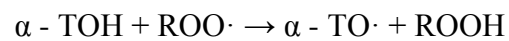


Slika 8. δ -tokoferol (preuzeto s: <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---T/Delta-Tocopherol.htm>)

Tijekom oksidacije, molekula α -tokoferola prelazi u α -tokoferoksil radikal, koji dalje može reagirati s drugim peroksilnim radikalom ili se pomoću vitamina C ponovno reducirati u

ishodni oblik, α -tokoferol. Prema tome mnogobrojna istraživanja pokazala su da vitamin E može usporiti proces ateroskleroze te kardiovaskularnih bolesti. (3)

Uloga vitamina E, kao antioksidansa je da inhibira fazu propagacije. α -tokoferol donira svoj fenolni vodikov atom radikalu i pretvori ga u hidroperoksid. Nastali tokoferol radikal je stabilan i kao takav se spaja s još jednim radikalom te postaje neaktivan. (5)



Pri čemu je:

$\alpha - \text{TOH}$ – alfa tokoferol,

$\alpha - \text{TO}\cdot$ – tokoferoksilni radikal.

4 ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA

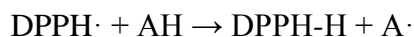
4.1 DPPH metoda

Metoda s DPPH radikalom predstavljena je na malo više od jedne stranice u časopisu Natural od strane Marsden Blois-a, naučnika sa Sveučilišta u Stanfordu, 1958 godine. (7) DPPH metoda je standardna rutinska kolorimetrijska metoda koja se koristi za procjenu antioksidativnog kapaciteta, odnosno sposobnosti hvatanja slobodnih radikala.



Slika 9 Princip DPPH metode (preuzeto s: <http://radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Antioxid.html>)

Molekula 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil, ili DPPH, je stabilni slobodni radikal. Otopina je ljubičaste boje te u etanolu apsorbira na 515 nm. Kada se u otopinu doda tvar koja može donirati vodikov atom, DPPH· prelazi u svoj reducirani oblik čime i nestaje ljubičasto obojenje otopine. Boja prelazi u žuto ovisno o količini antioksidansa (Slika 9.). (7) Promjenu boje prati se kinetičkom metodom što se može prikazati i na sljedeći način:



Pri čemu je:

DPPH· - DPPH radikal

AH - donor vodikovog atoma,

DPPH-H - reducirani oblik DPPH,

A· - slobodni radikal.

4.2 Kemijska kinetika

Kemijska kinetika se bavi proučavanjem brzina kemijskih reakcija i mehanizama kojima se te reakcije odvijaju. Brzina reakcije opisuje napredovanje kemijske reakcije s vremenom, a mehanizam reakcije predstavlja slijed događaja na molekularnoj razini kojima reaktanti prelaze u produkte reakcije.

Pri praćenju napredovanja kemijske reakcije mjere se promjene količine reaktanata ili produkata. Promjene u kemijskoj reakciji posljedica su niza događaja na molekularnoj razini. Događaji na molekularnoj razini nazivaju se elementarni procesi, dok se niz elementarnih procesa koji daju produkte naziva mehanizmom reakcije.

Brzina napredovanja kemijske reakcije definira se prirastom dosega reakcije (množine pretvorbi) s vremenom. Množina pretvorbi, doseg ili napredak povezan je s množinama sudionika kemijske reakcije. Sama brzina kemijske reakcije može ovisiti o različitim čimbenicima kao što je temperatura, tlak, koncentracija ili prisustvo katalizatora. (8) Brzina kemijske reakcije prikazuje se jednadžbom:

$$v = k [A][B]^2 \quad (1)$$

Pri čemu je:

v – brzina kemijske reakcije,

k – konstanta brzine kemijske reakcije (neovisna o koncentraciji, ovisna o temperaturi),

$[A]$ – koncentracija reaktanata na prvu potenciju,

$[B]^2$ – koncentracija reaktanata na drugu potenciju.

U analizi kinetike neke reakcije bitno je određivanje reda i koeficijenata brzine reakcije, što označava eksperimentalno pronalaženje ovisnosti brzine reakcije o koncentracijama

reaktanata. Kod određivanja brzine reakcije praćenjem u vremenu većinom se ne mjeri direktno koncentracija reaktanata ili produkata već neka veličina koja je proporcionalna koncentraciji. To može biti apsorbancija, električna provodljivost, kut optičkog zakretanja itd.

(8)

4.3 Matematički modeli kemijskih reakcija

„Matematičko modeliranje je postupak opisivanja realnog sustava matematičkim jednadžbama s ciljem razvoja i uporabe matematičkog modela za kasnije analize, projektiranja i optimiranja sustava za koji je model izgrađen“ (9) Kod modeliranja kemijskih reakcija može se opisati brzina te odrediti red kemijske reakcije.

Za modeliranje se najčešće koriste matematičke funkcije i ti se parametri optimiraju aproksimacijom ili interpolacijom neke krivulje.

Postoje četiri vrlo česta pristupa matematičkom modeliranju (9):

1. Empirijsko modeliranje,
2. Simulacijsko modeliranje,
3. Determinističko modeliranje,
4. Stohastičko modeliranje.

Postoje određeni principi kod svakog matematičkog modeliranja (9):

1. Imenovanje poznatih i nepoznatih vrijednosti varijabli koje opisuju problem,
2. Identificiranje/opisivanje odnosa između poznatih i nepoznatih varijabli u modelu. Ovi odnosi određeni su fizikalnim zakonima, intuicijom, iskustvom ili na neki drugi način,
3. Procjena utjecaja bilo kakve pretpostavke ugrađene u model o odnosu među varijablama,

4. Opisno rješenje problema – mora biti razumljivo svakome tko je u stanju razumjeti opis problema.

Za opisivanje kinetike kemijskih reakcija nestanka DPPH radikala u ovom istraživanju korišteno je pet matematičkih modela od kojih su tri monofazi i dva bifazna matematička modela.

Monofazni matematički modeli:

1. **Model kinetike nultog reda:** Ovaj model namijenjen je za opisivanje reakcija nultog reda. Takve reakcije su neovisne o koncentraciji reaktanata i odvijaju se konstantnom brzinom uz uvjet prisutnosti svih reaktanata. Što bi značilo da na brzinu reakcije ne utječe povećanje koncentracije.

$$\text{DPPH}\cdot_t = \text{DPPH}\cdot_0 + k_0 * t \quad (2)$$

2. **Model kinetike prvog reda:** Opisuje linearno kinetičko ponašanje gdje je karakteristična ovisnost o koncentraciji reaktanata. Zbog proporcionalnog odnosa brzine i koncentracije reaktanata, reakcija u pravilu nikad u potpunosti ne završava.

$$\text{DPPH}\cdot_t = \text{DPPH}\cdot_0 * e^{-k_1 * t} \quad (3)$$

3. **Kinetika logaritamskog reda:** Karakteristično za ovaj model je brzi početni rast nakon čega slijedi sporiji rast u beskonačnost. Početna koncentracija reaktanata određuje brzinu reakcije.

$$\text{DPPH}\cdot_t = \text{DPPH}\cdot_0 * e^{-k_1 * t} + c \quad (4)$$

Bifazni matematički modeli:

1. **Gustafson - Holden model:** To je nelinearni model koji se temelji na pretpostavci promjenjive konstante brzine reakcije prvog reda.

$$\text{DPPH}\cdot_t = \text{DPPH}\cdot_0 * (t/\beta + 1)^{-k_\alpha} \quad (5)$$

2. **Bifazni model kinetike prvog reda:** Definiran je izračunom dvije eksponencijalne jednadžbe koje u obzir uzimaju određene parametre kao što su koncentracija reaktanata u određenoj fazi reakcije, vrijeme odvijanja reakcije i količinu preostalog reaktanta. Eksperimentalne vrijednosti prilagođava nelinearnom regresijom.

$$\text{DPPH}\cdot_t = \text{DPPH}\cdot_1 * e^{-k_1 t} + \text{DPPH}\cdot_2 * e^{-k_2 t} + \text{DPPH}\cdot_r \quad (6)$$

Pri čemu su:

- $\text{DPPH}\cdot_0$ – količina radikala na početku eksperimenta,
- $\text{DPPH}\cdot_t$ – količina radikala u vremenu t ,
- $\text{DPPH}\cdot_1$ i $\text{DPPH}\cdot_2$ – količina radikala u fazi 1 i 2 u vremenu $t = 0$,
- $\text{DPPH}\cdot_r$ – preostala količina radikala,
- k_0, k_1, k_2, k_α – konstante brzine kemijske reakcije,
- t – vrijeme odvijanja kemijske reakcije,
- β – parametar ovisan o obliku krivulje (10) (11).

5 CILJ ISTRAŽIVANJA

Važnost vinove loze, njenog ploda je velika i poznata od davnina. Dugo smatran nusproduktom u proizvodnji vina, koštice grožđa zbog svojih kvaliteta našle su važno mjesto u mnogim istraživanjima. U ulju koštica grožđa izolirane su komponente kao zasićene i nezasićene masne kiseline, tokoferoli i polifenoli koji pokazuju izražena antioksidativna svojstva.

Budući da tokoferoli općenito predstavljaju jake antioksidanse a individualno pojedini izomeri tokoferola antioksidanse različite moći hvatanja radikala, cilj ovog istraživanja bio je ispitati sinergističko – antagonističko djelovanje izomera vitamina E (α -, γ - i δ -tokoferola). U uljima ekstrahiranih iz koštica grožđa dvaju sorti, Cabernet sauvignon i Cabernet franc s područja Slavonije, berba 2014, cilj je bio proučiti međusobno djelovanje izomera tokoferola prisutnih u ekstraktu i onih koji su dodani u različitim volumenima standardnih otopina izomera tokoferola. Također cilj je bio i ispitati utjecaj izomera tokoferola na ukupnu brzinu reakcije s radikalima i njihovu moguću uključenost u pojedine faze (brze i spore) brzine reakcije. Te na kraju predložiti mogući kinetički mehanizam reakcije izomera tokoferola i radikala.

6 Materijali i metode

6.1 Kemikalije

Kalijev hidroksid (KOH) p.a., Kemika, Hrvatska

Heksan (C₆H₁₄) p.a., J. T. Baker, Nizozemska

Etanol (C₂H₅OH) p.a., Carlo Erba, Francuska

2-propanol (C₃H₇OH), HPLC Gradiente Grade, J. T. Baker, Nizozemska

L(+)-askorbinska kiselina (C₆H₈O₆) p.a., Merck, Njemačka

Acetonitril (CH₃CN), HPLC Gradiente Grade, J. T. Baker, Nizozemska

Metanol (CH₃OH), HPLC Gradiente Grade, J. T. Baker, Nizozemska

Etilacetat (C₄H₈O₂), (99,8%) p.a., Fluka Chemika, Švicarska

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal DPPH· (C₁₈H₁₂N₅O₆), Aldrich Chemistry, Njemačka

α-tokoferol (C₂₉H₅₀O₂), 99,7 %, Supelco Analytical, SAD

γ-tokoferol, (C₂₈H₄₈O₂), 99,1 %, Supelco Analytical, SAD

δ-tokoferol, (C₂₇H₄₆O₂), 93,7 %, Supelco Analytical, SAD

6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), (C₁₄H₁₈O₄), 97 %, Sigma-Aldrich, Njemačka

6.2 INSTRUMENTI

Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (HPLC)

- Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti TSP Spectra System s P200 gradijentnom pumpom (SAD)
- SCM vakuum membranski degaser
- Rheodyne injektor 7725i s veličinom petlje 20 μ L
- UV/VIS detektor UV 2000
- kontroler SN 4000 i ChromQuest programska podrška
- KOLONA: Kromasil 100, C18, veličina zrna punjenja 7 μ m, širine i dužine 4 x 250 mm (MZ Analytical), Njemačka
- Celulozni filteri, Chromafil RC 45/15 MS, Macherey-Nagel, Njemačka

Spektrofotometar

- Cary 100 Bio WINUV, UV/VIS spektrofotometar, Varian, Australija

Centrifuga

- Rottina 420R, Andreas Hettich GmbH & Co., Njemačka

6.1 EKSTRAKCIJA ULJA IZ KOŠTICA GROŽĐA SUPERKRITIČNIM FLUIDOM

Ekstrakcija superkritičnim fluidom je novija tehnologija koja predstavlja odličnu alternativu komercijalnim postupcima ekstrakcije. Prednosti ugljik (IV) oksida (CO_2) u odnosu na organska otapala u klasičnim ekstrakcijama jesu bolja difuzija, niža viskoznost te manja površinska napetost. (12) Uzorci ulja korišteni u ovom radu dobiveni su ekstrakcijom superkritičnim CO_2 iz koštica grožđa. Za ekstrakciju odvagano je po 300 g koštica grožđa. Uvjeti ekstrakcije jesu sljedeći: tlak ekstrakcije iznosio je 30 MPa, temperatura 40 °C a protok CO_2 iznosio je 1,95 kg/h. Proces ekstrakcije trajao je 90 min. Ekstrakt je sakupljan u prethodno odvaženim staklenim epruvetama te je do daljnje analize skladišten na 4 do 6 °C. Sorte grožđa iz čijih je sjemenki ekstrahirano ulje jesu Cabernet sauvignon (CS) i Cabernet franc (CF) s područja Slavonije, berba 2014.

6.2 PRIPREMA UZORAKA - EKSTRAKCIJA VITAMINA E IZ ULJA KOŠTICA GROŽĐA

Uzorci ulja sastoje se od različitih komponenti kao što su proteini, ugljikohidrati i različiti minerali koji se odvajaju i detektiraju u analizama poput HPLC analize. Uzorci ekstrahiranih ulja (CS i CF) podvrgnuti su procesu saponifikacije kako bi se izdvojili tokoferoli i tokotrienoli (ekstrakt vitamina E). U ekstrakciji vodena faza zadržava polarne komponente dok u organskoj fazi zaostaju tokoferoli i tokotrienoli. Od svakog ulja pripremljeno je po sedam poduzoraka za analizu.

U plastičnu epruvetu s čepom (volumen od 50 mL) odvagano je 0,100 g ($\pm 0,001$ g) ulja. Dodana je askorbinska kiselina (0,05 g) te 5 mL smjese alkohola (smjesa alkohola se sastoji od 90,2 % etanola, 4,9 % metanola i 4,9 % izopropanola HPLC čistoće). Smjesa je vorteksirana 30 sekundi te stavljena u vodenu kupelj na 70 °C u vremenu od 30 minuta uz

povremeno miješanje uzoraka. Nakon 30 minuta uzorci su stavljeni u led 5 minuta. U uzorke je dodano 3 mL deionizirane vode i 5 mL heksana te ponovno vorteksirano 30 sekundi. Tako pripremljeni uzorci centrifugirani su na 1000 okr/min, tijekom 15 minuta na 25 °C. Nakon centrifugiranja uzoraka izdvojen je heksanski sloj koji je prebačen u staklene epruvete. U sloj koji je ostao u plastičnoj epruveti s čepom dodano je 5 mL heksana, uzorak vorteksiran nakon čega je opet slijedilo centrifugiranje (1000 okr/min/15 min/25 °C). Heksanski sloj je prebačen u staklenu epruvetu gdje je i prethodno izdvojen heksanski sloj nakon prvog centrifugiranja. Pripremljeni uzorci upareni su pomoću tekućeg dušika. Tako pripremljeni uzorci korišteni su u daljnjoj analizi.

6.3 PRIPREMA UZORAKA ZA HPLC ANALIZU

Nakon ekstrakcije vitamina E iz ulja koštica grožđa uzorci su pripremljeni za analizu tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Pripremljene su otopine standarda α -, γ - i δ -tokoferola ishodne koncentracije 100 mg/L. U ekstrahirane uzorke ekstrakta vitamina E dodani su standardi po 200 μ L kako je prikazano u tablici 2. Standardi su dodani u različitim kombinacijama da bi se daljnjom analizom moglo utvrditi međudjelovanje izomera vitamina E, odnosno α -, γ - i δ -tokoferola. Preostali dio do 1 mL nadodana je pokretna faza (acetonitril:metanol (75:25, V/V)).

Tablica 2. Volumeni standarada α -, γ - i δ -tokoferola u uzorcima vitamina E ekstrahiranog iz ulja CS i CF

UZORCI	ALFA/ μ L	GAMA/ μ L	DELTA/ μ L	POKRETN FAZA/ μ L
CF1	200	-	-	800
CF2	-	200	-	800
CF3	-	-	200	800
CF4	200	200	-	600
CF5	200	-	200	600
CF6	-	200	200	600
CF7	200	200	200	400

CS1	200	-	-	800
CS2	200	200	200	400
CS3	-	200	-	800
CS4	-	-	200	800
CS5	200	200	-	600
CS6	-	200	200	600
CS7	200	-	200	600

Pripremljeni uzorci su filtrirani kroz celulozne filtere 0,45 μm te analizirani tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti („High performance liquid chromatography“ - HPLC).

6.4 KROMATOGRAFSKA ANALIZA

Od 1 mL uzorka injekcijskom štrcaljkom uzeto je 20 μL i unešeno na početak kromatografske kolone. Kao pokretna faza korištena je smjesa otapala acetonitril:metanol (75:25, V/V). Temperatura na kojoj je termostatirana kolona iznosila je 25 °C, protok kroz kolonu iznosio je 1,2 mL/min na valnoj duljini od 295 nm. Kromatografska analiza je trajala 25 minuta. Za svaki uzorak iz kromatograma očitane su površine ispod pika, a koncentracije su određene iz kalibracijskih pravaca standardnih otopina α -, γ - i δ -tokoferola.

6.5 ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI - DPPH METODA

Dnevno je pripremljena svježa otopina DPPH radikala za analizu na način da je odvagano 0,002 g DPPH radikala, otopljeno u etilacetatu i kvantitativno prenešeno u odmjernu tikvicu od 50 mL. Svježe pripremljena otopina DPPH radikala zaštićena je od svjetlosti aluminijskom folijom te čuvana na tamnom mjestu.

U ekstrakt vitamina E koji je dobiven iz ulja koštica grožđa dodane su različite kombinacije standarda kao što je prikazano u tablici 2. U pripremljeni uzorak dodano je 2 mL etilacetata te vorteksirano dok se sav ekstrakt nije otopio.

Uzorak je pripremljen u staklenoj epruveti s čepom na navoj, na način da je automatskom pipetom dodano 1 mL ekstrakta i 3 mL otopine DPPH radikala. Vorteksirano 10 sekundi te prenešeno u kivetu. Mjerenje je započeto u 60 sekundi od trenutka kontakta ekstrakta i otopine DPPH. Apsorbancija je mjerena 60 minuta na 515 nm, u intervalima od 1 minute.

U staklenoj epruveti na navoj pripremljene su i slijepa probe. Jedna slijepa proba je otopina uzorka ekstrakta (SP1) koja je pripremljena dodavanjem 1 mL otopine ekstrakta i 3 mL etilacetata, vorteksirana 10 sekundi te prenešena u kivetu.

U drugu staklenu epruvetu pripremljena je slijepa proba otopine DPPH radikala (SP2) na način da je dodano 1 mL etilacetata i 3 mL otopine DPPH radikala, vorteksirano 10 sekundi te prenešeno u kivetu. Apsorbancija slijepih proba (SP1 i SP2) je mjerena prije svakog uzorka.

Antioksidacijska aktivnost izražava se gubitkom signala odnosno smanjenjem apsorbancije otopine uzorka ekstrakta i DPPH radikala. Postotak gubitka signala izražen je sljedećom jednačicom:

$$\% = [(ASP2 + ASP1 - AUz) / (ASP2 + ASP1)] \times 100 \quad (7)$$

Pri čemu je:

ASP2 – apsorbancija SP2 u 0 minuti,

ASP1 – apsorbancija SP1 u 0 minuti,

AUz – apsorbancija otopine uzorka ekstrakta s radikalom.

6.6 IZRADA BAŽDARNE KRIVULJE (TROLOX EKVIVALENT)

Jedan od načina izražavanja antioksidativnog kapaciteta je TEAC („Trolox equivalent antioxidant capacity“) metoda. Trolox je referentni standard koji se koristi za izražavanje rezultata dobivenih metodom za određivanje antioksidativne aktivnosti. Trolox je analog vitamina E (6-hidroksi-2,5,7,8-tetraetilkroman-2-karboksilna kiselina).

Ishodna otopina Troloxa pripravljena je otapanjem odgovarajuće mase Trolox-a kako bi se dobila koncentracija otopine od 0,001 M. Razrjeđenja ishodne otopine su pripravljena u rasponu od 0,3 do 0,21 mM.

Tablica 3. Volumeni razrjeđenja iz matične otopine Troloxa s odgovarajućim množinskim koncentracijama

	mL matične otopine u 10 mL	Konc. otopine mM
1	0,0	0,00
2	0,3	0,03
3	0,6	0,06
4	0,9	0,09
5	1,2	0,12
6	1,5	0,15

Pripremljena je svježa otopina DPPH radikala i to na način da je otopljeno 0,00104 g DPPH radikala u 25 mL etilacetata.

Pripremljene su slijepe probe, odnosno 5 otopina Troloxa bez radikala (SP3 = 1 mL otopine + 3 mL etilacetata) te je mjerena apsorbancija. Uz to mjerena je i apsorbancija slijepe probe otopine radikala (SP2 = 1 mL etilacetata + 3 mL otopine DPPH).

Uzorak za mjerenje pripremljen je na način da je u staklenu epruvetu dodano po 1 mL otopine pojedine koncentracije Troloxa i dodano po 3 mL otopine DPPH. Uzorak je homogeniziran na

vorteksu 10 sekundi te prenešen u staklenu kivetu. Cijeli postupak pripreme uzorka za mjerenje je obavljen u 1 minuti jer u 60-toj sekundi započinje spektrofotometrijska analiza. Apsorbancija je mjerena na 515 nm u intervalima od 1 minute kroz 30 minuta.

Antioksidacijska aktivnost otopina Troloxa izražava se postotkom gubitka signala prema jednadžbi:

$$\% = [(ASP2 + ASP3 - AUz) / (ASP2 + ASP3)] \times 100 \quad (8)$$

Pri čemu je:

ASP2 – apsorbancija SP2 u 0 minuti,

ASP3 – apsorbancija SP3 u 0 minuti,

AUz – apsorbancija pojedine otopine Troloxa s radikalom.

6.7 STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA

Dobivene eksperimentalne vrijednosti izražene su kao srednja vrijednost dvaju mjerenja uz odgovarajuće standardne devijacije.

Testiranje predloženih kinetičkih modela i njihovih grafičkih prikaza provedeno je postupkom nelinearne regresije matematičkim programom *Wolfram Research Mathematica*®, programski paket verzija 10.2 (*WolframResearch Co, SAD*).

Za procjenu slaganja dobivenih eksperimentalnih podataka s teorijski dobivenim podacima matematičkih modela korišteni su sljedeći statistički pokazatelji:

- Korelacijski koeficijent R^2 ,
- SRMSE – koeficijent varijacije korijena srednjeg kvadratnog odstupanja („*Scaled Root Mean Squared Error*“),
- Pogreška hi – kvadrat testa (χ^2).

Vrijednosti za navedene pokazatelje izračunate su u programskom paketu *Microsoft Excel 2010*.

7 REZULTATI

7.1 Udio izomera vitamina E u ekstraktu iz ulja CS i CF

Da bi se utvrdilo potencijalno sinergističko-antagonističko djelovanje izomera vitamina E u ekstrakte vitamina E iz ulja koštica grožđa dodani su određeni volumeni standarda α -, γ - i δ -tokoferola (Tablica 2). Kromatografskom analizom određeni su udjeli izomera α -, γ - i δ -tokoferola u uzorcima (Tablica 4 i 5). Rezultati su prikazani kao masa pojedinog izomera po gramu uzorka ulja ($\mu\text{g/g}$ ulja) (tablica 4), odnosno (tablica 5) kao masa pojedinog uzorka po gramu ekstrakta vitamina E ($\mu\text{g/g}$ ekstrakta vitamina E) iz ulja CF i CS.

Tablica 4. Udio α -, γ - i δ -tokoferola u ekstraktima vitamina E iz ulja koštica grožđa Cabernet Sauvignon (CS) i Cabernet Franc (CF) s dodanim standardima tokoferola (tablica 2.) izraženim kao $\mu\text{g/g}$ ulja

UZORCI	UDIO IZOMERA VITAMINA E ($\mu\text{g/g}$ ulja)		
	δ	γ	α
CF1	9,75 \pm 0,18	16,79 \pm 0,04	108,08 \pm 1,64
CF2	10,18 \pm 0,82	209,26 \pm 3,49	IPD*
CF3	142,03 \pm 0,23	7,21 \pm 0,69	IPD*
CF4	7,74 \pm 0,65	181,70 \pm 1,82	148,40 \pm 3,92
CF5	156,97 \pm 5,66	12,93 \pm 1,38	119,86 \pm 3,55
CF6	119,01 \pm 3,05	186,10 \pm 6,23	IPD*
CF7	122,09 \pm 3,23	172,11 \pm 7,18	103,84 \pm 2,11
CS1	17,45 \pm 0,52	20,90 \pm 1,11	89,90 \pm 3,26
CS2	4,13 \pm 5,84	160,34 \pm 4,16	IPD*
CS3	242,83 \pm 3,83	5,01 \pm 0,32	IPD*
CS4	17,36 \pm 0,78	188,08 \pm 6,57	84,85 \pm 5,68
CS5	139,29 \pm 1,17	17,13 \pm 0,45	78,59 \pm 2,29
CS6	148,01 \pm 0,65	193,37 \pm 1,08	IPD*
CS7	146,33 \pm 0,64	226,23 \pm 1,16	136,81 \pm 1,55

*IPD – ispod praga detekcije

Tablica 5. Udio α -, γ - i δ -tokoferola u ekstraktima vitamina E iz ulja koštica grožđa Cabernet Franc (CF) i Cabernet sauvignon (CS) dodanim standardima tokoferola (tablica 2.) izraženim kao $\mu\text{g/g}$ ekstrakta

UZORCI	UDIO IZOMERA VITAMINA E ($\mu\text{g/g}$ ekstrakta)		
	δ	γ	α
CF1	95,99 \pm 1,76	165,20 \pm 0,41	1063,63 \pm 16,16
CF2	143,51 \pm 11,49	2950,26 \pm 49,27	IPD*
CF3	418,28 \pm 0,68	21,23 \pm 2,02	IPD*
CF4	974,42 \pm 81,86	22871,93 \pm 228,78	18679,78 \pm 493,61
CF5	5924,28 \pm 213,66	487,85 \pm 52,25	4523,46 \pm 134,06
CF6	4473,82 \pm 114,83	6995,97 \pm 234,33	IPD*
CF7	2144,94 \pm 56,82	3023,73 \pm 126,22	1824,37 \pm 37,11
CS1	909,15 \pm 27,10	1089,06 \pm 57,82	4684,26 \pm 169,68
CS2	96,48 \pm 136,45	3747,51 \pm 97,25	IPD*
CS3	61253,14 \pm 966,20	1264,11 \pm 80,69	IPD*
CS4	672,21 \pm 30,06	7284,49 \pm 254,59	3286,30 \pm 220,08
CS5	6171,13 \pm 51,73	758,91 \pm 20,05	3481,81 \pm 101,30
CS6	5195,53 \pm 22,95	6788,08 \pm 38,07	IPD*
CS7	2689,81 \pm 11,69	4158,46 \pm 21,30	2514,91 \pm 28,46

*IPD – ispod praga detekcije

Kako je navedeno u tablici 2 dodani su izomeri vitamina E (α -, γ - i δ - tokoferol) u različitim kombinacijama. U tablicama 4 i 5 vidljivo je da je najveći udio upravo onih izomera koji su dodani u uzorke, odnosno ekstrakte vitamina E ulja CS i CF. Prema tome, udio α -tokoferola u uzorcima CS je od 78,59 \pm 2,29 do 136,81 \pm 1,55 $\mu\text{g/g}$ ulja, u uzorcima CF od 103,84 \pm 2,11 do 148,40 \pm 3,92 $\mu\text{g/g}$ ulja, dok u uzorcima u kojima standard α -tokoferol nije dodan nije niti detektiran kromatografski. Udio γ -tokoferola u uzorcima CS je 5,01 \pm 0,32 do 226,23 \pm 1,16 $\mu\text{g/g}$ ulja dok u uzorcima CF je od 7,21 \pm 0,69 do 209,26 \pm 3,49 $\mu\text{g/g}$ ulja. Udio δ -tokoferola u uzorcima CS je od 4,13 \pm 5,84 do 242,83 \pm 3,83 $\mu\text{g/g}$ ulja, dok u uzorcima CF je od 7,74 \pm 0,65 do 156,97 \pm 5,66 $\mu\text{g/g}$ ulja.

Ukupna masa izomera ispitivanih tokoferola po gramu ulja i ekstrakta prikazana je u tablici 6. Najveći udio ukupnih izomera (α -, γ - i δ -tokoferola) u uzorcima CS je u uzorku CS7 i iznosi 509,37 \pm 49,11 $\mu\text{g/g}$ ulja dok je u uzorcima CF najveći udio ukupnih tokoferola u uzorku CF7 i iznosi 398,03 \pm 35,34 $\mu\text{g/g}$ ulja.

Tablica 6. Ukupna masa α -, γ - i δ -tokoferola u μg po 1 g ulja te u μg po 1 g ekstrakta dobivenih iz uzoraka ulja Cabernet sauvignon (CS) i Cabernet franc (CF)

UZORCI	Masa ulja / g	masa μg ulja	Masa ekstrakta / g	masa μg ekstrakta
CF1	0,0994	134,62±54,85	0,0101	1324,83±539,80
CF2	0,1001	219,44±140,77	0,0071	3093,77±1984,67
CF3	0,1019	149,24±95,33	0,0346	439,51±280,76
CF4	0,1007	337,84±92,34	0,0008	42526,13±11622,93
CF5	0,1019	289,76±74,79	0,0027	10935,59±2822,63
CF6	0,1015	305,11±47,44	0,0027	11469,79±1783,43
CF7	0,1019	398,03±35,34	0,0058	6993,03±620,95
CS1	0,0990	128,25±40,87	0,0019	6682,48±2129,53
CS2	0,1005	164,47±110,46	0,0043	3843,99±2581,67
CS3	0,1009	247,84±168,16	0,0004	62517,24±42418,65
CS4	0,1007	290,29±85,98	0,0026	11242,99±3330,19
CS5	0,1019	235,01±61,08	0,0023	10411,84±2706,13
CS6	0,1018	341,38±32,08	0,0029	11983,61±1126,10
CS7	0,1011	509,37±49,11	0,0055	9363,17±902,66

7.2 Antioksidacijska aktivnost ekstrakta vitamina E iz ulja CS i CF izražena kao TEAC

U tablici 7 prikazane su koncentracije izomera α -, γ - i δ -tokoferola u mmol/kg ulja te pripadajući gubitak signala DPPH radikala. Tablični prikaz govori o postotku gubitka signala DPPH radikala u odnosu na koncentraciju dobivenu izračunom TEAC metodom. Vidljivo je da je najveći gubitak signala u uzorcima u kojima je i najveća antioksidativna aktivnost.

Tablica 7. Antioksidacijska aktivnost uzoraka iz skupine uzoraka ulja Cabernet sauvignon (CS) i Cabernet franc (CF) izražena TEAC („Trolox equivalent antioxidant capacity“) s pripadajućim gubitkom DPPH signala mjenjenim u 60 minuti

	% DPPH	mmol/kg
CF1	12,22	1,782
CF2	30,26	4,257
CF3	8,53	1,298
CF4	22,03	3,162
CF5	20,11	2,910

CF6	14,31	2,076
CF7	17,82	2,567
CS1	31,42	4,472
CS2	12,15	1,771
CS3	15,58	2,264
CS4	32,08	4,541
CS5	40,41	5,662
CS6	37,38	5,272
CS7	38,12	5,402

TEAC metodom određena je antioksidativna aktivnost uzoraka. U svaki od prva tri uzorka u skupini CF dodan je pojedinačni izomer tokoferola. CF2 s dodanim γ -tokoferolom pokazao je najveću antioksidativnu aktivnost i to 4,258 mmol/kg s gubitkom signala od 30,26 %, CF1 s dodanim α -tokoferolom ima antioksidativnu aktivnost od 1,782 mmol/kg s gubitkom signala od 12,22 % dok CF3 s dodanim δ -tokoferolom ima antioksidativnu aktivnost od 1,298 mmol/kg s gubitkom signala od 8,53 %. Kombinacija α - i γ - tokoferola pokazala je antagonistički učinak izomera što je vidljivo antioksidativnom aktivnošću u uzorku CF6 koja iznosi 2,076 mmol/kg s gubitkom signala od 14,31 %. Kombinacija sva tri tokoferola α -, γ - i δ -, uzorak CF7, pokazala je nešto veću antioksidativnu aktivnost od uzorka CF6. Antioksidativna aktivnost uzorka CF7 iznosila je 2,567 mmol/kg s gubitkom signala 17,82 % što ukazuje na antagonistički učinak antioksidativne aktivnosti kombinacije α -, γ - i δ -tokoferola u ekstraktu vitamina E iz ulja CF.

Na isti način određena je antioksidativna aktivnost kod skupine uzoraka CS. No rezultati koji su dobiveni pokazuju nešto drugačije vrijednosti. Uzorak CS1 u kojem je dodan α -tokoferol pokazuje antioksidativnu aktivnost od 4,472 mmol/kg s gubitkom signala od 31,42 %, CS3 u kojem je dodan δ -tokoferol pokazuje antioksidativnu aktivnost od 2,264 mmol/kg s gubitkom signala od 15,58 % dok CS2 s dodatkom γ -tokoferola pokazuje antioksidativnu aktivnost od

1,771 mmol/kg sa gubitkom signala od 12,15 %. Najveću antioksidativnu aktivnost iz ove skupine pokazuje uzorak CS5 u kojeg je dodana kombinacija izomera α - i δ -tokoferola te iznosi 5,662 mmol/kg s gubitkom signala od 40,41 % što ukazuje na antagonistički učinak ovih izomera. Kombinacija dodanih sva tri izomera, α -, γ - i δ -tokoferola, također pokazuje antagonistički učinak što je vidljivo u uzorku CS7 gdje antioksidativna aktivnost iznosi 5,402 mmol/kg sa gubitkom signala od 38,12 %. Uzorak CS6 u kojem su dodani γ - i δ -tokoferol pokazuje antioksidacijsku aktivnost od 5,272 mmol/kg s gubitkom signala od 37,38 % što pokazuje da ova dva izomera dodana u ekstrakt vitamina E ulja CS imaju sinergistički učinak.

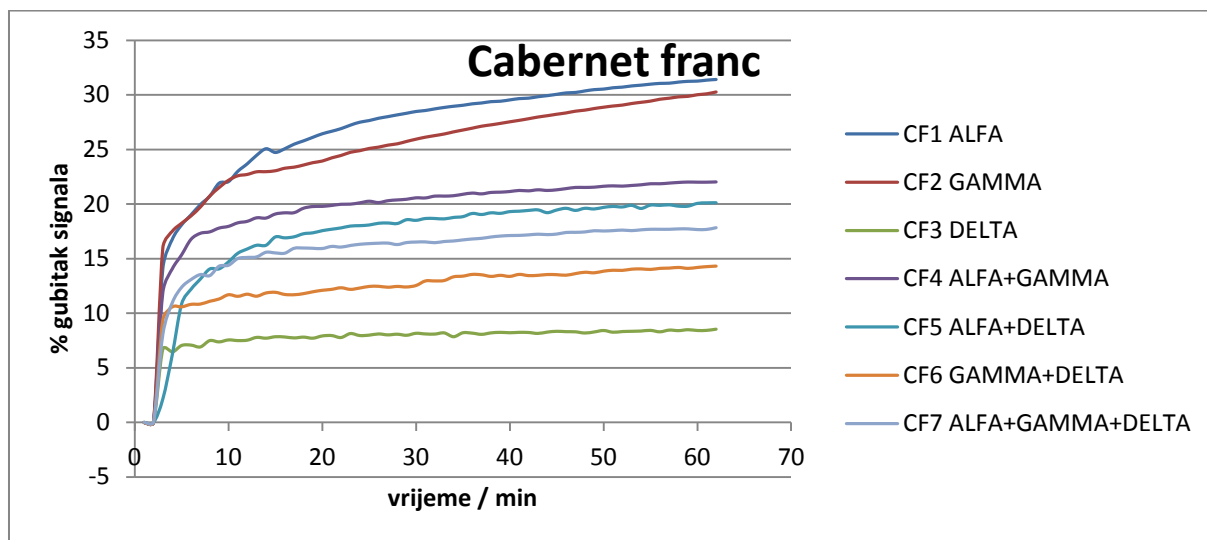
Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti dobivene TEAC metodom uzoraka ekstrakta vitamina E iz ulja CF i CS mogu se usporediti s vrijednostima antioksidacijske aktivnosti dobivene na čistim uzorcima ekstrakta vitamina E iz ulja CF i CS bez dodavanja standardnih otopina izomera tokoferola. Te vrijednosti su prikazane u tablici 8 s pripadajućim udjelom vitamina E.

Tablica 8. Vrijednosti antioksidativne aktivnosti izražene TEAC („Trolox equivalent antioxidant capacity“) puni naziv metodom te udio izomera vitamina E u ekstraktima vitamina E iz ulja Cabernet sauvignon (CS) i Cabernet franc (CF) bez dodatka izomera tokoferola (13)

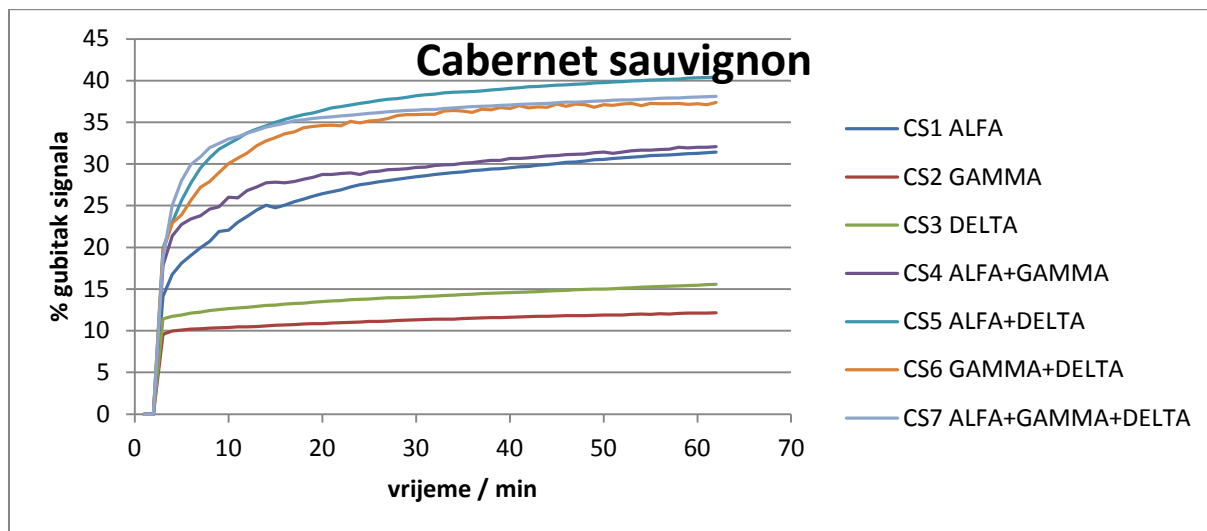
UZORCI	$\mu\text{g/g}$ ulja			TEAC
	δ	γ	Σ	mmol/kg
CF	$2,17 \pm 0,28$	$2,30 \pm 0,31$	4,47	0,3502
CS	$3,98 \pm 0,53$	$3,49 \pm 0,47$	7,47	0,2897

Vidljivo je da čisti ekstrakt vitamina E iz ulja CS i CF bez dodatka izomera tokoferola ima puno manju antioksidativnu aktivnost. S time se može zaključiti da veći udio tokoferola u uzorcima povećava antioksidativnu aktivnost vitamina E ekstrahiranog iz ulja CS i CF. U uzorcima gdje je ispitivana samo antioksidativna aktivnost ekstrakta vitamina E iz ulja rezultati pokazuju da veću antioksidativnu aktivnost ima ekstrakt vitamina E iz ulja CF, 0,3502 mmol/kg, dok ekstrakt vitamina E iz CS pokazuje slabiju antioksidativnu aktivnost,

0,2897 mmol/kg. (13) Uspoređujući rezultate gdje su dodani izomeri u različitim kombinacijama ekstraktu vitamina E iz ulja CS i CF vidljivo je da veću antioksidativnu aktivnost imaju uzorci iz skupine CS.



Slika 10 Gubitak signala DPPH· u uzorcima ulja Cabernet franc (CF) u odnosu na vrijeme (min)



Slika 11 Gubitak signala DPPH· u uzorcima ulja Cabernet sauvignone (CS) u odnosu na vrijeme (min)

Tijekom reakcije vidljivo je kako se izgled krivulje mijenja tijekom 60 minuta. Kod svih uzoraka, na početku reakcije krivulja je strmija što je odraz intenzivnijeg gubitka signala DPPH radikala, osobito u prvih nekoliko minuta. Odmakom vremena krivulja postaje monotonija. Gubitak signala uzoraka skupine CF i CS vidljivi su u tabličnom prikazu 9.

Vidljiva je razlika između gubitka signala DPPH radikala u uzorcima CF i CS između prve i tridesete minute koja je između 9 i 19 % dok razlika između tridesete i šezdesete minute je između 0,5 i 4 %.

Tablica 9 Gubitak signala DPPH radikala uzoraka iz skupine Cabernet franc (CF) i Cabernet sauvignon (CS) u prvoj minuti, tridesetj i šezdesetj minuti

	Gubitak signala DPPH radikala / %		
	1 min	30 min	60 min
CF1	2,53	11,48	12,22
CF2	16,01	26,27	30,27
CF3	6,72	8,08	8,53
CF4	11,92	20,73	22,03
CF5	2,16	18,66	20,12
CF6	9,28	12,95	14,31
CF7	8,05	16,45	17,81
CS1	14,11	28,72	31,42
CS2	9,58	11,38	12,15
CS3	11,41	14,15	15,58
CS4	17,84	29,81	32,08
CS5	19,88	38,37	40,41
CS6	19,51	35,96	37,38
CS7	18,74	36,51	38,12

7.3 Utjecaj različitih udjela izomera vitamina E u ekstraktima ulja CS i CF na kinetiku nestanka DPPH radikala

Da bi se pobliže objasnio mehanizam kinetike nestanka DPPH radikala dobivene eksperimentalne vrijednosti testirane su s pet kinetičkih modela (poglavlje 4.3.). Prema tome prikazane su vrijednosti konstanti brzine kemijske reakcije te statistički pokazatelji R^2 , SRMSE te χ^2 pogreška. U tablicama 8 i 9 prikazane su dobivene vrijednosti za monofazne modele, model kinetike nultog reda (jednadžba 2 potpoglavljju 4.3.), model kinetike prvog reda (jednadžba 3 potpoglavljju 4.3.) te logaritamski model (jednadžba 4 potpoglavljju 4.3.). U tablicama 10 i 11 prikazane su vrijednosti za bifazne modele, bifazni model kinetike prvog reda (jednadžba 5 potpoglavljju 4.3.) i Gustafson – Holden-ov model (jednadžba 6 potpoglavljju 4.3.).

Tablica 10 Kinetički parametri i statistički pokazatelji monofaznih kinetičkih modela reakcija nestanka DPPH· signala kod različitih omjera izomera α -, γ - i δ -tokoferola u uzorku ekstrakta vitamina E iz ulja Cabernet franc (CF)

Monofazni modeli	UZORCI						
	CF1	CF2	CF3	CF4	CF5	CF6	CF7
Kinetika nultog reda							
k_1	-0,0008	-0,0022	-0,0003	-0,0013	-0,0015	-0,0008	-0,0008
R^2	0,9998	0,9985	0,9999	0,9991	0,9988	0,9997	0,9998
SRMSE	0,0106	0,0588	0,0063	0,0403	0,0592	0,0138	0,0105
χ^2	1,17	2,75	0,89	2,27	2,76	1,33	1,16
Kinetika prvog reda							
k_1	0,0009	0,0030	0,0004	0,0016	0,0019	0,0009	0,0009
R^2	0,9998	0,9985	0,9998	0,9991	0,9988	0,9997	0,9998
SRMSE	0,0105	0,0569	0,0063	0,0399	0,0580	0,0137	0,0104
χ^2	1,16	2,70	0,89	2,26	2,73	1,33	1,15
Logaritamska kinetika							
k_1	0,1458	0,1021	1,3035	0,3571	0,1861	0,8052	0,1457
R^2	0,9999	0,9992	0,9999	0,9998	0,9998	0,9998	0,9999
SRMSE	0,0012	0,0326	0,0011	0,0094	0,0071	0,0070	0,0012
χ^2	0,39	2,06	0,37	1,11	0,96	0,95	0,38

Tablica 11 Kinetički parametri i statistički pokazatelji monofaznih kinetičkih modela reakcija nestanka DPPH· signala kod različitih omjera izomera α -, γ - i δ -tokoferola u uzorku ekstrakta vitamina E iz ulja Cabernet sauvignon (CS)

Monofazni modeli	UZORCI						
	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5	CS6	CS7
Kinetika nultog reda							
k_1	-0,0023	-0,0005	-0,0007	-0,0018	-0,0025	-0,0022	-0,0019
R^2	0,9981	0,9997	0,9996	0,9978	0,9950	0,9958	0,9953
SRMSE	0,0826	0,0133	0,0195	0,0927	0,1689	0,1526	0,1643
χ^2	3,25	1,30	1,58	3,44	4,65	4,42	4,59
Kinetika prvog reda							
k_1	0,0033	0,0005	0,0009	0,0026	0,0041	0,0035	0,0030
R^2	0,9982	0,9997	0,9996	0,9978	0,9952	0,9959	0,9954
SRMSE	0,0786	0,0133	0,0194	0,0906	0,1620	0,1472	0,1609
χ^2	3,17	1,30	1,57	3,41	4,55	4,34	4,54
Logaritamska kinetika							
k_1	0,1191	1,6023	1,1721	0,3069	0,2277	0,2176	0,4337
R^2	0,9995	0,9999	0,9998	0,9993	0,9991	0,9993	0,9995
SRMSE	0,0206	0,0029	0,0077	0,0267	0,0277	0,0243	0,0159
χ^2	1,63	0,61	1,00	1,86	1,90	1,77	1,43

Tablica 12 Kinetički parametri i statistički pokazatelji bifaznih kinetičkih modela reakcija nestanka DPPH· signala kod različitih omjera izomera α -, γ - i δ -tokoferola u uzorku ekstrakta vitamina E iz ulja Cabernet franc (CF)

Bifazni model	Uzorci						
	CF1	CF2	CF3	CF4	CF5	CF6	CF7
Kinetika prvog reda							
k_1	0,0805	0,0284	1,3035	1,1941	0,3662	0,8052	0,1457
k_2	0,7011	1,8509	1,3035	0,0541	0,0644	0,8052	0,1457
R^2	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9998	0,9999
SRMSE	0,0004	0,0011	0,0011	0,0003	0,0048	0,0070	0,0012
χ^2	0,22	0,37	0,38	0,21	0,80	0,97	0,39
Gustafson–Holden model							
k_a	0,0179	0,0487	NT	0,0272	0,0401	NT	0,0169
β	0,1301	0,0340	NT	0,0059	0,1620	NT	0,0995
R^2	0,9998	0,9999	NT	0,9999	0,9997	NT	0,9999
SRMSE	0,0009	0,0030	NT	0,0004	0,0115	NT	0,0006
χ^2	0,33	0,62	NT	0,22	1,22	NT	0,28

NT – nije testirano

Tablica 13 Kinetički parametri i statistički pokazatelji bifaznih kinetičkih modela reakcija nestanka DPPH· signala kod različitih omjera izomera α -, γ - i δ -tokoferola u uzorku ekstrakta vitamina E iz ulja Cabernet sauvignon (CS)

Bifazni model	Uzorci						
	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5	CS6	CS7
Kinetika prvog reda							
k_1	1,5942	1,6023	1,1721	1,5025	1,3764	2,2862	0,9289
k_2	0,0621	1,6023	1,1721	0,0564	0,0891	0,1084	0,0758
R^2	0,9999	0,9999	0,9998	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999
SRMSE	0,0008	0,0029	0,0077	0,0009	0,0017	0,0006	0,0005
χ^2	0,31	0,62	1,01	0,35	0,47	0,28	0,26
Gustafson – Holden model							
k_a	0,0596	0,0078	0,0142	0,0433	0,0726	0,0637	0,0539
β	0,1078	$5,45 \times 10^{-6}$	0,0005	0,0081	0,0403	0,0296	0,0065
R^2	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9998	0,9997
SRMSE	0,0006	0,0002	0,0004	0,0003	0,0028	0,0044	0,0072
χ^2	0,27	0,17	0,21	0,21	0,60	0,75	0,96

Statistički pokazatelji, korelacijski koeficijent R^2 , SRMSE te pogreška χ^2 testa ukazuju da bifazni modeli bolje prikazuju, odnosno opisuju kinetiku nestanka DPPH· u obje skupine analiziranih uzoraka.

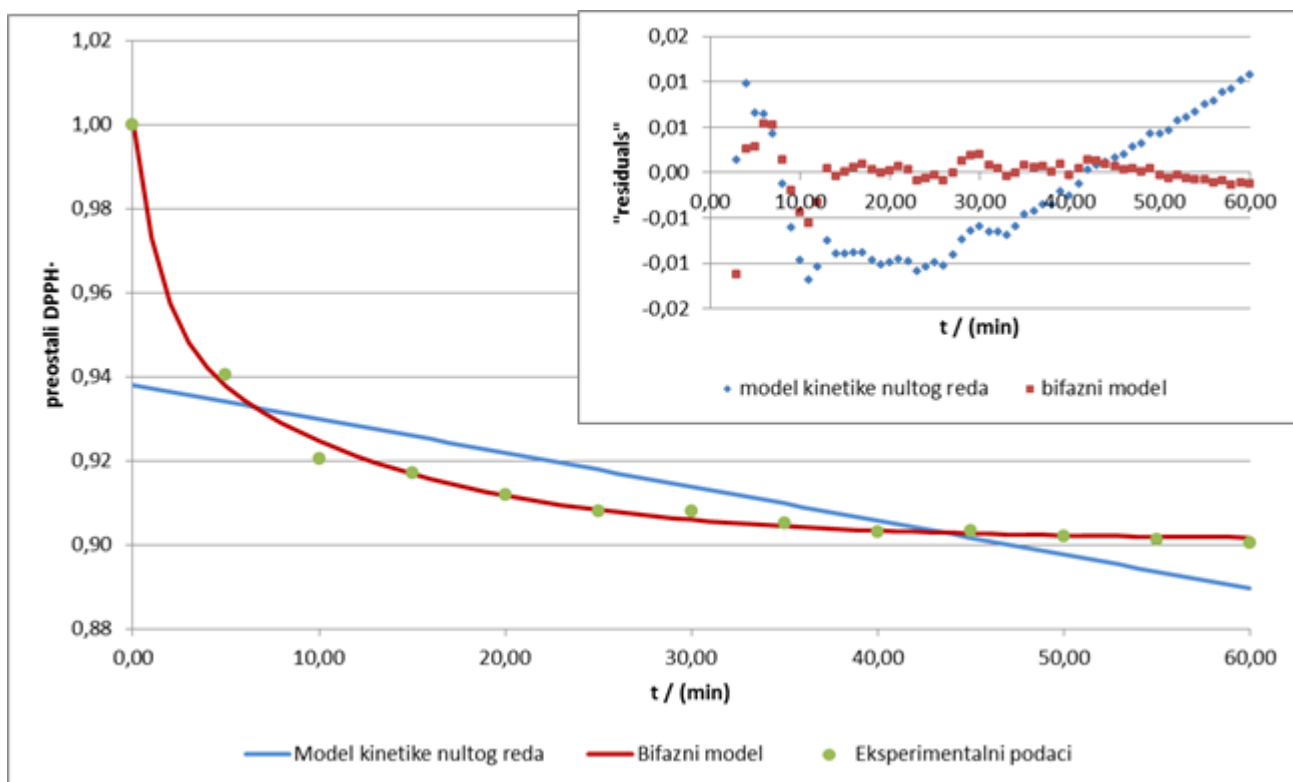
Korelacija je statistički postupak za izračunavanje povezanosti između dvije varijable. Vrijednost korelacije brojčano se iskazuje korelacijskim koeficijentom koji prikazuje u kojoj su mjeri promjene vrijednosti jedne varijable povezane s promjenama druge varijable. (14) Korelacijski koeficijent visok je kod svih modela no primjeti se razlika između monofaznih modela u odnosu na bifazne modele. Monofazni modeli imaju nešto niže vrijednosti korelacijskih koeficijenata R^2 od bifaznih modela.

Pogreška χ^2 testa je parametar koji opisuje slaganje između teoretskih i eksperimentalnih vrijednosti. Ako je ta vrijednost manja od 5 % smatra se da je model prihvatljiv. Prema statističkom testiranju vrijednosti pogreške χ^2 testa iznose ispod 5 % što zapravo dovodi do zaključka da su svi modeli prihvatljivi, no ipak postoji određena razlika. Pogreška od 0,17 % (CS2) do 1,22 % (CF5) kod bifaznih modela prikazuje da bolje opisuju kinetiku nestanka DPPH· dok su monofazni modeli nešto lošiji za prikaz kinetike DPPH· gdje pogreška χ^2 testa iznosi od 0,37 % (CF3) do 4,65 % (CS5). Od monofaznih modela najveće odstupanje je pokazao Model kinetike nultog reda dok najbolji su bili bifazni modeli (Bifazni model prvog reda i Gustafson – Holden model) podjednako ovisno o skupini uzorka. U uzorcima skupine CF najbolju korelaciju s eksperimentalnim vrijednostima ima Bifazni model kinetike prvog reda osim za uzorak CF7, dok za skupinu uzorka CS dominirao je model Gustafson-Holden osim za CS5, CS6 i CS7.

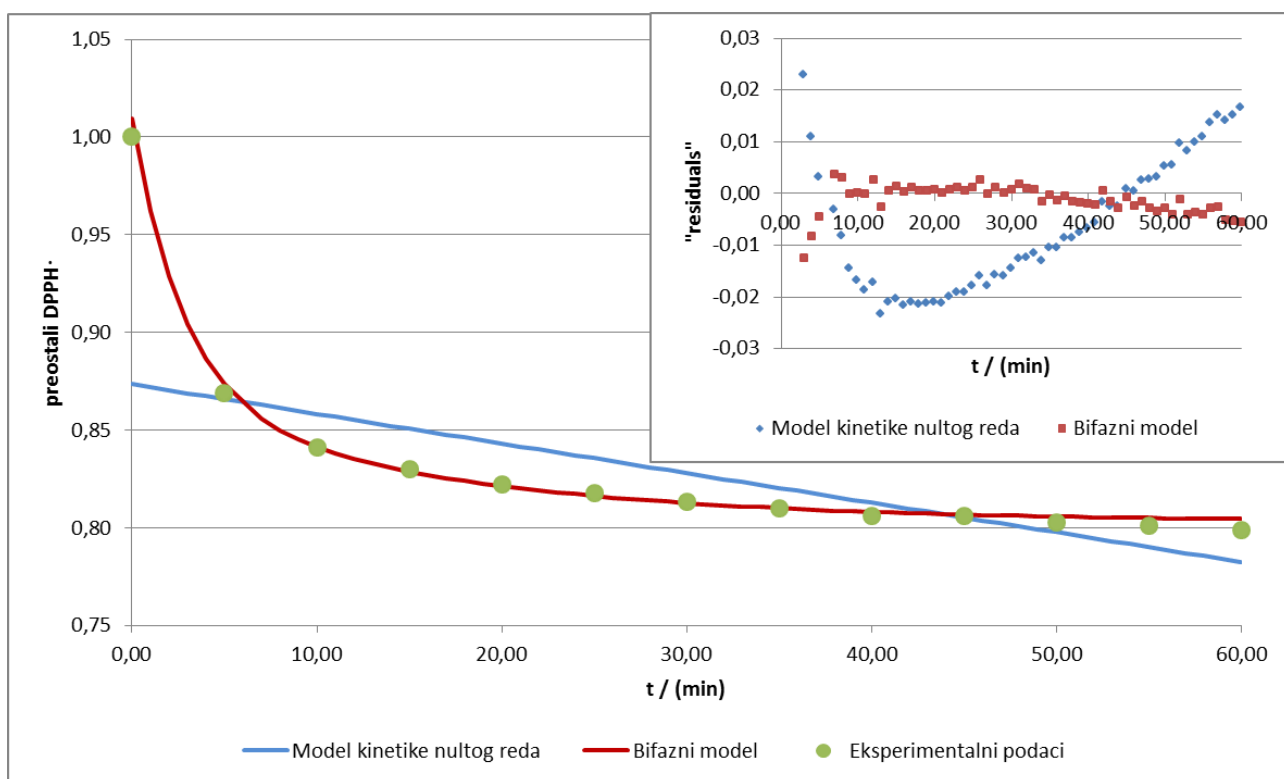
Matematičkim testiranjem dobivene su i vrijednosti koeficijenata reakcije kinetike. Konstanta (koeficijent) brzine neke reakcije je konstanta proporcionalnosti iz utvrđenog zakona za brzinu te reakcije (poglavlje 4.2.), odnosno konstanta brzine neke reakcije je jednaka brzini te

reakcije pri jediničnim koncentracijama svih sudionika reakcije. Prema tome konstante brzine neke reakcije opisuju reakciju, u ovom slučaju za bifazni model prvog reda, na način da konstanta k_1 opisuje brzinu reakcije u prvoj fazi (brzoj) reakcije dok konstanta k_2 brzinu kemijske reakcije u drugoj, sporijoj fazi. Za primjer, u uzorcima CS vidljivo je kako se brzina reakcije mijenja dodavanjem α -tokoferola s drugim izomerima. U uzorku CS1 u kojem je dodan α -tokoferol k_1 iznosi 1,5941 dok k_2 0,0621. Dodatkom γ -tokoferola zajedno s α -tokoferolom u uzorku CS4 dobiven je antagonistički učinak (gubitak signala 40,41 %) prema čemu su vrijednosti konstanti nešto drugačije, k_1 iznosi 1,5025 i k_2 0,0564. U uzorku CS7 u koji su dodani α -, γ - i δ -tokoferol dobiven je također antagonistički učinak (gubitak signala 38,12 %) uz konstante k_1 0,9289 i k_2 0,0758. Jedini uzorak koji je pokazao sinergistički učinak je CS6 (dodatak γ - i δ -tokoferola) gdje je i vidljivo povećanje konstante brzine reakcije, k_1 iznosi 2,2862 i k_2 iznosi 0,1084 što ukazuje na iznimnu brzu reakciju antioksidansa s radikalom DPPH u prvom dijelu reakcije.

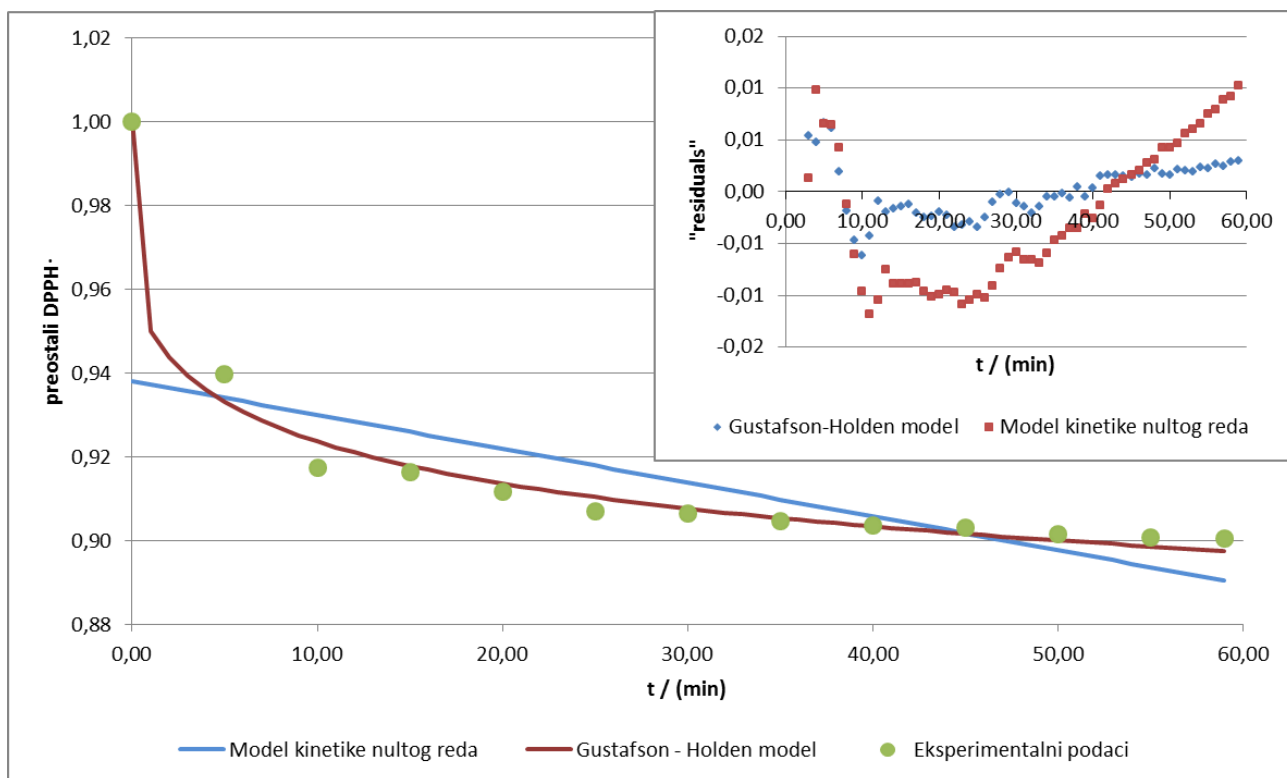
Za bolji prikaz kinetičkih modela koji najbolje i najlošije prikazuju reakciju tokoferola iz uzoraka skupine CF i CS s DPPH radikalom u sljedećim grafovima prikazani su odnosi eksperimentalnih vrijednosti i dobivenih teorijskih vrijednosti određenih matematičkih modela. Manji grafovi prikazuju odstupanje eksperimentalnih vrijednosti i vrijednosti određenog matematičkog modela prema statističkom pokazatelju SRMSE. Odstupanja su manja što su vrijednosti bliže nuli. Prikazano je šest grafova. Iz skupine CF prikazani su grafovi za uzorke CF1 (dodan je α -tokoferol, slika 12), CF5 (dodani su α - i δ -tokoferol, slika 13) te CF7 (dodani su α -, γ - i δ -tokoferol, slika 14). Iz skupine CS prikazani su grafovi za uzorke CS1 (dodan α -tokoferol, slika 15), CS5 (dodani su α - i δ -tokoferol, slika 16) te CS6 (dodan γ - i δ -tokoferol).



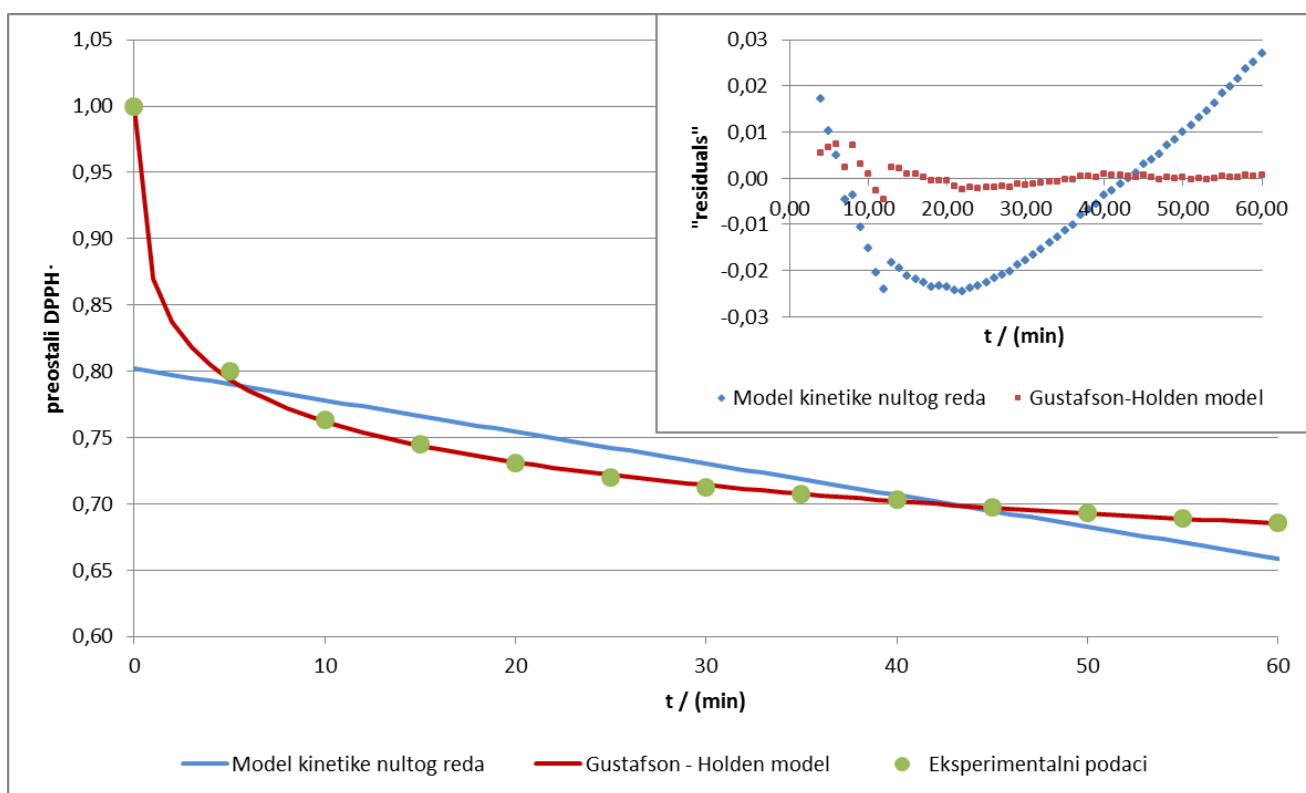
Slika 12 Grafički prikaz eksperimentalnih vrijednosti i vrijednosti modela koji najbolje i najlošije opisuju kinetiku nestanka DPPH u uzorku CF1 (ekstrakt vitamina E iz ulja Cabernet franc sa dodanim standardom α -tokoferola). Manji grafikon prikazuje odstupanja vrijednosti testiranih modela od eksperimentalnih.



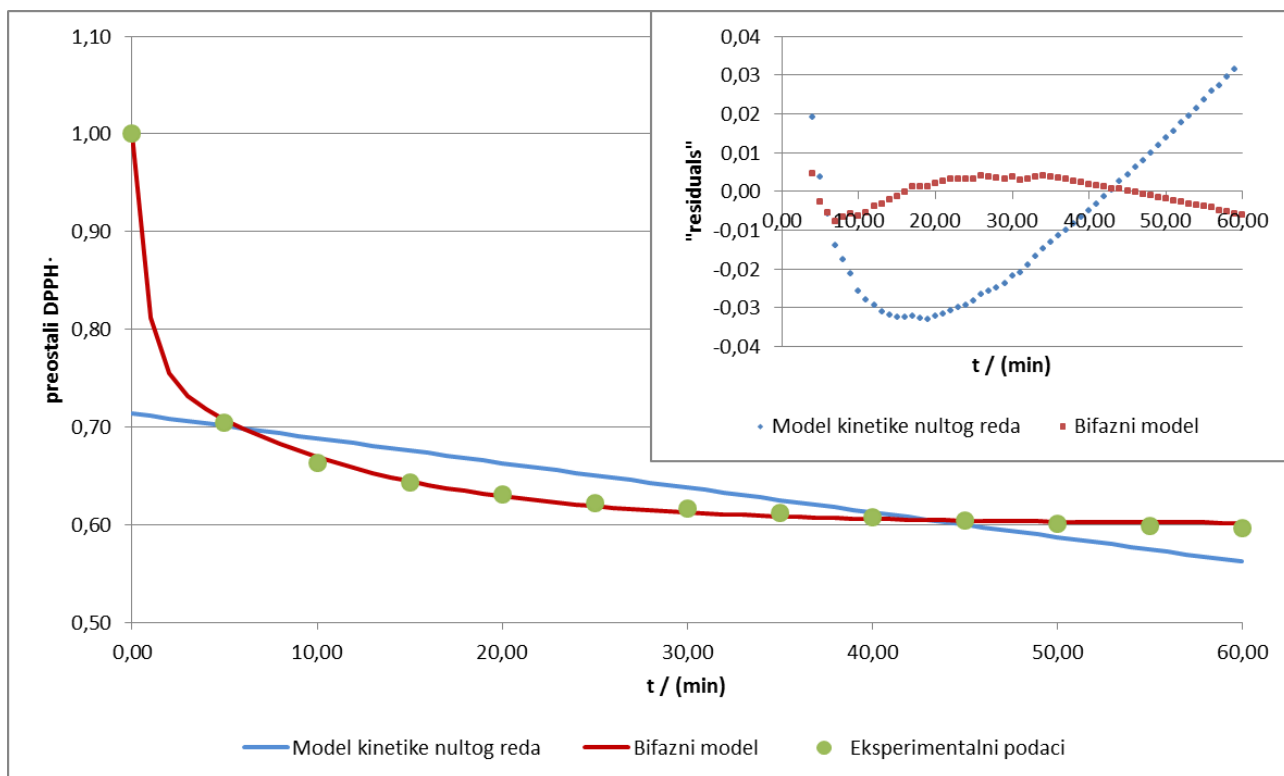
Slika 13 Grafički prikaz eksperimentalnih vrijednosti i vrijednosti modela koji najbolje i najlošije opisuju kinetiku nestanka DPPH u uzorku CF5 (ekstrakt vitamina E iz ulja Cabernet franc sa dodanim standardima α - i δ -tokoferola). Manji grafikon prikazuje odstupanja vrijednosti testiranih modela od eksperimentalnih.



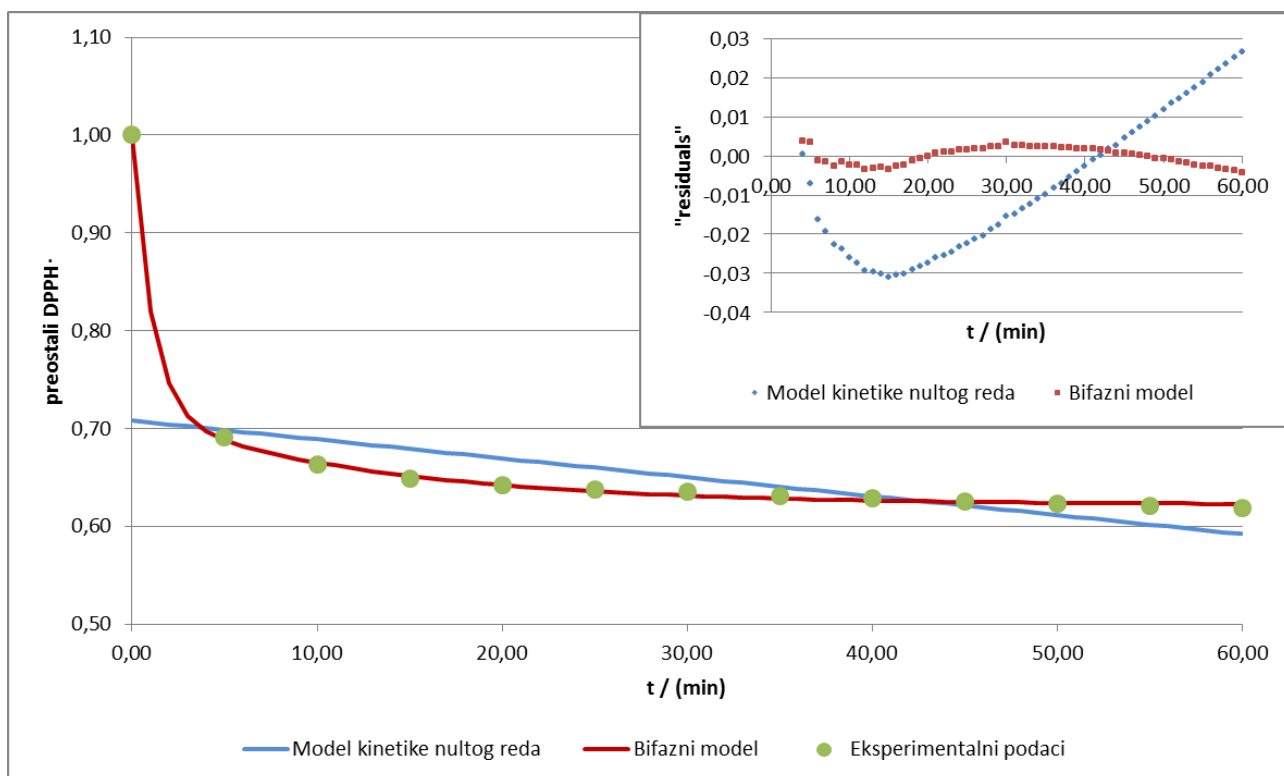
Slika 14 Grafički prikaz eksperimentalnih vrijednosti i vrijednosti modela koji najbolje i najlošije opisuju kinetiku nestanka DPPH u uzorku CF7 (ekstrakt vitamina E iz ulja Cabernet franc sa dodanim standardima α -, γ - i δ -tokoferola). Manji grafikon prikazuje odstupanja vrijednosti testiranih modela od eksperimentalnih.



Slika 15 Grafički prikaz eksperimentalnih vrijednosti i vrijednosti modela koji najbolje i najlošije opisuju kinetiku nestanka DPPH u uzorku CS1 (ekstrakt vitamina E iz ulja Cabernet sauvignon sa dodanim standardom α -tokoferola). Manji grafikon prikazuje odstupanja vrijednosti testiranih modela od eksperimentalnih.



Slika 16 Grafički prikaz eksperimentalnih vrijednosti i vrijednosti modela koji najbolje i najlošije opisuju kinetiku nestanka DPPH u uzorku CS5 (ekstrakt vitamina E iz ulja Cabernet sauvignon sa dodanim standardima α - i δ -tokoferola). Manji grafikon prikazuje odstupanja vrijednosti testiranih modela od eksperimentalnih.



Slika 17 Grafički prikaz eksperimentalnih vrijednosti i vrijednosti modela koji najbolje i najlošije opisuju kinetiku nestanka DPPH u uzorku CS7 (ekstrakt vitamina E iz ulja Cabernet sauvignon sa dodanim standardima α -, γ - i δ -tokoferola). Manji grafikon prikazuje odstupanja vrijednosti testiranih modela od eksperimentalnih.

8 RASPRAVA

Vino je alkoholno piće, jedno od najpopularnijih u svijetu, osobito u mediteranskoj kulturi. Uz vino se veže duga povijest i tradicija, od samog uzgoja vinove loze do različitih tehnika proizvodnje samog vina kao konačnog proizvoda. Ovom piću, zbog raznolikog bogatog sastava kao što su vitamini, minerali, taninske tvari, polifenoli pripisuju se terapijska i antiseptička svojstva koja su poznata od davnih vremena. U proizvodnji vina, koštice grožđa smatrane su nusproduktom dok nisu prepoznate vrijedne karakteristike tog ostatka.

Od koštica grožđa sve više se u današnje vrijeme proizvodi ulje na različite načine. Da li to bilo hladnim prešanjem ili nekom vrstom ekstrakcije. Kao i samo vino, ulje koštica grožđa obiluje vitaminima, mineralima, značajnim količinama antioksidanasa te nezasićenim masnim kiselinama. U ovom istraživanju korištena su ulja koštica grožđa sorti Cabernet sauvignon (CS) i Cabernet franc (CF) s područja Slavonije, berba 2014., dobivena ekstrakcijom superkritičnim fluidom sa CO₂.

U istraživanju provedenom na istim uzorcima ulja koštica grožđa sorti CS i CF ispitivana je antioksidativna aktivnost. (15) Metodom nestanka DPPH radikala dobivene su znatne razlike u antioksidativnoj aktivnosti ulja ekstrahiranih iz te dvije sorte. Uzorak CF pokazao je veću antioksidativnu aktivnost, odnosno učinkovitost hvatanja slobodnih radikala DPPH. Kinetika nestanka DPPH radikala u reakciji s uzorcima ulja ekstrahiranih iz CS i CF pokazuje eksponencijalni i brži rast na početku reakcije, a zatim se reakcija usporava, uz to primjećuje se i znatna razlika između kinetike uzoraka ulja sorti CS i CF. Kinetika antioksidativnog djelovanja objašnjena je komponentama koje imaju sporu i brzu kinetiku.

Obzirom da je mnogim istraživanjima utvrđeno da vitamin E ima veliku antioksidativnu važnost u hvatanju slobodnih radikala, kao i u sprječavanju lipidne peroksidacije u *in vivo* uvjetima cilj je bio u ovom istraživanju utvrditi antioksidativnu aktivnost vitamina E

ekstrahiranog iz ulja koštica grožđa sorti CS i CF odnosno sinergističko-atagonistički utjecaj izomera vitamina E nakon dodatka standardnih otopina pojedinih izomera ili njihovih kombinacija. Kromatografskom HPLC analizom kvantificirani su tokoferoli iz smjese u uzorcima ekstrakta. Time je dobivena koncentracija pojedinih izomera u uzorcima (tablice 4, 5, 6). Iz skupine ekstrakta ulja CF najveću ukupnu koncentraciju izomera imao je uzorak CF7 koji je sadržavao dodanu kombinaciju standarda α -, γ - i δ -tokoferola i iznosila je 398,03 $\mu\text{g/g}$ ulja dok iz skupine CS najveću koncentraciju imao je uzorak CS2 koji je imao dodan samo izomer γ -tokoferol i iznosila je 509,37 $\mu\text{g/g}$ ulja.

In vitro analizama pokazalo se da individualni tokoferoli imaju različite antioksidativne aktivnosti. Neka istraživanja pokazuju kako je γ -tokoferol efektivniji od α -tokoferola u prevenciji od lipidne peroksidacije dok druga pak tvrde obrnuto. Generalni zaključak je da aktivnost ovisi zapravo o eksperimentalnim uvjetima. U *in vitro* uvjetima α -tokoferol s drugim prirodnim ili sintetskim fenolima ima jako skromnu antioksidativnu aktivnost. Razlike u izomerima tokoferola čine supstituirane metilne skupine na pozicijama 2-, 3-, 5- i 6-kromanolnog prstena tokoferola. Upravo ta razlika položaja metilnih skupina kao i sama njihova prisutnost na određenom položaju uvjetuje i antioksidativnu aktivnost različitih izomera tokoferola. (16) (17) (5)

Prema tome u pripremljenim uzorcima za analizu ispitivana je antioksidativna aktivnost DPPH metodom, odnosno pratio se gubitak signala tijekom 60 minuta. Pripremljene su dvije skupine uzoraka, skupina ekstrakta vitamina E iz ulja CF i skupina ekstrakta vitamina E iz ulja CS (tablica 2). U skupini CF u prva tri uzorka dodana je po jedna vrsta standarda izomera tokoferola. Tako je u CF1 dodan izomer α -tokoferol, u CF2 izomer γ -tokoferol a u CF3 izomer δ -tokoferol. Gubitak signala u 60 minuti za navedene uzorke iznosio je: 12,22 %, 30,25 % te 8,53 %. U uzorcima CF4, CF5, CF6 i CF7 dodavane su različite kombinacije izomera da bi se uočilo sinergističko ili antagonističko djelovanje izomera. Rezultati su

pokazali da izomeri u ekstraktu vitamina E iz ulja koštica grožđa sorte CF imaju antagonističko djelovanje i to: α - i γ -tokoferoli (CF4) su dali gubitak signala od 22,03 %, α - i δ -tokoferoli (CF5) 20,11 %, γ - i δ -tokoferoli (CF6) 14,31 % dok kombinacija svih triju tokoferola (CF7) dala je gubitak signala DPPH radikala 17,82 %.

Na isti način pripremljene su kombinacije za uzorke iz skupine CS. Rezultati su slični no cjelokupno je nešto veća antioksidativna aktivnost. Uzorci CS1, CS2 i CS3 sadržavali su po jednu vrstu standarda izomera, u CS1 je dodan α -tokoferol, u CS2 je dodan γ -tokoferol dok u CS3 je dodan δ -tokoferol. Gubitak signala DPPH radikala redom je iznosio: 31,42 %, 12,15 % i 15,58 %. Istraživanje je pokazalo da kombinacije uzoraka pokazuju antagonističko djelovanje i to za uzorak CF4, kombinacija α - i γ -tokoferola ima gubitak signala 32,08 %, za uzorak CF5, kombinacija α - i δ -tokoferola, gubitak signala DPPH iznosio je 40,41 % dok je za kombinaciju svih izomera u uzorku CS7 gubitak signala iznosio 38,12%. Jedan uzorak je pokazao sinergističko djelovanje izomera i to uzorak CS6, kombinacija γ - i δ -tokoferola gdje je gubitak signala DPPH iznosio 37,38 %.

Mehanizam inhibicije oksidacije staničnih membrana vitaminom E nije u potpunosti razjašnjen. Poznato je da α -tokoferol brže djeluje u homogenom okruženju od β -, γ - i δ -tokoferola. Kada se α -tokoferol i δ -tokoferol nađu zajedno u membrani stanice i spremaju se „napasti“ slobodni radikal prvo se potroši sav α -tokoferol dok δ -tokoferol je inaktivan. Tek kada sav α -tokoferol izreagira u reakciju ulazi δ -tokoferol. α -tokoferol je najreaktivniji od svih izomera tokoferola i on prvi djeluje u reakcijama inhibicije. Prosječna biološka aktivnost tokoferola u *in vivo* i u *in vitro* uvjetima je: α -tokoferol > β -tokoferol \approx γ -tokoferol > δ -tokoferol. (18)

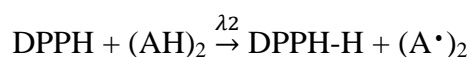
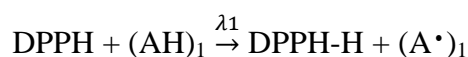
Osim samog gubitka signala DPPH radikala u vremenu pratila se i sama kinetika nestanka DPPH radikala što je prikazano na slikama od 12 do 17 za šest uzoraka. Na grafovima su

prikazani matematički modeli koji najbolje i najlošije opisuju eksperimentalne vrijednosti s dobivenim teorijskim vrijednostima određenih matematičkih modela. Prema statističkim pokazateljima i izgledom grafova utvrđeno je da bifazni modeli (Bifazni model kinetike prvog reda te Gustafson – Holden-ov model) najbolje opisuju kinetiku nestanka DPPH radikala što ukazuje na to da se reakcija odvija u dvije faze. Početni strmiji nagib kinetičke krivulje ukazuje na brzu reakciju radikala i brzih antioksidanasa koja se odvija u svega prvih nekoliko minuta. Nakon toga kada se potroše „brzi“ antioksidansi u reakciju stupaju oni „spori“ što se vidi prema naglom prekidu krivulje i vidljive puno monotonije linije. Burton (16) spominje da upravo taj nagli prekid krivulje označava visoko djelotvorni antioksidans, u tom slučaju je opisivao α -tokoferol. Prema tome može se zaključiti da izomeri tokoferola α -, γ - i δ -, koji su istraživani u ovom radu su visoko djelotvorni antioksidansi te je njihova reakcija iznimno brza u prvim minutama kemijske reakcije.

Prema podacima koji se mogu očitati s grafova na kojima su prikazane eksperimentalne vrijednosti vidljivo je da je brza reakcija, strmi pad u prosjeku u prvih 4 do 6 minuta. Prema autorima Sanchez – Moreno i suradnicima, koji su proučavali kinetičko ponašanje antioksidativnih komponenti i klasificirali brzine reakcija, brzine gubitka signala DPPH radikala dobivene ovim istraživanjem ukazuju na vrlo brze reakcije. Kinetičko ponašanje obzirom na brzinu gubitka signala DPPH radikala u vremenu (minute) klasificira se kao: brzo (< 5 minuta), srednje (od 5 do 30 minuta) i sporo (> 30 minuta) (19).

Espin i suradnici (20) mjerili su antioksidativnu aktivnost 57 različitih jestivih ulja iz različitih izvora i s različitim porijeklom (maslinovo ulje, sezamovo ulje, bademovo ulje, suncokretovo ulje, ...). Mjeren je nestanak DPPH radikala na 515 nm. Apsorbancija se povećava kako se boja otopine mijenja odnosno prelazi iz ljubičaste u žutu što predstavlja neutralizaciju radikala antioksidansom na način da antioksidans donira vodikov atom DPPH radikal. Prema tome, nestanak DPPH radikala je proporcionalan količini antioksidansa.

Dobiveni rezultati nestanka DPPH radikala pokazali su prisutnost dvije grupe antioksidansa, brzi i spori što je bilo vidljivo dobivenim bifaznim modelom jednadžbe. Reakcije antioksidansa mogu se prikazati i na način:



Gdje $(\text{AH})_1$ i $(\text{AH})_2$ predstavljaju brze i spore antioksidanse a λ_1 i λ_2 konstante brzine reakcije (što je vrijednost veća, antioksidans brže reagira).

U istraživanju gdje se promatrala antioksidativna aktivnost ulja bučinih sjemenki DPPH metodom dobiveni rezultati pokazali su da se reakcija kinetike također odvijala u dva stupnja.

U prvom bržem dijelu reakcije reagiraju γ - i δ -tokoferol dok u drugom monotonijem dijelu reakcije reagira α -tokoferol. α -tokoferol je pokazao veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na γ - i δ -tokoferol. (21)

9 ZAKLJUČAK

Ulje koštica grožđa ima raznolik sastav te ima izrazito antioksidativno djelovanje. Blagodat antioksidativnog djelovanja je iznimno važno u sprječavanju lipidne peroksidacije u staničnim membranama koja može dovesti do smrti stanica. Zaštita stanica od utjecaja slobodnih radikala iznimno je bitna u prevenciji nastanka kardiovaskularnih bolesti i autoimunih bolesti koje se povezuju s negativnim utjecajem slobodnih radikala na ljudske stanice.

Prema tome antioksidativno djelovanje ulja koštica grožđa posjeduje važne prednosti u očuvanju zdravlja. U ovom radu nastojalo se utvrditi koliko zapravo izomeri vitamina E imaju antioksidativni učinak te kakvo je njihovo međudjelovanje.

Analizom i obradom podataka dolazi se do zaključka da tokoferoli u uljima CF i CS imaju izrazito brzu antioksidativnu aktivnost što su zapravo pokazali bifazni matematički modeli, osobito bifazni model prvog reda. Matematičkim modelima je prikazana izrazito brza početna reakcija, brz nestanak signala DPPH radikala nakon čega slijedi sporija faza nestanka DPPH radikala što ukazuje na prisutnost dvije grupe antioksidanasa, brzih i sporih.

Osim toga dodavanjem izomera vitamina E, odnosno dodavanjem kombinacija α -, γ - i δ -tokoferola u uzorke ekstrakta vitamina E iz ulja Caberbet sauvignon i Cabernet franc dobiveni rezultati pokazuju da različite kombinacije tokoferola u uzorcima u većini uzoraka, imaju antagonističko djelovanje osim u u uzorku CS6 (dodani γ - i δ -tokoferol) gdje je vidljivo sinergističko djelovanje tokoferola.

Uspoređujući rezultate s drugim istraživanjima nameću se nova pitanja za daljnja i detaljnija istraživanja. Vidljivo je da osim tokoferola u uljima neke druge komponente imaju jači ili slabiji utjecaj na antioksidativnu aktivnost. Prema tome potrebno je detaljnije istražiti sve prisutne komponente u uljima koje imaju antioksidativnu aktivnost i dublje ispitati mehanizme reakcija.

Literatura

1. Grožđe. *Coolinarika*. [Online] [Cited: svibanj 31, 2016.]
<http://www.coolinarika.com/namirnica/grozdje/>.
2. **Wikipedija**. Vitamini. *Wikipedija*. [Online] [Cited: svibanj 31, 2016.]
<https://hr.wikipedia.org/wiki/Vitamini>.
3. **M. Medić-Šarić, I. Buhač, V. Bradamante**. *Vitamini i minerali istine i predrasude*.
Zagreb : F.Hoffmann - La Roche, 2000.
4. *Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice*. **Leo Štefan, Tina Tepšić, Tina Zavidić, Marta Urukalo, Dalibor Tota, Robert Domitrović**. Rijeka : Medicina 2007, 2007, Vol. 43.
5. *Vitamin E: Antioxidant activity, biokinetics and bioavailability*. **Graham W. Burton, Maret G. Traber**. Brown University : Annu. Rev. Nutr., 1990, Vols. 10: 357-382.
6. **Sassan Pazirandeh, David L Burns**. Up To Date- Data Base. [Online] [Cited: svibanj 27, 2016.] www.uptodate.com.
7. *The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity*. **Molyneux, Philip**. 26:211-219, s.l. : Songklanakarin J.Sci.Technol., 2004.
8. **Cvitaš, Tomislav**. *Fizikalna kemija*. Zagreb : s.n., 2007.
9. **Magdić, Damir**. *Uvod u matematičko modeliranje*. Osijek : Prehrambeno - tehnološki fakultet.
10. **J.J.T.I. Boesten, K.Aden, C. Beigel, S. Beulke, M. Dust**. *Guidance Document on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration*. 2006. version 2,0.
11. *Use of kinetics, Weibull and PLSR models to predict the retention of ascorbic acid, total phenols and antioxidant activity during storage of pasteurized pineapple juice*. **Hong Zheng, Hongfei Lu**. s.l. : Food Science and Technology, 2011, Vols. 44: 1273 - 1281.
12. *Kinetički modeli za ekstrakciju uljarica superkričnim CO₂ - pregledni rad*. **S. Jokić, B. Nagy, D. Velić, A. Bucić-Kojić, M. Bilić**. Osijek : Croat. J. Food Sci. Technol , 2011, Vols. 3: 39 - 54.

13. **Butković, Dina.** *Antioksidativna aktivnost vitamina E ekstrahiranog iz sjemenki grožđa Cabernet sauvignon i Cabernet franc (vitis vinifera L.).* Rijeka : Diplomski rad, 2016.
14. *Što treba znati kada izračunavamo koeficijent korelacije?* **Martina Udovičić, Ksenija Baždarić, Lidija Bilić Zulle, Mladen Petrovečki.** s.l. : Biochemia Medica, 2007, Vols. 17: 10 - 5.
15. **Ogrizović, R.** *Antioksidativno djelovanje ulja ekstrahiranih iz sjemenki Cabernet sauvignon i Cabernet franc (Vitis vinifera L.); Diplomski rad.* Rijeka : s.n., 2015.
16. *Autoxidation of Biological Molecules. 1. The Antioxidant Activity of Vitamin E and related Chain - Breaking phenolic Antioxidants in Vitro.* **G. W. Burton, K.U. Ingold.** Ottawa, Canada : J. Am. Chem. Soc., 1981., Vols. 103: 6472 - 6477.
17. *In vitro antioxidant activity of tocopherols and tocotrienols and comparison of vitamin E concentration and lipophilic antioxidant capacity in human plasma.* **Lars Muller, Kathleen Theile and Volker Bohm.** Jena, Germany : Mol. Nutr. Food Res., 2010, Vols. 54:731-742.
18. *Molecular Pharmacology of Vitamin E: Structural aspects of Antioxidant activity.* **Saskia A.B.E. van Acker, Luc M.H. Koymans, Aalt Bast.** Amsterdam, The Netherlands : Free Radical Biology and Medicine, 1993, Vols. 15: 311-328.
19. *Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.* **Jimenez-Escrig, Sancez - Moreno, Saura-Calixto.** s.l. : J. Sci. Food Agric., 2000, Vols. 80: 1686 - 1690.
20. *Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oil and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical.* **Juan Carlos Espin, Cristina Soler-Rivas, Harry J. Wichers.** s.l. : J. Agric. Food Chem., 2000, Vols. 48, 648:656.
21. *Involvement of alfa, gama and delta tocopherol isomers from pumpkin (Cucurbita pepo L.) seed oil or oil mixtures in the biphasic DPPH disappearance kinetics.* **Dalibor Broznić, Gordana Čanadi Jurešić, Čedomila Milin.** Rijeka : Food Technol. Biotechnol., 2015, Vols. 54:200-210 (2016).
22. *Gamma-Tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention.* **Qing Jiang, Stephan Christen, Mark K Shigenaga, Bruce N Ames.** 714-722, USA : An J Clin Nutr, 2001, Vol. 74.

23. **Karlson, Peter.** *Biokemija.* Zagreb : Školska knjiga, 1993.

10 ŽIVOTOPIS

OSOBNJE INFORMACIJE

Ime i prezime: Lidija Šimić

Spol: Ž

Datum rođenja: 20.02.1991. (Pula)

Državljanstvo: Hrvatica

Adresa: Maršala Tita 107, 52223 Raša

RADNO ISKUSTVO

Svibanj, Lipanj 2016. – promotor za Vichy proizvode

Ljeto 2015. – sezonski rad u hotelu „Bellvue****“ i beach bar „Exotic“ ,Rabac (konobar)

Ljeto 2014. – sezonski rad u trgovini „Adria“, Poreč (trgovac)

Studeni 2013. do ožujak 2014. – caffè bar „Williams“, Rijeka (konobar)

Ljeto 2013. – sezonski rad u hotelu „Marina**“ i „Bellvue****“, Rabac (pomoćni konobar)

Siječanj 2010. do rujan 2010. –Dom za starije i nemoćne, Raša (njegovateljica)

Ljeto 2008. - sezonski rad u restoranu „Slavija“, Rabac (pomoćni šanker)

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

2014.- 2016. - Medicinski fakultet u Rijeci; smjer: Diplomski studij Sanitarno inženjerstvo

2010.- 2014. - Medicinski fakultet u Rijeci; smjer: Prediplomski studij Sanitarno inženjerstvo

2005.-2009. - Srednja medicinska škola, Pula

OSOBNJE VJEŠTINE

Komunikacijske vještine:

- Materinji jezik: Hrvatski jezik
- Ostali jezici: Engleski jezik, Njemački jezik

Računalne vještine:

- dobro vladanje alatima Microsoft Office™

Ostale vještine:

- Crtanje i slikanje (akril na platnu)
- Pjevanje u zboru „Schola Cantorum Rijeka“

Vozačka dozvola:

- B kategorija

Zvaršni rad:

- preddiplomski studij Sanitarno inženjerstvo završen je obranom rada pod naslovom :
„Utjecaj karaktera humusa na sorpcijsko ponašanje Dimetoata u tlima Istarskih maslinika“

Studentske aktivnosti:

- vođenje studentskog projekta „Čiste ručice“
- sudjelovanje u projektu „Znanost, inovacije, tržište“ pri znanstvenom parku StepRi
- član Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta za 2015. i 2016. godinu
- zamjenica predstavnika studenata Sanitarnog inženjerstva u Studentskom zboru Medicinskog fakulteta u Rijeci za 2015. i 2016. godinu
- demonstratorica na Zavodu za kemiju i biokemiju na kolegijima:
Opća kemija
Anorganska kemija
Analitička kemija I i II
Instrumentalne metode
Fizikalna kemija