

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA PEČARIČ STRNAD

**PRIMERJAVA RAZLIČNIH METOD ZA *IN VITRO* VREDNOTENJE
ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI AMFIFILNIH ANTIOKSIDANTOV**

**COMPARISON OF DIFFERENT METHODS FOR *IN VITRO* EVALUATION OF
ANTIOXIDANT ACTIVITY OF AMPHIPHILIC ANTIOXIDANTS**

UNIVERSITY STUDY PROGRAMME COSMETOLOGY

Ljubljana, 2017

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Aleša Obreze, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Mirjam Gosenca Matjaž, mag. farm. Celotno laboratorijsko delo je bilo opravljeno na Katedri za farmacevtsko tehnologijo.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Alešu Obrezi, mag. farm. in somentorici doc. dr. Mirjam Gosenca Matjaž za razpoložljivost, usmerjanje, strokovne nasvete in prijaznost med izdelavo diplomske naloge. Prav tako se zahvaljujem vsem zaposlenim na Katedri za farmacevtsko tehnologijo. Zahvaljujem se tudi očetu in mami za nasvete pri izdelavi naloge in za vso podporo izkazano tekom celotnega študija. Enaka zahvala gre tudi sestri, bratu in fantu.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Aleša Obreze, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Mirjam Gosenca Matjaž, mag. farm.

Tina Pečarič Strnad

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Damjan Janeš, mag. farm

Članica komisije: doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

1	POVZETEK.....	6
2	ABSTRACT	7
3	SEZNAM OKRAJŠAV	8
4	UVOD	10
4.1	RADIKALI.....	10
4.1.1	Reaktivne kisikove zvrsti	11
4.2	ANTIOKSIDANTI.....	12
4.3	OKSIDATIVNI STRES	14
4.4	LIPIDNA PEROKSIDACIJA	14
4.5	METODE UGOTAVLJANJA ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI	15
4.5.1	Difenilpikrilhidrazilna (DPPH) metoda	16
4.5.2	Metoda z β -karotenom	17
4.6	OKSIMI IN AMIDOKSIMI.....	18
5	NAMEN DELA.....	20
6	MATERIALI IN METODE	21
6.1	MATERIALI.....	21
6.1.1	Antioksidanti	21
6.1.2	Aparature in oprema.....	26
6.1.3	Reagenti.....	26
6.1.4	Programska oprema.....	26
6.2	METODE	27
6.2.1	Ugotavljanje antioksidativne učinkovitosti z DPPH metodo	27
6.2.1.1	<i>Izdelava umeritvene premice.....</i>	<i>27</i>
6.2.1.2	<i>Priprava osnovne raztopine DPPH.....</i>	<i>27</i>
6.2.1.3	<i>Priprava raztopin testiranih antioksidantov</i>	<i>27</i>
6.2.1.4	<i>Izvedba metode</i>	<i>28</i>
6.2.2	Ugotavljanje antioksidativne učinkovitosti z metodo z β -karotenom	29

6.2.2.1	Priprava 0,2-odstotne raztopine β -karotena v kloroformu	29
6.2.2.2	Priprava 0,4-odstotne (m/V) raztopine Tween-a 20.....	29
6.2.2.3	Priprava raztopin testiranih antioksidantov	29
6.2.2.4	Priprava reakcijske zmesi	30
6.2.2.5	Izvedba metode	30
7	REZULTATI	31
7.1	UGOTAVLJANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI Z DPPH METODO	31
7.1.1	Amidoksimi	32
7.1.2	Oksimi	33
7.1.3	Derivati galaktoze.....	34
7.1.4	Derivati glukoze	35
7.2	UGOTAVLJANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI Z METODO Z β -KAROTENOM.....	36
8	RAZPRAVA.....	39
8.1	UGOTAVLJANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI Z DPPH METODO	39
8.2	UGOTAVLJANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI Z METODO Z β -KAROTENOM.....	41
9	SKLEP	46
10	LITERATURA	47

KAZALO SLIK

Slika 1:	Fentonova reakcija.....	12
Slika 2:	Lipidna peroksidacija.....	15
Slika 3:	Umeritvena premica za določanje koncentracije DPPH.....	32
Slika 4:	Prikaz količine DPPH (%), ki ni reagirala, pri amidoksimih po 30 min pri koncentracijah 5 mM in 10 mM. Rezultati so podani kot povprečje $\pm$ SD (n=2).	32

Slika 5:	Prikaz količine DPPH (%), ki ni reagirala, pri oksimih po 30 min, pri koncentracijah 5 mM in 10 mM. Rezultati so podani kot povprečje $\pm$ SD (n=2).	33
Slika 6:	Prikaz količine DPPH (%), ki ni reagirala, pri derivatih galaktoze po 30 min, pri koncentraciji 0,1 mM. Rezultati so podani kot povprečje $\pm$ SD (n=2).	34
Slika 7:	Prikaz količine DPPH (%), ki ni reagirala, pri derivatih glukoze po 30 min, pri koncentracijah 0,5 mM in 5 mM. Rezultati so podani kot povprečje $\pm$ SD (n=2).	35
Slika 8:	Antioksidativne učinkovitosti (% ANT) po 120 min pri temperaturah 25°C in 37°C pri testiranih AO, kjer smo le-te lahko izračunali. Rezultati so prikazani kot povprečje $\pm$ SD, n=5.	38

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I:	Količina DPPH (%), ki ni reagirala, pri amidoksimih po 30 min, pri koncentracijah 5 mM in 10 mM, ($x \pm$ SD, n=2).	33
Preglednica II:	Količina DPPH (%), ki ni reagirala, pri oksimih po 30 min, pri koncentracijah 5 mM in 10 mM, ($x \pm$ SD, n=2).	34
Preglednica III:	Količina DPPH (%), ki ni reagirala, pri derivatih galaktoze po 30 min, pri koncentraciji 0,1 mM, ($x \pm$ SD, n=2).	35
Preglednica IV:	Količina DPPH (%), ki ni reagirala, pri derivatih glukoze po 30 min, pri koncentracijah 0,5 mM in 5 mM, ($x \pm$ SD, n=2).	36
Preglednica V:	Prikaz razmerij med reakcijsko zmesjo in raztopino AO ter koncentracije nastalih raztopin.	37
Preglednica VI:	Antioksidativne učinkovitosti (% ANT) po 120 min pri 25°C. Prikazani so rezultati ($x \pm$ SD, n=5) pri testiranih AO, kjer smo le-te lahko izračunali.	38
Preglednica VII:	Antioksidativne učinkovitosti (% ANT) po 120 min pri 37°C. Prikazani so rezultati kot povprečje $\pm$ SD (n=5) pri testiranih AO, kjer smo le-te lahko izračunali.	38
Preglednica VIII:	Primerjava količine DPPH (%), ki ni reagirala, po 30 min, pri koncentracijah 5 mM in 10 mM iz leta 2009 in 2017.	41
Preglednica IX:	Prikaz nihanja rezultatov absorbanc.	44

1 POVZETEK

Med reaktivne kisikove zvrsti (ROS) sodijo kisikovi radikali in tudi neradikali, ki se z lahkoto pretvorijo v radikale. Radikal je vsaka zvrst, ki ima v svoji strukturi vsaj en nesparjen elektron. Njihova glavna značilnost je, da so večinoma reaktivni in v okolici iščejo elektron, ki jim primanjkuje. Antioksidant je vsaka molekula, ki ROS odstrani, prepreči ali upočasni njihov nastanek ter zmanjša posledice oksidativnih poškodb tarčnih molekul. V telesu imamo antioksidante, ki jih lahko delimo na encimske in neencimske. Encimski so telesu lastni, neencimske pa v organizem večinoma vnesemo s hrano.

Oksimi in amidoksimi so amfifilni antioksidanti. Oksimi se v farmaciji pogosto uporabljajo za ponovno aktivacijo z organofosfati ireverzibilno zavrtih acetilholinesteraz. Prav tako preprečijo oksidacijo LDL (lipoproteinov majhne gostote). Posledica tega je preprečitev nastanka oziroma razvoja ateroskleroze. Antioksidativno delovanje se kaže s tem, da reagirajo z raznimi radikali in kelirajo kovinske ione. Amidoksimska funkcionalna skupina je redka v zdravilnih učinkovinah, zasledimo jo na primer v tripanocidih, antihipertenzivih,... Antioksidativno delovanje oksimov in amidoksimov temelji na neposredni reakciji z radikali, poleg tega lahko kelirajo kovinske ione.

V okviru raziskovalnega dela smo izbrali 13 predhodno sintetiziranih antioksidantov z oksimskimi in amidoksimskimi funkcionalnimi skupinami in jim ugotovili antioksidativno učinkovitost z dvema različnima metodama. Izbrali smo difenilpikrilhidrazilno (DPPH) metodo, ki deluje v bolj hidrofilnem okolju in metodo z β -karotenom, ki deluje v bolj lipofilnem okolju. Z DPPH metodo smo poleg antioksidativne učinkovitosti preverili tudi funkcionalno stabilnost nekaterih izbranih antioksidantov. To smo naredili tako, da smo antioksidativno učinkovitost spojin, ki smo jo ugotovili, primerjali z meritvami izpred več let. Z metodo z β -karotenom izbrani antioksidanti še niso bili testirani, zato je bil naš cilj optimizacija metode za testiranje te vrste antioksidantov. Na koncu smo rezultate, dobljene z obema metodama, primerjali in ovrednotili. Pri DPPH metodi smo antioksidativno učinkovitost potrdili za vse testirane antioksidante, medtem ko nam pri metodi z β -karotenom to ni uspelo. Prav tako nam ni uspelo optimizirati metode in bo treba še nekaj nadaljnjega dela za to. Potrdili pa smo funkcionalno stabilnost izbranih antioksidantov pri ustreznih razmerah shranjevanja.

2 ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) are constituted of oxygen radicals, as well as non-radicals which are easily converted to radicals. Radical is every species which contains at least one free electron. Their main characteristic is that they are mostly reactive and are looking for a lacking electron in their proximity. Antioxidant is every molecule which eliminates ROS, prevents or slows down the production of ROS and reduces the oxidative damage of target molecules. Antioxidants present in our body are either enzymatic and non-enzymatic. Enzymatic antioxidants originate in the human body, whereas non-enzymatic antioxidants mostly enter the human body through food.

Oximes and amidoximes are amphiphilic antioxidants. Oximes are frequently used in pharmaceutical industry for an activation of organophosphate-inhibited acetylcholinesterase. They also prevent the oxidation of LDL (low-density lipoproteins). The consequence is the prevention of arterosclerosis. Amidoxime functional group is present in some pharmaceuticals, for example trypanocides, antihypertensives, etc. Antioxidative properties of oximes and amidoximes are shown through direct reaction with radicals and chelation of metal ions.

In the scope of our research work we chose 13 previously synthesised antioxidants with oxime and amidoxime functional groups and investigated their antioxidant properties by using two different methods. We chose the diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) method, which functions in more hydrophilic environment and the β -carotene method, which functions in more lipophilic environment. With the DPPH method we have, besides the antioxidant properties, also investigated the functional stability of chosen antioxidants. We have done this by comparing the measured antioxidant properties with the ones obtained several years ago. With the β -carotene method these antioxidants have not yet been tested and the goal of this research work was the optimization of this method for testing this group of antioxidants. At the end we have compared and evaluated the results gained by both methods. With DPPH method we proved antioxidant activity for all tested antioxidants, while the β -carotene method was not successful. In that respect we have failed to optimize the β -carotene method and that will therefore require some further work. On the other hand, we have proven functional stability of chosen antioxidants showed when stored properly.

3 SEZNAM OKRAJŠAV

% ANT	– odstotek zaviranja razbarvanja β -karotena
% (m/V)	– masno volumski odstotek
A	– absorbanca
$A_{t=t}$	– absorbanca, izmerjena ob določenem času ($t=15/30/45$)
A_0	– absorbanca DPPH brez vzorca
AE	– protiradikalska učinkovitost
A_f	– absorbanca DPPH z vzorcem po 30 min
AO	– antioksidant
$A_{t=0}$	– absorbanca, izmerjena na začetku
BDE	– energija, nujna za razcep vezi z vodikovim atomom
c	– koncentracija
DNA	– deoksiribonukleinska kislina
DPPH	– 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
e^-	– elektron
EC ₅₀	– koncentracija antioksidanta, nujna da se začetka količina DPPH zmanjša za polovico
GSH	– glutation
GSSG	– glutation-disulfid
HAT	– prenos vodikovega atoma
IP	– ionizacijski potencial
LDL	– lipoproteini majhne gostote
LOOH	– lipidni peroksid
OAR 40	– 4-(3-(heksilamino)-2-hidroksipropoksi)- <i>N'</i> -hidroksibenimidamid
OAR 44	– 4-(3-(oktilamino)-2-hidroksipropoksi)- <i>N'</i> -hidroksibenzimidamid
OAR 46	– 4-(3-(dodecilamino)-2-hidroksipropoksi)- <i>N'</i> -hidroksibenzimidamid
OAR 47	– 4-(3-(tetradecilamino)-2-hidroksipropoksi)- <i>N'</i> -hidroksibenzimidamid

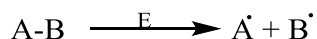
OAR 65	– 4-(3-(oktilamino)-2-hidroksipropoksi)benzaldehydoksim
OAR 67	– 4-(3-(dodecilamino)-2-hidroksipropoksi)benzaldehydoksim
OAR 69	– 4-(3-(decilamino)-2-hidroksipropoksi)benzaldehydoksim
OJB-BK	– 1(<i>E/Z</i>)2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2,3,4,5-tetrahidroksi-6-(oktiloksi)heksanaloksim
OJB-CK	– 1(<i>E/Z</i>)2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2,3,4,5-tetrahidroksi-6-(deciloksi)heksanaloksim
OJB-DK	– 1(<i>E/Z</i>)2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2,3,4,5-tetrahidroksi-6-(dodeciloksi)heksanaloksim
ONT 47	– <i>N</i> -((<i>E/Z</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> , <i>E/Z</i>)-3,4,5,-trihidroksi-1,6-bis(hidroksiamino)heksan-2-il)-heksandekanamid
ONT 49	– <i>N</i> -((2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> , <i>E/Z</i>)-3,4,5,6-tetrahidroksi-1-(hidroksiimino)heksan-2-il)-tetradekanamid
ONT 50	– <i>N</i> -((2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> , <i>E/Z</i>)-3,4,5,6-tetrahidroksi-1-(hidroksilimino)heksan-2-il)-heksadekanamid
ROS	– reaktivne kisikove zvrsti
SD	– standardni odklon
SET	– enoelektronski prenos
SOD	– superoksid-dismutaza
t	– čas
Tween 20	– polisorbat 20

4 UVOD

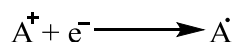
4.1 RADIKALI

Radikal je vsaka zvrst, ki ima v svoji strukturi enega ali več nesparjenih elektronov (1). Njihova glavna značilnost je, da so večinoma reaktivni in v okolici iščejo elektron, ki jim primanjkuje. Nastajajo lahko po več mehanizmih (2):

- Homolizna cepitev kovalentne vezi:



- Redoks reakcija:

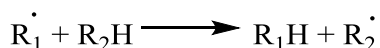


- Obsevanje:

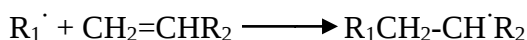


Ko imamo v celicah radikale, ti lahko takoj reagirajo naprej in praviloma za potek reakcij ne potrebujejo encimov. Take reakcije imenujemo radikalske reakcije in so naključne ter spontane. Zanje je značilen nastanek več različnih produktov. V celicah povzročajo oksidativne poškodbe bioloških molekul, saj lahko teoretično reagirajo s prvo organsko molekulo, ki jo srečajo. To velja zlasti za kratkožive, izredno reaktivne radikale, kamor uvrščamo hidroksilni radikal $OH^{\bullet}$ (2). Z molekulami lahko reagirajo na več načinov. Spojini lahko radikal odvzame vodikov atom, pri čemer se tvori nov radikal. Prav tako je produkt nov radikal, če se radikal adira na dvojno vez spojine. Neradikalski produkt pa dobimo, če med seboj reagirata dva radikala:

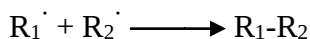
- Odvzem vodikovega atoma:



- Adicija na dvojno vez:



- Reakcija dveh radikalov med seboj:



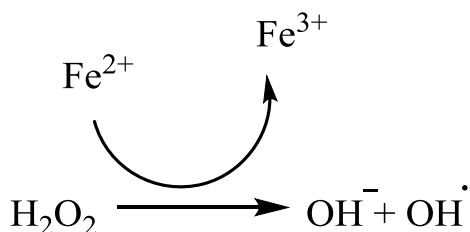
Niso pa radikali vedno škodljivi. V dovolj majhnih količinah so nekateri koristni, saj sodelujejo v celičnem signaliziranju, lahko sodelujejo pri lovljenju drugih, bolj reaktivnih radikalov ali pa sodelujejo z makrofagi, ki jih uporabijo za uničevanje patogenov (imajo citotoksično delovanje) (2).

4.1.1 Reaktivne kisikove zvrsti

Izraz reaktivne kisikove zvrsti (ROS) zajema kisikove radikale (superoksidni, peroksilni, hidroperoksilni, hidroksilni in alkoksilni radikal) in neradikale (vodikov peroksid, hipoklorna kislina, ozon, singletni kisik in peroksinitrit), ki se lahko pretvorijo v radikale. ROS nastajajo v metaboličnih reakcijah, vpletene so v encimske reakcije, izražanje genov, mitohondrijski prenos elektronov, prenos signalov,... Okolje v celici preprečuje potencialne poškodbe, ki bi nastale zaradi prevelike koncentracije radikalov. Vzdržujejo ga antioksidativni encimi, kot so superoksid-dismutaza (SOD), katalaza, glutation-peroksidaza in neencimski AO; glutation, askorbinska kislina, α -tokoferol. Če se ravnovesje med AO in oksidirajočimi zvrstmi v celici spremeni, to lahko vodi v oksidativni stres in poškodbe celice (1).

Kisik (O_2) ima v svoji strukturi dva nesparjena elektrona, zato je biradikal. Za zapolnitev orbital potrebuje dva elektrona z nasprotnima spinoma. Da se orbitale kisika popolnoma zapolnijo, se mora spin enega elektrona obrniti, kar pa zahteva zelo veliko energije. Zato je lažji in pogostejši pojav, da kisik sprejme en elektron in se pretvori v superoksid ($O_2^{\cdot-}$) (2). V živih organizmih se pri aerobnih razmerah več kot 90 % kisika takoj reducira do vode. Ta proces se pri evkariontih dogaja na notranji strani membran mitohondrija. Manj kot 10 % vsega kisika se reducira do superoksida ($O_2^{\cdot-}$). Temu navadno sledi pretvorba superoksida do vodikovega peroksida (H_2O_2), ki ni radikal, je pa bolj reaktiven od kisika (2). Celicam je nevaren, ker iz njega nastajajo radikali in ker lahko prehaja membrane ter oksidira tiolne skupine beljakovin. Čeprav ima vodikov peroksid omejeno reaktivnost, lahko sodeluje v Fentonovi reakciji (1). Le-ta je pomemben način tvorbe hidroksilnega radikala ($OH^{\cdot}$). Gre za reakcijo pretvorbe vodikovega peroksida, ki jo katalizirajo kovinski, najpogosteje železovi (II) ioni. Fe^{2+} ioni vodikovemu peroksidu oddajo en elektron ter se oksidirajo do

Fe^{3+} . Vodikov peroksid elektron sprejme in razpade na hidroksilni radikal in hidroksidni anion (2). Potek reakcije lahko vidimo na sliki 1:



Slika 1: Fentonova reakcija.

Hidroksidni anion se nato protonira in pretvori v vodo (2). Hidroksilni radikal pa v telesu ob povečani koncentraciji zaradi reaktivnosti povzroča ogromno škodo (1). V celici vsako sekundo nastane okoli 50 hidroksilnih radikalov. Le-ti se nato pretvorijo v manj reaktivne produkte ali pa reagirajo z molekulami v okolici (4). Reagirajo lahko skoraj s katerokoli molekulo, tudi z molekulami DNA, z membranskimi lipidi in ogljikovimi hidrati (1). Sodelujejo v patogenezi nevrodegenerativnih bolezni, srčnožilnih in rakavih obolenj (4). Vsem molekulam, s katerimi reagirajo, odvzamejo en elektron (1).

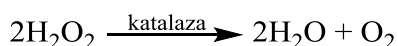
Superoxid se lahko protonira do hidroperoksilnega radikala ($\text{O}_2\text{H}^\cdot$). Ta igra pomembno vlogo pri peroksidaciji lipidov. Je močnejši oksidant od predhodnika, zato lahko začne verižno reakcijo oksidacije polinenasičenih fosfolipidov, kar privede do poškodb bioloških membran (4). ROS lahko nastajajo tudi v endoplazemskem retikulumu in membranah jedra (3).

Med reaktivne zvrsti poleg ROS uvrščamo tudi reaktivne dušikove zvrsti (dušikov(II) oksid, dušikov(IV) oksid, peroksinitrit,...) in reaktivne žveplove zvrsti (sulfhidrilni, sulfinilni radikal, vodikov sulfid,...) (2).

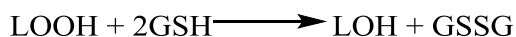
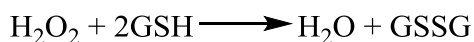
4.2 ANTIOKSIDANTI

Nadzor ROS je zagotovljen z njihovim nastajanjem in pretvorbo v nereaktivne ali manj reaktivne produkte. Za odstranjevanje ROS skrbijo zapleteni antioksidativni sistemi. Antioksidant (AO) je vsaka molekula, ki ROS odstrani, prepreči ali upočasni njihov nastanek ter odpravi oksidativne poškodbe tarčne molekule (3). Delimo jih lahko glede na več lastnosti. Poznamo lipofilne in hidrofilne AO. Hidrofilni so v vodnem okolju, lipofilni pa

zlasti v celičnih membranah (6). Nekateri AO so obnovljivi in se, ko zreagirajo z radikalom, oksidirajo, vendar jih nato drug AO obnovi, neobnovljivi radikali pa se v reakciji z radikalom porabijo in se ne regenerirajo (2). Delimo jih lahko tudi glede na izvor. Nekateri AO so endogeni, torej telesu lastni, druge pa moramo vnesti v organizem s hrano in so eksogeni. Lahko jih delimo tudi na encimske in neencimske. Encimski navadno vsebujejo kofaktorje (bakrove, cinkove, manganove, železove ione, glutation,...) (6). Encimi katalizirajo reakcije, v katerih se ROS pretvorijo v neškodljive produkte, največkrat v vodo in kisik. Mednje sodi superoksid-dismutaza, ki je v citosolu in mitohondrijih celice. Katalizira reakcijo, kjer dva superoksida sprejmeta vsak po en proton in se pretvorita v kisik in vodikov peroksid. Vodikov peroksid se nato s pomočjo katalaze pretvori v vodo in kisik (3).



Prav tako lahko vodikov peroksid reducirajo od glutatona odvisne peroksidaze. Poleg tega reducirajo tudi lipidne perokside.



Tak mehanizem skrbi za pretvorbo superoksida do kisika in vodikovega peroksida in odstranitev le-tega. Glavni cilj je, da se izognemo nastanku $\text{OH}^\bullet$, saj za njegovo odstranitev organizem ne pozna neposrednega encimskega mehanizma. Zaradi tega je najboljša zaščita pred $\text{OH}^\bullet$, da nastaja v čim manjši količini. To skupaj dokaj uspešno dosegajo vsi AO v verigi. Majhne koncentracije ROS temu sistemu lahko uidejo, iz njih nastane $\text{OH}^\bullet$, ki potem poškoduje celice (3).

Med neencimske AO sodijo askorbinska kislina, tokoferoli, karotenoidi, polifenoli, sečna kislina,... Večino jih v organizem vnesemo s hrano (3). To so reducenti, ki reducirajo ROS. Sečna kislina je endogeni AO, ki je v organizmu eden izmed najbolj zastopanih. Prisotna je v plazmi. Kot AO deluje v hidrofilnem okolju (6). V to skupino uvrščamo tudi endogeni tripeptid glutation (GSH), ki ga sintetizira večina živih bitij. Koncentracijo ROS nadzira

tako, da z njimi reagira ali pa deluje kot kofaktor za encime, ki odstranjujejo ROS. Nivo količine GSH uravnava organizem sproti, glede na svoje stanje in potrebe (3).

4.3 OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres je stanje, ko povečana koncentracija ROS prehodno ali kronično poškoduje celične komponente. Pojavi se, ko imamo v telesu preveč ROS in/ali premalo AO, ki bi nas varovali pred njimi (3). Primanjkljaj AO lahko nastane zaradi zunanjega vnosa reaktivnih zvrsti, npr. zaradi kajenja, ali pa je posledica notranjih sprememb, na primer staranje (1), izčrpajo se lahko zaloge neencimskih AO, lahko je posledica inaktivacije nujnih encimov, navadno pa je razlog kombinacija večih dejavnikov. Povečana koncentracija ROS lahko vpliva na številne, če ne na vse življenjske procese. Posledice so odvisne od vrste in mesta nastajanja ROS, učinkovitosti drugih AO, virov energije in od celic, s katerimi reagirajo (3).

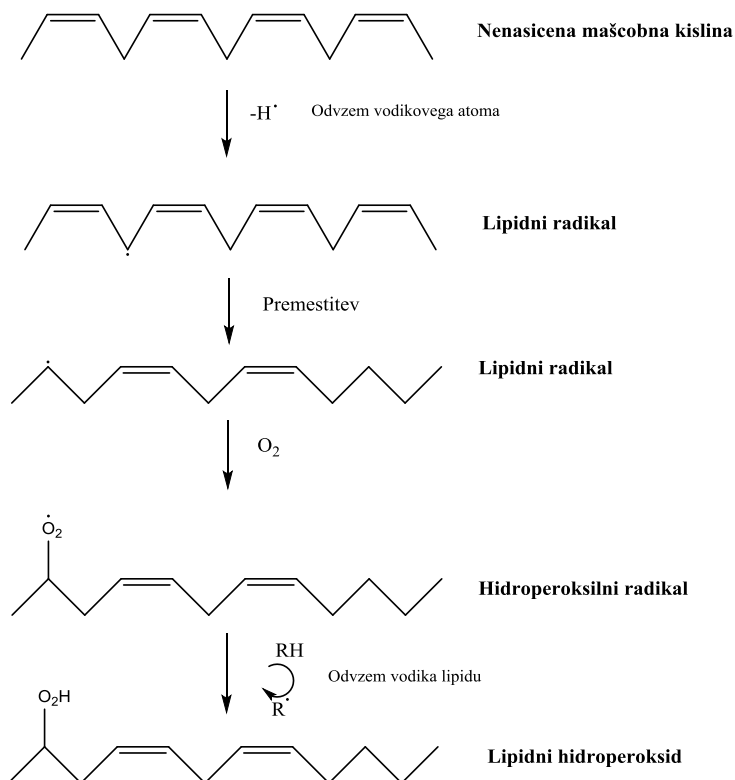
V oksidativnem stresu se lahko v organizmu vzpostavijo različna stanja. Najbolj idealno je, če se uspe stanju normalizirati, tako da se poveča koncentracija in aktivnost AO, ki nato odstranijo prisotne ROS. Če se to ne zgodi, lahko organizem preide v kronični oksidativni stres, ki se pogosto pojavlja pri različnih boleznih, kot so rak, diabetes, srčnožilne in nevrodegenerativne bolezni. V takih primerih je pomembno, da ugotovimo, ali je oksidativni stres vzrok za nastanek bolezni ali pa je obratno. Poleg teh dveh stanj se v telesu ob preveliki koncentraciji ROS lahko vzpostavi tudi stanje reorganizacije. To pomeni, da se stanje ne vrne v prvotno, ampak se z reorganizacijo homeostaze, tudi ROS, vzpostavi novo stanje (3). Zaželeno je, da organizem odstrani presežek ROS čim prej in čim bolj učinkovito, saj se na tak način najbolje izognemo dolgotrajnejšim celičnim poškodbam.

4.4 LIPIDNA PEROKSIDACIJA

Lipidna peroksidacija je proces verižnih reakcij, v katerih radikali reagirajo z lipidi, ki imajo dvojno vez med dvema C atomoma ($C=C$) v celicah in jih oksidirajo. Glavne tarče so tako polinenasičene maščobne kisline, prav tako pa tudi glikolipidi, fosfolipidi, ki jih vsebujejo, in nasičena molekula holesterola (4).

Proces lipidne peroksidacije je sestavljen iz treh glavnih stopenj; iniciacije, propagacije in terminacije (7). Radikal lipidu odvzame vodikov atom in nastane lipidni radikal. Nato spontano poteče premestitev dvojnih vezi, tako da so konjugirane, kar predstavlja energijsko bolj ugodno stanje. Lipidni radikal reagira s kisikom v okolici do hidroperoksilnega radikala.

Le-ta nato odvzame vodikov atom sosednjemu lipidu in nastane lipidni hidroperoksid. Ta reakcija je verižna in poteka toliko časa, dokler ne zmanjka lipidov ali kisika. Prekine se lahko tudi z AO, ki hidroperoksilnemu radikal donira svoj vodikov atom, nato pa reagira z drugim hidroperoksilnim radikalom in nastane neradikalni produkt. Potek lipidne peroksidacije je prikazan na sliki 2 (5):



Slika 2: Lipidna peroksidacija.

Glavna posledica lipidne peroksidacije, ki jo opazimo v vsakdanjem življenju, je žarkost olj in maščob (2).

4.5 METODE UGOTAVLJANJA ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI

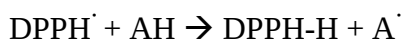
Za ugotavljanje antioksidativne učinkovitosti poznamo veliko različnih metod. Njihov glavni cilj je ovrednotiti učinkovitost določenega AO. Glede na mehanizem reakcije in način deaktivacije radikalov se metode delijo v dve glavni skupini; HAT (hydrogen atom transfer – prenos vodikovega atoma) in SET (single electron transfer – enoelektronski prenos). Končni rezultat obeh mehanizmov je enak, razlikujeta pa se v kinetiki. Oba mehanizma lahko potekata hkrati, od strukture in lastnosti AO ter vrste topila pa je odvisno, kateri

prevladuje. Glavna faktorja, ki določita mehanizem in učinkovitost AO, sta BDE (bond dissociation energy) – energija, ki je nujna za razcep vezi z H atomom, in IP (ionization potencial) – ionizacijski potencial. Reakcije s HAT mehanizmom merijo klasično sposobnost AO, da reagira z radikalom. Reakcije s SET mehanizmom pa merijo zmožnost AO, da odda en elektron. Z njim nato reducirajo katerokoli spojino, v našem primeru radikale (8, 10).

4.5.1 Difenilpikrilhidrazilna (DPPH) metoda

Z difenilpikrilhidrazilno (DPPH) metodo ugotavljamo antioksidativno učinkovitost testiranih spojin in sicer sprektofotometrijsko. (10). Je standardna, preprosta in praktična kolorimetrijska metoda. Za merjenje večjih količin AO lahko uporabimo tudi mikrotitrne plošče. Prvi je metodo razvil Blois leta 1958, ko je dokazal sposobnost stabilnega DPPH radikala, da sprejme vodikov atom iz cisteina. Po nekaj desetletjih je ravno zaradi tega postala zanimiva za ugotavljanje antioksidativne učinkovitosti (11).

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) je eden redkih stabilnih organskih dušikovih radikalov in je komercialno dostopen (10). Nesparjen elektron ima delokaliziran po celotni molekuli, zaradi česar je obarvan vijolično. Učinkovitost testiranega AO spremljamo preko redukcije DPPH. Le-ta AO odvzema vodikove atome in se na ta način reducira. Potek redukcije lahko spremljamo vizualno, saj se barva DPPH iz vijolične barve spremeni v blede rumeno, ugotavljamo pa jo z merjenjem absorbance na spektrofotometru pri valovni dolžini absorpcijskega maksimuma DPPH, to je pri 516 nm (9).



Odstotek DPPH, ki ni reagiral, po končani meritvi izračunamo po spodnji enačbi:

$$\% \text{ DPPH} = A_f / A_0 \times 100$$

A_f – absorbanca DPPH z vzorcem po 30 min

A_0 – absorbanca DPPH brez vzorca

Odstotek DPPH, ki ni reagiral, je obratno sorazmeren z učinkovitostjo testiranega AO. Manj DPPH kot ostane, bolj je AO učinkovit. Poleg DPPH, ki ni reagiral, lahko ugotavljamo tudi koncentracijo AO, ki je nujna, da se začetna količina DPPH zmanjša na polovico in je definirana kot EC_{50} . Čas, v katerem se to zgodi, je definiran kot t_{EC50} . Sanchez-Moreno je s

sodelavci (1998) predstavil še dodaten parameter za prikaz antioksidativne učinkovitosti; protiradikalno učinkovitost (antiradical efficiency - AE). Parameter je načeloma bolj uporaben kot EC₅₀, ker upošteva še čas reakcije. Izračuna se po spodnji enačbi (10):

$$AE = 1/EC_{50} \times t_{EC50}$$

Glavna prednost DPPH metode je zagotovo, da so meritve antioksidativne učinkovitosti dokaj preproste, saj za izvedbo poleg substratov potrebujemo le spektrofotometer. Pozorni pa moramo biti, da AO, ki jih testiramo, ne absorbirajo pri podobnih valovnih dolžinah kot DPPH (516 nm). Takim AO, na primer karotenoidom, s to metodo ne moremo ugotavljati antioksidativne učinkovitosti (10).

4.5.2 Metoda z β -karotenom

Karotenoidi se razbarvajo zaradi avtooksidacije, ki je sprožena s svetlobno energijo, toploto ali pa zaradi različnih radikalov. Pri merjenju antioksidativne učinkovitosti s to metodo imamo v reakcijski zmesi prisotne β -karoten, kloroform, kot topilo, Tween 20, ki deluje kot emulgator, linolno kislino in vodo. Pri reakciji poteka avtooksidacija linolne kisline, pri čemer se tvorijo peroksilni radikali. Ti nato reagirajo z β -karotenom in ta se razbarva. Ob dodatku AO v reakcijsko zmes le-ta reagira s peroksilnimi radikali in zato ščiti β -karoten. Stopnja razbarvanja β -karotena je odvisna od antioksidativne učinkovitosti testiranega AO. Spremembo barve merimo spektrofotometrijsko pri 470 nm. Ker je metoda počasnejša, navadno za izvedbo uporabljamo mikrotitrne plošče s 96 odprtinami (12).

Iz dobljenih absorbanc lahko izračunamo stopnjo razbarvanja β -karotena po spodnji enačbi (13):

$$R = \ln (A_{t=0} / A_{t=t}) \times 1/t$$

$A_{t=0}$ – absorbanca, izmerjena na začetku

$A_{t=t}$ – absorbanca, izmerjena ob določenem času ($t=15/30/45\ldots$ min), navadno ob času zadnje meritve.

Iz teh podatkov lahko nato po spodnji enačbi izračunamo odstotek zaviranja razbarvanja β -karotena in s tem učinkovitost testiranega AO (13):

$$\% \text{ ANT} = 100 \times ((R_{\text{KONTROLA}} - R_{\text{VZOREC}}) / R_{\text{KONTROLA}})$$

Izračunamo lahko tudi razmerje stopnje oksidacije med kontrolo in vzorcem (13):

$$\text{ORR} = R_{\text{VZOREC}} / R_{\text{KONTROLA}}$$

4.6 OKSIMI IN AMIDOKSIMI

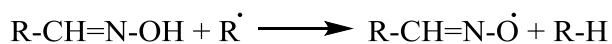
Oksimi so spojine, ki sodijo v skupino iminov. Njihova funkcionalna skupina je $R^1R^2C=NOH$ pri čemer R^1 predstavlja organski del verige, R^2 pa je v primeru aldoksimov vodik, v primeru ketoksimov pa druga organska skupina. Amidoksimi so oksimi amidov, njihova funkcionalna skupina pa je $RC(=NOH)(NR^1R^2)$ (16).

Oksime se v farmaciji najpogosteje uporablja za ponovno aktivacijo z organofosfati inhibiranih acetilholinesteraz. Organofosfate, ki so zaviralci acetilholinesteraz, se največ uporablja kot pesticide. Dokazano je, da povzročajo oksidativni stres pri podganah, miših in v človeškem telesu, vendar pa natančen mehanizem delovanja še ni dobro poznan. Za dober pristop zdravljenja zastrupitve z organofosfati so se izkazale spojine, ki reaktivirajo acetilholinesteraze z antioksidativnimi lastnostmi, na primer pralidoksim (14, 15).

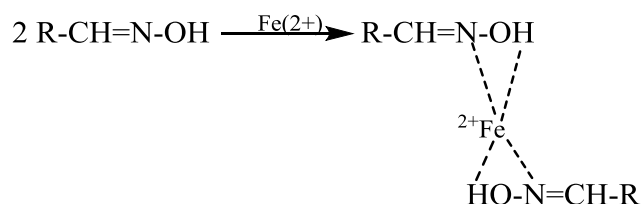
Oksimi preprečijo tudi oksidacijo LDL. Posledica tega je preprečitev nastanka oziroma razvoja ateroskleroze (kronične vnetne bolezni). AO delovanje oksimov se kaže s tem, da reagirajo z raznimi radikali in kelirajo kovinske ione (14, 15).

Antioksidativno delovanje oksimov:

- Neposredna reakcija z radikali:



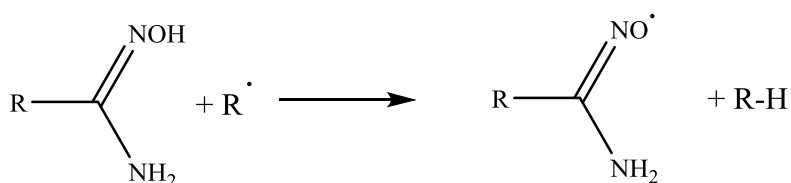
- Keliranje kovinskih ionov:



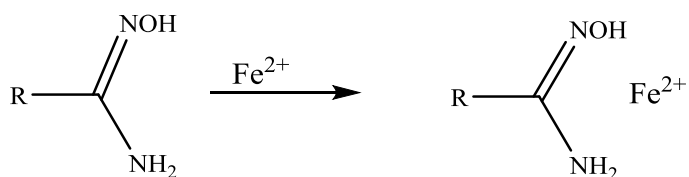
Amidoksimska funkcionalna skupina je prisotna v nekaterih zdravilnih učinkovinah (tripanocidi, tuberkulostatiki, antihipertenzivi, baktericidi,...). Značilnost amidoksimov so šibko kisle lastnosti. Obstajajo lahko v dveh tautomernih oblikah; bolj stabilni amidoksimski in manj stabilni hidroksiaminenaminski, pri kateri je onemogočena tvorba intramolekulskih vodikovih vezi med H in OH. Antioksidativno delovanje amidoksimov se kaže s tem, da neposredno reagirajo z radikali in kelirajo kovinske ione (14).

Antioksidativno delovanje amidoksimov:

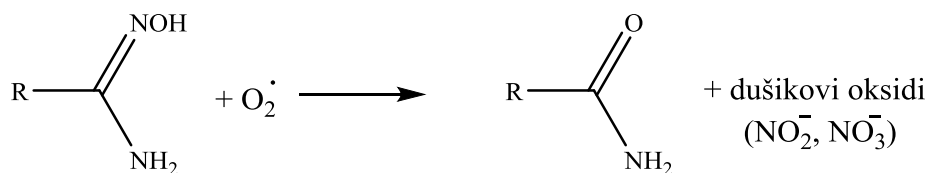
- Neposredna reakcija z radikali:



- Keliranje kovinskih ionov:



- Reakcija s superoksidnim radikalom:



5 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je ovrednotiti antioksidativno učinkovitost strukturno različnih amfifilnih spojin. Antioksidativno učinkovitost bomo preverjali z dvema različnima metodama, in sicer z DPPH metodo ter metodo z β -karotenom. DPPH metoda temelji na reakciji redukcije radikala DPPH, ki se med reakcijo iz vijolične barve razbarva, zaradi česar lahko reakcijo spremljamo spektrofotometrijsko. Metoda z β -karotenom temelji na vrednotenju antioksidativne učinkovitosti preko spremljanja lipidne peroksidacije. Med meritvami se β -karoten ob prisotnosti lipidnih radikalov razbarva, zaradi česar lahko tudi pri tej metodi potek razbarvanja β -karotena spremljamo spektrofotometrijsko.

Izbrane spojine so bile sintetizirane v okviru predhodnega raziskovalnega dela na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani. Antioksidativna učinkovitost izbranih spojin je bila z DPPH metodo ugotovljena že takrat, to je po sintezi, zato bomo s ponovnim vrednotenjem preverili tudi funkcionalno stabilnosti teh spojin.

Nadalje bomo antioksidativno učinkovitost spojin vrednotili z metodo z β -karotenom. Primarni cilj je optimizacija omenjene metode za ugotavljanje antioksidativne učinkovitosti oksimov in amidoksimov z namenom nadaljnjega rutinskega testiranja amifilnih spojin s podobno strukturo. Na ta način želimo razširiti nabor možnih metod za spremljanje antioksidativne aktivnosti različnih molekul. Poleg tega bomo, zaradi različnosti metod, rezultate obeh metod primerjali in ugotovili, kateri AO so bolj primerni za testiranje z DPPH metodo in kateri z metodo z β -karotenom. DPPH metoda se izvaja v bolj hidrofilnem okolju, metoda z β -karotenom pa v bolj lipofilnem okolju, zato je namen tega dela primerjava obeh metod tudi iz vidika različnega okolja.

6 MATERIALI IN METODE

6.1 MATERIALI

6.1.1 Antioksidanti

V diplomski nalogi smo vrednotili antioksidativno učinkovitost 13 različnih amifilnih spojin z dvema različnima metodama, in sicer z DPPH metodo ter metodo z β -karotenom. Spojine so bili različni amidoksimi (OAR 40, OAR 44, OAR 46, OAR 47), oksimi (OAR 65, OAR 69, OAR 67), derivati galaktoze (OJB-BK, OJB-CK, OJB-DK) in derivati glukoze (ONT 47, ONT 49, ONT 50). Za vse našete spojine je značilno, da imajo oksimsko ali amidoksimsko funkcionalno skupino (17); natančneje so predstavljene v tekstu spodaj.

OAR 40:

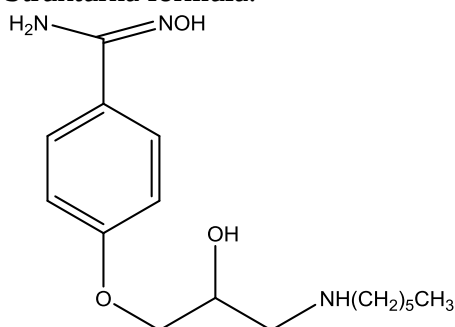
Kemijska formula: $C_{16}H_{27}N_3O_3$

IUPAC ime: 4-(3-(heksilamino)-2-hidroksipropoksi)-*N'*-hidroksibenimidamid

Skupina: amidoksim

Molska masa: $M=309,2$ g/mol

Strukturna formula:



OAR 44:

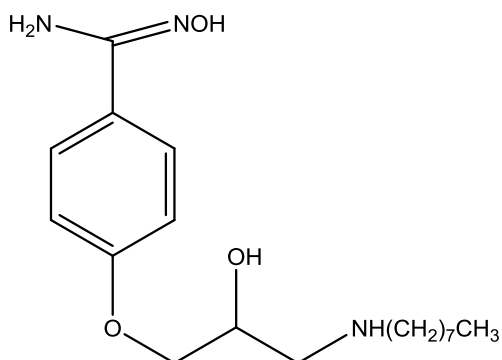
Kemijska formula: $C_{18}H_{31}N_3O_3$

IUPAC ime: 4-(3-(oktilamino)-2-hidroksipropoksi)-*N'*-hidroksibenzimidamid

Skupina: amidoksim

Molska masa: $M=337,2$ g/mol

Strukturna formula:



OAR 46:

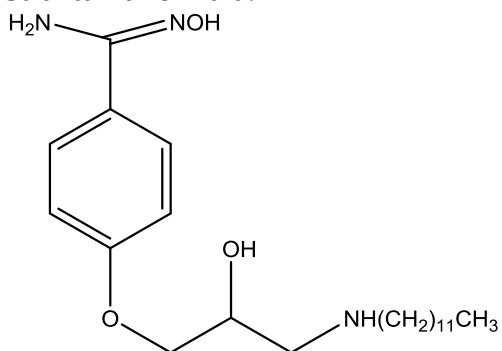
Kemijska formula: C₂₂H₃₉N₃O₃

IUPAC ime: 4-(3-(dodecilamino)-2-hidroksipropoksi)-*N'*-hidroksibenzimidamid

Skupina: amidoksim

Molska masa: M=393,4 g/mol

Strukturna formula:



OAR 47:

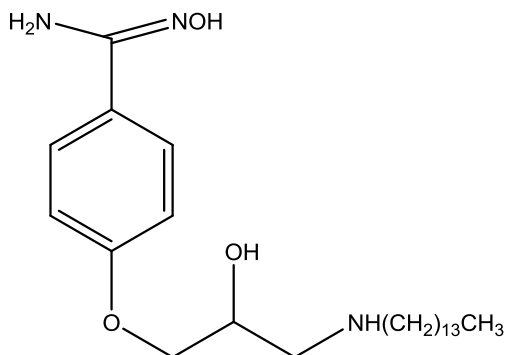
Kemijska formula: C₂₄H₄₃N₃O₃

IUPAC ime: 4-(3-(tetradecilamino)-2-hidroksipropoksi)-*N'*-hidroksibenzimidamid

Skupina: amidoksim

Molska masa: M=421,3 g/mol

Strukturna formula:



OAR 65:

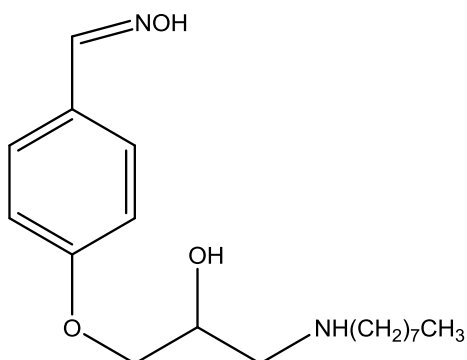
Kemijska formula: C₁₈H₃₀N₂O₃

IUPAC ime: 4-(3-(oktilamino)-2-hidroksipropoksi)benzaldehydoksime

Skupina: oksime

Molska masa: M=322,2 g/mol

Strukturna formula:

**OAR 67:**

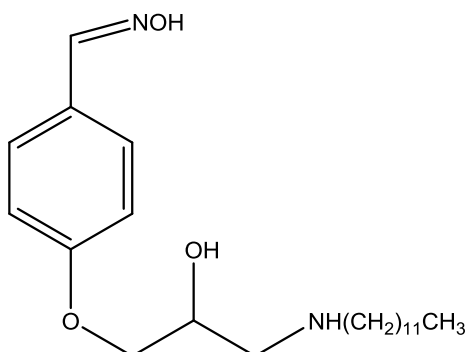
Kemijska formula: C₂₂H₃₈N₂O₃

IUPAC ime: 4-(3-(dodecilamino)-2-hidroksipropoksi)benzaldehydoksime

Skupina: oksime

Molska masa: M=378,3 g/mol

Strukturna formula:

**OAR 69:**

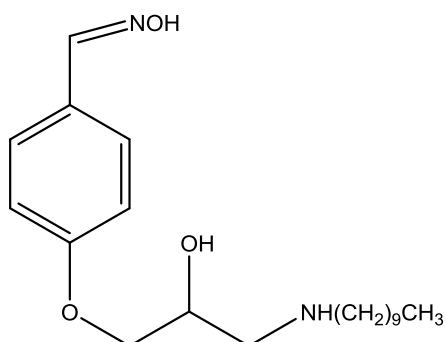
Kemijska formula: C₂₀H₃₄N₂O₃

IUPAC ime: 4-(3-(decilamino)-2-hidroksipropoksi)benzaldehydoksime

Skupina: oksime

Molska masa: M=350,3 g/mol

Strukturna formula:



OJB-BK:

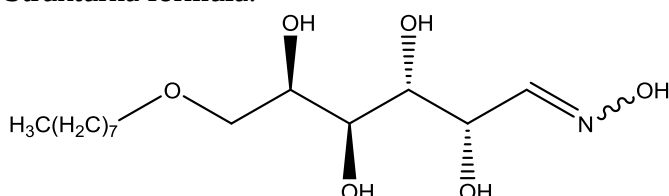
Kemijska formula: C₁₄H₂₉NO₆

IUPAC ime: 1(*E/Z*)2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-2,3,4,5-tetrahidroksi-6-(oktiloksi)heksanaloksim

Skupina: derivat galaktoze z oksimsko funkcionalno skupino

Molska masa: M=307,3 g/mol

Strukturna formula:



OJB-CK:

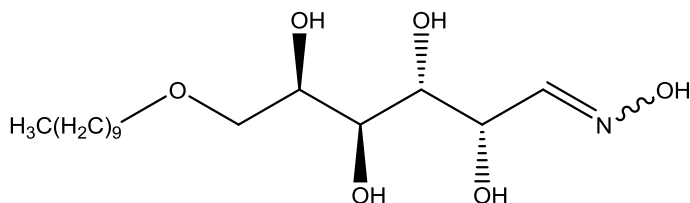
Kemijska formula: C₁₆H₃₃NO₆

IUPAC ime: 1(*E/Z*)2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-2,3,4,5-tetrahidroksi-6-(deciloksi)heksanaloksim

Skupina: derivat galaktoze z oksimsko funkcionalno skupino

Molska masa: M=335,3 g/mol

Strukturna formula:



OJB-DK:

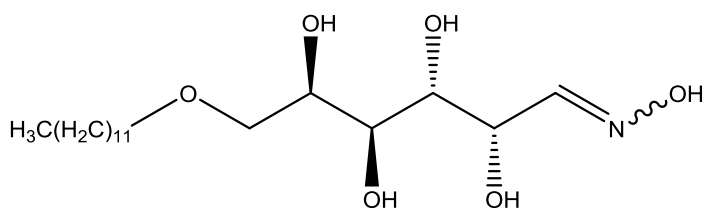
Kemijska formula: C₁₈H₃₇NO₆

IUPAC ime: 1(*E/Z*)2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-2,3,4,5-tetrahidroksi-6-(dodeciloksi)heksanaloksim

Skupina: derivat galaktoze z oksimsko funkcionalno skupino

Molska masa: M=363,4 g/mol

Strukturna formula:



ONT 47:

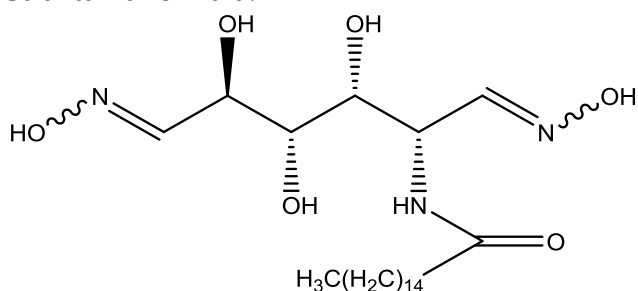
Kemijska formula: C₂₂H₄₃N₃O₆

IUPAC ime: *N*-((*E/Z*,2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,*E/Z*)-3,4,5,-trihidroksi-1,6-bis(hidroksiamino)heksan-2-il)-heksandekanamid

Skupina: derivat glukoze z oksimsko funkcionalno skupino

Molska masa: M=445,4 g/mol

Strukturna formula:



ONT 49:

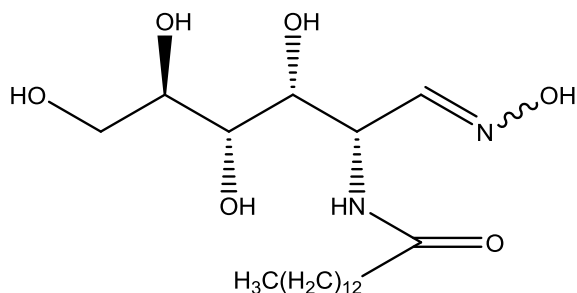
Kemijska formula: C₂₀H₄₀N₂O₆

IUPAC ime: *N*-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,*E/Z*)-3,4,5,6-tetrahidroksi-1-(hidroksiimino)heksan-2-il)-tetradekanamid

Skupina: derivat galaktoze z oksimsko funkcionalno skupino

Molska masa: M=404,4 g/mol

Strukturna formula:



ONT 50:

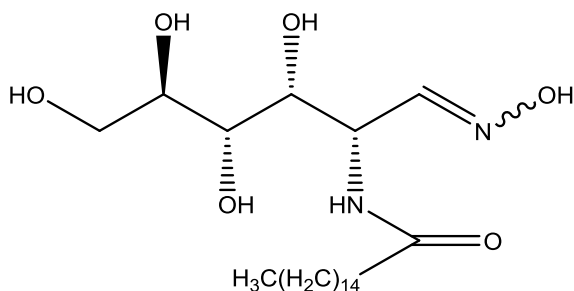
Kemijska formula: C₂₂H₄₂N₂O₆

IUPAC ime: *N*-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*,*E/Z*)-3,4,5,6-tetrahidroksi-1-(hidroksilimino)heksan-2-il)-heksadecanamid

Skupina: derivat galaktoze z oksimsko funkcionalno skupino

Molska masa: M=432,4 g/mol

Strukturna formula:



6.1.2 Aparature in oprema

- Analizna tehtnica (Mettler Toledo AG 245, Švica)
- Analizna tehtnica (Mettler Toledo XS 205, Švica)
- Mikrotitrne plošče s 96 vdolbinicami (TPP[®] Techno Plastic Products, Transadingen, Švica)
- Mikrotitrski čitalec Sapphire2[™] (Tecan, Švica)
- Rotavapor (Büchi R-114) (Büchi, Švica)
- Ultrazvočna kadička Sonis (Iskra Pio, Slovenija)
- UV spektrofotometer (Hewlett Packard 8453, Nemčija)

Na UV spektrofotometru (Hewlett Packard 8453, Nemčija) smo opravili meritve absorbanc pri DPPH metodi, na mikrotitrskem čitalcu Sapphire2[™] pa smo opravili meritve absorbanc pri metodi z β -karotenom.

6.1.3 Reagenti

- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- β -karoten (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Linolna kislina (60-74%) (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Metanol (Emparta, Nemčija)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, Nemčija)

Metanol smo uporabili kot topilo pri razredčevanju uporabljenih AO pri obeh metodah. Linolno kislino, Tween 20 in β -karoten pa smo uporabili pri pripravi reakcijske zmesi pri metodi z β -karotenom.

6.1.4 Programska oprema

Za risanje struktur smo uporabili program ChemDraw Ultra 7.0.

6.2 METODE

Antioksidativno učinkovitost smo preverjali z dvema različnima metodama, in sicer z DPPH metodo ter metodo z β -karotenom. Ker so testirani AO amfifilni, nas je zanimala primerjava rezultatov AO učinkovitosti, vrednotene po dveh različnih metodah.

6.2.1 Ugotavljanje antioksidativne učinkovitosti z DPPH metodo

Z DPPH metodo smo ugotovili antioksidativno učinkovitost izbranih AO. Učinkovitost testiranega AO smo merili preko redukcije DPPH radikala. Le-ta se reducira, saj antioksidantu odvzema H-atome. Posledica tega je sprememba barve DPPH iz vijolične v blede rumeno, potek reakcije smo tako spremljali spektrofotometrijsko pri valovni dolžini absorpcijskega maksimuma DPPH, to je pri 516 nm. (18).

6.2.1.1 Izdelava umeritvene premice

Za izvedbo metode DPPH smo najprej pripravili umeritveno premico DPPH. Pripravili smo dve paralelki z različno začetno natehto DPPH, ki smo ju nato ustrezno redčili ter dobili redčitve v koncentracijskem območju 0,015-0,074 mM. Kot topilo smo uporabili metanol. Pripravljenim redčitvam raztopine DPPH smo nato izmerili absorbanco pri 516 nm (19).

6.2.1.2 Priprava osnovne raztopine DPPH

Osnovno raztopino DPPH smo pripravili tako, da smo v 20 mL bučko natančno natehtali približno 10 mg DPPH in do oznake dopolnili z metanolom. Raztopino smo sonicirali na ultrazvočni kopeli tako dolgo, dokler se ni raztopil celoten DPPH. Nato smo jo ustrezno redčili do koncentracije $\sim 0,063$ mM. Pripravljene raztopine smo zaščitili pred svetlobo (bučke smo ovili v aluminijasto folijo ter jih imeli shranjene stran od virov svetlobe). Osnovno raztopino DPPH smo pripravili vsak dan pred začetkom meritev.

6.2.1.3 Priprava raztopin testiranih antioksidantov

a) *Priprava raztopin amidoksimov in oksimov*

Učinkovitost teh AO smo testirali pri dveh različnih koncentracijah in sicer 5 mM in 10 mM. Za pripravo raztopine s koncentracijo 10 mM smo v 10 mL bučko natehtali ustrezno maso AO in dopolnili do oznake z metanolom. Tako pripravljeno raztopino smo ustrezno redčili še do koncentracije 5 mM.

b) Priprava raztopin derivatov galaktoze

Učinkovitost teh AO smo zaradi slabše topnosti testirali pri koncentraciji 0,1 mM. Raztopino s koncentracijo 0,1 mM smo pripravili tako, da smo v 10 mL bučko natehtali ustrezno maso AO in dopolnili do oznake z metanolom.

c) Priprava raztopin derivatov glukoze

Učinkovitost teh AO smo testirali pri dveh različnih koncentracijah, in sicer 0,5 mM in 5 mM. Za pripravo raztopine s koncentracijo 5 mM smo v 10 mL bučko natehtali ustrezno maso AO in dopolnili do oznake z metanolom. Tako pripravljeno raztopino smo ustrezno redčili še do koncentracije 0,5 mM.

6.2.1.4 Izvedba metode

Antioksidativno učinkovitost testiranih AO smo merili tako, da smo spektrofotometrijsko spremljali stopnjo redukcije DPPH preko koncentracije DPPH v vzorcu. Ob prisotnosti boljšega AO je bila stopnja redukcije DPPH večja. Merili smo pri valovni dolžini absorpcijskega maksimuma DPPH, pri 516 nm. Pred vsako meritvijo smo najprej izmerili absorbanco osnovne raztopine DPPH, to je brez dodane raztopine AO. Nato smo v kiveto dodali 1 mL raztopine testiranega AO, pomešali in v najkrajšem času začeli z meritvami (čas 0 min in nato vsako minuto) do ravnotežnega stanja, to je do trenutka, ko se stopnja redukcije DPPH ni več spreminjala in AO ni več deloval. Izkazalo se je, da je bilo ravnotežno stanje večine testiranih AO pri 30 min. Meritve smo za posamezen AO izvedli v dveh paralelah.

Iz dobljenih rezultatov (absorbance osnovne raztopine DPPH in absorbance vzorca (osnovna raztopina DPPH + testiran AO) v ravnotežnem stanju pri 516 nm) smo izračunali količino DPPH (%), ki ni reagirala, iz katere smo ugotovili učinkovitost testiranega AO. Manjša, kot je bila količina DPPH, ki ni reagirala, večja je bila učinkovitost testiranega AO.

$$\% \text{ DPPH} = A_f / A_0 \times 100$$

A_f – absorbanca DPPH z raztopino testiranega AO po 30 min

A_0 – absorbanca DPPH brez vzorca

6.2.2 Ugotavljanje antioksidativne učinkovitosti z metodo z β -karotenom

Pri ugotavljanju antioksidativne učinkovitosti so v reakcijski zmesi prisotni β -karoten, kloroform kot topilo, Tween 20, ki deluje kot emulgator, linolna kislina in prečiščena voda. V reakcijski zmesi poteka avtooksidacija linolne kisline, zaradi česar se tvorijo peroksilni radikali. Med reakcijo ti reagirajo z β -karotenom in ta se razbarva. Če je v reakcijski zmesi prisoten AO, le-ta reagira s peroksilnimi radikali in na tak način zaščiti β -karoten pred razbarvanjem. V tem primeru se β -karotenom razbarva manj, stopnjo razbarvanja pa lahko ugotovimo spektrofotometrijsko (20).

6.2.2.1 Priprava 0,2-odstotne raztopine β -karotena v kloroformu

Raztopino smo pripravili tako, da smo 2 mg β -karotena natehtali v 10 mL bučko in dopolnili do oznake s kloroformom.

6.2.2.2 Priprava 0,4-odstotne (m/V) raztopine Tween-a 20

Raztopino smo pripravili tako, da smo v 50 mL bučko natehtali 0,2 g Tween-a 20 in dopolnili do oznake s prečiščeno vodo.

6.2.2.3 Priprava raztopin testiranih antioksidantov

d) Priprava raztopin amidoksimov in oksimov

Raztopine teh AO smo testirali pri koncentraciji 10 mM. Pripravili smo jih tako, da smo v 10 mL bučko natehtali ustrezno maso AO in dopolnili do oznake z metanolom.

e) Priprava raztopin derivatov galaktoze

Raztopine teh AO smo testirali pri koncentraciji 0,1 mM. Pripravili smo jih tako, da smo v 10 mL bučko natehtali ustrezno maso testiranega AO in dopolnili do oznake z metanolom.

f) Priprava raztopin derivatov glukoze

Raztopine te skupine AO smo testirali pri koncentraciji 5 mM. Za pripravo raztopine ustrezne koncentracije smo v 10 mL bučko natehtali ustrezno maso AO in do oznake dopolnili z metanolom.

6.2.2.4 Priprava reakcijske zmesi

V bučko smo dodali 2,2 μL linolne kisline, 18,1 μL 0,4-odstotne raztopine Tween-a 20 in 100 μL 0,2-odstotne raztopine β -karotena s kloroformom. Tako pripravljeno raztopino smo segrevali pri znižanem tlaku toliko časa, da smo odstranili kloroform. Preostanek smo raztopili v 5 mL prečiščene vode.

6.2.2.5 Izvedba metode

Antioksidativno učinkovitost testiranih AO smo merili na podlagi razbarvanja β -karotena. Stopnjo razbarvanja smo izmerili spektrofotometrijsko pri valovni dolžini absorpcijskega maksimuma β -karotena, to je 470 nm. Merili smo v mikrotitrskih ploščah s 96 vdolbinicami. V posamezno vdolbinico smo dali zmes pripravljene reakcijske zmesi β -karotena, linolne kisline in Tween-a 20 in pa raztopino določenega AO. Na začetku smo z več poskusi določili razmerje raztopine AO in raztopine β -karotena, linolne kisline in Tween-a 20. Med meritvami je bilo problematično izhlapevanje metanola, zaradi česar so bile kinetične meritve neverodostojne. Zaradi tega smo meritve izvajali tako, da smo jih imeli ves čas merjenja pokrite v sušilniku, ven pa smo jih vzeli samo ob času meritve. Tako smo zmanjšali izhlapevanje metanola. Plošče smo v sušilniku hranili pri 25°C in 37°C. Meritev antioksidativne učinkovitosti posameznega testiranega AO je trajala 120 min, merili pa smo v 15 minutnih intervalih (21).

Odstotek inhibicije razbarvanja β -karotena (% ANT) zaradi prisotnosti testiranega AO in s tem antioksidativno učinkovitost smo izračunali po slednji enačbi:

$$\% \text{ ANT} = 100 \times ((R_{\text{kontrola}} - R_{\text{vzorec}}) / R_{\text{kontrola}})$$

$$R = \ln (A_{t=0} / A_{t=120}) \times (1 / t)$$

$A_{t=0}$ – izmerjena absorbanca β -karotena ob času $t=0$ min

$A_{t=120}$ – izmerjena absorbanca β -karotena ob času $t=120$ min

7 REZULTATI

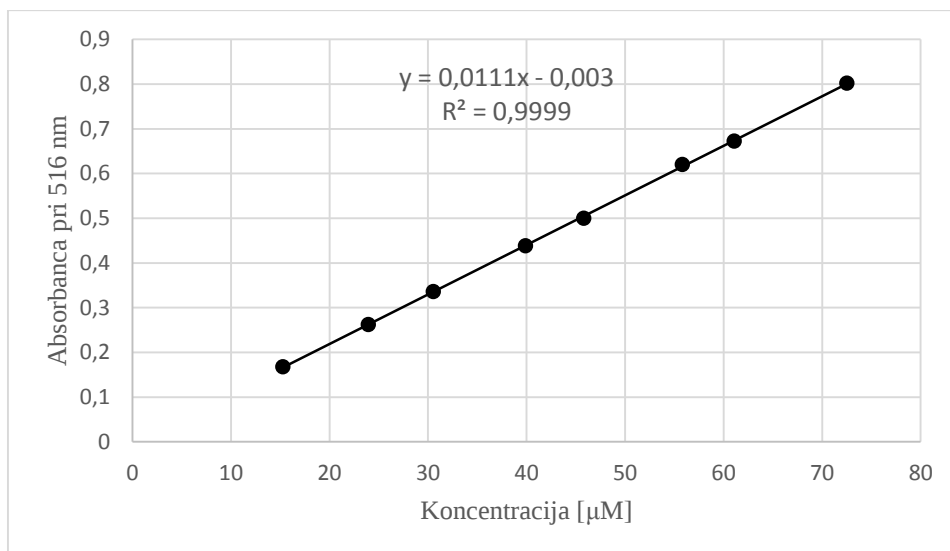
V diplomski nalogi smo ugotavljali antioksidativno učinkovitost 13 različnih amfifilnih AO. Zaradi narave AO smo se odločili antioksidativno učinkovitost testirati z dvema različnima metodama; DPPH metodo in metodo z β -karotenom. Ti dve metodi smo izbrali zato, ker nas je zanimalo, kako se testirani amfifilni AO odzovejo v dveh različnih okoljih. Pri DPPH metodi je okolje bolj hidrofilno, pri metodi z β -karotenom pa je okolje bolj lipofilno. Poleg tega je bila antioksidativna učinkovitost izbranih AO z DPPH metodo izmerjena že pred nekaj leti, zato smo te rezultate primerjali z našimi in tako ovrednotili funkcionalno stabilnost izbranih AO.

7.1 UGOTAVLJANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI Z DPPH METODO

Antioksidativno učinkovitost testiranih spojin z DPPH metodo smo spremljali spektrofotometrijsko preko redukcije radikala DPPH. Posamezna meritev je trajala 30 min, naredili smo dve paraleli. Iz povprečne vrednosti rezultatov smo izračunali preostalo količino DPPH (%), ki ni reagirala in nam podaja antioksidativno učinkovitost testiranega AO.

Umeritvena premica

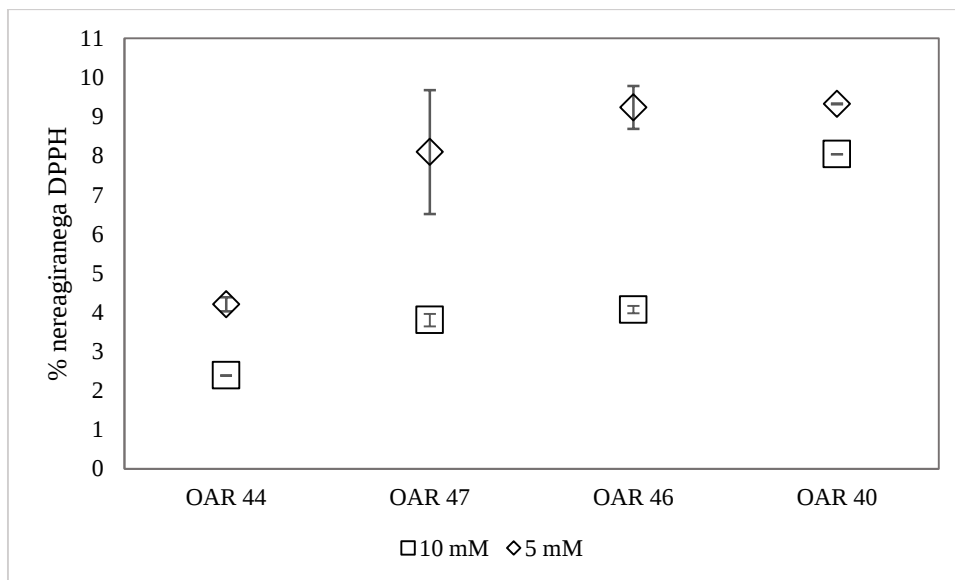
Pred pričetkom ugotavljanja antioksidativne učinkovitosti izbranim AO smo pripravili umeritveno premico DPPH radikala pri valovni dolžini 516 nm. Na ta način smo nato lahko določali koncentracijo DPPH ob prisotnosti testiranega AO.



Slika 3: Umeritvena premica za določanje koncentracije DPPH.

7.1.1 Amidoksimi

Antioksidativno učinkovitost amidoksimov smo testirali pri koncentracijah 5 mM in 10 mM. Na sliki 4 so podani % DPPH, ki ni reagiral po času 30 min, številčne vrednosti pa so podane v preglednici I kot povprečje dveh meritev.



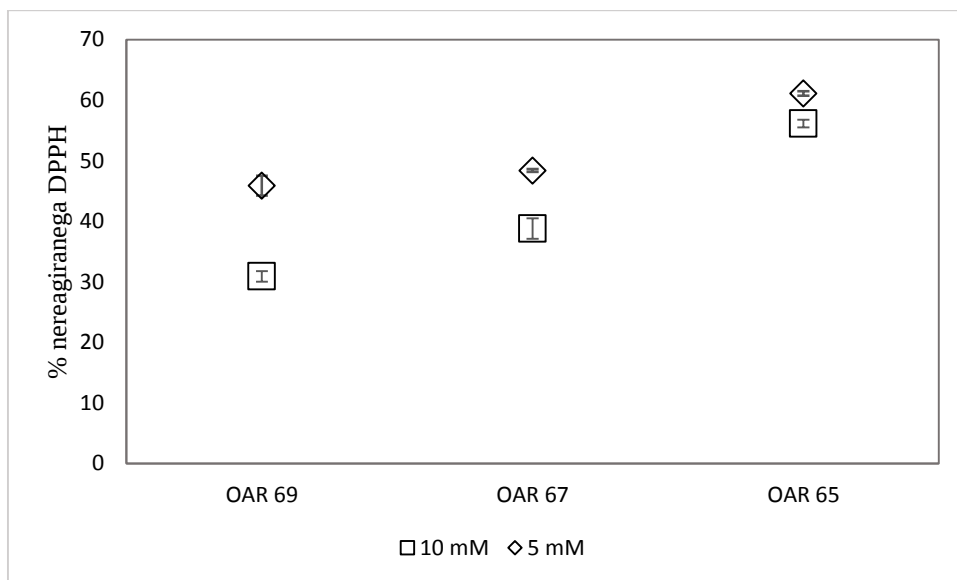
Slika 4: Prikaz količine DPPH (%), ki ni reagirala, pri amidoksimih po 30 min pri koncentracijah 5 mM in 10 mM. Rezultati so podani kot povprečje $\pm$ SD (n=2).

Preglednica I: Količina DPPH (%), ki ni reagirala, pri amidoksimih po 30 min, pri koncentracijah 5 mM in 10 mM, ($x \pm SD$, $n=2$).

AO	OAR 44	OAR 47	OAR 46	OAR 40
% nereagiranega DPPH $\pm$ SD ($n=2$), c = 5 mM	$4,2 \pm 0,2$	8 ± 1	$9,2 \pm 0,5$	$9,3 \pm 0,005$
% nereagiranega DPPH $\pm$ SD ($n=2$), c = 10 mM	$2,4 \pm 0,01$	$3,8 \pm 0,2$	$4,2 \pm 0,1$	$8,1 \pm 0,007$

7.1.2 Oksimi

Antioksidativno učinkovitost oksimov smo testirali pri koncentracijah 5 mM in 10 mM. Na sliki 5 so prikazane vrednosti količine DPPH, ki ni reagirala, v odstotkih po 30 min, v preglednici II pa so podane številčne vrednosti v odstotkih, kot povprečje dveh meritev.



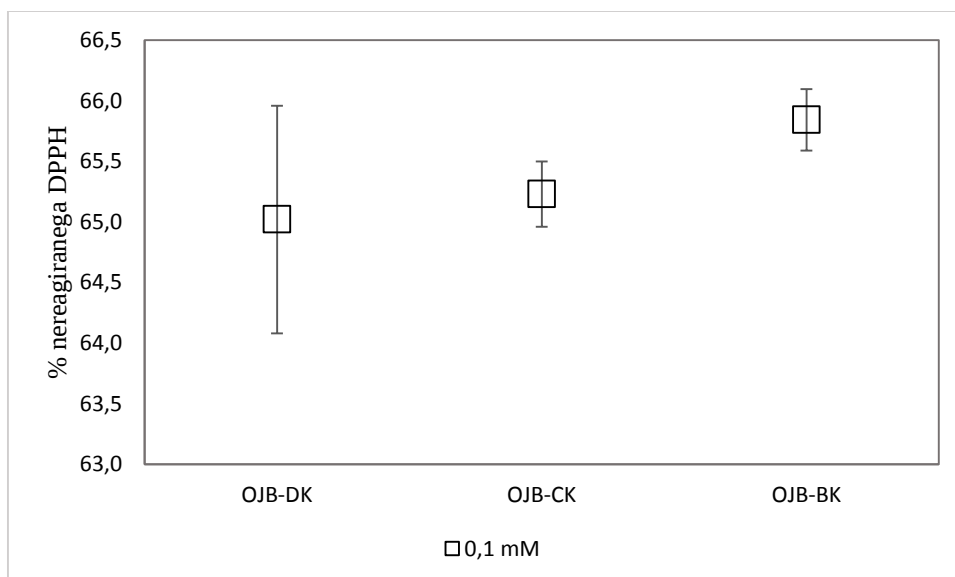
Slika 5: Prikaz količine DPPH (%), ki ni reagirala, pri oksimih po 30 min, pri koncentracijah 5 mM in 10 mM. Rezultati so podani kot povprečje $\pm$ SD ($n=2$).

Preglednica II: Količina DPPH (%), ki ni reagirala, pri oksimih po 30 min, pri koncentracijah 5 mM in 10 mM, ($\bar{x} \pm SD$, $n=2$).

AO	OAR 69	OAR 67	OAR 65
% nereagiranega DPPH $\pm$ SD ($n=2$), c = 5 mM	46 $\pm$ 2	48,4 $\pm$ 0,2	61,1 $\pm$ 0,4
% nereagiranega DPPH $\pm$ SD ($n=2$), c = 10 mM	30,9 $\pm$ 0,9	39 $\pm$ 2	56,1 $\pm$ 0,6

7.1.3 Derivati galaktoze

Antioksidativno učinkovitost derivatov galaktoze smo zaradi slabše topnosti testirali pri nižji koncentraciji, in sicer 0,1 mM. Tudi tukaj nam slika 6 prikaže odstotek količine DPPH, ki ni reagirala, po končani meritvi, preglednica III pa nam poda številčne vrednosti v odstotkih, kot povprečje dveh meritev.



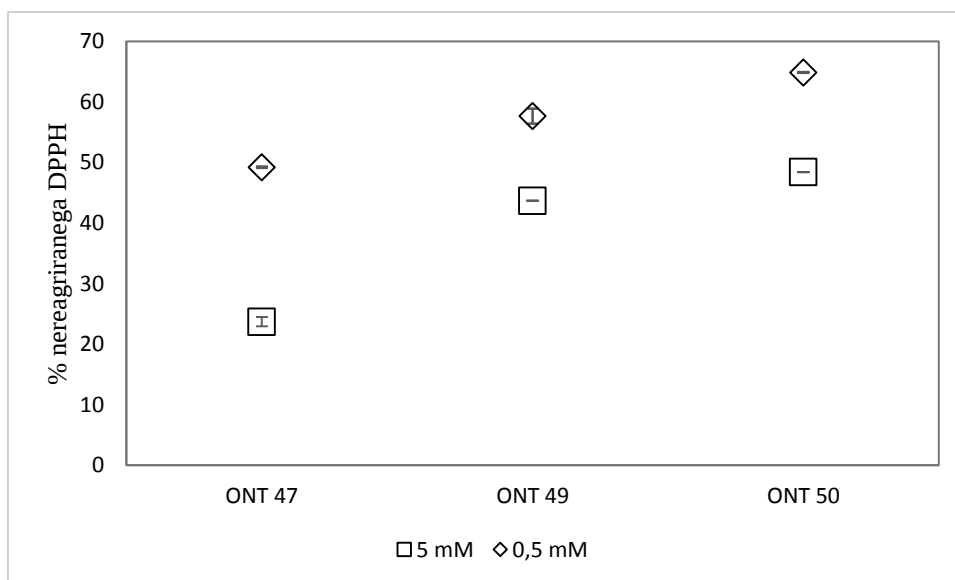
Slika 6: Prikaz količine DPPH (%), ki ni reagirala, pri derivatih galaktoze po 30 min, pri koncentraciji 0,1 mM. Rezultati so podani kot povprečje $\pm$ SD ($n=2$).

Preglednica III: Količina DPPH (%), ki ni reagirala, pri derivatih galaktoze po 30 min, pri koncentraciji 0,1 mM, ($x \pm SD$, $n=2$).

AO	OJB-DK	OJB-CK	OJB-BK
% nereagirane DPPH $\pm$ SD ($n=2$), c = 0,1 mM	65,0 $\pm$ 0,9	65,2 $\pm$ 0,2	65,8 $\pm$ 0,3

7.1.4 Derivati glukoze

Antioksidativno učinkovitost derivatov glukoze smo testirali pri koncentracijah 0,5 mM in 5 mM. Na sliki 7 in v preglednici IV vidimo prikaz količine DPPH (%), ki ni reagirala, in pa številčne vrednosti v odstotkih, kot povprečje v odstotkih.



Slika 7: Prikaz količine DPPH (%), ki ni reagirala, pri derivatih glukoze po 30 min, pri koncentracijah 0,5 mM in 5 mM. Rezultati so podani kot povprečje $\pm$ SD ($n=2$).

Preglednica IV: Količina DPPH (%), ki ni reagirala, pri derivatih glukoze po 30 min, pri koncentracijah 0,5 mM in 5 mM, ($\bar{x} \pm SD$, $n=2$).

AO	ONT 47	ONT 49	ONT 50
% nereagiranega DPPH $\pm$ SD ($n=2$), $c = 0,5 \text{ mM}$	$49,2 \pm 0,1$	58 ± 1	$64,9 \pm 0,05$
% nereagiranega DPPH $\pm$ SD ($n=2$), $c = 5 \text{ mM}$	$23,7 \pm 0,8$	$43,7 \pm 0,02$	$48,4 \pm 0,04$

7.2 UGOTAVLJANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI Z METODO Z β -KAROTENOM

Z metodo z β -karotenom smo spremljali antioksidativno učinkovitost testiranih spojin spektrofotometrijsko preko razbarvanja β -karotena. Posamezna meritev je potekala 120 min in sicer pri dveh različnih temperaturah (25°C in 37°C). Antioksidativno učinkovitost testiranih AO smo nato ugotovili preko izračuna % ANT. Večji kot je % ANT, večja je učinkovitost testiranega AO. Za določene spojine % ANT nismo mogli izračunati, in sicer zaradi večje absorbance po 120 min kot na začetku, posledično so bile izračunane vrednosti % ANT večje od 100 %. Prav tako je bil pri nekaterih testiranih AO problematično, da se je absorbanca pri kontroli ustreznega razmerja (reakcijska zmes : metanol) zmanjšala manj kot pa pri vzorcu z AO z istim razmerjem (reakcijska zmes : raztopina AO). V teh primerih je bil izračunan % ANT negativen.

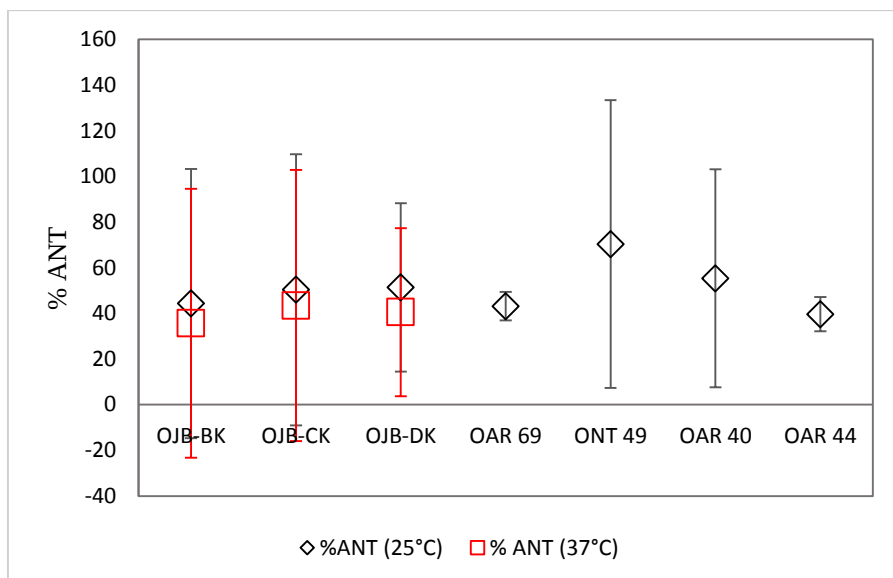
Med meritvami smo želeli metodo optimizirati. Pred izvedbo smo morali določiti razmerje med reakcijsko zmesjo in raztopino testiranega AO. Slednje zaradi različne topnosti testiranih AO ni bilo enako pri vseh. Glede na redčenje smo nato izračunali tudi koncentracije nastalih raztopin. V preglednici V lahko vidimo uporabljena razmerja med reakcijsko zmesjo in raztopino testiranega AO ter koncentracije nastalih raztopin

Preglednica V: Prikaz razmerij med reakcijsko zmesjo in raztopino AO ter koncentracije nastalih raztopin.

AO	Amidoksima OAR 40, OAR 44	Amidoksim OAR 46	Amidoksim OAR 47	Oksimi	Derivati galaktoze	Derivati glukoze
Razmerje reakcijska zmes:raztopina AO	1:2	1:3	1:4	2:1	1:1	2:1
c [mM]	6,67	7,5	8	6,67	0,05	3,33

Nato smo potek reakcije spremljali s kinetičnimi meritvami pri temperaturah 25°C in 50°C, vendar je med meritvami izhlapeval metanol in so se testirani AO oborili. Zaradi tega smo potek reakcije spremljali tako, da si bile mikrotitrne plošče z vzorci ves čas v sušilniku na ustrezni temperaturi (25°C in 37°C) in smo jih vzeli ven le vsakih 15 min, da smo izvedli meritve.

Na sliki 8 in v preglednicah VI in VII so prikazane vrednosti % ANT pri temperaturah 25°C in 37°C. Prikazani so rezultati samo za tiste AO, ki smo jim % ANT lahko izračunali. Rezultati so predstavljeni kot povprečje petih meritev, zaradi manjšega števila pa smo predstavili vse skupaj.



Slika 8: Antioksidativne učinkovitosti (% ANT) po 120 min pri temperaturah 25°C in 37°C pri testiranih AO, kjer smo le-te lahko izračunali. Rezultati so prikazani kot povprečje $\pm$ SD, n=5.

Preglednica VI: Antioksidativne učinkovitosti (% ANT) po 120 min pri 25°C. Prikazani so rezultati ($x \pm$ SD, n=5) pri testiranih AO, kjer smo le-te lahko izračunali.

AO	OAR 40	OAR 44	OAR 69	OJB-BK	OJB-CK	OJB-DK	ONT 49
c [mM]	6,67	6,67	6,67	0,05	0,05	0,05	3,33
% ANT	55 $\pm$ 47	40 $\pm$ 7	43 $\pm$ 59	44 $\pm$ 59	50 $\pm$ 59	51 $\pm$ 37	70 $\pm$ 63

Preglednica VII: Antioksidativne učinkovitosti (% ANT) po 120 min pri 37°C. Prikazani so rezultati kot povprečje $\pm$ SD (n=5) pri testiranih AO, kjer smo le-te lahko izračunali.

AO	OJB-BK	OJB-CK	OJB-DK
c [mM]	0,05	0,05	0,05
% ANT	36 $\pm$ 42	43 $\pm$ 39	41 $\pm$ 68

8 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo vrednotili antioksidativno učinkovitost 13 izbranim AO, ki so bili sintetizirani v preteklih letih na Fakulteti za farmacijo. Za ugotavljanje antioksidativne učinkovitosti izbranih AO smo izbrali dve različni metodi. Ker so izbrani AO amfifilni, smo izbrali dve metodi, pri katerih smo lahko spremljali vedenje AO v različnem okolju. DPPH metoda deluje v bolj hidrofilnem okolju, metoda z β -karotenom pa v bolj lipofilnem okolju. Zanimala nas je namreč povezava med antioksidativno učinkovitostjo v dveh različno polarnih okoljih. Z DPPH metodo je bila antioksidativna učinkovitost izbranim AO že ugotovljena takoj po sintezi. Slednje rezultate smo primerjali z našimi in tako ocenili funkcionalno stabilnost izbranih AO.

8.1 UGOTAVLJANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI Z DPPH METODO

Pri DPPH metodi smo antioksidativno učinkovitost testirali z merjenjem redukcije DPPH. Ker je DPPH obarvan vijolično in med redukcijo spremeni barvo do blede rumene barve, smo reakcijo lahko spremljali spektrofotometrijsko. Absorbanco smo merili pri 516 nm, to je pri valovni dolžini absorpcijskega maksimuma DPPH.

Amidoksime in oksime smo testirali pri koncentracijah 5 mM in 10 mM, derivate galaktoze pri koncentraciji 0,1 mM in derivate glukoze pri koncentracijah 0,5 mM in 5 mM. Koncentracije so bile izbrane glede na topnost izbranih AO v metanolu. Pri izbranih koncentracijah so se AO brez težav raztopili, le v primeru derivatov galaktoze je bila hitrost raztapljanja kljub majhni koncentraciji nekoliko manjša oziroma je potekala dlje časa ob mešanju. Pri vseh meritvah smo kot topilo izbrali metanol, ki se tudi sicer uporablja kot standardno topilo pri tej metodi. Meritve so potekale tako, da smo najprej izmerili absorbanco osnovne raztopine DPPH, kjer ni bilo dodanega AO, nato pa smo v kiveto dodali še raztopino testiranega AO in čim hitreje izmerili absorbanco. Nato smo meritve ponavljali na vsako minuto do ravnotežnega stanja, ki je bil v primeru vseh spojin 30 min. Iz izmerjenih absorbanc smo nato izračunali količino DPPH (%), ki ni reagirala, po 30 min. Preko tega parametra smo ugotovili učinkovitost testiranega AO. Večja, kot je bila količina DPPH (%), ki ni reagirala po 30 min, manjša je bila antioksidativna učinkovitost AO.

Amidoksime in oksime smo testirali pri koncentracijah 5 mM in 10 mM. Kot vidimo iz slike 4 in preglednice I, so vsi amidoksimi reagirali kot reducenti, saj se je pri vseh testiranih AO

iz te skupine DPPH zelo dobro reducirali, ne glede na koncentracijo. Vsi so zmanjšali koncentracijo DPPH za več kot 90 %. Pri oksimih iz slike 5 in preglednice II opazimo manjšo antioksidativno učinkovitost, saj so reducirali okrog 30-50 % DPPH. Vse testirane spojine izkazujejo večjo AO učinkovitost pri večji koncentraciji, to je pri koncentraciji 10 mM, kar je pričakovano, saj je pri večji koncentraciji na voljo več AO, ki lahko reducira DPPH. Če primerjamo spojine oksimskega in amidoksimskega tipa, lahko zaključimo, da so amidoksimi boljši AO kot oksimi, saj so pri isti koncentraciji AO reducirali več DPPH.

Derivate galaktoze smo zaradi slabše topnosti testirali pri 100-krat manjši koncentraciji kot amidoksime in oksime, to je pri 0,1 mM. Posledično smo pričakovali tudi manjše znižanje koncentracije DPPH (%), kar smo z eksperimenti potrdili. Iz slike 6 in preglednice III vidimo, da so DPPH reducirali do okoli 65 %. Ker je testirana koncentracija teh AO toliko nižja, prave vzporednice z drugimi testiranimi AO ne moremo narediti. Kljub temu vidimo, da so ti AO pri koncentraciji 0,1 mM reducirali samo nekoliko manj DPPH kot pa oksim OAR 65 (sicer najslabši AO med oksimi), ki je bil testiran pri koncentraciji 5 mM. Zaključimo lahko, da izkazujejo dobro antioksidativno učinkovitost upoštevanje testirano koncentracijo.

Derivate glukoze smo testirali pri koncentracijah 0,5 mM in 5 mM. Na sliki 7 in preglednici IV vidimo, da so bili AO pri večjih koncentracijah tudi tukaj bolj učinkoviti kot AO pri nižjih koncentracijah zaradi enakega razloga kot amidoksimi in oksimi. Rezultate antioksidativne učinkovitosti derivatov glukoze lahko glede na testirane koncentracije primerjamo z rezultati antioksidativnih učinkovitosti amidoksimov in oksimov pri koncentraciji 5mM. Vidimo, da so derivati glukoze boljši AO kot oksimi ter slabši kot amidoksimi.

Vseh testiranih AO glede na antioksidativno učinkovitost ne moremo primerjati, saj so bile testirane koncentracije različne. Primerjamo lahko amidoksime, oksime in derivate glukoze pri koncentraciji 5 mM in sicer jih glede na antioksidativno učinkovitost razvrstimo tako; najboljši AO so amidoksimi, nekoliko slabši derivati glukoze, najslabši pa oksimi. Pri koncentraciji 10 mM lahko primerjamo amidoksime in oksime. Izkazalo se je, da so amidoksimi veliko boljši AO kot oksimi. Derivatov glukoze pri koncentraciji 0,5 mM ne moremo primerjati z drugimi testiranimi AO, prav tako ne derivatov galaktoze testiranih pri koncentraciji 0,1 mM.

Primerjava funkcionalne stabilnosti po osmih letih

Kot smo že omenili, so bili testirani AO sintetizirani na Fakulteti za farmacijo v okviru predhodnega raziskovalnega dela. Izbranim AO so že takrat izmerili antioksidativno učinkovitost z DPPH metodo, zato smo se odločili, da rezultate primerjamo in na tak način ovrednotimo funkcionalno stabilnost omenjenih AO. Zanimalo nas je torej, ali se je antioksidativna učinkovitost ohranila ali pa se je morda drastično zmanjšala. Vsi AO so bili v tem času primerno shranjeni (to je zaščiteni pred svetlobo, $T = 22 \pm 2^\circ\text{C}$).

V preglednici VIII so zbrani podatki iz leta 2009 in rezultati našega dela. Vidimo, da je antioksidativna učinkovitost pri vseh testiranih AO sicer manjša kot leta 2009, vendar ne bistveno. Pri večini, zlasti pri amidoksimih, je razlika količine DPPH (%), ki ni reagirala po 30 min, zgolj nekaj odstotkov. Tudi pri drugih, zlasti pri oksimih, kjer je količina DPPH (%), ki ni reagirala, nekoliko večja, kot leta 2009, je še vedno kar primerljiva. Iz tega lahko sklepamo, da so sintetizirani AO ob pravilnem hranjenju funkcionalno stabilni in ohranijo antioksidativno učinkovitost še kar nekaj let po sintezi.

Preglednica VIII: Primerjava količine DPPH (%), ki ni reagirala, po 30 min, pri koncentracijah 5 mM in 10 mM iz leta 2009 in 2017.

AO	OAR 44	OAR 46	OAR 65	OAR 67	OAR 69
% nereagiranega DPPH 2009, c = 5 mM	4	9	60	39	39
% nereagiranega DPPH 2017, c = 5 mM	4	9	61	48	46
% nereagiranega DPPH 2009, c = 10 mM	0	5	52	17	17
% nereagiranega DPPH 2017, c = 10 mM	2	4	56	39	31

8.2 UGOTAVLJANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI Z METODO Z β -KAROTENOM

Izbranim AO smo antioksidativno učinkovitost ugotavljali tudi z metodo z β -karotenom. To je metoda, ki temelji na poteku spremljanja lipidne peroksidacije. Pri reakciji se tvorijo peroksilni radikali, ki reagirajo z β -karotenom v zmesi in le-ta se razbarva. Če imamo v

reakcijski zmesi prisotno spojino z antioksidativnim delovanjem, s peroksilnimi radikali reagira spojina in ne β -karoten. Na ta način AO zmanjša razbarvanje β -karotena. S to metodo AO oksimskega in amidoksimskega tipa na Fakulteti za farmacijo še niso bili testirani, zato je bil naš cilj optimizirati metodo in dobiti komplementarne rezultate glede na DPPH metodo.

Za izvedbo metode smo potrebovali 0,2-odstotno raztopino β -karotena v kloroformu, 0,4-odstotno raztopino (m/V) Tween-a 20 in raztopine testiranih AO v ustreznih koncentracijah. Raztopine oksimov in amidoksimov smo pripravili pri koncentraciji 10 mM, derivate galaktoze pri koncentraciji 0,1 mM, derivate glukoze pa pri koncentraciji 5 mM. Razlog za različne koncentracije raztopin je tako kot pri DPPH metodi različna topnost izbranih AO. Tudi pri tej metodi smo kot topilo uporabili metanol.

Pripravljene raztopine smo želeli razredčiti še z 0,4-odstotno raztopino Tween-a 20. Zaradi tega smo izbrali AO OAR 46 in pripravili različna razmerja raztopin tega AO in raztopine Tween-a 20, vendar se je spojina pri vseh razmerjih oborila. Zaradi tega smo se odločili, da bomo vse AO testirali samo kot raztopine z metanolom in tem raztopinam dodati reakcijsko zmes z β -karotenom.

Reakcijsko zmes smo pripravili, tako da smo v bučko dodali ustrezno količino linolne kisline, 0,4-odstotne raztopine Tween-a 20 in 0,2-odstotne raztopine β -karotena. Pripravljeno zmes smo segrevali pri znižanem tlaku toliko časa, da smo odstranili ves kloroform. Nato smo preostanek raztopili v prečiščeni vodi.

Antioksidativno učinkovitost smo ugotavljali spektrofotometrijsko na podlagi merjenja absorbance pri valovni dolžini absorpcijskega maksimuma β -karotena, 470 nm. Tako smo lahko zaznali oksidacijo β -karotena. Merili smo v mikrotitrskih ploščah. V vsako vdolbinico smo dali reakcijsko zmes 0,2-odstotne raztopine β -karotena, linolne kisline in 0,4-odstotne raztopine Tween-a 20 in raztopino testiranega AO v ustreznem razmerju. Pred izvedbo meritev smo z več poskusi določili ustrezno razmerje med reakcijsko zmesjo in raztopino testiranega AO. Pri tem smo imeli probleme z obarjanjem, tako da ni bilo mogoče, da bi bilo razmerje pri vseh AO enako. V preglednici V so prikazana uporabljena razmerja med reakcijsko zmesjo in raztopino AO. Za kontrolo smo imeli pripravljena vsa testirana razmerja, pri čemer smo namesto raztopine AO dodali samo metanol. Glede na določeno razmerje so se ustrezno zmanjšale tudi koncentracije izbranih AO. Oksime, OAR 40 in OAR

44 smo torej testirali pri koncentraciji 6,67 mM, amidoksim OAR 46 pri 7,5 mM in amidoksim OAR 47 pri koncentraciji 8 mM. Derivate galaktoze smo testirali pri koncentraciji 0,05 mM, derivate glukoze pa pri 3,33 mM.

Absorbanco smo najprej poskušali meriti s kinetičnimi meritvami pri dveh različnih temperaturah; 25°C in 50°C, tako da je bila mikrotitrsko plošča ves čas meritve (120 min) v spektrofotometru, vendar je med meritvami izhlapeval metanol (volumen se je zmanjšal tudi za polovico) in so se posledično AO med meritvami obarjali. Poskus smo nato izvedli tako, da smo pokrite mikrotitrsko plošče med meritvami imeli shranjene v sušilniku na 25°C in 37°C, ven pa smo jih vzeli ob vsaki meritvi, torej na 15 min. Ta način merjenja bil ustrežnejši, saj se AO med meritvami niso obarjali. Na ta način smo bistveno zmanjšali izhlapevanje metanola in se izognili obarjanju. Vsako meritev smo opravili enkrat, vendar pa smo naenkrat testirali 5 paralel istega AO.

Nato smo iz dobljenih rezultatov izračunali % ANT, da bi lahko ugotovili antioksidativno učinkovitost testiranih AO. % ANT nam pove odstotek zaviranja razbarvanja β -karotena, kar pomeni da večji % ANT pomeni večjo antioksidativno učinkovitost testiranega AO. Vendar pa smo lahko % ANT izračunali le za določene AO. Pri 25°C smo % ANT lahko izračunali sedmim AO in sicer za vse derivate galaktoze, OAR 69, ONT 49, OAR 40 in OAR 44, pri 37°C pa smo rezultate dobili samo pri vseh derivatih galaktoze. Opazili smo namreč, da se že meritve absorbanc kontrole pri določenem času pri različnih paralelah zelo razlikujejo, kar se načeloma ne bi smelo dogajati. Enako se je dogajalo tudi pri meritvah absorbanc testiranih AO. Pri nekaterih rezultatih se je dogajalo tudi, da je bila začetna absorbanca manjša kot končna po 120 min. Zaradi tega smo imeli težave pri izbiri ustreznih vrednosti absorbanc, ki smo jih vzeli za izračun % ANT, saj jih je veliko odstopalo. Preverili smo tudi, če kakšen testiran AO, pri katerem smo imeli težave z izračunom % ANT, absorbira pri valovni dolžini absorpcijskega maksimuma β -karotena, vendar ni.

Preglednica IX: Prikaz nihanja rezultatov absorbanc.

A (0 min)	A (15 min)	A (30 min)	A (45 min)	A (60 min)	A (75 min)	A (90 min)	A (105 min)	A (120 min)
0,0743	0,0819	0,0811	0,081	0,0848	0,084	0,0966	0,1175	0,0801
0,0687	0,0755	0,0755	0,0746	0,0724	0,0815	0,0757	0,0687	0,0767
0,0643	0,0698	0,0753	0,0713	0,0683	0,0703	0,0667	0,0723	0,1388
0,0806	0,084	0,0842	0,085	0,0823	0,0775	0,0857	0,0796	0,0952
0,1653	0,1146	0,1129	0,1139	0,1143	0,1221	0,1371	0,2385	0,0825

Iz slike 8 in preglednic VI in VII vidimo, da smo pri meritvah pri temperaturi 25°C dobili več meritev kot pri meritvah pri temperaturi 37°C. Pri tej metodi smo rezultate pri obeh temperaturah dobili samo pri derivatih galaktoze. Tako kot pri DPPH metodi, je bila tudi pri metodi z β -karotenom ta skupina AO testirana pri najmanjši koncentraciji. Tokrat smo jih testirali pri koncentraciji 0,05 mM. Derivati galaktoze so pri temperaturi 25°C imeli večjo antioksidativno učinkovitost kot pri temperaturi 37°C. Pri vseh so antioksidativne učinkovitosti pri 25°C večje za približno 10 %. Vidimo, da je razbarvanje β -karotena najbolj zmanjšal AO OJB-BK, najslabše pa OJB-DK. To je ravno obratno kot pri DPPH metodi, kjer je OJB-DK najbolj znižal koncentracijo DPPH, OJB-BK pa najslabše.

Pri amidoksimih smo relevanten rezultat dobili samo pri dveh testiranih AO, in sicer pri OAR 40 in OAR 44 in še to samo pri temperaturi 25°C. Antioksidativna učinkovitost je bila med 40 in 55 %. Ta rezultat kaže manjšo antioksidativno učinkovitost omenjenih spojin glede na rezultate DPPH metode. Pri metodi z β -karotenom smo imeli s to skupino AO največ težav, saj smo morali najbolj prilagajati razmerja med reakcijsko zmesjo in raztopino testiranega AO. Bili so najmanj topni (ob mešanju reakcijska zmes in raztopina AO). To je tudi dokaz, da je okolje v izbranih metodah (DPPH metoda in metoda z β -karotenom) različno.

Pri oksimih smo rezultat dobili samo pri enem od treh testiranih AO in sicer pri OAR 69. Testirani AO je preprečil razbarvanje β -karotena za okoli 40 % pri 25°C, pri 37°C pa rezultata nismo dobili. Pri derivatih glukoze smo dobili rezultat samo pri enem testiranem

AO in sicer pri ONT 49. Tudi tukaj smo rezultat dobili samo pri temperaturi 25°C. Dobljena antioksidativna učinkovitost je približno 70 %.

Rezultatov antioksidativne učinkovitosti testiranih AO dobljenih z metodo z β -karotenom je praktično nemogoče primerjati glede na antioksidativno učinkovitost. Metode nam ni uspelo optimizirati in je vsekakor nujno nadaljnje delo, je bila pa omenjena metoda najbolj primerna za testiranje derivatov galaktoze, kar je verjetno povezano z ustrezno topnostjo le-teh v reakcijski zmesi.

9 SKLEP

V okviru diplomske naloge smo preverjali antioksidativno učinkovitost 13 izbranim AO z oksimsko ali amidoksimsko funkcionalno skupino. Antioksidativno učinkovitost smo izbranim AO ugotavljali z dvema različnima metodama, DPPH metodo, ki je že optimizirana, in pa metodo z β -karotenom, ki smo jo želeli optimizirati za izbran tip AO.

Z DPPH metodo smo lahko testirali vse izbrane AO, prav tako smo pri vseh dobili verodostojne rezultate. Ker smo različne skupine AO zaradi različne topnosti testirali pri različnih koncentracijah, vseh nismo mogli primerjati. Od tistih, testiranih pri enaki koncentraciji (5 mM), so koncentracijo DPPH najbolj znižali amidoksimi, slabše derivati glukoze in najslabše oksimi. Derivati galaktoze so glede na majhno koncentracijo (0,1 mM) reducirali podoben % DPPH kot oksimi pri koncentraciji 5 mM. Poleg antioksidativne učinkovitosti nas je zanimala tudi funkcionalna stabilnost izbranih AO, saj jim je le-ta že bila izmerjena osem let nazaj. Pri primerjavi rezultatov takoj po sintezi (iz leta 2009) in letos smo ugotovili, da so izbrani AO ob pravilnem hranjenju funkcionalno stabilni, saj se je antioksidativna učinkovitost praktično v celoti ohranila.

Pri testiranju antioksidativne učinkovitosti izbranih AO z metodo z β -karotenom je bil cilj metodo optimizirati za naš tip AO. Izbrani AO z oksimsko in amidoksimsko skupino s to metodo še niso bili izmerjeni. Izbrane skupine AO smo tako kot pri DPPH metodi testirali pri različnih koncentracijah. AO smo testirali pri dveh različnih temperaturah; 25 in 37°C. Absorbance smo lahko izmerili pri vseh testiranih AO, vendar pa zaradi nihanj absorbanc med meritvami nismo uspeli izračunati antioksidativne učinkovitosti za vse testirane AO. Antioksidativno učinkovitost smo lahko za obe temperaturi ugotavljali samo derivatom galaktoze. Metode nam sicer ni uspelo optimizirati, tako tudi nismo mogli primerjati antioksidativne učinkovitosti testiranih AO z različnima metodama, kar bo cilj nadaljnjih raziskav.

10 LITERATURA

1. Bayir H: Reactive oxygen species. Crit Care Med 2005; 33: 498-501.
2. Pečar S, Mravljak J: Šumi življenja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2015.
3. Luschak V: Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. Chemico-Biological Interactions 2014; 224: 164-175.
4. Ayala A, Muñoz M, Argüelles S: Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2014; Article ID 360438: 31 strani, doi:10.1155/2014/360438
5. Gutteridge J: Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. Clin. Chem 1995; 41: 1819-1828.
6. Nimse S.B, Pal D: Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. Royal society of chemistry 2015; 5:27986-28006.
7. Roginsky V, Lissi E: Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. Food chemistry 2005; 92: 235-254.
8. Karadag A, Ozcelik B, Saner S: Review of Methods to Determine Antioxidants Capacities. Springer Science 2009; 2: 41-60.
9. Brand Williams W, Cuvelier M.E, Berset C: Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. Lebensm Wiss u Technol 1995; 28: 25-30.
10. Prior R.L, Wu X, Schaich K: Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. J. Agric. Food Chem 2005; 53: 4290-4302.
11. Molyneux P: The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. J. Sci. Technol. 2004; 26: 211-219.

12. Prieto M.A, Rodríguez-Amado I, Vázquez J.A, Anders Y, Murado M.A: A standardized kinetic model to evaluate the antioxidant activity responses. The β -Carotene method as a case study. Instituto de Investigaci3n Mariñas.
13. Amarowicz R, Pegg R.B, Rahimi – Moghaddam P, Barl B, Weil J.A: Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. Food Chemistry 2004; 84: 551-562.
14. Ribič A: Sinteza in vrednotenje oksimov in amidoksimov kot amfifilnih antioksidantov. Diplomaska naloga, fakulteta za farmacijo, 2009.
15. Trdina N: Načrtovanje in sinteza neionogenih amfifilnih mimetikov glikolipida. Diplomaska naloga, fakulteta za farmacijo, 2010.
16. Elektronski vir:

<https://en.wikipedia.org/wiki/Oxime> (Dostop: 25.7.2017).
17. Gosenca M, Mravljak J, Gašperlin M, Obreza A: The Design, Synthesis, and Antioxidant Activity of Amphiphilic Oximes and Amidoximes. Acta Chim. Slov. 2013; 60: 310-322.
18. Kulisic T, Radonic A, Katalinic V, Milos M: Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. Food Chemistry 2004; 85: 633-640.
19. Pišek Š: Vrednotenje stabilnosti in antioksidativne učinkovitosti različnih koloidnih sistemov kot nosilcev za eterično olje poprove mete. Diplomaska naloga, fakulteta za farmacijo, 2016.
20. Koleva I.I, van Beek T.A, Linssen J.P.H, de Groot A, Evstatieva L.N: Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods. Phytochem. Anal. 2002; 13: 8-17.
21. Krakar D: Optimizacija metod za ugotavljanje antioksidativne aktivnosti izvlečka lubja navadne jelke (Abies Alba Mill.). Diplomaska naloga, fakulteta za farmacijo, 2011.