

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VESNA JURKAŠ

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM
FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VESNA JURKAŠ

**UGOTAVLJANJE ANTIOKSIDATIVNE
AKTIVNOSTI V RAZLIČNIH VRSTAH AJDE
(*Fagopyrum sp.*)**

**DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY
IN DIFFERENT BUCKWHEAT SPECIES
(*Fagopyrum sp.*)**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko biologijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Nine Kočever Glavač, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Eve Tavčar Benković, mag. farm.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Nini Kočever Glavač za vso pomoč in nasvete pri izdelavi magistrske naloge, saj si je vedno vzela čas za moja vprašanja in težave pri laboratorijskem delu ter pisanju magistrske naloge.

Hvala tudi somentorici asist. dr. Evi Tavčar Benković ter vsem zaposlenim na katedri za farmacevtsko biologijo, saj so bili vedno pripravljeni pomagati in me usmerjati pri mojih dilemah.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Nine Kočever Glavač, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Eve Tavčar Benković, mag. farm.

Vesna Jurkaš

Predsednik komisije: prof. dr. Aleš Mrhar, mag. farm.

Član komisije: izr. prof. dr. Janez Ilaš, mag. farm.

VSEBINA

1	UVOD	1
1.1	Reaktivne zvrsti in oksidativni stres	1
1.2	Antioksidanti	2
1.3	Flavonoidi	2
1.4	Rutin	3
1.5	Ajda	4
2	NAMEN DELA	6
3	MATERIALI IN METODE	7
3.1	Rastlinski material	7
3.2	Kemikalije	7
3.3	Aparature	8
3.4	Metode	9
3.4.1	Metoda DPPH	9
3.4.2	Metoda ABTS	9
3.4.3	Metoda reducirajoče moči antioksidanta.....	10
3.4.4	Metoda z 2-deoksi- <i>D</i> -ribozo	10
3.4.5	Metoda s tiocianatom	10
3.4.6	Metoda z β -karotenom	11
3.4.7	Metoda NADH	11
4	EKSPERIMENTALNO DELO	12
4.1	Priprava vzorcev	12
4.2	Ekstrakcija	12
4.3	Metode za ugotavljanje antioksidativne aktivnosti	12
4.3.1	Metoda DPPH	13
4.3.2	Metoda ABTS	13
4.3.3	Metoda reducirajoče moči antioksidanta.....	14
4.3.4	Metoda z 2-deoksi- <i>D</i> -ribozo	15
4.3.5	Metoda s tiocianatom	15
4.3.6	Metoda z β -karotenom	16
4.3.7	Metoda NADH	17
5	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	18
5.1	Metoda DPPH.....	18
5.1.1	Listi in cvetovi <i>F. esculentum</i> Moench sorte Darja.....	18
5.1.2	Cvetovi različnih vrst ajd	19

5.1.3	Plodovi različnih vrst ajd.....	19
5.1.4	Listi različnih vrst ajd.....	21
5.1.5	Standardi.....	22
5.1.6	Primerjava listov, cvetov in plodov.....	22
5.2	Metoda ABTS.....	23
5.2.1	Listi in cvetovi <i>F. esculentum</i> Moench sorte Darja.....	23
5.2.2	Cvetovi različnih vrst ajd	24
5.2.3	Plodovi različnih vrst ajd.....	25
5.2.4	Listi različnih vrst ajd.....	25
5.2.5	Primerjava standardov	27
5.2.6	Primerjava listov, cvetov in plodov.....	27
5.3	Metoda reducirajoče moči antioksidanta	28
5.3.1	Listi in cvetovi <i>F. esculentum</i> Moench sorte Darja.....	28
5.3.2	Cvetovi različnih vrst ajd	29
5.3.3	Plodovi različnih vrst ajd.....	30
5.3.4	Listi različnih vrst ajd.....	31
5.3.5	Primerjava standardov	32
5.3.6	Primerjava listov, cvetov in plodov.....	32
5.4	Metoda z 2-deoksi- <i>D</i> -ribozo.....	33
5.5	Metoda s tiocianatom.....	33
5.6	Metoda z β -karotenom.....	34
5.7	Metoda NADH	35
6	SKLEPI.....	36
7	LITERATURA	37
8	PRILOGA	39

POVZETEK

Kisik kot stranski produkt fotosinteze predstavlja vir življenja za aerobne organizme, hkrati pa je osnova radikalskih reakcij, ki vodijo v poškodbe proteinov, lipidov in DNA. Oksidativne poškodbe celic in tkiv lahko preprečujemo z antioksidanti. Ti so lahko endogenega izvora ali jih zaužijemo s hrano. Najbolj pogosti so vitamin C, vitamin E in β -karoten, v zadnjem času pa vse večjo pozornost dobivajo fenolne spojine. Med njih spadajo rutin, kvercetin in kvercitrin, ki jih najdemo v ajdi.

Namen magistrske naloge je bil ugotoviti antioksidativno aktivnost izvlečkov listov, cvetov in plodov pri različnih vrstah ajd. Ugotavljali smo tudi, kako se spreminja antioksidativna aktivnost vzorcev med rastjo ajde.

Za ugotavljanje antioksidativne aktivnosti smo uporabljali sedem različnih spektrofotometričnih metod (metode DPPH, ABTS, NADH in reducirajoče moči ter metode z 2-deoksi-*D*-ribozo, tiocianatom in β -karotenom). Vzorce ajd smo najprej zmleli, nato ekstrahirali v zmesi acetona in vode v razmerju 9 : 1 ter s filtriranjem dobili raztopine za nadaljnje analize z naštetimi metodami.

Metode so med seboj dale različne rezultate antioksidativne aktivnosti tudi, če so bili mehanizmi reakcij zasnovani na istem principu. Potrdili smo, da listi in cvetovi izkazujejo večjo antioksidativno aktivnost kot plodovi. Vrsta ajde, ki jo lahko izpostavimo kot najboljši vir antioksidativnih snovi, ker je pri več metodah izstopala po največji antioksidativni aktivnosti, je *F. leptopodum* 1977 (cvet, januarsko nabiranje).

Na podlagi rezultatov magistrske naloge smo zaključili, da predstavljajo različne vrste ajde dober vir polifenolnih spojin.

ABSTRACT

Oxygen as a by-product of photosynthesis is a source of life for aerobic microorganisms, while at the same time it is the basis of free-radical reactions, which lead to the damage of proteins, lipids and DNA. Oxidative damage of cells and tissues may be successfully prevented by antioxidants. The latter are of endogenous origin or can be delivered by food. The most common are vitamin C, vitamin E and β -carotene, and recently increasing attention is given to phenolic compounds. Among them, rutin, quercetin and quercitrin are found in buckwheat.

The purpose of this master's thesis was to determine the antioxidant activity of leaf, flower and fruit extracts of different buckwheat species. We also observed how the antioxidant activity changes during buckwheat growth.

We used seven different spectrophotometric methods (DPPH, ABTS, NADH, reducing power, 2-deoxy-*D*-ribose, thiocyanate method and β -carotene method) to determine the antioxidant activity. Buckwheat samples were first ground, then extracted with a mixture of acetone and water in a ratio of 9 : 1, and filtered to get the solutions for the subsequent analysis using the aforementioned methods.

The results varied greatly according to the method used, even if the mechanisms of reactions were based on the same principle. We confirmed that leaves and flowers exhibit a greater antioxidant activity than fruits. Buckwheat species with the highest antioxidative activity was *F. leptopodum* 1977 (flower, 4th sample).

Based on the results of this master's thesis, we concluded that different types of buckwheat represent a good source of polyphenolic compounds.

SEZNAM OKRAJŠAV

ABTS – 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina)

ABTS⁺ – 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)

DPPH – 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin

EDTA – etilendiaminotetraocetna kislina

NADH – nikotinamid adenin dinukleotid

NBT – nitromodro-tetrazolijev klorid

PMS – fenazin metasulfat

TBA – 2-tiobarbiturna kislina

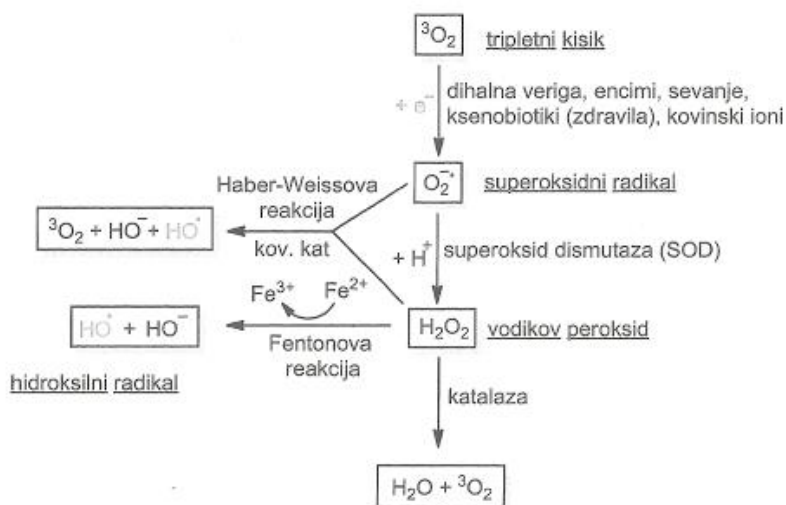
TCA – triklorocetna kislina

1 UVOD

1.1 REAKTIVNE ZVRSTI IN OKSIDATIVNI STRES

Radikali so atomi, ioni ali molekule, katerih reaktivna narava izvira iz enega ali več nesparjenih elektronov, ki težijo k pritegnitvi partnerskega elektrona. Nastanejo med enoelektronsko redukcijo ali oksidacijo ter s homolitsko cepitvijo kovalentne vezi pod vplivom toplote, svetlobe ali ultravijoličnega sevanja. Življenjska doba radikalov se giblje od območja milisekund do nekaj več desetletij. Reaktivnost radikalov temelji na odtegnitvi protona, adiciji na dvojno vez ali reakciji z drugim radikalom. Te reakcije so hitre in verižne (vedno znova nastajajo radikali) ter posledično stalno prisotne [1-3].

Kisik je nujno potreben za preživetje aerobov, vendar hkrati vir reakcij, pri katerih nastajajo potencialno nevarni kisikovi radikali in neradikalske kisikove zvrsti (slika 1). Poleg reaktivnih kisikovih zvrsti poznamo še reaktivne dušikove, žveplove, ogljikove in halogenske zvrsti. Gre za spojine, ki povzročajo nenadzorovano oksidacijo (oksidativni stres – glej spodaj) osnovnih gradnikov celic (lipidov, membran, proteinov, DNA) in s tem spremembo strukture in funkcije le-teh. Endogeni viri reaktivnih zvrsti so dihalna veriga oz. proces celičnega dihanja, oksidativni izbruh, imunski odziv ter metabolizem telesu lastnih in tujih snovi. Eksogeni viri reaktivnih zvrsti so ionizirajoče in ultravijolično sevanje, ultrazvok, različne kemikalije, tobačni dim, smog, kronični vnetni procesi itd [1-3].



Slika 1: Reaktivne kisikove zvrsti in njihove pretvorbe [2]

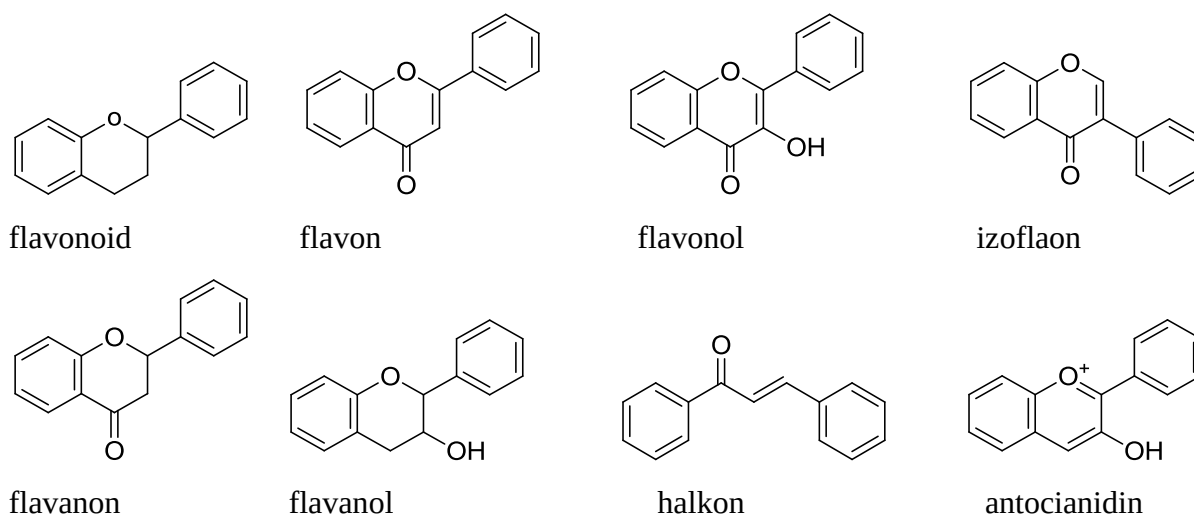
Oksidativni stres je porušeno dinamično ravnoesje med tvorbo reaktivnih zvrsti in antioksidativno zaščito v korist prvih. V stanju homeostaznega ravnoesja je prisoten blag odklon v korist oksidativnega stresa, ki deluje zaščitno; reaktivne zvrsti so namreč del imunskega odziva in vnetnih reakcij, ki tako sprožijo smrt patogenov ali rakavih celic ter povečajo odpornost telesu lastnih celic. Na drugi strani povečana tvorba reaktivnih zvrsti ali zmanjšana količina/funkcija endogenih in eksogenih antioksidantov privede do večjih odklonov, kar prispeva k nastanku različnih bolezenskih stanj [1-3].

1.2 ANTIOKSIDANTI

Antioksidant je snov, ki lahko upočasni ali prepreči oksidacijo biomolekul, če pa je ta že nastala, jo antioksidant lahko odstrani. Antioksidante delimo na endogene in eksogene. V prvo skupino uvrščamo encime (superoksid-dismutaza, katalaza, glutacion-peroksidaza) in neencimske nizkomolekulske spojine (glutacion, bilirubin, koencim Q, lipojska kislina, sečna kislina, melatonin), ki jih naše telo samo proizvaja, v drugo pa spojine, pridobljene s prehrano (askorbinska kislina, tokoferol, (poli)fenoli, karotenoidi). Prevelike količine antioksidantov lahko delujejo prooksidativno [1-3].

1.3 FLAVONOIDI

Flavonoide uvrščamo med fenolne spojine, odgovorne za značilno obarvanost cvetov, plodov in listov. Predstavljajo sekundarne metabolite rastlin (in gliv) s številnimi funkcijami: zaščita rastline pred mikroorganizmi in ultravijoličnim sevanjem, privabljanje opraševalcev, prevajanje signalov itd. Osnovno strukturo flavonoidov prikazuje slika 2. Pogosto so v obliki *O*-glikozidov ali redkeje kot *C*-glikozidi, kar jim daje vodotopne lastnosti. Glede na strukturo aglikonskega dela ločimo različne podtipe flavonoidov: flavone, flavonole, flavanole, flavanone, izoflavone, halkone in antocianidine (slika 2), od katerih sta v naravi najbolj pogosta prva dva [4, 5].

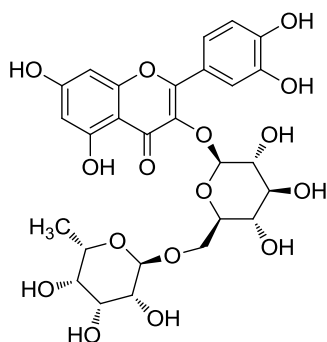


Slika 2: Kemijske strukture različnih flavonoidov

Glede na raznovrstnost flavonoidov imajo le-ti številne farmakološke učinke, kot so antioksidativno, protitumorno in protivnetno delovanje, zmanjšanje prepustnosti žil, estrogensko delovanje itn. Antioksidativno delovanje temelji na preprečevanju lipidne peroksidacije preko inaktivacije radikalov. Velike koncentracije flavonoidov imajo lahko ravno nasprotno oz. prooksidativno delovanje. Najpomembnejši viri flavonoidov so sadje (jagodičevje, šipek, citrusi, marelice), zelenjava (brokoli, špinača, paradižnik), rdeče vino, zeleni čaj, temna čokolada in nekatere zdravilne rastline (ginko, šentjanževka, kamilica, rman, pegasti badelj) [4, 5].

1.4 RUTIN

Rutin je flavonoid, ki ga najdemo v številnih rastlinah, vendar ga ajda po do sedaj znanih podatkih vsebuje največ. Nahaja se predvsem v cvetovih in listih, toda za razliko od različnih žit ajda rutin vsebuje tudi v plodovih. Vsebnost rutina v listih in cvetovih je pogojena z različnimi okoljskimi dejavniki, od katerih ima največji prispevek sevanje UV-B, pod vplivom katerega se poveča vsebnost tako rutina kot tudi drugega sekundarnega metabolita kvercitrina. Oba se naprej pretvarjata v kvercetin. Vsebnost rutina v plodovih je gensko pogojena. Rutin v svoji strukturi vsebuje dve molekuli sladkorja, vendar je kljub temu slabo topen v vodi; gram rutina lahko raztopimo šele v osmih litrih vode [6]. Prav tako se rutin slabo absorbira iz prebavnega trakta [7-9].



Slika 3: Kemijska struktura rutina

1.5 AJDA

Ajda (*Fagopyrum* sp.) spada v družino dresnovk (Polygonaceae), vendar jo zaradi uporabe semen pogosto uvrščamo med žita, ki pripadajo družini trav (Poaceae) [4]. Ime ajda izhaja iz nemške besede *Heide* kar pomeni »ajd, pogan«, namreč že v 12. stoletju so jo križarji prinesli iz poganskih krajev vzhodne Kitajske. Angleško poimenovanje *buckwheat* ter nemško *Buchweizen*, pomenita »bukovo žito«, kar govori o podobni obliki ajdovih plodov in bukovih semen. Poznamo 15 vrst ajd [12], od katerih je v Sloveniji najbolj zastopana navadna ajda (*F. esculentum*), v zadnjem času vse bolj tudi tatarska ajda (*F. tataricum*).

Navadna ajda je enoletna rastlina, ki povprečno zraste do višine 60 cm. Spodnji listi so pecljati, zgornji sedeči, oboji srčaste do puščičaste oblike. Cvetovi so bele do rdeče barve in združeni v mnogocvetna socvetja. Oprašujejo jih predvsem čebele, zato ajda spada med medonosne rastline. Ajda cveti od julija do oktobra, nato se razvijejo trirobi plodovi, s katerimi se tudi razmnožuje. Barva plodov variira od sive, rjave preko temnorjave do črne. Plodovi so sestavljeni iz trde zunanje luščine, v kateri je seme. V prehranski industriji semenom pravimo kaša. Z drgnjenjem žita ob trdo površino odstranijo luščine in zmes presejejo, da dobijo semena. Seme je zgrajeno iz zunanje semenske ovojnice, endosperma in kalčka (embrija). Z mletjem semen in dodatnim sejanjem pridobimo moko in zdrob.



Slika 4: Listi, cvetovi, plodovi in semena ajde *F. esculentum*

Ajdo primarno gojimo v prehranske namene [11]. Predvsem koristna je za diabetike in srčne bolnike zaradi počasi prebavljivega škroba [15] ter za ljudi s celiakijo, ker ne vsebuje glutena [11, 15], vse več raziskav pa potrjuje tudi njen terapevtski potencial. Zel ajde je bogata s flavonoidi, in sicer je od tega 2 do 10 % rutina [4], kolikor ga ne vsebuje nobena druga rastlina [13]. Prav tako vsebuje na splošno več polifenolov od večine drugih rastlin. V zeli ajde najdemo tudi hiperozid, kvercitrin in antocianine [4]. Raziskave potrjujejo, da rutin zavira encim hialuronidazo, katere aktivnost se poveča ob vnetnih spremembah.

Hialuronidaza razgrajuje hialuronsko kislino, ki je pomembna sestavina bazalne membrane kapilar. Rutin torej zmanjša prepustnost kapilar, tako da ohranja steno kapilar nepoškodovano in posledično ne nastajajo edemi [4, 14]. Poleg antiedemotoznega učinka je rutin v ajdi odgovoren tudi za njeno antioksidativno delovanje preko preprečevanja lipidne peroksidacije [4]. Na tem mestu je potrebno omeniti, da je izvleček ajde bolj učinkovit kot ekvivalenten odmerek rutina. Razlog za to leži v sinergističnem delovanju drugih flavonoidov in spojin, ki jih ajda vsebuje. V ajdi se nahaja tudi fagopirin, ki lahko povzroči znake fototoksičnosti, podobno kot hipericin iz šentjanževke [4, 6, 16].

2 NAMEN DELA

Namen magistrske naloge bo ugotavljanje antioksidativne aktivnosti v različnih vrstah ajde s pomočjo spektrofotometrije. Antioksidativno aktivnost bomo ugotavljali v listih, cvetovih in plodovih 7 različnih vrst ajd. Prav tako bomo ugotavljali, kako se med rastjo spreminja antioksidativna aktivnost v vzorcih listov in cvetov ajde *F.esculentum* Moench sorte Darja. Antioksidativno aktivnost vzorcev ajd bomo primerjali tudi z antioksidativno aktivnostjo standardov (vitamin C, vitamin E, rutin, kvercetin, kvercitrin). To so antioksidanti, ki jih z raznoliko prehrano vnašamo v telo.

Metode, s pomočjo katerih bomo ugotavljali antioksidativno aktivnost, bomo razdelili v dve skupini:

1. Metode, s katerimi bomo testirali vse vzorce:

- metoda DPPH,
- metoda ABTS,
- metoda reducirajoče moči.

2. Metode, s katerimi bomo dodatno testirali izbrane vzorce z največjo antioksidativno aktivnostjo:

- metoda z 2-deoksi-*D*-ribozo,
- metoda s tiocianatom,
- metoda z β -karotenom,
- metoda NADH.

Razlog za takšno delitev je zahtevnost izvedbe metod iz druge skupine, ki hkrati z velikim številom (87) vzorcev onemogoča ustrezno ponovljivost rezultatov. Na koncu bomo glede na rezultate izpostavili vrsto ajde oziroma del ajde, ki bo izkazal najboljše antioksidativne lastnosti.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

Analizirali smo osem različnih vrst ajd, katerih semena smo pridobili z Biotehniške fakultete. Vse ajde so rasle v enakih razmerah v koritih na sončni legi. Glede na količino razpoložljivega rastlinskega materiala smo analizirali cvetove, plodove in liste, nabrane v štirih časovnih točkah rasti ajde, in sicer po enem, dveh, treh in šestih mesecih rasti. Analizirali smo tudi vzorce listov in cvetov vrste *F. esculentum* sorte Darja, ki so jih nabirali v razmiku štirih dni znotraj časovnega obdobja od 3. 8. do 24. 9. 2015. Ajda je rasla na polju v Gameljnah pod Šmarno Goro.

3.2 KEMIČALIJE

1,1-Difenil-2-pikrilhidrazin, Fluka (Buchs, Švica)

2,2-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina) diamonijeva sol, p. a., Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)

2-Deoksi-*D*-riboza, Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)

2-Tiobarbiturna kislina, Merck KGaA (Darmstadt, Nemčija)

Aceton (J. T. Baker; Deventer, Nizozemska, Panreac; Barcelona, Španija)

Amonijev persulfat, Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)

Amonijev tiocianat, p. a., Merck KGaA (Darmstadt, Nemčija)

Dikolorometan

D- α -tokoferol, Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)

Etanol, absolutni, p. a., Carlo Erba reagenti (Rodano, Italija)

Etilendiamintetraocetna kislina, natrijeva sol, dihidrat, 99+ %, Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)

Fenazin metasulfat, ≥ 90 % (UV), Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)

Kalijev heksacianoferat(III), p. a., Kemika (Zagreb, Hrvaška)

Klorovodikova kislina, 37 %, p. a., Carlo Erba reagenti (Rodano, Italija)

L-askorbinska kislina, Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)

Linolna kislina, Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)

Metanol, p. a., Carlo Erba reagenti, (Rodano, Italija)
Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, p. a., Kemika (Zagreb, Hrvaška)
Natrijev hidroksid, brezvodne pelete, p. a., Carlo Erba reagenti (Rodano, Italija)
Nikotinamid adenin dinukleotid, reducirana dinatrijeva sol, 97%, Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)
Nitrotetrazolijev klorid modro, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)
 β -Karoten, Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)
Triklorocetna kislina, p. a., Merck KGaA (Darmstadt, Nemčija)
Tween 20, Fluka, Chemika, Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)
Vodikov peroksid 30 % raztopina v vodi, p. a., Merck KGaA, (Darmstadt, Nemčija)
Železov(II) klorid tetrahidrat, p.a, Merck KGaA (Darmstadt, Nemčija)
Železov(III) klorid heksahidrat, granulated, p. a., Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)

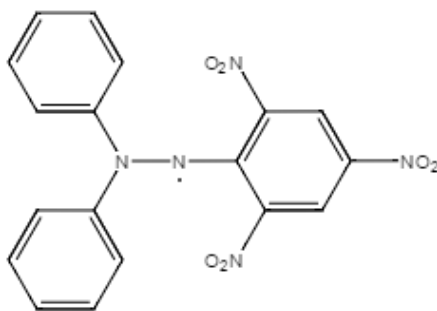
3.3 APARATURE

Avtomatske pipete, Biohit-Proline, Biohit (Helsinki, Finska)
Čitalec mikrotitrskih plošč Synergy H4, BioTek
Grelna plošča Camag TLC Plate Heater III, Camag (Muttens, Švica)
Kambič sušilnik SP-55 EASY
Mikrotitrne ploščice, TPP
Nastavki za pipete, Saerstedt (Numbrecht, Nemčija)
Spektrofotometer NANOCOLOR[®] UV/VIS II, Macherey-Nagel (Düren, Nemčija)
Tehtnica Kern & Sohn GmbH (Balingen, Nemčija)
Tehtnica Mettler Toledo XS205 Dual range
Ultrazvočna kadička Bandelin Sonorex Digitec

3.4 METODE

3.4.1 Metoda DPPH

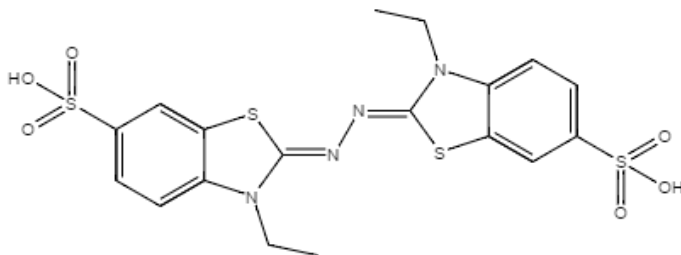
DPPH je stabilen radikal, ki ima absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 517 nm. Stabilnost molekule je posledica delokalizacije prostega elektrona po celotni molekuli, kar preprečuje, da bi le ta dimerizirala. Delokalizacija je tudi razlog za vijoličasto obarvanje molekule DPPH. Antioksidant kot donor vodikovih atomov povzroči nastanek reducirane oblike DPPH ter spremembo barve iz vijoličaste v rumeno, kar zaznamo z zmanjšanjem absorbance. Število vodikovih atomov, ki jih antioksidant lahko donira, določa stehiometrijo reakcije. Če antioksidant donira dva vodikova atoma, to pomeni, da reducira dve molekuli DPPH, in je stehiometrija 2 proti 1 [16] [17].



Slika 5: Kemijska struktura molekule DPPH

3.4.2 Metoda ABTS

Amonijev persulfat povzroči oksidacijo ABTS v radikal $\text{ABTS}^{\cdot+}$, ki je intenzivne modrozeleno barve z absorpcijskim maksimumom pri valovni dolžini 734 nm. Antioksidant privede do nastanka reducirane oblike radikala, kar opazimo kot razbarvanje raztopine in zmanjšanje absorbance [16] [18].



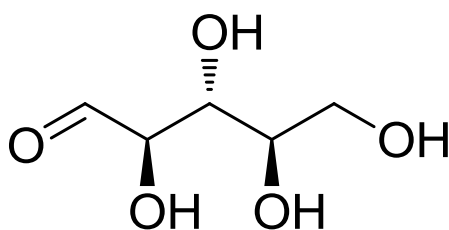
Slika 6: Kemijska struktura molekule ABTS

3.4.3 Metoda reducirajoče moči antioksidanta

Antioksidant kot reducirajoča spojina privede do pretvorbe feri oblike železa (Fe^{3+}) v fero obliko (Fe^{2+}). Pri tem se barva spremeni iz rumene v zelenomodro, odvisno od moči antioksidanta. Absorpcijski maksimum nastale oblike je pri valovni dolžini 700 nm. Vrednost absorbance je linearno odvisna od reducirajoče moči antioksidanta [16] [19] [20].

3.4.4 Metoda z 2-deoksi-*D*-ribozo

EDTA v prisotnosti askorbinske kisline kelira Fe^{3+} ione. Pride do redukcije Fe^{3+} in tako nastane kompleks Fe^{2+} -EDTA. Pod vplivom vodikovega peroksida pri pH 7,4 nastane hidroksilni radikal ($\text{OH}^\cdot$), zaradi česar se Fe^{2+} oksidira (Fentonova reakcija). 2-deoksi-*D*-riboza fragmentira pod vplivom $\text{OH}^\cdot$, kar v reakciji s tiobarbiturno kislino pri nizkem pH in visoki temperaturi vodi v nastanek rožnatega kromofora. Prisotnost antioksidanta prepreči nastanek $\text{OH}^\cdot$ in tako ni fragmentacije 2-deoksi-*D*-riboze ter ne nastaja krofor [16] [20] [21].



Slika 7: Kemijska struktura 2-deoksi-*D*-riboze

3.4.5 Metoda s tiocianatom

Oksidacija linolne kisline privede do nastanka lipidnih peroksidov, ki reagirajo z FeCl_2 in tvorijo rdečkasto obarvan kromogen z absorpcijskim maksimumom pri valovni dolžini 500 nm. Antioksidant prepreči tvorbo lipidnih peroksidov, kar opazimo z manj intenzivnim obarvanjem [16] [22].

4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 PRIPRAVA VZORCEV

Rastlinski material smo najprej zmleli; pri vrstah ajde, pri katerih smo imeli na razpolago zadostno količino materiala, smo le tega zmleli v kavnem mlinčku, pri ostalih vrstah, katerih količina razpoložljivega materiala je bila majhna, smo le tega zmleli v 2-mililitrski plastični epruveti s pomočjo električnega brusilnika. Nato smo natehtali po 100 mg posameznega zmletga vzorca v 15-mililitrsko plastično epruveto in dodali 10 mL ekstrakcijskega topila (zmes acetona in vode v razmerju 9 : 1). Pri vzorcih, kjer smo imeli na razpolago maso, manjšo od 100 mg, smo ustrezno prilagodili količino ekstrakcijskega topila, da smo ohranili navedeno razmerje.

4.2 EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je potekala v dveh delih z razmikom treh mesecev. V prvem delu smo ekstrahirali 45 vzorcev, v drugem pa še preostalih 42 vzorcev. Oba dela sta potekala na enak način. Po dodatku ekstrakcijskega topila smo plastične epruvete močno pretresli, da smo omočili rastlinski material, in jih dali v ultrazvočno kad. Inkubacija z ultrazvokom je potekala dve uri pri 60 °C (vodo smo predhodno ogreli, temperaturo pa vzdrževali z dolivanjem hladne vode). Po pretečenem času smo plastične epruvete za 22 ur prestavili na okenske police v ležec položaj, da so bile čim bolj izpostavljene sončni svetlobi. Nato smo jih ponovno za dve uri inkubirali z ultrazvokom pri 60 °C. Nato smo s pomočjo igle in plastične brizge odvzeli supernatant ter ga filtrirali skozi 0,22-mikrometrski filter.

4.3 METODE ZA UGOTAVLJANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

Pri prvi skupini metod za ugotavljanje antioksidativne aktivnosti (DPPH, ABTS in metoda reducirajoče moči) smo za primerjavo uporabljali pet standardov, in sicer vitamin C, vitamin E, rutin, kvercetin ter kvercitrin. Osnovne raztopine standardov smo pripravili tako, da smo v 15-mililitrsko plastično epruveto natehtali 1 mg posameznega standarda in dodali 10 mL

zmesi ekstrakcijskega topila ter shranjevali v hladilniku. Antioksidativno aktivnost smo določali spektrofotometrično. Teste smo izvajali v mikrotitrskih ploščicah z volumnom 330 μL . Vsak vzorec smo analizirali v treh ponovitvah in končno absorbanco podali kot povprečje. Posameznih testov antioksidativne aktivnosti nismo validirali zaradi prevelikega števila vzorcev in posledično prezahtevne izvedbe. Osnovne raztopine vzorcev in standardov smo večinoma uporabljali neposredno, redčili smo jih le v primeru, ko so bile izmerjene absorbance izven splošno veljavnega območja linearnosti (tj. med 0,1 in 1,0).

4.3.1 Metoda DPPH

Reagenti:

- 0,04 g/L DPPH v metanolu. Raztopina je fotosenzibilna, zato smo vsak dan delali s sveže pripravljeno raztopino.

Postopek izvedbe:

9 μL osnovne raztopine vzorca ali standarda smo dodali 225 μL raztopine DPPH. Za slepi vzorec smo uporabili 9 μL zmesi ekstrakcijskega topila, za kontrolni vzorec pa enako količino galne kisline (1 g/L), raztopljene v ekstrakcijskem topilu; s kontrolnim vzorcem smo dosegli maksimalno razbarvanje. 30 minut po zapolnitvi zadnjega stolpca mikrotitrne plošče smo raztopinam izmerili absorbanco pri valovni dolžini 517 nm.

Antioksidativno aktivnost smo izračunali s pomočjo enačbe 1:

$$AA = (A_{\text{slepa}} - A_{\text{vzorec}}) / (A_{\text{slepa}} - A_{\text{kontrola}}) \times 100.$$

4.3.2 Metoda ABTS

Reagenti:

- 7 mM raztopina ABTS v ekstrakcijskem topilu,
- 140 mM raztopina amonijevega persulfata v ekstrakcijskem topilu.

Najprej smo pripravili raztopino $\text{ABTS}^{\cdot+}$ tako, da smo 10 mL 7 mM raztopine ABTS dodali 178 μL 140 mM raztopine amonijevega persulfata. Bučko smo ovili z alu folijo in jo pustili

16 ur na sobni temperaturi. Potem smo raztopino ABTS^{•+} redčili s prečiščeno vodo, da smo pri valovni dolžini 734 nm dobili absorbanco 0,7.

Postopek izvedbe:

8 µL osnovne raztopine vzorca ali standarda smo dodali 312 µL raztopine ABTS^{•+}. Za slepi vzorec smo uporabili 8 µL zmesi ekstrakcijskega topila, za kontrolni vzorec pa enako količino galne kisline (1g/L), raztopljene v ekstrakcijskem topilu; s kontrolnim vzorcem smo dosegli maksimalno razbarvanje. Po 6 minutah smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 734 nm.

Antioksidativno aktivnost smo izračunali s pomočjo enačbe 2:

$$AA = (A_{\text{slepa}} - A_{\text{vzorec}}) / (A_{\text{slepa}} - A_{\text{kontrola}}) \times 100.$$

4.3.3 Metoda reducirajoče moči antioksidanta

Reagenti:

- 1-odstotna raztopina K₃Fe(CN)₆ v prečiščeni vodi,
- 10-odstotna raztopina TCA v prečiščeni vodi,
- 0,1-odstotna raztopina FeCl₃ · 6H₂O v prečiščeni vodi,
- 0,1 M fosfatni pufer (pH = 7,0).

Postopek izvedbe:

5 µL osnovne raztopine vzorca ali standarda smo dodali 54 µL 0,1 M pufru (pH 7,0) in 60 µL 1 % raztopine K₃Fe(CN)₆. Za slepi vzorec smo uporabili 54 µL 0,1 M pufru (pH 7,0) in 60 µL 1 % raztopine K₃Fe(CN)₆. Mikrotitrsko ploščo, napolnjeno z zgoraj opisanimi raztopinami, smo 20 minut inkubirali pri temperaturi 50 °C. Nato smo raztopinam dodali 30 µL 10-odstotne raztopine TCA in 150 µL prečiščene vode ter izmerili absorbanco pri valovni dolžini 700 nm (A₁). Zatam smo raztopinam dodali še 5 µL 0,1-odstotne raztopine FeCl₃ in ponovno pomerili absorbanco pri valovni dolžini 700 nm (A₂).

Reducirajočo moč antioksidantov smo izračunali po enačbi 3:

$$RM = (A_{2\text{vzorec}} - A_{1\text{vzorec}}) / (A_{2\text{slepi}} - A_{1\text{slepi}}).$$

4.3.4 Metoda z 2-deoksi-*D*-ribozo

Reagenti:

- 1 mM raztopina EDTA v fosfatnem pufru (pH = 7,4),
- 14 mM raztopina 2-deoksi-*D*-riboze v 0,2 M fosfatnem pufru (pH = 7,4),
- 10 mM raztopina H₂O₂ v 0,2 M fosfatnem pufru (pH = 7,4),
- 10-odstotna raztopina TCA in 0,5-odstotna raztopina TBA v prečiščeni vodi,
- 1 mM raztopina askorbinske kisline v 0,2 M fosfatnem pufru (pH = 7,4),
- 1 mM raztopina FeCl₃ · 6H₂O v vodi,
- 0,2 M fosfatni pufer (pH = 7,4).

1 mM raztopina FeCl₃ · 6H₂O mora biti sveže pripravljena tik pred izvedbo metode, saj hitro oksidira, kar opazimo kot oranžno obarvanje.

Postopek izvedbe:

100 µL osnovne raztopine vzorca smo dodali 100 µL 0,2 M fosfatnega pufera (pH = 7,4), 100 µL 1 mM raztopine askorbinske kisline, 100 µL 1 mM raztopine EDTA, 200 µL 1 mM raztopine FeCl₃ · 6H₂O, 200 µL 14 mM raztopine 2-deoksi-*D*-riboze in na koncu še 100 µL 10 mM raztopine H₂O₂. Za kontrolni vzorec smo uporabili ekstrakcijsko topilo in dodali zgoraj našteje reagente, enako kot pri osnovni raztopini vzorca. Kontrolno in vzorčne raztopine smo eno uro inkubirali pri temperaturi 37 °C. Nato smo raztopinam dodali 1 mL raztopine 10-odstotne TCA in 0,5-odstotne TBA, da smo ustavili potek reakcije, ter raztopine za 30 minut izpostavili vreli vodi in nato ohladili na ledu. 200 µL reakcijske zmesi smo prenesli v mikrotitrsko ploščo in pomerili absorbanco pri 535 nm.

Odstotek inhibicije oksidacije 2-deoksi-*D*-riboze smo izračunali po enačbi 4:

$$\% \text{ inhibicije} = ((A_{\text{kontrola}} - A_{\text{vzorec}}) / A_{\text{kontrola}}) \times 100.$$

4.3.5 Metoda s tiocianatom

Reagenti:

- 2,51-odstotna raztopina linolne kisline v ekstrakcijskem topilu,
- 30-odstotna raztopina NH₄SCN v prečiščeni vodi,

- 0,02 M raztopina $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ v 3,5-odstotni (V/V) raztopini HCl v prečiščeni vodi,
- 0,1 M fosfatni pufer (pH = 7,0).

Postopek izvedbe:

40 μL osnovne raztopine vzorca smo dodali 41 μL 2,51 % raztopine linolne kisline v ekstrakcijskem topilu, 80 μL 0,1 M fosfatnega pufera (pH = 7,0) in 39 μL prečiščene vode. Kontrolno raztopino smo pripravili tako, da smo 40 μL ekstrakcijskega topila dodali enake reagente kot osnovnim raztopinam vzorca. Pripravljene raztopine smo tesno zaprli v 2-mililitrske plastične epruvete in inkubirali 24 ur pri 37 °C. 5 μL posamezne raztopine smo dodali 200 μL ekstrakcijskega topila, 5 μL 30-odstotne raztopine NH_4SCN in 5 μL 0,02 M raztopine FeCl_2 v 3,5-odstotni raztopini HCl. Po preteku točno 3 minut od dodatka zadnjega reagenta smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 500 nm.

Odstotek inhibicije peroksidacije linolne kisline smo izračunali po enačbi 5:

$$\% \text{ inhibicije} = (1 - (A_{\text{vzorec}} / A_{\text{kontrola}})) \times 100.$$

4.3.6 Metoda z β -karotenom

Reagenti:

- 0,2-odstotna raztopina β -karotena v CH_2Cl_2 ,
- linolna kislina,
- 0,4-odstotna (V/V) raztopina Tween 20 v ekstrakcijskem topilu.

Raztopina radikalov:

2,5 μL linolne kisline smo dodali 18 μL 0,4-odstotne raztopine Tween 20 in 100 μL 0,2-odstotne raztopine β -karotena v CH_2Cl_2 . Pustili smo, da CH_2Cl_2 izhlapi v digestoriju in ga do konca odstranili s prepihanjem z argonom. Nato smo dodali 5 mL prečiščene vode in močno stresali, da se je β -karoten raztopil.

Postopek izvedbe:

40 μL posameznega vzorca smo dodali 200 μL raztopine radikalov. Kontrolno raztopino smo pripravili tako, da smo 40 μL 0,4-odstotne raztopine Tween 20 dodali 200 μL raztopine

radikalov. Spektrofotometer smo segreli na 50 °C in vzorce inkubirali 120 minut. Absorbanco smo merili v 15-minutnih intervalih pri valovni dolžini 470 nm tako, da smo prvo meritev izvedli ob času nič in zadnjo ob 120. minuti.

Odstotek inhibicije razbarvanja β -karotena smo izračunali po enačbi 6:

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

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

4.3.7 Metoda NADH

Reagenti:

- 156 μ M NBT v fosfatnem pufru (pH = 7,4),
- 468 μ M NADH v fosfatnem pufru (pH = 7,4),
- 60 μ M PMS v fosfatnem pufru (pH = 7,4),
- 0,1 M fosfatni pufer (pH = 7,4).

Vse raztopine je potrebno pripraviti tik pred izvedbo metode, še posebej občutljiva je raztopina PMS, ki hitro spreminja barvo iz rumene preko zelene do modre.

Postopek izvedbe:

25 μ L osnovne raztopine vzorca smo dodali 125 μ L 156 μ M raztopine NBT in 100 μ L 468 μ M raztopine NADH. Kontrolno raztopino smo pripravili tako, da smo 25 μ L ekstrakcijskega topila dodali 125 μ L 156 μ M raztopine NBT in 100 μ L 468 μ M raztopine NADH. Začetek reakcije je pogojen z dodatkom 12,5 μ L 60 μ M PMS. Absorbanco pri valovni dolžini 560 nm smo pomerili 5 minut po dodatku zadnjega reagenta.

Odstotek inhibicije nastanka superoksidnega radikala smo izračunali po enačbi 7:

$$\% \text{ inhibicije} = (A_{\text{kontrola}} - A_{\text{vzorec}}) / A_{\text{kontrola}} \times 100.$$

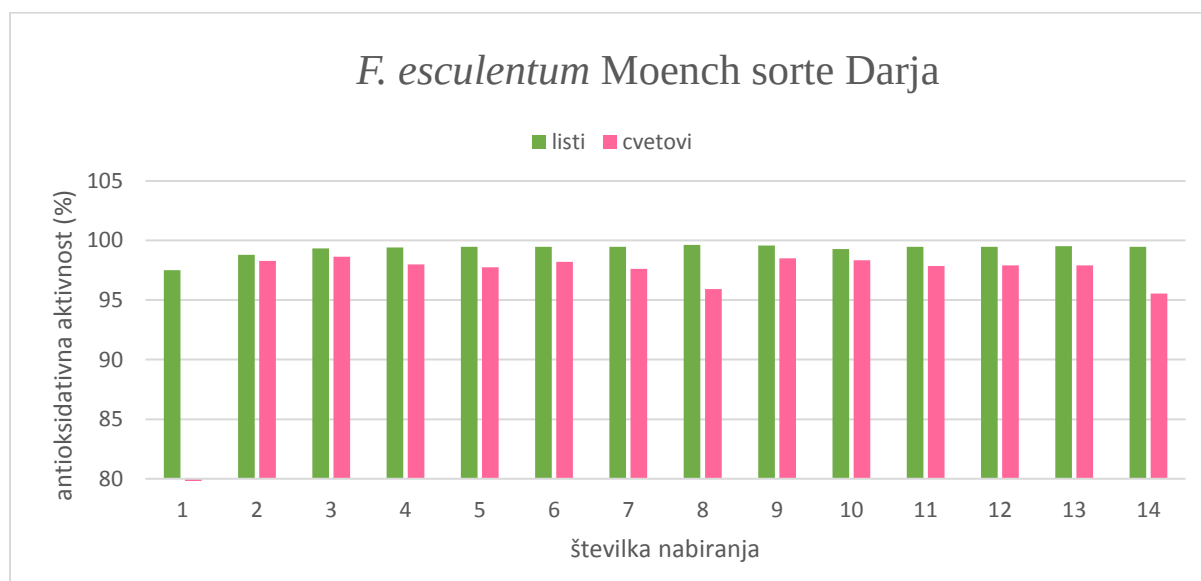
5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 METODA DPPH

5.1.1 Listi in cvetovi *F. esculentum* Moench sorte Darja

Pri navedeni ajdi smo analizirali vzorce listov in cvetov, nabranih v času rasti ajde na vsake štiri dni. Rezultate metode DPPH prikazuje graf 1.

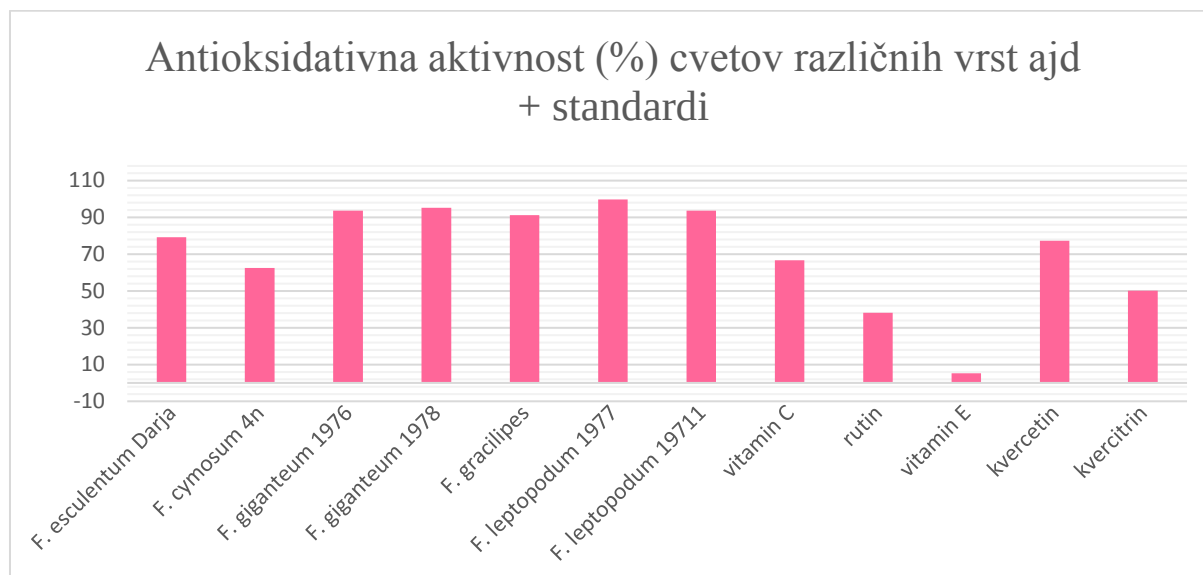
Pri metodi DPPH antioksidativna aktivnost v vzorcih listov med rastjo ajde ostaja skoraj enaka (99,3 do 99,6 %), razen na samem začetku, ko je le nekoliko manjša (97,5 % pri vzorcih listov 1. nabiranja in 98,8 % pri vzorcih 2. nabiranja). Te razlike so majhne in lahko izhajajo iz eksperimentalne napake ($KV < 3$). Vzorci cvetov kažejo v primerjavi z vzorci listov manjšo antioksidativno aktivnost (95,5 do 98,6 %). Pri vzorcih cvetov opazimo upad antioksidativne aktivnosti pri 8. in zadnjem (14.) nabiranju. Razlog so lahko stresni dejavniki, katerim je rastlina bila izpostavljena (suša, vlaga, temperaturni šok). Vzrok za padec antioksidativne aktivnosti pri vzorcu zadnjega nabiranja bi bila lahko tvorba plodov (razlaga na str. 20).



Graf 1: Spreminjanje antioksidativne aktivnosti vzorcev listov in cvetov *F. esculentum* Moench Darja pri metodi DPPH med rastjo ajde. Med posameznim nabiranjem je razmik štirih dni.

5.1.2 Cvetovi različnih vrst ajd

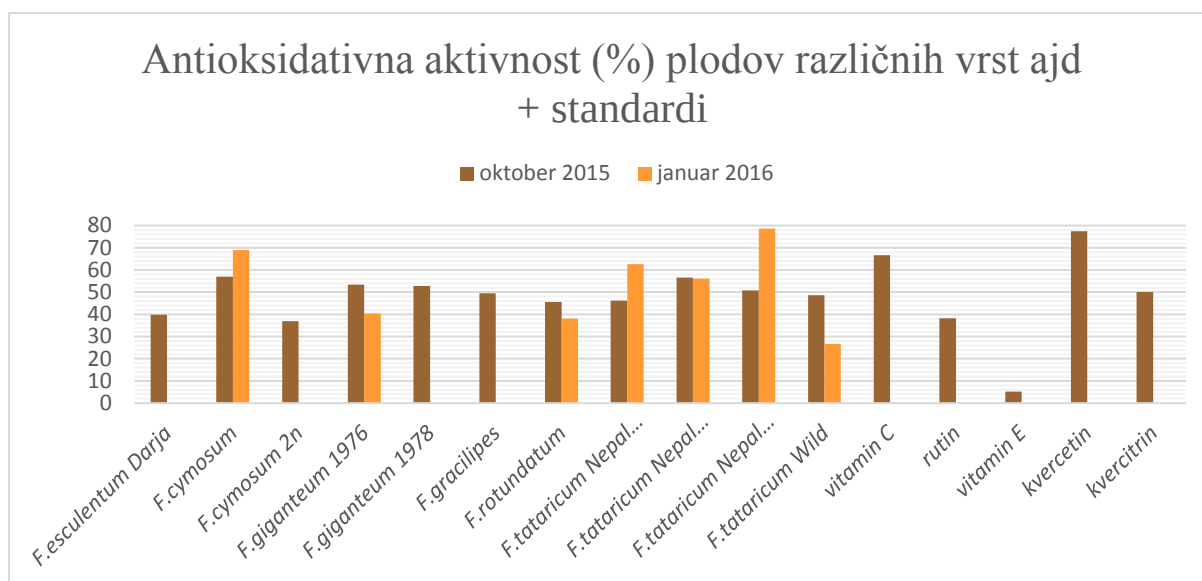
Na voljo smo imeli cvetove sedmih vrst ajd (graf 2). Uporabili smo tudi standarde v koncentraciji 0,1 mg/mL (100 krat manjša koncentracija kot pri vzorcih), in sicer vitamin C, vitamin E, rutin, kvercetin in kvercitrin. Našteti standardi so pogosti antioksidanti v prehrani človeka ter tako olajšajo primerjavo rezultatov. Vzorci cvetov *F. giganteum* 1976, *F. giganteum* 1978, *F. gracilipes*, *F. leptopodum* 1977 in *F. leptopodum* 19711 so pokazali več kot 90-odstotno antioksidativno aktivnost, za nekoliko slabša antioksidanta pa sta se izkazala vzorca cvetov *F. esculentum* sorte Darja (79,2 %) in *F. cymosum* 4n (62,4 %). Omeniti velja tudi razliko v antioksidativni aktivnosti vzorcev cvetov vrste *F. esculentum* z različnih rastišč (pod Šmarno Goro (podpoglavje 5.1.1) in Semič (spodaj)).



Graf 2: Antioksidativna aktivnost vzorcev cvetov različnih vrst ajd pri metodi DPPH.

5.1.3 Plodovi različnih vrst ajd

Med seboj smo primerjali antioksidativno aktivnost vzorcev plodov šestih vrst ajd, nabranih oktobra 2015 in januarja 2016: *F. esculentum*, *F. cymosum*, *F. giganteum*, *F. gracilipes*, *F. rotundatum* in *F. tataricum* (graf 3).



Graf 3: Antioksidativna aktivnost vzorcev plodov različnih vrst ajd pri metodi DPPH.

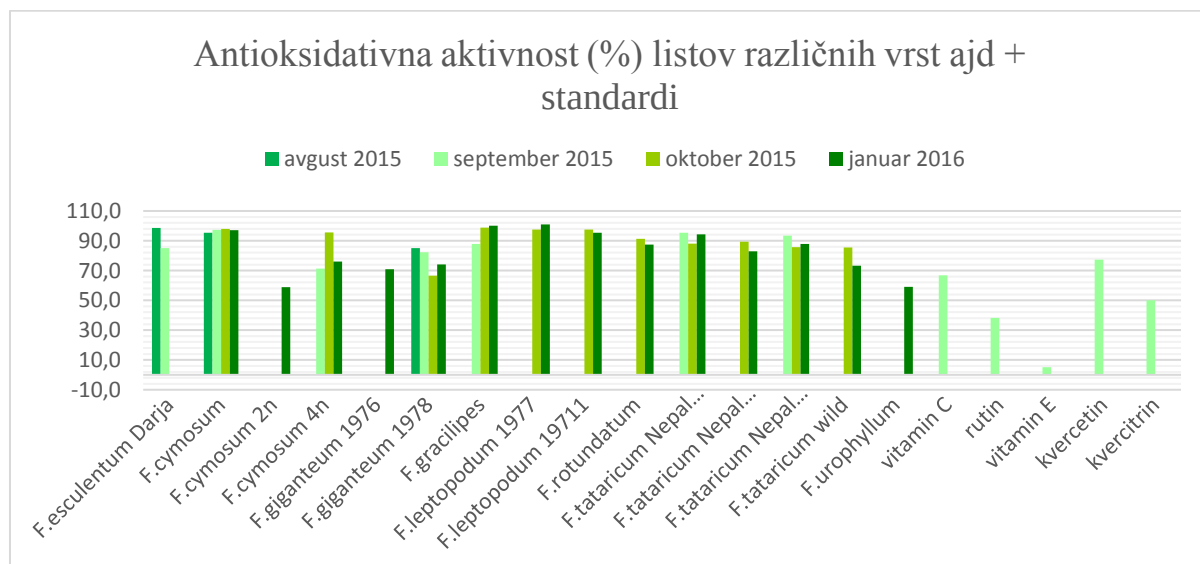
F. tataricum Nepal 1303 se je pokazala kot najbolj obetavna glede antioksidativne aktivnosti vzorcev plodov, nabranih januarja (78,6 %), *F. cymosum* pa glede antioksidativne aktivnosti plodov nabranih oktobra (57,0 %). Najmanjšo antioksidativno aktivnost oktobrskega nabiranja so dali plodovi *F. cymosum* 2n (36,9 %), januarskega pa *F. tataricum* Wild (26,7 %). Oktobrske vrednosti antioksidativne aktivnosti med seboj bistveno manj nihajo (36,9 do 57,0 %) v primerjavi z januarskimi (26,7 do 78,6 %). Vidimo tudi, da se antioksidativna aktivnost s časom ne spreminja enako, saj pri vzorcih *F. cymosum*, *F. tataricum* Nepal 1301 in *F. tataricum* Nepal 1303 naraste, pri vzorcih *F. giganteum* 1976, *F. rotundatum* in *F. tataricum* Wild pade, pri vzorcu *F. tataricum* Nepal 1302 pa ostane praktično enaka. Poleg tega so slabo primerljive vrednosti antioksidativne aktivnosti med različnimi vzorci istih vrst iz istega obdobja nabiranja: vsi vzorci *F. tataricum*, nabrani oktobra oziroma januarja, dajejo zelo različne vrednosti. Nasprotno pa smo podobno antioksidativno aktivnost dobili pri obeh vzorcih *F. giganteum* oktobrskega nabiranja. Različne vrste so medsebojno neenakomerno dozorevale. Ko so se pri eni vrsti plodovi že popolnoma razvili in začeli odpadati se je pri drugi vrsti šele začela pretvorba cvetov v plodove. Različno dozorevanje je tako dodaten razlog za slabo primerljivost.

Rast antioksidativne aktivnosti pri vzorcih *F. cymosum*, *F. tataricum* Nepal 1301 in *F. tataricum* Nepal 1303 bi lahko pomenila, da ima bolj razvita rastlina (zreli plodovi) večji antioksidativni potencial. Ob upoštevanju te predpostavke, bi lahko manjšo antioksidativno aktivnost plodov, nabranih januarja (*F. giganteum* 1976, *F. rotundatum* in *F. tataricum* Wild), razložili kot posledico premalo razvitih plodov, nabranih oktobra. Vzorce plodov, ki smo jih

analizirali, so namreč ob nabiranju opredelili kot plod takoj, ko se je začela najmanjša možna vidna sprememba cveta v plod. Ker imajo cvetovi bistveno večjo antioksidativno aktivnost kot plodovi, bi lahko nedozorel plod, na katerem so še vidni ostanki cvetov, lažno prispeval k večji antioksidativni aktivnosti.

5.1.4 Listi različnih vrst ajd

Med seboj smo primerjali antioksidativno aktivnost vzorcev listov osmih vrst ajd, nabranih avgusta 2015, septembra 2015, oktobra 2015 in januarja 2016: *F. esculentum*, *F. cymosum*, *F. giganteum*, *F. gracilipes*, *F. leptopodum*, *F. rotundatum*, *F. tataricum* in *F. urophyllum* (graf 4).

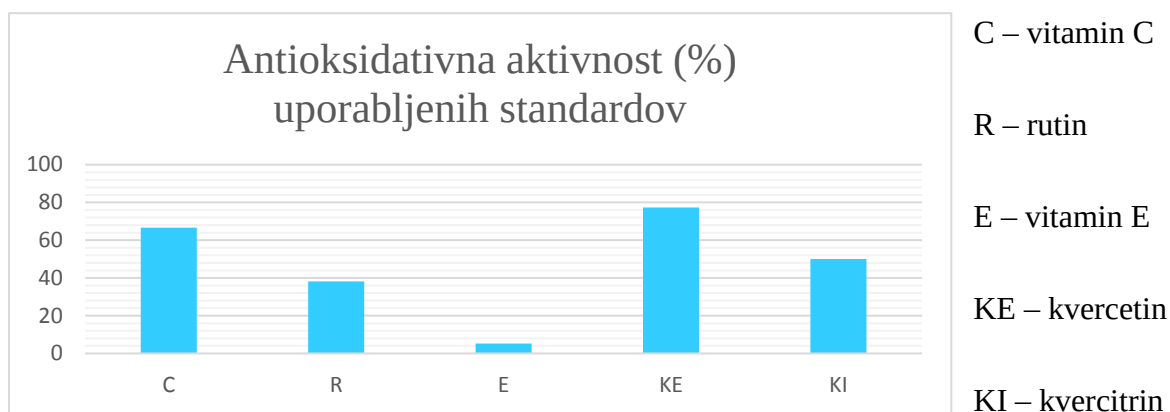


Graf 4: Antioksidativna aktivnost vzorcev listov različnih vrst ajd pri metodi DPPH.

Meritve vzorcev listov tistih vrst, pri katerih smo imeli na voljo liste vsaj dveh nabiranj, so pokazale, da se med rastjo antioksidativna aktivnost v vzorcih listov spreminja v razponu do približno 15 %, z izjemo vzorcev listov *F. cymosum* 4n z razponom 24,5 %. Z vidika primerjave antioksidativne aktivnosti vzorcev listov istega nabiranja (januarja) so največji antioksidativni potencial (100 %) pokazali listi *F. leptopodum* 1977 ter *F. gracilipes*, medtem ko so najmanjšo antioksidativno aktivnost dali listi *F. cymosum* 2n (58,9 %).

5.1.5 Standardi

Med seboj smo primerjali antioksidativno aktivnost standardov v koncentraciji 0,1 mg/mL, ki se kot antioksidanti pogosto pojavljajo v prehrani človeka, in sicer vitamin C, rutin, vitamin E, kvercetin ter kvercitrin (graf 5).



Graf 5: Antioksidativna aktivnost standardov pri metodi DPPH.

Pri metodi DPPH se je kot najboljši antioksidant pokazal kvercetin (77,4 %), za katerim so se po padajoči antioksidativni aktivnosti zvrstili vitamin C (66,7%), kvercitrin (50,1 %), rutin (38,2 %) in vitamin E (5,2 %).

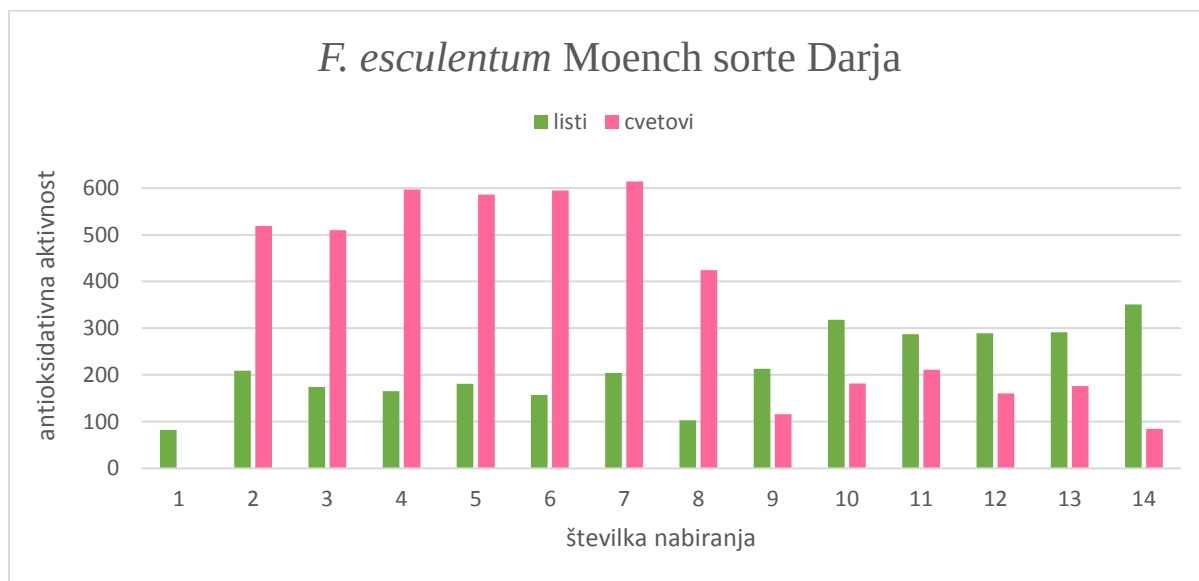
5.1.6 Primerjava listov, cvetov in plodov

Medsebojna primerjava antioksidativne aktivnosti vzorcev listov, cvetov in plodov, testiranih z metodo DPPH, je pokazala, da se cvetovi in listi ne razlikujejo bistveno glede antioksidativnega potenciala, medtem ko so se plodovi izkazali kot slabši antioksidanti.

5.2 METODA ABTS

5.2.1 Listi in cvetovi *F. esculentum* Moench sorte Darja

Pri navedeni ajdi smo analizirali vzorce listov in cvetov, nabranih v času rasti ajde na vsake štiri dni. Rezultate metode ABTS prikazuje graf 6.

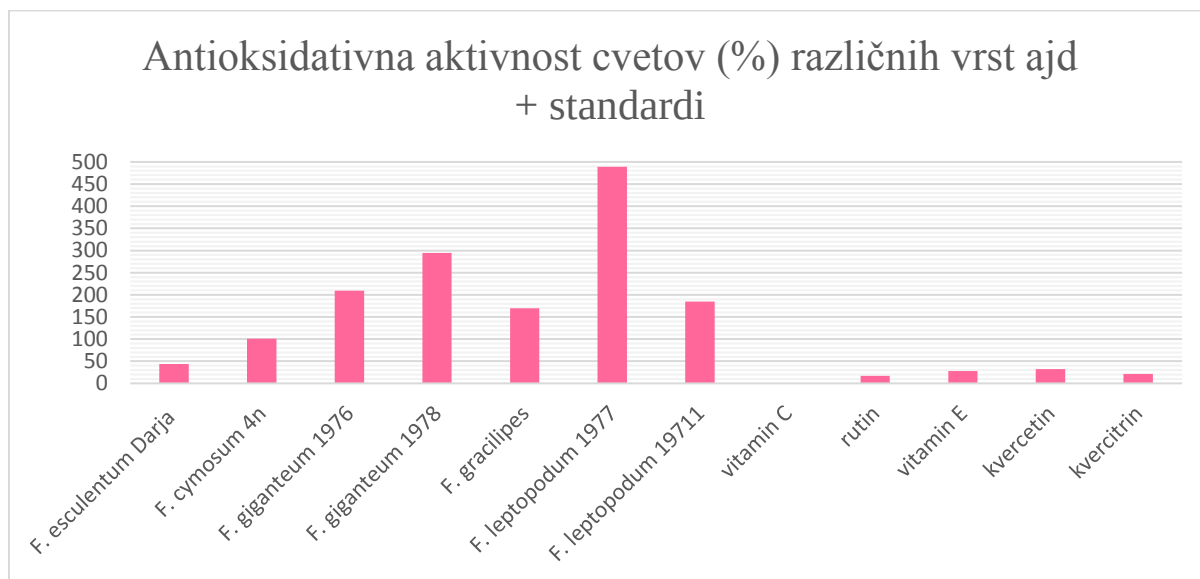


Graf 6: Spreminjanje antioksidativne aktivnosti listov in cvetov *F. esculentum* Moench Darja pri metodi ABTS med rastjo ajde. Med posameznim nabiranjem je razmik štirih dni. Antioksidativne aktivnosti presegajo 100 % zaradi redčenja vzorcev, ki je bilo potrebno zaradi zagotovitve splošnega območja linearnosti absorbanč.

Ugotovili smo, da je antioksidativna aktivnost v vzorcih listov najmanjša na začetku rasti ajde (1. nabiranje 82,5 %), nato se precej poveča (z izjemo vzorca 8. nabiranja) ter doseže največje vrednosti med 10. in 14. nabiranjem (287,4 % do 351,2 %). Antioksidativna aktivnost v vzorcih cvetov je v primerjavi z vzorci listov bistveno večja (približno trikrat) v prvi polovici rasti ajde, nato pa se v drugi polovici, po 8. nabiranju, izrazito zmanjša in pade pod vrednosti antioksidativne aktivnosti vzorcev listov v tem obdobju. Nihanje rezultatov s časom je lahko posledica nihanja pogojev rasti, vremena, zalivanja in ostalih stresorjev katerim je rastlina bila časovno različno izpostavljena. Razlog za upad antioksidativne aktivnosti proti koncu rasti je lahko tudi začetek tvorbe plodov (glej str. 20).

V primerjavi z metodo DPPH so pri metodi ABTS opazne bistveno večje razlike antioksidativne aktivnosti med vzorci cvetov in listov ter med prvo in drugo polovico rasti ajde, kar preseneča glede na to, da obe metodi temeljita na podobnem mehanizmu delovanja.

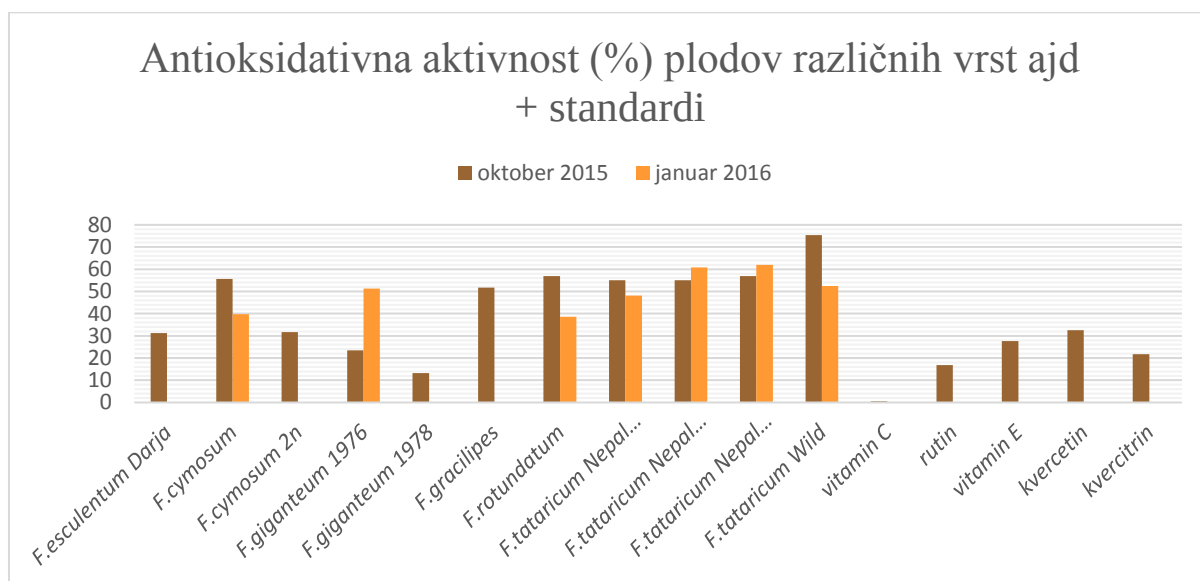
5.2.2 Cvetovi različnih vrst ajd



Graf 7: Antioksidativna aktivnost vzorcev cvetov različnih vrst ajd pri metodi ABTS.

Pri metodi ABTS so vzorci cvetov različnih vrst ajd (graf 7) pokazali zelo velik razpon vrednosti antioksidativne aktivnosti (44,0 do 489,2 %) v primerjavi z metodo DPPH (62,4 do 99,8%). Najmanjši antioksidativni potencial pri metodi ABTS je imel vzorec *F. esculentum* Darja (44,0 %). Kot najboljši antioksidant je izstopal vzorec *F. leptopodum* 1977, in sicer z izjemno antioksidativno aktivnostjo (489,2 %) v primerjavi s cvetovi drugih vrst; ta vzorec je imel največjo antioksidativno aktivnost tudi pri metodi DPPH.

5.2.3 Plodovi različnih vrst ajd



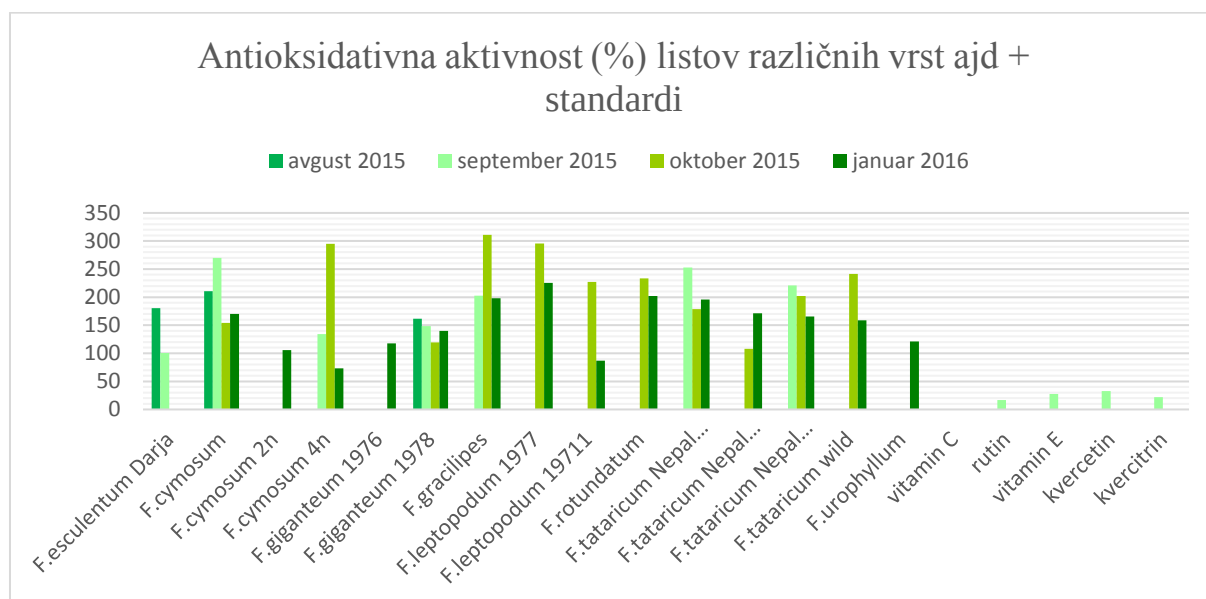
Graf 8: Antioksidativna aktivnost vzorcev plodov različnih vrst ajd pri metodi ABTS.

Pri metodi ABTS so pokazali največji antioksidativni potencial vzorci plodov *F. tataricum*, in sicer *F. tataricum* Wild pri oktobrskem nabiranju (75,3 %) ter *F. tataricum* Nepal 1303 pri januarskem nabiranju (62,0 %). Najmanjšo antioksidativno aktivnost so dali vzorci plodov *F. giganteum* 1978 v oktobrskem nabiranju (13,3 %) ter *F. rotundatum* (38,6 %) v januarskem nabiranju (graf 8). Enako kot pri metodi DPPH oktobrske vrednosti antioksidativne aktivnosti nihajo bolj v primerjavi z januarskimi. Opazimo, da se tako kot pri metodi DPPH tudi pri metodi ABTS antioksidativna aktivnost s časom ne spreminja enako; pri vzorcih *F. giganteum* 1976, *F. tataricum* Nepal 1302 in *F. tataricum* Nepal 1303 naraste, pri *F. cymosum*, *F. rotundatum*, *F. tataricum* Nepal 1301 in *F. tataricum* Wild pade. Različni vzorci *F. tataricum* iz istega obdobja nabiranja (oktober) dajejo primerljive vrednosti antioksidativne aktivnosti, z izjemo *F. tataricum* Wild. Pri vrstah *F. cymosum* in *F. giganteum* različna vzorca iz istega obdobja nabiranja ne dajeta primerljivih rezultatov. Nihanja rezultatov so lahko posledica neenakomernega dozorevanja plodov. Rezultati metode ABTS so slabo primerljivi z rezultati metode DPPH, ki prav tako temelji na lovljenju radikalov.

5.2.4 Listi različnih vrst ajd

Z metodo ABTS smo ponovno prišli do nekoliko drugačnih zaključkov v primerjavi z metodo DPPH. Z grafa 9 je razvidno, da so pri določenih vrstah ajd (*F. cymosum* 4n, *F. gracilipes*, *F.*

leptopodum (1977 in 19711), *F. rotundatum* ter *F. tataricum* Wild) vzorci listov oktobrskega nabiranja pokazali bistveno večjo antioksidativno aktivnost v primerjavi z januarskim in septembrskim nabiranjem.



Graf 9: Antioksidativna aktivnost vzorcev listov različnih vrst ajd pri metodi ABTS.

Glede na oktobrsko nabiranje so največjo antioksidativno aktivnost dali listi *F. gracilipes* (310,8 %), takoj za tem pa *F. leptopodum* 1977 (225,3 %) ter *F. cymosum* 4n (294,9 %), najmanjšo antioksidativno aktivnost pa listi *F. tataricum* Nepal 1302 (107,8 %). Listi januarskega nabiranja so dali zanimiv rezultat, namreč največji antioksidativni potencial so tudi tukaj dali listi *F. leptopodum* 1977 (225,3 %), najmanjši pa listi *F. cymosum* 4n (73,5 %), ki so tretji najboljši pri oktoborskem nabiranju. Januarsko nabiranje obeh podvrst *F. giganteum* ter vseh podvrst tatarskih ajd daje podobne rezultate, medtem ko je pri podvrstah *F. cymosum* in *F. leptopodum* nekoliko večja razlika. Do teh razlik lahko pride zaradi neenakomernega razvoja različnih vrst ajd. Namreč poganjanje, rast, cvetenje, tvorba plodov in odmiranje rastline ni pri vseh vrstah potekalo enako hitro.

5.2.5 Primerjava standardov



Graf 10: Antioksidativna aktivnost standardov pri ABTS metodi.

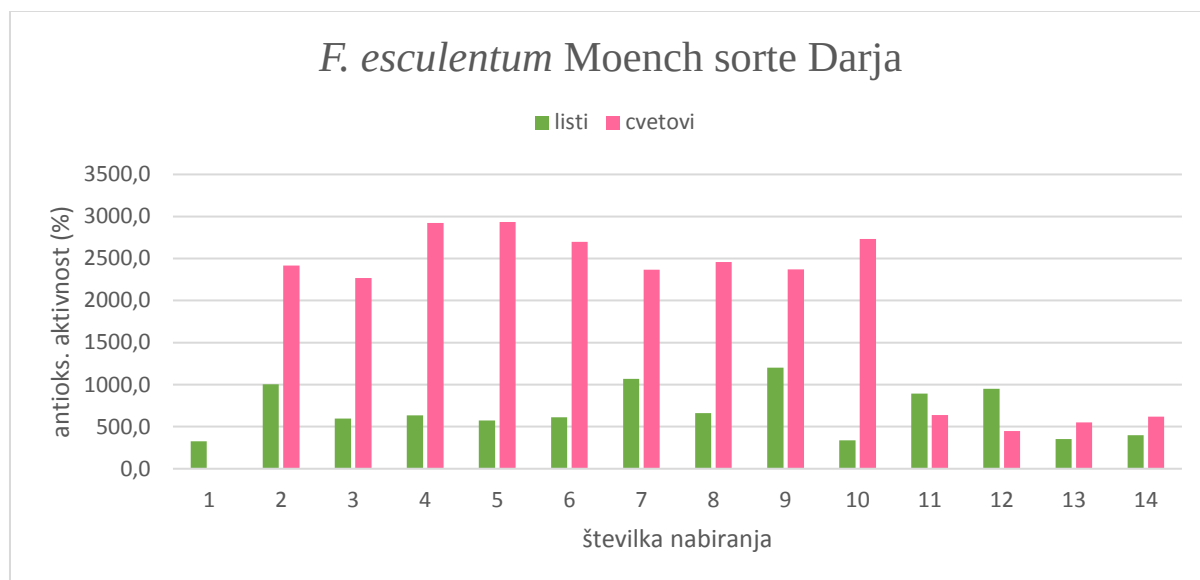
Kvercetin se je tudi pri metodi ABTS (graf 10) pokazal kot standard z največjo antioksidativno aktivnostjo (32,5 %), takoj za njim sledita vitamin E (27,7 %) in kvercitrin (21,7 %), vendar so vrednosti precej manjše kot pri metodi DPPH. Poleg tega smo z metodo ABTS vitaminu C dokazali zelo slabe antioksidativne lastnosti, a dobre za vitamin E, kar je ravno obratno kot pri metodi DPPH.

5.2.6 Primerjava listov, cvetov in plodov

Z metodo ABTS smo dokazali, da imajo listi boljši antioksidativni potencial kot plodovi, rezultati za vzorce cvetov pa so bolj variabilni, zato bi bilo smiselno raziskavo ponoviti z večjim številom vzorcev. Za vrste, pri katerih smo imeli na voljo tako cvetove kot plodove (*F. giganteum*, *F. gracilipes*, *F. esculentum* Darja), smo potrdili, da so plodovi šibkejši antioksidanti kot cvetovi, kar potrjuje tudi metoda DPPH.

5.3 METODA REDUCIRAJOČE MOČI ANTIOKSIDANTA

5.3.1 Listi in cvetovi *F. esculentum* Moench sorte Darja



Graf 11: Spreminjanje antioksidativne aktivnosti vzorcev listov in cvetov *F. esculentum* Moench Darja pri metodi reducirajoče moči med rastjo ajde. Med posameznim nabiranjem je razmik štirih dni. Antioksidativne aktivnosti presegajo 100 % zaradi redčenja vzorcev, ki je bilo potrebno zaradi zagotovitve splošnega območja linearnosti absorbanč.

Z metodo reducirajoče moči antioksidanta smo ugotovili, da imajo vzorci listov na začetku rasti (1. nabiranje) manjšo antioksidativno aktivnost (327,3 %), ki nato naraste, vendar začne po 7. nabiranju precej nihati (graf 11). Vzorci cvetov kažejo v začetnem in srednjem obdobju rasti bistveno večjo antioksidativno aktivnost (2269 % do 2933 %) kot na koncu rasti (po 10. nabiranju), kar je verjetno posledica tvorbe plodov. Vzorci cvetov v primerjavi z vzorci listov kažejo približno trikrat večjo antioksidativno aktivnost v začetnem in srednjem obdobju rasti, na koncu rasti pa se ta razlika bistveno zmanjša ter pri 11. in 12. nabiranju pade pod antioksidativno aktivnostjo vzorcev listov. Vzrok tako velike raznolikosti so lahko različni stresorji, katerim je rastlina izpostavljena, tako npr. suša ali nevihta spremenita metabolizem antioksidantov in drugih snovi v smeri izgradnje ali razgradnje kar lahko vpliva na rezultate testov.

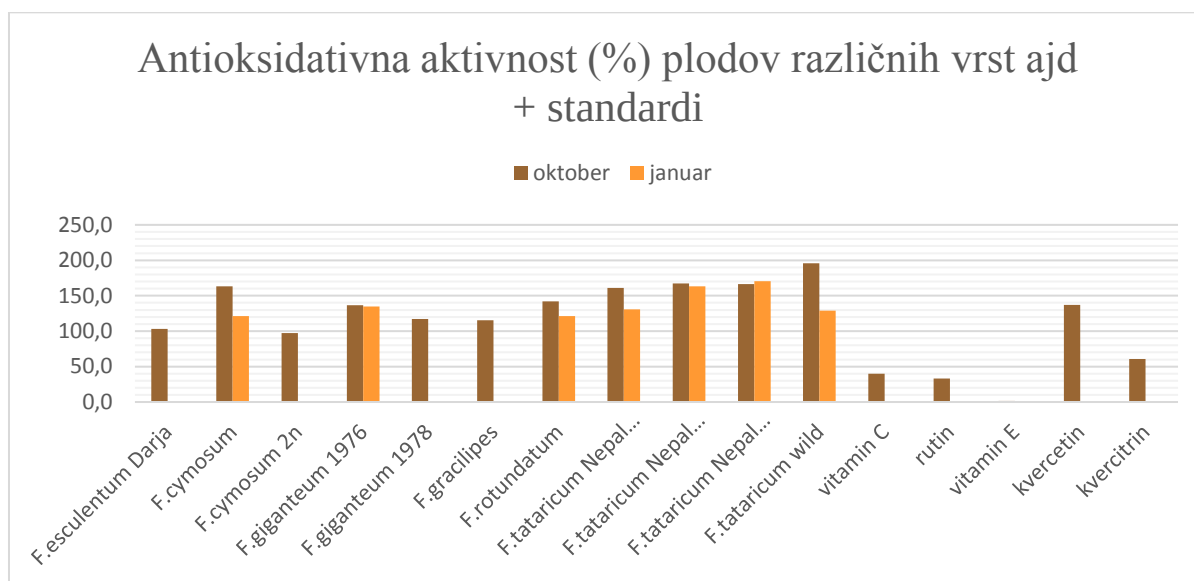
5.3.2 Cvetovi različnih vrst ajd



Graf 12: Antioksidativna aktivnost vzorcev cvetov različnih vrst ajd pri metodi reducirajoče moči. Antioksidativne aktivnosti presegajo 100 % zaradi redčenja vzorcev, ki je bilo potrebno zaradi zagotovitve splošnega območja linearnosti absorbanc.

Z metodo reducirajoče moči antioksidanta smo vzorcu *F. leptopodum* 1977 ponovno dokazali najboljši antioksidativni potencial (966,3 %) med vsemi cvetovi (graf 12). Najmanjšo reducirajočo moč je pokazal vzorec *F. giganteum* 1976 (98,4 %). Profil antioksidativne aktivnosti je podoben kot pri metodi ABTS.

5.3.3 Plodovi različnih vrst ajd

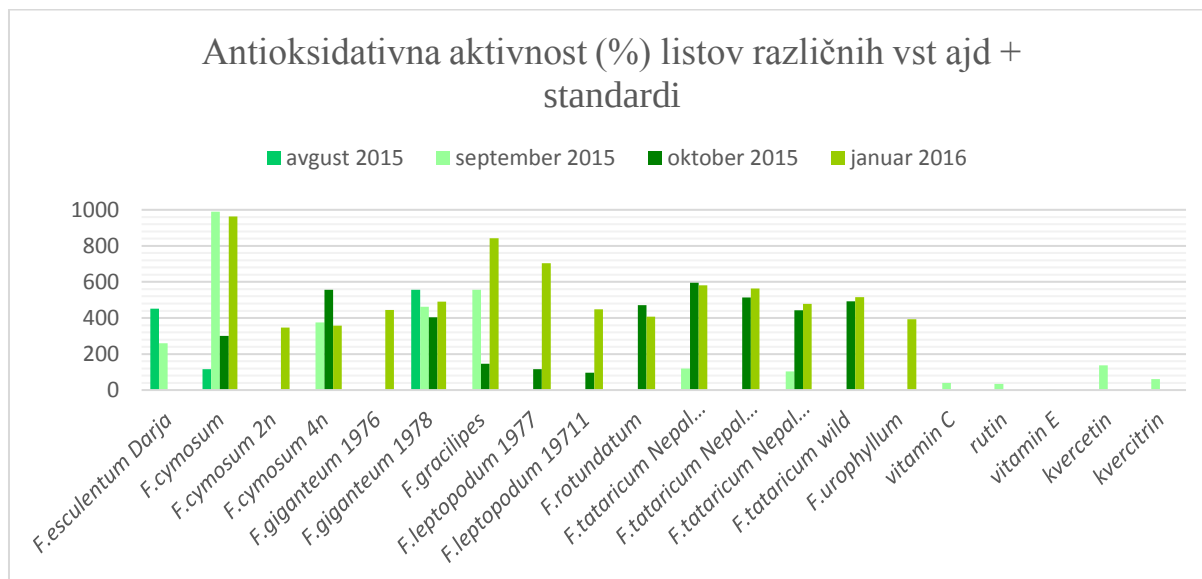


Graf 13: Antioksidativna aktivnost vzorcev plodov različnih vrst ajd pri metodi reducirajoče moči. Antioksidativne aktivnosti presegajo 100 % zaradi redčenja vzorcev, ki je bilo potrebno zaradi zagotovitve splošnega območja linearnosti absorbanc.

Najboljšo reducirajočo moč antioksidanta (graf 13) smo ugotovili pri vzorcih plodov *F. tataricum*, in sicer največjo pri *F. tataricum* Wild (195,6 %) za oktobrsko nabiranje. Ravno ta vzorec je pokazal tudi največjo razliko reducirajoče moči plodov, nabranih oktobra, in tistih, nabranih januarja (129,0 %). Najmanjši antioksidativni potencial oktobrskega nabiranja smo dobili pri vzorcih plodov *F. cymosum* 2n (97,4 %).

Vse vrste ajd, pri katerih smo imeli na voljo plodove obeh nabiranj, so pokazale večjo antioksidativno moč vzorcev plodov, nabranih oktobra, v primerjavi s plodovi, nabranimi januarja, razen pri *F. tataricum* Nepal 1303, pri kateri so januarski plodovi kazali nekoliko večji antioksidativni potencial. Razlog za upad reducirajoče moči pri večini januarskih vzorcev bi bili lahko nepopolno razviti plodovi, nabrani oktobra (glej str. 20).

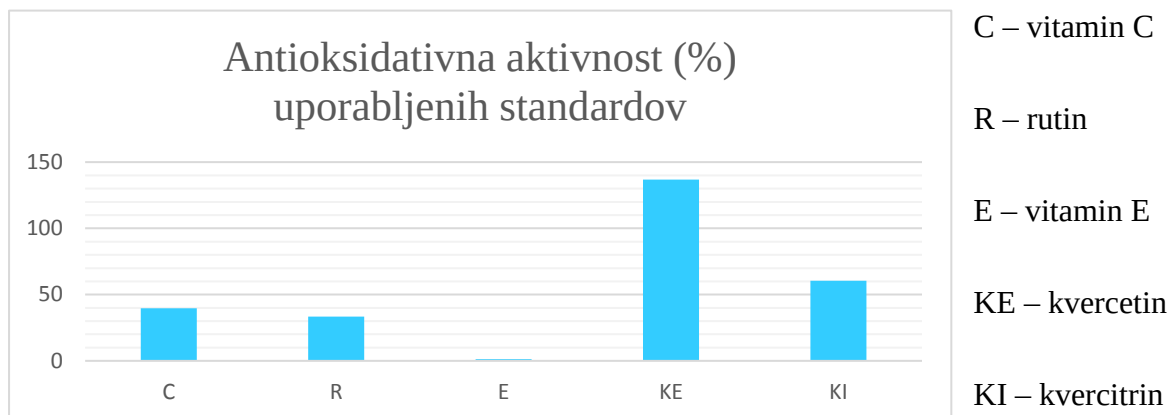
5.3.4 Listi različnih vrst ajd



Graf 14: Antioksidativna aktivnost listov različnih vrst ajd pri metodi reducirajoče moči. Antioksidativne aktivnosti presegajo 100 % zaradi redčenja vzorcev, ki je bilo potrebno zaradi zagotovitve splošnega območja linearnosti absorbanč.

Vzorci listov ajde *F. cymosum* zelo izstopajo po reducirajoči moči (963,5 %), sledijo jim vzorci listov *F. gracilipes* (842,3 %) ter *F. leptopodum* 1977 (704,0 %), kar prikazuje graf 14. Zanimivo je, da smo najmanjši antioksidativni potencial dokazali drugemu vzorcu vrste *F. cymosum* (*F. cymosum* 2n), in sicer 347 %. Pri vseh štirih analiziranih vrstah *F. tataricum* se antioksidativna aktivnost vzorcev listov oktobrskega in januarskega nabiranja ne razlikuje bistveno, ravno tako pri *F. rotundatum*, medtem ko do ogromnih razlik prihaja pri vrstah *F. cymosum*, *F. gracilipes* ter obeh vzorcih vrst *F. leptopodum* v korist januarskega nabiranja. Mladi listi verjetno še ne vsebujejo aktivnih metabolitov, ki vplivajo na rezultat tega testa, zato opazimo večjo antioksidativno aktivnost pri starejših, oz. kasneje nabranih vzorcih.

5.3.5 Primerjava standardov



Graf 15: Antioksidativna aktivnost standardov pri metodi reducirajoče moči.

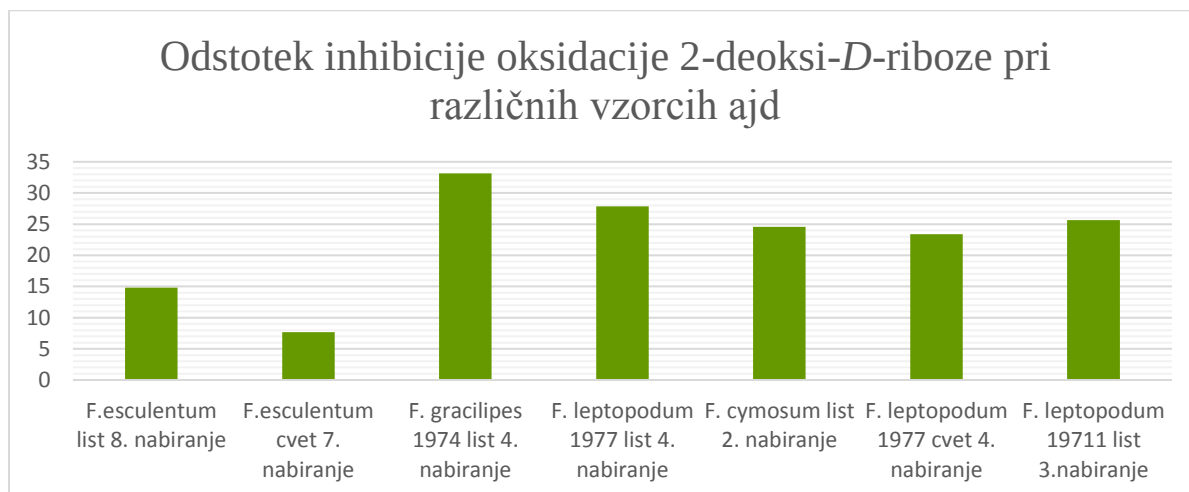
Ponovno smo dokazali, da je ravno kvercetin od vseh uporabljenih standardov tisti z največjim antioksidativnim potencialom (136,9%). Poleg tega je vrednost antioksidativne aktivnosti kvercetina večja kot pri metodah DPPH in ABTS. Profil antioksidativne aktivnosti (graf 15) je podoben tistemu pri metodi DPPH, medtem ko v primerjavi s profilom pri metodi ABTS opazimo odstopanja, največ pri vitaminu C in vitaminu E. Vitamin E ne kaže skoraj nobenega antioksidativnega potenciala pri metodi reducirajoče moči, medtem ko je pri metodi ABTS drugi najboljši po vrednosti antioksidativne aktivnosti. Ravno obratno opazimo pri vitaminu C.

5.3.6 Primerjava listov, cvetov in plodov

Z metodo reducirajoče moči smo dokazali, da so listi in cvetovi z antioksidanti bogatejši del rastline kot plodovi. Izjema je *F. giganteum* 1976, pri kateri so se vzorci plodov pokazali kot boljši antioksidanti v primerjavi z vzorci cvetov. Na voljo smo imeli cvetove in plodove le nekaterih vrst, zato bi bilo za bolj natančno opredelitev potrebno raziskati povezavo pri večjem številu vzorcev.

5.4 METODA Z 2-DEOKSI-D-RIBOZO

Pri metodi z 2-deoksi-*D*-ribozo in vseh nadaljnjih metodah smo testirali sedem vzorcev z največjo antioksidativno aktivnostjo. Zahtevnost izvedbe spodaj navedenih metod namreč ni omogočala ustrezne ponovljivosti rezultatov za obravnavo celotnega števila (87) vzorcev.

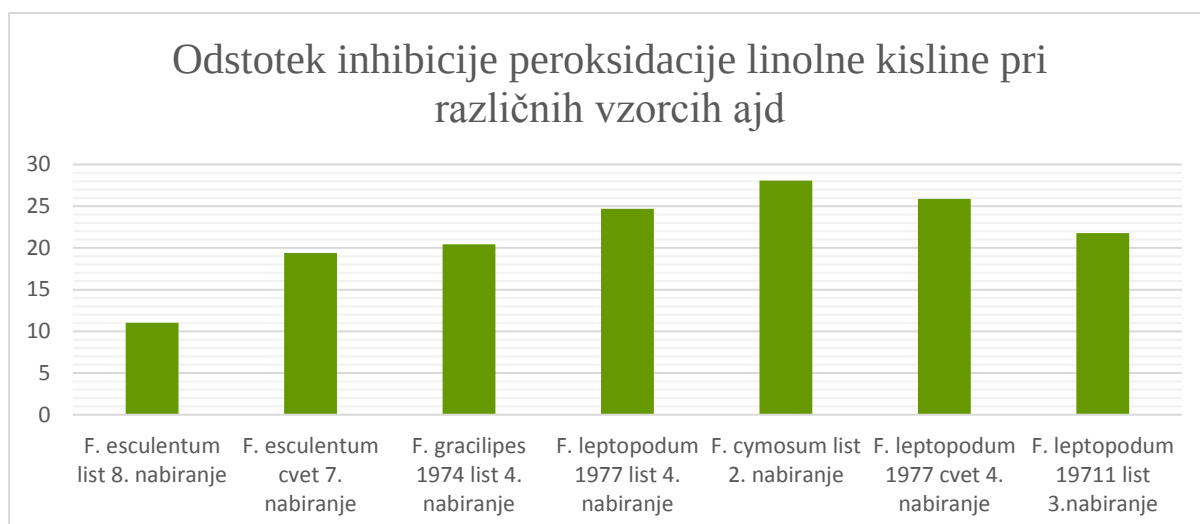


Graf 16: Odstotek inhibicije oksidacije 2-deoksi-*D*-riboze pri sedmih najbolj obetavnih vzorcih ajd.

Pri omenjeni metodi dosejata vzorca listov *F. gracilipes* 1974 januarskega nabiranja (33,2 %) in *F. leptopodum* 1977 januarskega nabiranja (27,9 %) največji odstotek inhibicije oksidacije 2-deoksi-*D*-riboze, najslabše antioksidativne lastnosti pa je pokazal vzorec cveta *F. esculentum* Darja 7. nabiranje (graf 16). Podobno kot pri metodi s tiocianatom opazimo bistveno manjše vrednosti antioksidativne aktivnosti pri vseh sedmih vzorcih glede na vrednosti pri metodi DPPH, ABTS in metodi reducirajoče moči.

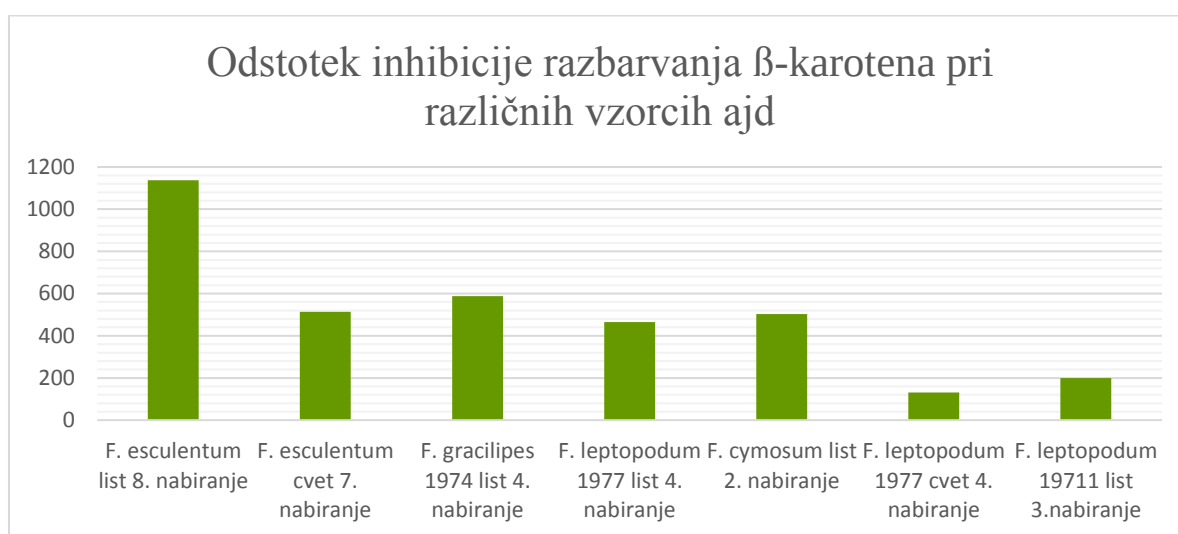
5.5 METODA S TIOCIANATOM

Pri metodi s tiocianatom (graf 17) sta vzorca listov *F. cymosum* septembrskega nabiranja (28,1 %) in cvetov *F. leptopodum* 1977 januarskega nabiranja (25,9 %) pokazala največji odstotek inhibicije peroksidacije linolne kisline med sedmimi vzorci. Najslabše antioksidativne lastnosti pri tej metodi kaže vzorec *F. esculentum* 8. nabiranja. Vseh sedem vzorcev je pokazalo bistveno manjše vrednosti antioksidativne aktivnosti (11,0 do 28,1 %) kot pri metodah DPPH, ABTS in reducirajoče moči (od 100 % do 2460,0 %).



Graf 17: Odstotek inhibicije peroksidacije linolne kisline pri sedmih najbolj obetavnih vzorcih ajd.

5.6 METODA Z β -KAROTENOM

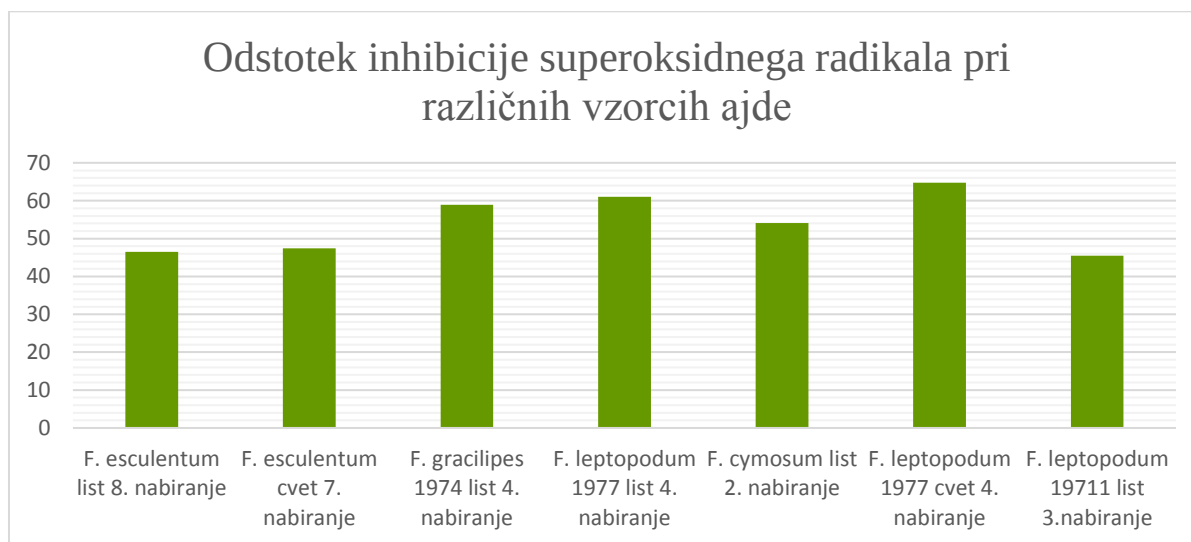


Graf 18: Odstotek inhibicije razbarvanja β -karotena pri sedmih najbolj obetavnih vzorcih ajd. Antioksidativne aktivnosti presegajo 100 % zaradi redčenja vzorcev, ki je bilo potrebno zaradi zagotovitve splošnega območja linearnosti absorbanč.

Daleč največjo inhibicijo razbarvanja β -karotena (graf 18) kaže vzorec lista *F. esculentum* Darja 8. nabiranja (1137 %), kar je presenetljivo, če rezultate primerjamo z rezultati metode s tiocianatom, ki prav tako temelji na oksidaciji linolne kisline. Pri metodi s tiocianatom je namreč ravno ta vzorec tisti z najmanjšim antioksidativnim potencialom med vsemi vzorci. Vzorec cveta *F. leptopodum* 1977 januarskega nabiranja pri tej metodi kaže najmanjši

antioksidativni potencial (131,8 %), kar ponovno preseneča glede na to, da je pri tiocianatni metodi rezultat ravno obraten. Razloge za takšne razlike bi bilo potrebno še dodatno raziskati.

5.7 METODA NADH



Graf 19: Odstotek inhibicije superoksidnega radikala pri sedmih najbolj obetavnih vzorcih ajd.

Največji odstotek inhibicije superoksidnega radikala pri metodi NADH (graf 19) daje vzorec cveta *F. leptopodum* 1977 januarskega nabiranja (64,8 %) in vzorec lista *F. leptopodum* 1977 januarskega nabiranja (61,0 %). Celoten razpon odstotka inhibicije se giblje med 45,5 in 64,8 %. Metoda daje dokaj pričakovane rezultate glede na to, da so vzorci pri ostalih metodah, ki prav tako temeljijo na mehanizmu lovljenja radikala (DPPH in ABTS), kazali visok antioksidativni potencial.

6 SKLEPI

Na podlagi rezultatov magistrskega dela smo prišli do naslednjih zaključkov:

- Pri metodi DPPH smo dokazali, da med rastjo ajde ne prihaja do večjih sprememb v antioksidativni aktivnosti. Vzorci listov in cvetov se ne razlikujejo bistveno po antioksidativnosti, medtem ko so se vzorci plodov izkazali kot slabši antioksidanti.
- Metoda ABTS je pokazala povečanje antioksidativne aktivnosti v vzorcih listov ter zmanjšanje antioksidativne aktivnosti v vzorcih cvetov med rastjo rastline. Dokazali smo, da imajo vzorci listov boljšo antioksidativno aktivnost kot plodovi, so pa cvetovi različnih vrst ajd bolj variabilni glede vrednosti antioksidativne aktivnosti.
- Z metodo reducirajoče moči antioksidanta smo dokazali, da je antioksidativna aktivnost vzorcev cvetov večja na začetku rasti rastline, medtem ko je antioksidativna aktivnost vzorcev listov bolj variabilna med rastjo ajde. Vzorci listov in cvetov so izkazali večjo antioksidativno aktivnost kot vzorci plodov.
- Metoda s tiocianatom je dala majhne vrednosti antioksidativne aktivnosti za vseh sedem vzorcev. Kot najbolj obetavni so se pokazali vzorci listov *F. cymosum* septembrskega nabiranja ter cvetovi *F. leptopodum* 1977 januarskega nabiranja.
- Pri metodi z 2-deoksi-D-ribozo so bile vrednosti antioksidativne aktivnosti še manjše kot pri metodi s tiocianatom. Največjo antioksidativno aktivnost je imel vzorec lista *F. gracilipes* 1974 januarskega nabiranja.
- Metoda z β -karotenom je izpostavila vzorec lista *F. esculentum* Moench sorte Darja 8. nabiranja kot izjemen po antioksidativnih lastnostih.
- Metoda NADH je dokazala, da je vzorec cvetov *F. leptopodum* 1977 januarskega nabiranja antioksidativno najbolj obetaven.
- Različne vrste ajde predstavljajo dober vir polifenolnih spojin.
- Vrsta, ki je imela pri večini metod največjo antioksidativno aktivnost, je cvet *F. leptopodum* 1977 januarskega nabiranja.
- Vpliv na antioksidativno aktivnost zagotovo imajo še drugi dejavniki, ki so lahko predmet nadaljnjih raziskav. Nekateri od teh so druge spojine v rastlini, čas od ekstrakcije do analize, pogoji rasti, stopnja rasti ob vzorčenju, stres, katerim je izpostavljena rastlina itd. Ravno tako bi bilo smiselno raziskati, kakšna je korelacija med antioksidativno aktivnostjo in koncentracijo antioksidantov v ajdi, kot so rutin, kvercetin in kvercitrin.

7 LITERATURA

- [1] Mravljak J: Radikali in oksidativni stres, Farm Vestn 2015; 66: 127-132
- [2] Pečar S, Mravljak J: Šumi življenja, 1. izdaja, Slovensko Farmacevtsko Društvo, Ljubljana 2015
- [3] Sollner-Dolenc M: Snovi, ki povzročajo oksidativni stres. Posledice oksidativnega stresa (prosojnice), Fakulteta za farmacijo, 2015
- [4] Kreft S, Kočever Glavač N: Sodobna fitoterapija. SFD, Ljubljana, 2013
- [5] Kawser Hossain M, Abdal Dayem A, Han J, Yin Y, Kim K, Kumar Saha S, Yang G-M, Yeon Choi H, Cho S-G: Molecular Mechanisms of the Anti-Obesity and Anti-Diabetic Properties of Flavonoids, Int J Mol Sci. 2016; 17 (4): 569
- [6] Vrečar N: Ugotavljanje vsebnosti rutina, kvercetina in kvercitrina v različnih vrstah ajde (magistrska naloga), Ljubljana, 2016
- [7] de Araújo M.E.M.B, Moreira Franco Y.E, Alberto T.G, Sobreiro M.A, Conrado M.A, Priolli D.G, Frankland Sawaya A.C.H, Ruiz A.L.T.G, de Carvalho J.E, de Oliveira Carvalho P: Enzymatic de-glycosylation of rutin improves its antioxidant and antiproliferative activities. Food Chemistry, 2013; 141: 266–273
- [8] Suzuki T, Honda Y, Mukasa Y: Effects of UV-B radiation, cold and desiccation stress on rutin concentration and rutin glucosidase activity in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) leaves. Plant Science, 2005; 168: 1303-1307
- [9] Bai C. Z, Feng M. L, Hao X. L, Zhong Q. M, Tong L. G, Wang Z. H: Rutin, quercetin, and free amino acid analysis in buckwheat (*Fagopyrum*) seeds from different locations. Genet. Mol. Res. 2015; 14: 19040-19048
- [10] Hršak T: Vsebnost polifenolnih snovi v ajdi (*Fagopyrum esculentum* Moench) (diplomsko delo), Ljubljana, 2011
- [11] Bystricka J, Musilova J, Thomas J, Vollmannova A, Lachman J, Kavalcova P: Changes of Polyphenolic Substances in the Anatomical Parts of Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) During its Growth Phases. Foods 2014; 3: 558-568
- [12] Jing R, Li H-Q, Hu C-L, Jiang Y-P, Qin L-P, Zheng C-J: Phytochemical and Pharmacological Profiles of Three *Fagopyrum* Buckwheats. International Journal of Molecular Sciences 2016; 17(4): 589

- [13] Zielińska D, Turemko M, Kwiatkowski J, Zieliński H: Evaluation of Flavonoid Contents and Antioxidant Capacity of the Aerial Parts of Common and Tartary Buckwheat Plants. *Molecules* 2012; 17: 9668-9682
- [14] Szawara-Nowak D, Bączek N, Zieliński H: Antioxidant capacity and bioaccessibility of buckwheat-enhanced wheat bread phenolics. *J Food Sci Technol* 2016; 53: 621–630
- [15] Ozvatič P: Pridelovanje navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench) v Pomurju (diplomsko delo), Ljubljana, 2014
- [16] Krakar D: Optimizacija metode za ugotavljanje antioksidativne aktivnosti izvlečka lubja navadne jelke (diplomska naloga), Ljubljana, 2011
- [17] Vladimir-Knežević S, Blažeković B, Kindl M, Vladić J, Lower-Nedza A.D, Brantner A.H: Acetylcholinesterase Inhibitory, Antioxidant and Phytochemical Properties of Selected Medicinal Plants of the Lamiaceae Family. *Molecules* 2014; 19: 767-782
- [18] Lee K.J, Jung P.M, Oh Y-C, Song N-Y, Kim T, Ma J.Y: Extraction and Bioactivity Analysis of Major Flavones Compounds from *Scutellaria baicalensis* Using In Vitro Assay and Online Screening HPLC-ABTS System. *J Anal Methods Chem.* 2014; 563702: 9
- [19] Jing S, Zhang X, Yan L-J: Antioxidant Activity, Antitumor Effect, and Antiaging Property of Proanthocyanidins Extracted from Kunlun Chrysanthemum Flowers. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015; 983484: 10
- [20] Chobot V: Simultaneous Detection of Pro- and Antioxidative Effects in the Variants of the Deoxyribose Degradation Assay. *J Agric Food Chem.* 2010; 58: 2088–2094.
- [21] Olugbami J.O, Gbadegesin M.A, Odunola O.A: In vitro free radical scavenging and antioxidant properties of ethanol extract of *Terminalia glaucescens*. *Pharmacognosy Res.* 2015; 7: 49–56.
- [22] Rezaeizadeh A, Zuki A.B.Z, Abdollahi M, Goh Y.M, Noordin M.M, Hamid M, Azmi T.I: Determination of antioxidant activity in methanolic and chloroformic extracts of *Momordica charantia*. *African Journal of Biotechnology* 2011; 10: 4932-4940.
- [23] Babu D, Gurumurthy P, Borra S.K, Cherian K.M: Antioxidant and free radical scavenging activity of triphala determined by using different in vitro models. *Journal of Medicinal Plant Research* 2013; 7: 2898-2905.

8 PRILOGA

Preglednica I: Antioksidativna aktivnost analiziranih vzorcev pri sedmih uporabljenih metodah (n – število nabiranja; 1 = avgust, 2 = september, 3 = oktober, 4 = januar).

vrsta ajde	del ajde	n	DPPH	ABTS	reduc.	riboza	tiocian	β-karot	NADH
<i>F. cymosum</i>	list	1	95,5	210,8	115,3				
<i>F. cymosum</i>	list	2	97,2	269,6	989,7	24,6	28,1	502,2	54,1
<i>F. cymosum</i>	list	3	98,0	154,2	300,5				
<i>F. cymosum</i>	list	4	97,0	169,9	963,5				
<i>F. cymosum</i>	plod	3	57,0	55,7	163,4				
<i>F. cymosum</i>	plod	4	69,0	39,8	121,1				
<i>F. cymosum 2n</i>	list	4	58,9	105,7	347,0				
<i>F. cymosum 2n</i>	plod	3	36,9	31,6	97,4				
<i>F. cymosum 4n</i>	list	2	95,7	134,2	375,2				
<i>F. cymosum 4n</i>	list	3	95,7	294,9	555,8				
<i>F. cymosum 4n</i>	list	4	76,1	73,5	357,8				
<i>F. cymosum 4n</i>	cvet	3	62,4	100,6	327,6				
<i>F. esculentum Darja(S)</i>	list	1	98,6	180,1	451,8				
<i>F. esculentum Darja(S)</i>	list	2	85,0	100,6	260,4				
<i>F. esculentum Darja(S)</i>	cvet	3	79,2	44,0	186,7				
<i>F. esculentum Darja(S)</i>	plod	3	39,8	31,3	103,1				
<i>F. esculentum Darja</i>	list	1	97,5	82,5	327,3				
<i>F. esculentum Darja</i>	list	2	98,8	209,0	1002,3				
<i>F. esculentum Darja</i>	list	3	99,3	174,1	596,4				
<i>F. esculentum Darja</i>	list	4	99,4	165,1	633,1				
<i>F. esculentum Darja</i>	list	5	99,5	180,7	572,9				
<i>F. esculentum Darja</i>	list	6	99,5	157,2	610,4				
<i>F. esculentum Darja</i>	list	7	99,5	204,2	1070,0				
<i>F. esculentum Darja</i>	list	8	99,6	103,0	660,0	14,8	11,0	1137,0	46,5
<i>F. esculentum Darja</i>	list	9	99,6	213,3	1202,0				
<i>F. esculentum Darja</i>	list	10	99,3	318,1	338,6				
<i>F. esculentum Darja</i>	list	11	99,5	287,4	895,5				
<i>F. esculentum Darja</i>	list	12	99,5	289,2	949,8				
<i>F. esculentum Darja</i>	list	13	99,5	291,6	352,5				
<i>F. esculentum Darja</i>	list	14	99,5	351,2	400,3				
<i>F. esculentum Darja</i>	cvet	1	98,3	518,7	2417				
<i>F. esculentum Darja</i>	cvet	2	98,6	510,2	2269,0				
<i>F. esculentum Darja</i>	cvet	3	98,0	597,0	2923,3				
<i>F. esculentum Darja</i>	cvet	4	97,7	586,1	2933,3				
<i>F. esculentum Darja</i>	cvet	5	98,2	595,2	2699,7				
<i>F. esculentum Darja</i>	cvet	6	97,6	614,5	2368,3				

<i>F. esculentum</i> Darja	cvet	7	95,9	424,1	2460,0	7,7	19,4	513,0	47,5
<i>F. esculentum</i> Darja	cvet	8	98,5	116,3	2369,0				
<i>F. esculentum</i> Darja	cvet	9	98,3	181,9	2731,3				
<i>F. esculentum</i> Darja	cvet	10	97,9	211,4	637,6				
<i>F. esculentum</i> Darja	cvet	11	97,9	160,2	449,5				
<i>F. esculentum</i> Darja	cvet	12	97,9	176,5	549,4				
<i>F. esculentum</i> Darja	cvet	13	95,5	84,3	618,7				
<i>F.giganteum</i> 1976	list	4	70,9	117,7	444,8				
<i>F.giganteum</i> 1976	cvet	3	93,6	209,5	98,4				
<i>F.giganteum</i> 1976	plod	3	53,4	23,5	136,7				
<i>F.giganteum</i> 1976	plod	4	40,4	51,3	135,0				
<i>F.giganteum</i> 1978	list	1	85,1	161,4	555,8				
<i>F.giganteum</i> 1978	list	2	82,3	148,7	461,4				
<i>F.giganteum</i> 1978	list	3	66,6	119,6	403,6				
<i>F.giganteum</i> 1978	list	4	74,1	139,9	490,4				
<i>F.giganteum</i> 1978	cvet	3	95,3	294,9	577,8				
<i>F.giganteum</i> 1978	plod	3	52,8	13,3	117,0				
<i>F.gracilipes</i>	list	2	87,8	202,5	556,0				
<i>F.gracilipes</i>	list	3	98,9	310,8	146,4				
<i>F.gracilipes</i>	list	4	100,1	198,2	842,3	33,2	20,4	587,7	58,9
<i>F.gracilipes</i>	cvet	3	91,2	169,6	439,0				
<i>F.gracilipes</i>	plod	4	49,5	51,8	115,3				
<i>F.leptopodum</i> 1977	list	3	97,5	295,6	115,7				
<i>F.leptopodum</i> 1977	list	4	100,9	225,3	704,0	27,9	24,7	465,0	61,0
<i>F.leptopodum</i> 1977	cvet	4	99,8	489,2	966,3	23,4	25,9	131,8	64,8
<i>F.leptopodum</i> 19711	list	3	97,4	227,2	96,2	25,7	21,8	199,1	45,5
<i>F.leptopodum</i> 19711	list	4	95,4	86,7	447,6				
<i>F.leptopodum</i> 19711	cvet	4	93,6	184,8	504,6				
<i>F.rotundatum</i>	list	3	91,3	233,5	470,4				
<i>F.rotundatum</i>	list	4	87,5	201,9	407,8				
<i>F.rotundatum</i>	plod	3	45,6	57,0	142,0				
<i>F.rotundatum</i>	plod	4	38,1	38,6	121,2				
<i>F.tataricum</i> Nepal 1301	list	2	95,3	252,5	119,3				
<i>F.tataricum</i> Nepal 1301	list	3	88,0	178,5	595,6				
<i>F.tataricum</i> Nepal 1301	list	4	94,2	195,8	581,6				
<i>F.tataricum</i> Nepal 1301	plod	3	46,1	55,1	161,2				
<i>F.tataricum</i> Nepal 1301	plod	4	62,7	48,2	130,7				
<i>F.tataricum</i> Nepal 1302	list	3	89,4	107,8	514,0				
<i>F.tataricum</i> Nepal 1302	list	4	83,0	171,5	563,2				
<i>F.tataricum</i> Nepal 1302	plod	3	56,5	55,1	167,4				
<i>F.tataricum</i> Nepal 1302	plod	4	56,1	60,8	163,2				
<i>F.tataricum</i> Nepal 1303	list	2	93,5	220,9	103,0				
<i>F.tataricum</i> Nepal 1303	list	3	85,6	201,9	442,7				
<i>F.tataricum</i> Nepal 1303	list	4	87,9	165,7	478,9				

<i>F.tataricum Nepal 1303</i>	plod	3	50,8	57,0	166,6
<i>F.tataricum Nepal 1303</i>	plod	4	78,6	62,0	170,4
<i>F.tataricum wild</i>	list	3	85,5	241,1	492,0
<i>F.tataricum wild</i>	list	4	73,2	158,9	514,8
<i>F.tataricum wild</i>	plod	3	48,6	75,3	195,6
<i>F.tataricum wild</i>	plod	4	26,7	52,5	129,0
<i>F.urophyllum</i>	list	4	59,1	120,9	393,8