

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MANCA VOLOVŠEK

**MAGISTRSKA NALOGA**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA  
BIOMEDICINA

Ljubljana, 2018



UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MANCA VOLOVŠEK

**ANTIOKSIDATIVNE LASTNOSTI OLEUROPEINA IN  
EKSTRAKTOV IZ OLJČNIH LISTOV**

**ANTIOXIDATIVE PROPERTIES OF OLEUROPEIN AND  
EXTRACTS FROM OLIVE LEAVES**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA  
BIOMEDICINA

Ljubljana, 2018



Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo, Fakultete za farmacijo, pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm.

### **Zahvala**

Za pomoč pri izdelavi magistrske naloge bi se iskreno zahvalila mentorju izr. prof. dr. Janezu Mravljaku, mag. farm. za koristne nasvete, strokovno pomoč, usmerjanje in spodbudne besede.

Hvala tudi družini, ki so mi omogočili študij in verjeli vame. Posebna zahvala pa gre mojemu Davidu, ki me je podpiral tekom celotnega študija, za vso neprecenljivo spodbudo in podporo.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm.

Manca Volovšek

Komisija za zagovor magistrske naloge:

Predsednica: prof. dr. Janja Marc

Mentor: izr. prof. dr. Janez Mravljak

Član: doc. dr. Bojan Doljak



# KAZALO VSEBINE

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1. UVOD</b>                                                             | 1  |
| <b>1.1 OKSIDATIVNI STRES</b>                                               | 1  |
| <b>1.2 URAVNAVANJE OKSIDATIVNEGA STRESA Z ANTIOKSIDANTI</b>                | 2  |
| <b>1.3 (POLI)FENOLI</b>                                                    | 4  |
| <b>1.4 FENTONOVA REAKCIJA</b>                                              | 4  |
| <b>1.5 KELACIJA KOVINSKIH IONOV</b>                                        | 5  |
| <b>1.6 LISTI OLJKE IN OLEUROPEIN</b>                                       | 6  |
| 1.6.1 Kardioprotektivno delovanje oleuropeina                              | 7  |
| 1.6.2 Protitumorno delovanje oleuropeina                                   | 9  |
| <b>1.7 ANTIOKSIDANTI KOT PREHRANSKA DOPOLNILA</b>                          | 10 |
| 1.7.1 Določanje oksidativnega stresa                                       | 10 |
| <b>1.8 VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI</b>                          | 11 |
| 1.8.1 DPPH test                                                            | 11 |
| 1.8.2 UV-VIS spektrofotometrična titracija vzorcev z $\text{Fe}^{3+}$ ioni | 13 |
| <b>2. NAMEN DELA</b>                                                       | 14 |
| <b>3. MATERIALI IN METODE</b>                                              | 15 |
| <b>3.1 TOPILA IN REAGENTI</b>                                              | 15 |
| <b>3.2 MERILNI PRIPOMOČKI IN APARATI</b>                                   | 17 |
| <b>3.3 RAČUNALNIŠKA PROGRAMSKA OPREMA</b>                                  | 18 |
| <b>3.4 OPIS IN PRIPRAVA VZORCEV IN STANDARDOV</b>                          | 18 |
| 3.4.1 Opis vzorcev                                                         | 18 |
| 3.4.2 Opis standardov                                                      | 19 |
| 3.4.3 Antioksidativna sposobnost redukcije radikala DPPH                   | 20 |
| 3.4.3.1 Priprava raztopin vzorcev                                          | 20 |
| 3.4.3.2 Priprava raztopin standardiziranega izvlečka oleuropeina           | 20 |
| 3.4.3.3 Priprava raztopin standarda $\alpha$ -tokoferola                   | 20 |
| 3.4.4 Spremljanje kinetike redukcije DPPH                                  | 21 |
| 3.4.4.1 Priprava raztopin vzorcev                                          | 21 |
| 3.4.4.2 Priprava raztopin standardiziranega izvlečka oleuropeina           | 21 |
| 3.4.5 UV-Vis spektrofotometrična titracija vzorcev z $\text{Fe}^{3+}$ ioni | 22 |
| 3.4.5.1 Priprava raztopin vzorcev                                          | 22 |
| 3.4.5.2 Priprava raztopine standardiziranega izvlečka oleuropeina          | 22 |
| 3.4.5.3 Priprava raztopine standarda kvercetina                            | 22 |
| <b>3.5. IZVEDBA METOD EKSPERIMENTALNEGA DELA</b>                           | 23 |

|                                                                                           |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.5.1 Postopek določanja antioksidativne sposobnosti redukcije radikala DPPH.....         | 23        |
| 3.5.1.1 Izračun vrednosti EC <sub>50</sub> .....                                          | 24        |
| 3.5.2 Postopek meritve kinetike redukcije DPPH .....                                      | 25        |
| 3.5.2.1 Izračun hitrostnih konstant .....                                                 | 25        |
| 3.5.3 Postopek UV-Vis spektrofotometrične titracije vzorcev z Fe <sup>3+</sup> ioni ..... | 26        |
| <b>4. REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>                                                     | <b>27</b> |
| <b>4.1 ANTIOKSIDATIVNA SPOSOBNOST REDUKCIJE RADIKALA DPPH.....</b>                        | <b>27</b> |
| 4.1.1 Standard α-tokoferol.....                                                           | 27        |
| 4.1.2 Preiskovani vzorci .....                                                            | 29        |
| 4.1.3 Komentar rezultatov redukcije radikala DPPH .....                                   | 33        |
| <b>4.2 MERITVE KINETIKE REDUKCIJE DPPH .....</b>                                          | <b>36</b> |
| 4.2.1 Komentar meritev kinetike redukcije DPPH.....                                       | 41        |
| <b>4.3 UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIČNA TITRACIJA VZORCEV Z Fe<sup>3+</sup> IONI.....</b>       | <b>46</b> |
| 4.3.1 Standard kvercetin.....                                                             | 46        |
| 4.3.2 Preiskovani vzorci .....                                                            | 48        |
| <b>5. SKLEP .....</b>                                                                     | <b>56</b> |
| <b>6. LITERATURA .....</b>                                                                | <b>57</b> |
| <b>PRILOGE .....</b>                                                                      | <b>I</b>  |

## POVZETEK

Večina ljudi povezuje mediteransko prehrano z oljčnim oljem in s tem z zdravim načinom prehranjevanja. Pozabljamo pa na liste oljke, ki so stranski odpadki pri celotni proizvodnji oljčnega olja. Sestava listov oljke temelji na (poli)fenolnih spojinah. Listi oljke so dober vir antioksidanta oleuropeina. Oleuropein ima koristne učinke na zdravje ljudi, deluje kardioprotektivno, protivnetno, inhibira agregacijo trombocitov, antiaterogeno in protitumorno ter ima protimikrobne lastnosti in nevroprotektivne učinke.

Namen magistrske naloge je bilo ovrednotiti antioksidativne lastnosti standardiziranega izvlečka oleuropeina, ter sedmim rastlinskim ekstraktom iz oljčnih listov in vzorcu »terana«, pridobljenem iz ovojnic grozdja po stiskanju. Vsi rastlinski ekstrakti so bili pridobljeni s superkritično ekstrakcijo s CO<sub>2</sub> iz surovine, ki predstavlja tehnološki odpadki pri pridobivanju oljčnega olja oziroma vina. Za določitev antioksidativne kapacitete smo uporabili 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilni (DPPH) test, ki temelji na spremljanju redukcije radikala DPPH. Vsi rastlinski ekstrakti so imeli slabšo antioksidativno kapaciteto kot standardiziran izvleček oleuropeina. Kot dodaten parameter za karakterizacijo antioksidativne aktivnosti smo izmerili hitrost reakcije med antioksidantom in DPPH. Ugotovili smo, da z višjo koncentracijo narašča tudi hitrostna konstanta. Analiza rezultatov meritev kinetike redukcije DPPH je pokazala, da je med vsemi vzorci standardiziran izvleček oleuropeina že pri zelo nizkih koncentracijah hitro reagiral z DPPH. Ker izkazujejo polifenolne spojine tudi sposobnost keliranja kovinskih ionov (ionov železa in bakra), smo vzorce preučevali z UV-Vis spektroskopijo, z namenom ugotavljanja sposobnosti keliranja železovih ionov. Polifenoli s koordinativno vezavo železovih ionov preprečijo nastanek hidroksilnega radikala, ki je najreaktivnejši radikal, ki lahko nastane v našem telesu. Z UV-Vis spektrofotometrično titracijo smo določili vezavno stehiometrijo med vzorcem in Fe<sup>3+</sup>. Ugotovili smo, da so vsi vzorci izkazali sposobnost keliranja Fe<sup>3+</sup> ionov v različnih masnih razmerjih.

Na osnovi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da je najboljše antioksidativne lastnosti izkazoval standardiziran izvleček oleuropeina, zato bi bil potencialno zanimiv za nadaljnje študije o možni farmakološki uporabi za preprečevanje ali upočasnitev kardiovaskularnih in nevrodegenerativnih bolezni.

**Ključne besede:** oleuropein, antioksidativna kapaciteta, kelacija železovih ionov, DPPH

## ABSTRACT

The Mediterranean cuisine is oftentimes associated with olive oil and its role in a healthy diet. What is usually overlooked though are the olive tree leaves, which are disposed of during the oil's production. Their composition is based on (poly)phenol compounds, while also being a formidable source of the antioxidant oleuropein, which has a myriad of beneficial effects on its consumers' health, including acting antiinflammatory, antimicrobial and antiatherogenically, showing tumor suppressing traits, inhibiting the aggregation of thrombocytes, as well as having cardio- and neuroprotective effects.

The following Master's thesis was written with the intent of evaluating the antioxidative properties of a standardized extract of oleuropein, seven extracts from olive tree leaves as well as a sample of »teran« wine, gathered from the grape skins after pressing. All plant extracts were obtained by supercritical extraction with CO<sub>2</sub> from a raw material representing technological waste in the production of olive oil or wine. In order to determine these qualities, a 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) test was used, which is based on tracking the reduction of the DPPH radical. All of the plant extracts were shown to have an inferior antioxidative capacity compared to that of the standardized oleuropein extract. As an additional parameter for the characterization of antioxidative activity, the speed of the reaction between the antioxidant and the DPPH was additionally looked at. It was consecutively shown that there is a correlation between the concentration and the speed constant, as the former's rise resulted in the latter's increase. An analysis of the results of DPPH reduction kinetics shows that among all samples, a standardized extract of oleuropein reacted fast with DPPH at very low concentrations. Due to the polyphenol compounds' capability of chelating metallic ions (iron and copper ions), we used UV-Vis spectroscopy to study the samples, with the intent of determining the capability of chelating iron(III). Through a coordinative bonding of iron ions, the formation of hydroxyl radicals, the most reactive radical in our body, is prevented. Through the use of UV-Vis spectrophotometric titration we determined the binding stoichiometry between the sample and iron(III), having discovered that all samples display the ability to chelate iron(III) ions in different mass ratios.

The results showed that the best antioxidant properties were demonstrated by a standardized extract of oleuropein. Its beneficial effect could help in making way for future studies, in

regards to the pharmacological use of oleuropein in the prevention as well as slowing down the progression of cardiovascular and neurodegenerative diseases.

**Key words:** oleuropein, antioxidant capacity, chelation of iron ions, DPPH

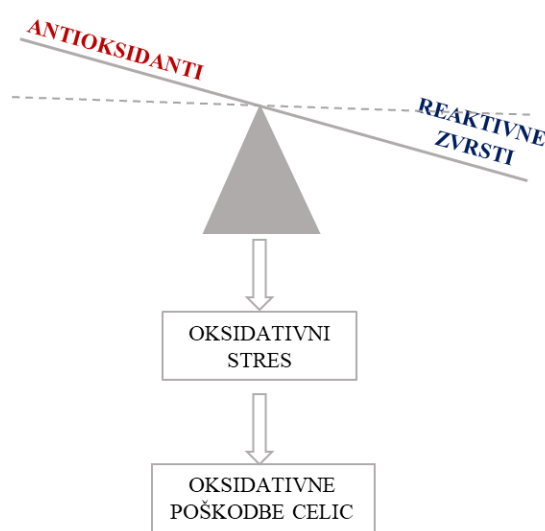
## SEZNAM OKRAJŠAV

|                  |                                      |
|------------------|--------------------------------------|
| cAMP             | Ciklični adenzin monofosfat          |
| COX              | Ciklooksigenaza                      |
| DPPH             | 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil         |
| DNA              | Deoksiribonukleinska kislina         |
| EC <sub>50</sub> | 50-odstotna efektivna koncentracija  |
| ICAM-1           | Znotrajcelična adhezijska molekula-1 |
| IL-1 $\beta$     | Interlevkin-1 $\beta$                |
| LOX              | Lipooksigenaza                       |
| NF- $\kappa$ B   | Jedrni dejavnik kapa B               |
| R <sup>2</sup>   | Koeficient determinacije             |
| ROS              | Reaktivne kisikove zvrsti            |
| RNS              | Reaktivne dušikove zvrsti            |
| SOD              | Superoksid dismutaza                 |
| TNF- $\alpha$    | Dejavnik tumorske nekroze alfa       |
| VCAM-1           | Žilna celična adhezijska molekula-1  |

# 1. UVOD

## 1.1 OKSIDATIVNI STRES

Dr. Helmut Sies je leta 1985 prvi vpeljal pojem oksidativni stres, ki je vrsta kemičnega stresa. (1, 2). Po definiciji je oksidativni stres, ki so mu izpostavljeni vsi aerobni organizmi, vsako stanje v celici in kasneje v tkivu in organu, kjer prevladujejo oksidativni procesi (nenadzorovane eno-elektronske oksidacije); spremeni se prvotno ravnovesje med reduktivnimi in oksidativnimi procesi (3). Ravnovesje se lahko poruši zaradi povečane tvorbe potencialno škodljivih reaktivnih zvrsti in/ali zmanjšane antioksidativne zaščite, kar vodi v oksidativne poškodbe biomolekul v celicah (Slika 1). Zaradi zmanjšane vnosa antioksidantov s hrano, biološke razpoložljivosti ali endogene sinteze antioksidantov lahko pride do zmanjšane antioksidativne obrambe (1).



Slika 1: Slika prikazuje porušeno ravnovesje med antioksidanti in reaktivnimi zvrstmi, ki vodi v oksidativni stres, ta pa povzroča oksidativne poškodbe biomolekul (prirejeno po 1).

Vzrok za nastanek povečane količine radikalov so zunanji (UV svetloba, ionizirajoče sevanje, nekatere kemikalije npr. pesticidi, kajenje, onesnaženost v zraku vpliva na nastanek ozona v okolju), notranji dejavniki (spontane eno-elektronske redoks reakcije, kronična vnetja, metabolizem nekaterih zdravilnih učinkovin, encimske reakcije (sintaze dušikovega oksida (NO) in različne oksidaze) ter intenzivna in dolgo trajajoča telesna obremenitev. Oksidativni stres povezujemo z zgodnjim staranjem in vrsto bolezenskih stanj, kot so nevrodegenerativne bolezni (Alzheimerjeva, Parkinsonova bolezen), nekatera rakava obolenja, ateroskleroza, sladkorna bolezen, kronični bronhitis itd. (2, 3). Čeprav reaktivne

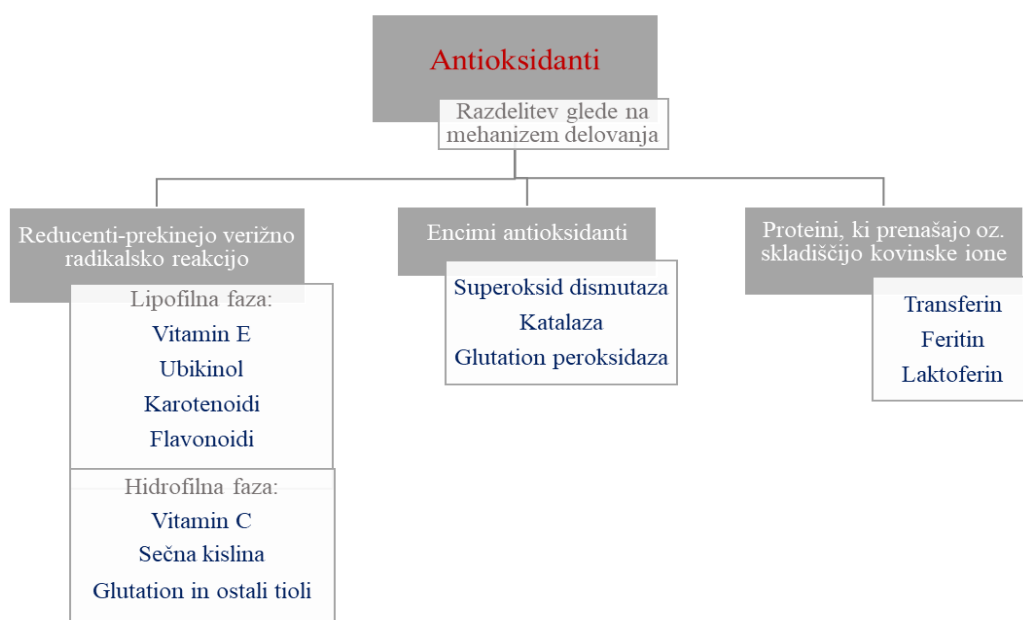
zvrsti največkrat povezujemo le s škodljivimi učinki (oksidacija biomolekul), pa imajo tudi pozitivno vlogo v našem organizmu, saj sodelujejo v procesu redoks signaliziranja ( $\text{NO}^\bullet$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) in obrambe imunskega sistema pred patogeni. Zato je fiziološko ravnovesje rahlo nagnjeno na stran reaktivnih zvrsti in tako omogoča pozitivni oksidativni stres za redoks signaliziranje (1). Pozitivni oksidativni stres v našem organizmu stalno poteka, a moramo se zavedati, da oksidacije celičnih sestavin (proteini, membrane, DNA) potekajo v količinsko zelo omejenem obsegu ob zadostni antioksidativni zaščiti (3). Povišane količine ROS (reaktivne kisikove zvrsti) in RNS (reaktivne dušikove zvrsti) vplivajo tudi na večjo učinkovitost obrambnih in popravljivih mehanizmov, in sicer se preko redoks signaliziranja zviša nivo izražanja encimov antioksidantov in encimov za popravilo DNA (1).

## **1.2 URAVNAVANJE OKSIDATIVNEGA STRESA Z ANTIOKSIDANTI**

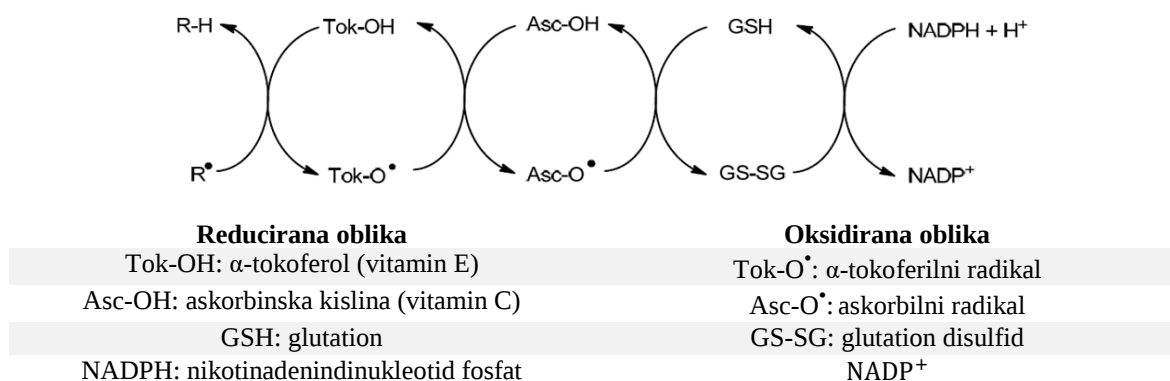
Antioksidanti so kemijska zaščita, ki varujejo celico pred oksidativnim stresom. Antioksidanti so definirani kot vse snovi, ki upočasnijo, preprečijo ali odstranijo možnost oksidativnih poškodb pomembnih biomolekul: lipidov, proteinov in nukleinskih kislin (1). Preprečijo širjenje verižne oksidacije, odstranijo reaktivne zvrsti, preprečijo delovanje singletnega kisika ali pa vežejo ione prehodnih kovin in tako preprečijo prenos elektronov (4). Antioksidanti so kemijsko reducenti. Reducent (antioksidant) odda elektron ali vodikov atom in se oksidira (»potroši«), oksidant (radikal) pa sprejme elektron in se reducira (5). Antioksidanti zaščitijo celične sestavine pred nekontroliranimi oksidacijami, tako da se žrtvujejo v reakciji s primarnim radikalom. Nov radikal (oksidiran antioksidant), ki nastane pri reakciji antioksidanta z reaktivnim radikalom, je bolj stabilen (manj kemično reaktiven) in običajno ni več sposoben nadaljevati oksidacije (4).

Antioksidante razdelimo glede na izvor, strukturo, fizikalno-kemijske lastnosti, po mehanizmu delovanja (Slika 2) in glede na zmožnosti obnavljanja: ali so del antioksidativne mreže (3). Po izvoru jih delimo na endogene (telo jih samo sintetizira: glutation, koencim Q, superoksid dismutaza (SOD), katalaza itd.) in eksogene antioksidante (vnesemo jih s hrano ali v obliki prehranskih dopolnil: vitamin C in E, karotenoidi, (poli)fenoli rastlinskega izvora) (6). Ker se endogena sinteza nekaterih antioksidantov s starostjo zmanjšuje (koencim Q), jih je smiselno nadomeščati s prehranskimi dopolnili (3). Glede na fizikalno-kemijske lastnosti jih delimo na lipofilne (vitamin E) in hidrofilne (vitamin C) antioksidante. Večina antioksidantov ni obnovljivih, torej se v reakciji z radikali porabljajo (metaboliti se izločajo

iz telesa, npr. sečna kislina). Antioksidanti, ki so v celici del antioksidativne mreže, med seboj sodelujejo, tako da eden drugega obnavljajo (reducirajo) (Slika 3). Tokoferol (z redoks potencialom 480 mV) se v reakciji z radikalom oksidira in sam postane radikal (tokoferilni radikal). Po določenem času in ob kopičenju bi lahko tokoferilni radikal sprožil novo radikalsko reakcijo, a na tem mestu poskrbi antioksidativna mreža za njegovo pravočasno redukcijo z antioksidanti, ki imajo nižji redoks potencial. Askorbat (z redoks potencialom 282 mV) obnavlja tokoferilni radikal, nastali askorbilni radikal regenerira glutathion (z redoks potencialom -240 mV), glutathion disulfid pa reducira glutathion reduktaze, ki koristijo NADPH, ki je najpomembnejši celični reducent. Vidimo, da je obnavljanje kemična redukcija oksidiranih antioksidantov, pri tem pa organizem troši svojo energijo oziroma reducente (NADPH) (3, 6).



Slika 2: Shema prikazuje razdelitev antioksidantov glede na mehanizem delovanja (prirejeno po 7).



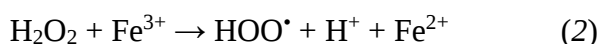
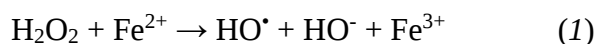
Slika 3: Primer delovanja antioksidativne mreže (6).

### 1.3 (POLI)FENOLI

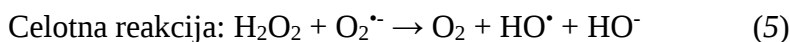
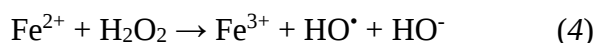
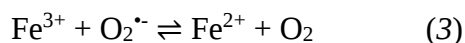
Fenol je vsaka spojina, ki ima hidroksilno skupino ( $-\text{OH}$ ) vezano na benzenov obroč. Monofenoli imajo eno, difenoli dve in polifenoli več aromatskih  $-\text{OH}$  skupin. Rastline vsebujejo veliko raznolikih fenolnih spojin (flavanoli: katehin v rdečem vinu, flavanoni: toksifolin v citrusih, flavonoli: kvercetin v olivah, flavoni: apigenin v peteršilju, antocianidini: malvidin v rdečem vinu, derivati cimetine kisline: kavna kislina v olivah in oljčnem olju), vključno s tokoferoli. Rastlinski (poli)fenoli so *in vitro* dobri antioksidanti, so lovilci peroksilnega radikala in tako inhibirajo lipidno peroksidacijo. Fenoli odstranjujejo tudi druge reaktivne zvrsti;  $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{NO}_2^\bullet$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$ ,  $\text{ONOOH}$ ,  $\text{HOCl}$ . Nekateri reagirajo tudi s superoksidnim radikalom ( $\text{O}_2^\bullet$ ), zlasti di- in polifenoli (8).

### 1.4 FENTONOVA REAKCIJA

Fentonova reakcija je primer radikalske reakcije katalizirane z nekaterimi ioni prehodnih kovin železa in bakra (8). V Fentonovi reakciji (Reakcija 1) se  $\text{Fe}^{2+}$  oksidira v  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  pa se reducira v hidroksidni anion ( $\text{HO}^-$ ) in hidroksilni radikal ( $\text{HO}^\bullet$ ) (3).  $\text{HO}^\bullet$  je najreaktivnejši radikal v našem telesu, ki sproži lipidno peroksidacijo, reagira hitro in neselektivno s prvo organsko molekulo, ki jo sreča in povzroči poškodbe biomolekul (4). Upoštevati je treba tudi reakcijo  $\text{Fe}^{3+}$  s prebitkom  $\text{H}_2\text{O}_2$ , kjer nastane hidroperoksilni radikal ( $\text{HOO}^\bullet$ ),  $\text{Fe}^{2+}$  in proton (Reakcija 2) (3).



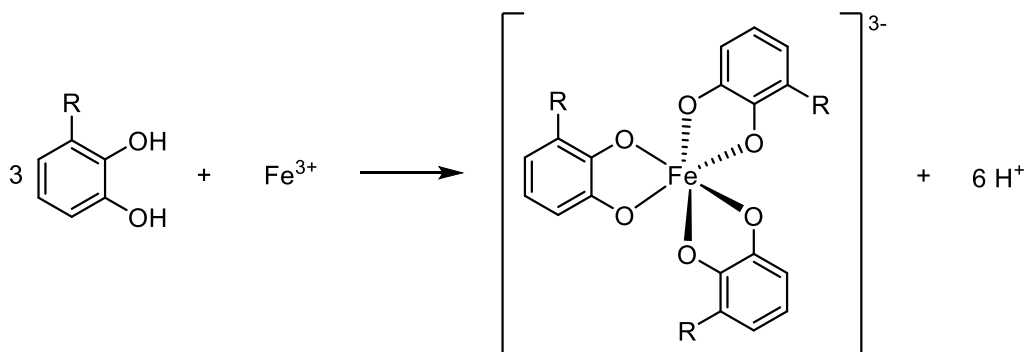
V fizioloških razmerah je v celici prisotnega izredno malo  $\text{H}_2\text{O}_2$ , zato reakcija 2 največkrat ne poteka. Pri Haber-Weissovi reakciji pa je možna redukcija  $\text{Fe}^{3+}$  s  $\text{O}_2^\bullet$ , ki kaže na to, da železovi ioni ne glede na oksidacijsko stanje sodelujejo pri nastajanju  $\text{HO}^\bullet$  (Reakcije 3 – 5) (3). V Haber-Weissovi reakciji tako nastane  $\text{Fe}^{2+}$ , ki lahko ponovno vstopa v Fentonovo reakcijo in prispeva k nastanku  $\text{HO}^\bullet$ .



## 1.5 KELACIJA KOVINSKIH IONOV

Med antioksidativne lastnosti rastlinskih polifenolov prištevamo tudi sposobnost keliranja kovinskih ionov (predvsem ionov železa in bakra). Kelatorji koordinativno vežejo kovinske ione ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}/\text{Cu}^{2+}$ ) in tako preprečijo, da bi ti katalizirali nastanek  $\text{HO}^\bullet$  po mehanizmu Fentonove reakcije (3). Ioni prehodnih kovin (železovi, bakrovi, manganovi, kromovi) so paramagnetni, ker imajo enega ali več nesparjenih elektronov v  $d$  orbitalah. Kljub paramagnetnim lastnostim in nesparjenim elektronom niso radikali, lahko pa sodelujejo v enoelektronskih redoks redukcijah in oksidacijah (4).

Ligandi so donorji elektronov, kovinski kationi pa elektrone sprejemajo. Vez med donorjem elektronskega para in kovinskim kationom imenujemo koordinacijska vez. Koordinacijsko število pa nam pove število vezanih atomov ligandov na kovinski ion in je odvisno od velikosti in vrste liganda. Torej manjši kot so ligandi, več se jih lahko veže na kovinski kation. Kadar se ligand veže na kovinski kation preko dveh ali več atomov, govorimo o kelatnih ligandih oz. kelatorjih.  $\text{Fe}^{2+}$  in  $\text{Fe}^{3+}$  imata koordinacijsko število 6 in zato oktaedrično razporeditev ligandov (5). Kelacija je nastanek dveh ali več koordinacijskih vezi med kovinskim kationom ter bidentatnim/polidentatnim ligandom, ki se z dvema ali več atomi veže v kelatni kompleks (9). Znano je, da so polifenoli, predvsem derivati katehola in galata močni kelatorji kovinskih ionov. Polifenoli, ki jih sestavlja kateholna (npr. katehin) ali galatna skupina, lahko vežejo  $\text{Fe}^{3+}$  v razmerju 3 : 1 (Slika 4) (10). Pri bidentatnih ligandih (kar pomeni, da se ligand veže na kovinski ion preko dveh atomov) zasedejo 3 molekule vseh 6 koordinacijskih mest na  $\text{Fe}^{3+}$ , nastane kelatni kompleks v razmerju 3 : 1 (3, 5).



Slika 4: Nastanek stabilnega kompleksa med deprotoniranim fenolnim ligandom in kovinskim kationom ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Galati ( $\text{R}=\text{OH}$ ), kateholi ( $\text{R}=\text{H}$ ) (10).

## 1.6 LISTI OLJKE IN OLEUROPEIN

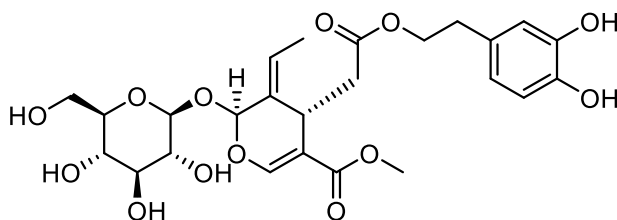
Izdelke pridobljene iz dreves oljk so že stoletja nazaj uporabljali ljudje za krepitev zdravja. V mnogih civilizacijah je imela oljka močan kulturni in simbolni pomen. Oljčni listi so veljali za simbol miru in zdravja (11). Znano je protivnetno in protitumorno delovanje (poli)fenolov v listih oljke, plodovih oljke (fenola: hidroksitirozol in tirozol, flavonoidi: kvercetin in njegovi glikozidi, antocianini, derivati hidroksicimetne kisline: verbaskozid, kumarna kislina, kavna kislina) in deviškem (neraфинiranem) oljčnem olju (11, 12).

Listi oljke so bogat vir fenolnih spojin, ki jih glede na strukturne značilnosti razdelimo na:

- sekoiridoide: oleuropein (6 do 9 %), ligstrozid, dimetiloleuropein,
- flavoni: glikozidi apigenina in luteolina, luteolin,
- flavonoli: rutin (glukozid kvercetina),
- flavan-3-oli: katehin,
- substituirani fenoli: tirozol, hidroksitirozol, vanilin,
- fenolne kisline: kavna kislina, verbaskozid in kumarna kislina (so derivati hidroksicimetne kisline), vanilinska kislina (derivat hidroksibenzojske kisline),
- lignani: pinorezinol, acetoksipinorezinol (12, 13).

Glavni sekoiridoidni glikozid v listih oljke je oleuropein (glavna bioaktivna spojina oljke), ki je odgovoren za grenak okus nepredelanih plodov oljke in oljčnih listov. Kemično je oleuropein ester elenolne kisline in hidroksitirozola in ima ugodno delovanje na zdravje ljudi. Oleuropein deluje antioksidativno, antiaterogeno, protitumorno, protimikrobno in protivnetno (14). Strukturno oleuropeina so iz svežih listov oljke določili Panizzi in sodelavci leta 1960 (13, 14). Kemične in encimske reakcije pri predelavi oliv v oljčno olje zmanjšajo koncentracijo oleuropeina in poveča se količina hidroksitirozola, ki je glavni razgradnji produkt oleuropeina (14). Oleuropein je v večjih količinah prisoten v nepredelanih olivah in oljčnih listih, hidroksitirozol pa je v večjih koncentracijah prisoten v olivah in oljčnem olju (15). Molekula oleuropeina je sestavljena iz treh strukturnih podenot (Slika 5): na elenolno kislino (sekoiridoid) je vezana molekula glukoze in 4-(2-hidroksietil) benzen-1,2-diol, znan tudi kot hidroksitirozol (polifenol). Olive vsebujejo 140 mg/g suhe snovi oleuropeina, malo manj oleuropeina pa vsebujejo oljčni listi (60–90 mg/g suhe snovi). Ugotovili so, da se

oleuropein hitro absorbira po zaužitju, maksimalno plazemsko koncentracijo doseže v 2 urah. Hidroksitirozol je glavni metabolit, ki se hitro izloči v urin v obliki glukuronida ali v zelo nizkih koncentracijah kot prost hidroksitirozol (14).



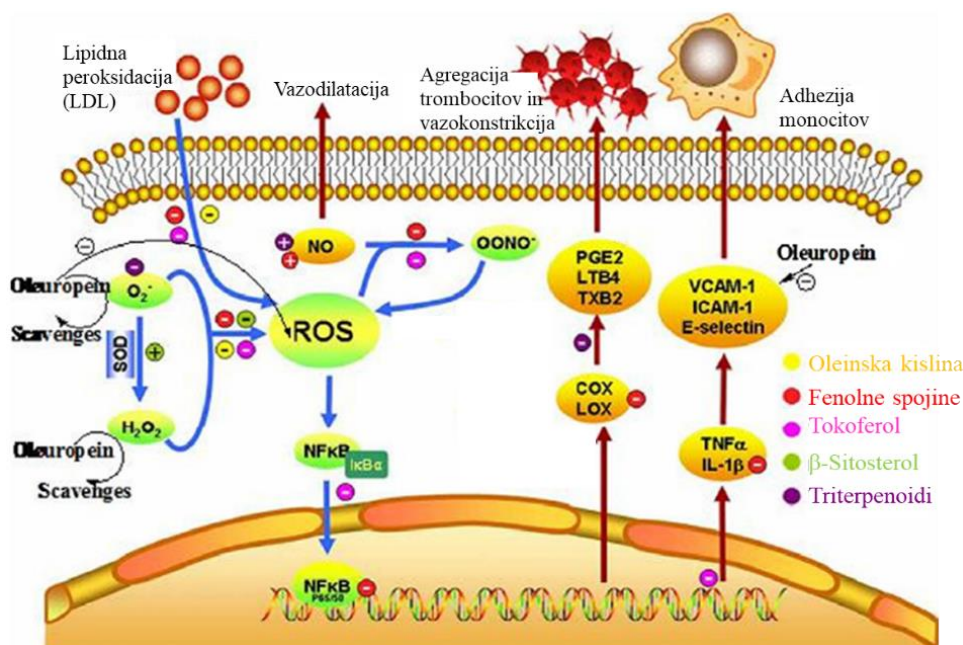
Slika 5: Molekulska struktura oleuropeina.

### 1.6.1 Kardioprotektivno delovanje oleuropeina

Oleuropein ima koristen učinek na bolezni srca in ožilja. In sicer deluje vazodilatorno, preprečuje agregacijo trombocitov, ima protivnetno delovanje, protimikrobno delovanje in antioksidativne lastnosti (Slika 6) (14). Oleuropein je zaščitni dejavnik pred aterosklerozo.

Glavni mehanizem, s katerim sestavine oljčnega olja vplivajo na aktivacijo endotelija, je inhibicija nastajanja in/ali odstranjevanje ROS. Oleinska kislina, oleuropein in  $\beta$ -sitosterol inhibirajo tvorbo znotrajceličnih ROS.  $\beta$ -sitosterol lahko poveča aktivnost encima SOD, s tem pa zmanjša nivo  $O_2^{\cdot-}$ .  $O_2^{\cdot-}$  se v celici pretvori s pomočjo SOD do  $H_2O_2$  in kisika in na ta način varuje celice pred toksičnostjo  $O_2^{\cdot-}$  in zmanjša verjetnost nastanka peroksinitrita ( $ONOO^-$ ), ki lahko povzroči oksidativni stres. Čeprav v reakciji nastane  $H_2O_2$ , ki je močan oksidant, ga ne uvrščamo med radikale. Še vedno pa je nevaren za celico, saj ob prisotnosti ionov prehodnih kovin Fe in Cu nastaja  $HO^{\cdot}$ . S pomočjo encima katalaze pa se  $H_2O_2$  pretvori do vode in kisika. Različni dejavniki tveganja za nastanek ateroskleroze (povišane vrednosti holesterola v krvi, povišan krvni tlak, kajenje...) povečujejo koncentracijo  $O_2^{\cdot-}$  v endoteliju arterije. Zato bi bila smiselna uporaba fenolnih antioksidantov v začetnem procesu ateroskleroze, ko zaradi večjih koncentracij  $O_2^{\cdot-}$  nastane toliko  $ONOO^-$ , da ga razpoložljivi antioksidanti niso sposobni sproti odstranjevati in se začne oksidacija LDL (lipoproteini nizke gostote). Ko delci LDL vstopijo skozi endotelijsko plast arterij, se v prisotnosti ROS ali celo oksidativnega stresa oksidirajo. V oksidiranih LDL so prisotni različni citotoksični hidroperoksidi lipidov, reaktivni aldehidi, radikali (peroksilni in alkoksilni radikali) in citotoksični oksisteroli (produkti oksidacije holesterola) (3, 14).

Tokoferol in fenolne spojine so učinkoviti antioksidanti, ki zavrejo lipidno peroksidacijo, odstranjujejo ROS in NO<sup>•</sup> in na ta način se zmanjša verjetnost nastanka ONOO<sup>-</sup>. V steni arterije lahko ONOO<sup>-</sup> sproži oksidacijo LDL in nitriranje tirozinov v LDL delcih, kar pojasnjuje vpletenost RNS v oksidativni stres. ROS lahko aktivirajo jedrni dejavnik kapa B (transkripcijski faktor NF-κB), ki se premakne v jedro celice, kjer se veže na prepoznane sekvence DNA in sproži izražanje genov. Aktiviranje NF-κB je lahko blokirano s strani α-tokoferil sukcinata. Fenolne spojine pa blokirajo nastanek NF-κB/DNA kompleksov. Posledica aktivacije NF-κB je izražanje genov za vnetne citokine (dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β)), lipooksigenazo (LOX) ter ciklooksigenazo (COX) in s tem vpliv na nivo celičnih adhezijskih molekul in eikozanoidov (derivati arahidonske kisline, mediatorji vnetja). Oleuropein direktno zavira sintezo žilnih in znotrajceličnih adhezijskih molekul VCAM-1, ICAM-1, selektina E, ki nakazujejo na poškodbo endotelija. Aktivacijo LOX in COX zavirajo fenoli in triterpenoidi (oleuropein, oleanolna kislina), medtem ko izražanje IL-1β zavirajo fenoli in tokoferoli, kar prispeva k zaščiti endotelija pred vazokonstrikcijo, agregacijo trombocitov in adhezijo monocitov. Oleuropein zavira adhezijo in agregacijo trombocitov, kar je povezano z zaviranjem cAMP-fosfodiesteraze. Oleuropein poveča produkcijo NO<sup>•</sup>, ki z relaksacijo gladkih mišičnih celic (vazodilatacija) znižuje krvni tlak (3, 14).



Slika 6: Shema mehanizmov nekaterih sestavin oljčnega olja (prirejeno po 14).

## **Antioksidativno delovanje**

Oleuropein učinkovito inhibira oksidacijo LDL (oksidiran LDL pridobi aterogene lastnosti) in na ta način zmanjšuje incidenco srčno žilnih bolezni predvsem na področju Mediterana (mediteranski način prehranjevanja), kjer je prehrana bogata s polifenolnimi spojinami (oljčno olje, sveže sadje in zelenjava). Odstranjevanje radikalov in inhibicija oksidacije LDL ugodno modificirata patofiziološke procese na celični ravni. In sicer z inhibicijo produkcije superoksidnega aniona, inhibicijo agregacije trombocitov z zaviranjem tvorbe tromboksana in zmanjšanje proizvodnje provnetnega levkotriena B<sub>4</sub> (preko inhibicije encima COX in LOX) lahko prepreči nastanek ateroskleroze.

Coni in sodelavci so ugotovili, da so se ob dodatku oljčnega olja in 7 mg/kg oleuropeina v prehrano kuncev zmanjšale plazemske koncentracije celotnega holesterola in zmanjšalo nastajanje oksidiranega LDL. Tako se je tveganje za nastanek ateroskleroze zmanjšal (14). Visioli in sodelavci pa so dokazali, da oleuropein *in vivo* zniža procese lipidne peroksidacije. Uporabili so biološki označevalec lipidne peroksidacije (F<sub>2</sub>-izoprostan) in na ta način preučili, ali ima oleuropein antioksidativno delovanje *in vivo* pri ljudeh. V študiji leta 2006 so prostovoljci jemali 6 tednov oleuropein. Učinki so se kazali v zmanjšani koncentraciji celotnega holesterola in trigliceridov (14).

## **Protivnetno delovanje**

Oleuropein vpliva na aktivnost encima inducibilne NO-sintaze v aktiviranih makrofagih, ki lokalno proizvaja NO<sup>\*</sup>, ta pa deluje citotoksično na mikrobe in tako sodeluje v imunski obrambi. Dobro je poznan protivnetni učinek oleuropeina s tem, ko inhibira aktivnost encima LOX in na ta način prepreči sintezo levkotriena B<sub>4</sub> iz arahidonske kisline, ki je mediator vnetja (14, 16).

### **1.6.2 Protitumorno delovanje oleuropeina**

Več epidemioloških študij je pokazalo, da je incidenca nekaterih vrst raka v Mediteranu nižja v primerjavi z drugimi področji. To so pripisali mediteranski prehrani. V randomizirani klinični študiji so ugotovili ugodne učinke mediteranske prehrane pri zmanjšanju smrtnosti za 56 % in pri zmanjšanju tveganja za nastanek raka za 61 % v obdobju štiriletnega spremljanja prostovoljcev. Protitumorno delovanje pripisujejo oleuropeinu. Ta deluje proapoptotično, antiproliferativno, zmanjša invazivnost na celičnih linijah različnih vrst raka

(mehurja, dojk, debelega črevesja, levkemije, prostate, raka ščitnice in ledvic). Kot antioksidant ščiti celice pred poškodbami DNA, ki nato vodijo v mutacije (11, 15).

## **1.7 ANTIOKSIDANTI KOT PREHRANSKA DOPOLNILA**

Splošna priporočila govorijo o tem, da ni dobro jemati en sam antioksidant v visokih odmerkih, ampak je bolje uporabljati kombinacijo antioksidantov, ker s tem vplivamo na celotno antioksidativno mrežo. Namreč en sam antioksidant v visokih koncentracijah lahko izraža pro-oksidativni učinek nad antioksidativnim. Vsak posamezen antioksidant v kombinaciji naj ne preseže priporočenih dnevnih odmerkov. Predno začnemo z jemanjem antioksidantov v obliki prehranskih dopolnil, je treba ugotoviti, ali nam ga res primanjkuje. Treba je določiti stopnjo oksidativnega stresa pri posamezniku v telesnih tekočinah. Lažje kot oksidativni status je določiti antioksidativni status, torej kakšne so zaloge antioksidantov v plazmi. Uporabo prehranskih dopolnil naj nadomešča zdrava in uravnotežena prehrana ali zmerno uživanje živil, ki so bogata z antioksidanti (oljčno olje, zeleni čaj, rdeče vino...). Prehranska dopolnila so smiselna pri ljudeh, kjer z zdravo prehrano ne moremo doseči zadostnega vnosa antioksidantov, vendar jih nato postopoma opuščamo in nadomeščamo z uravnoteženo prehrano bogato s sadjem in zelenjavo (17). Le ta vsebuje različne antioksidante v varnih koncentracijah, med tem ko prehranska dopolnila z visokimi odmerki antioksidantov lahko porušijo ravnovesje med tvorbo in odstranjevanjem reaktivnih zvrsti (1). Pomembno je tudi vedeti, da je antioksidante primerno jemati samo na samem začetku radikalno sproženih oksidacij. Ko enkrat pride do trajnih oksidativnih poškodb, so antioksidanti največkrat neučinkoviti. Raziskovalci iščejo načine za ugotavljanje antioksidativnega statusa organizma, le ta bi pravilno usmerjal uporabo antioksidantov v obliki prehranskih dopolnil. Do sedaj se sami odločamo, kako in kdaj bomo organizem razbremenili oksidativnega stresa in zaščitili pred preveliko količino radikalov. Sami lahko prispevamo k lovljenju ravnotežja med reduktivnimi in oksidativnimi procesi in s tem obvarujemo organizem pred različnimi obolenji (4). Zaključimo lahko, da jemanje prevelikih količin prehranskih dopolnil z antioksidanti lahko vodi v pro-oksidativne učinke in antioksidativni stres, kjer je moteno celično signaliziranje (1).

### **1.7.1 Določanje oksidativnega stresa**

Znatno in dolgotrajen oksidativni stres ob nezadostni antioksidativni zaščiti pusti dolgotrajne posledice. V zgodnjem obdobju neravnovesja oksidativni stres ne kaže tipične klinične slike,

ki bi nas opozorila na prisotnost oksidativnega stresa v organizmu. Zaznamo ga šele, ko pride do nepopravljivih poškodb in simptomov kronične bolezni. Zaradi preprečevanja razvoja bolezni je treba določiti stopnjo oksidativnega stresa in odpraviti njegove vzroke (npr. kronično vnetje z obsežnim oksidativnim stresom vodi do pojava raka in degenerativnih bolezni) (3, 17). Določitev stanja oksidativnega stresa je težko določljivo, ker imajo radikali kratko življenjsko dobo (večina okoli 1 ms) in so visoko kemično reaktivni. Uporabljajo se različne metode, s katerimi lahko določamo neposredno posamezne reaktivne zvrsti ali pa posredno različne produkte oksidacij. Za določitev oksidativnega stresa se najpogosteje uporabljajo:

- elektronska paramagnetna resonanca z uporabo spinskih pasti, kjer ujamemo manj stabilne in kratkožive radikale,
- določanje malondialdehida kot sekundarnega produkta oksidacije lipidov, določanje izoprostanov kot pomembnih bioloških označevalcev lipidne peroksidacije (določamo jih v urinu),
- določanje 8-hidroksi-gvanozina kot biološki označevalec oksidacije DNA v urinu,
- kemiluminescenca za merjenje sproščanja radikalov iz nevtrofilcev (1, 2).

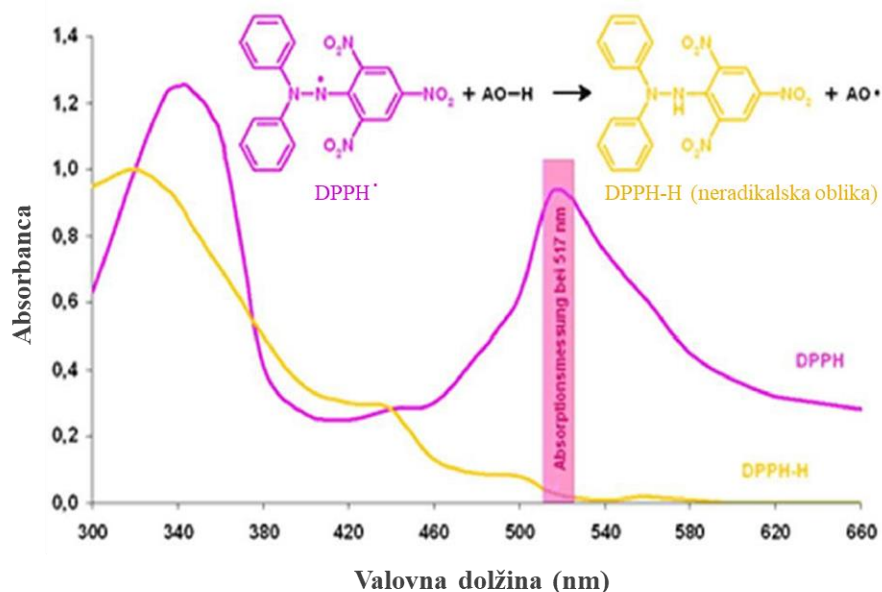
## **1.8 VREDNOTENJE ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI**

### **1.8.1 DPPH test**

2,2-Difenil-1-pikrilhidrazilni (DPPH) test se uporablja za oceno antioksidativnih lastnosti različnih spojin in njihovih zmesi (18, 19). To metodo je predstavil Marsden Blois leta 1958, ki je dokazal, da je DPPH sposoben sprejeti H-atom od molekule cisteina (antioksidant) (18). Metoda redukcije DPPH je enostavna, hitra, poceni in učinkovita kolorimetrična metoda (20, 21).

DPPH je stabilen organski radikal, ki ima nesparjen valenčni elektron pretežno na enem dušikovem atomu v dušikovem mostu (22). Zaradi delokalizacije nesparjenega elektrona po celotni molekuli DPPH, le ta ne dimerizira, kot se to zgodi z večino ostalih radikalov. Temno vijolično obarvana raztopina DPPH v metanolu ima maksimalno absorpcijo pri 517 nm (20, 23). DPPH ob prisotnosti antioksidanta lahko sprejme elektron ali H-atom od antioksidanta in DPPH preide v reducirano obliko 2,2-difenil-1-pikrilhidrazin (DPPH-H) (19, 20). Tekom redukcije radikala se spremeni barva iz vijolične v svetlo rumeno barvo, sočasno pa močno upade absorbanca pri valovni dolžini 517 nm (Slika 7). Barvno spremembo spremljamo

spektrofotometrično (18). Večje število H-atomov kot lahko antioksidant odda, več molekul DPPH lahko reducira in svetlejša je obarvanost raztopine (20).



Slika 7: Graf prikazuje barvno spremembo DPPH iz vijolične v rumeno barvo, ko je izpostavljen antioksidantu (prirejeno po 24).

Za interpretacijo rezultatov meritev uporabljamo parameter  $EC_{50}$  (50-odstotna efektivna koncentracija) (23).  $EC_{50}$  je definirana kot koncentracija antioksidanta, ki je potrebna za redukcijo 50% začetne koncentracije DPPH. Parameter  $EC_{50}$  je prvi vpeljal Brand Williams leta 1995 in nam omogoča primerljivost različnih antioksidantov po učinkovitosti, ne glede na koncentracijo preiskovanega vzorca (20). Nižja, kot je vrednost  $EC_{50}$ , večji bo delež reduciranega DPPH in večja je antioksidativna kapaciteta vzorca. Kot standarda sta široko uporabna vitamin C in E, s katerima potrdimo ustreznost izbrane metode za vrednotenje antioksidativnih lastnosti (23).

Antioksidativno aktivnost merimo pri sobni temperaturi in s tem preprečimo možno termično degradacijo molekul (21). Sončna svetloba, kisik in pH reakcijske mešanice vplivajo na stabilnost raztopine DPPH (znižajo absorbanco DPPH) (22, 25). Pri DPPH testu se uporabljajo različni protokoli, ki se razlikujejo v koncentraciji raztopine DPPH, različni inkubacijski časi, topila, pH reakcijske mešanice, različni načini podajanja rezultatov in tako ne moremo primerjati rezultate med seboj (22). Prednost metode je, da DPPH reagira s celotnim vzorcem in tudi s šibkimi antioksidanti, ki zahtevajo daljše inkubacijske čase.

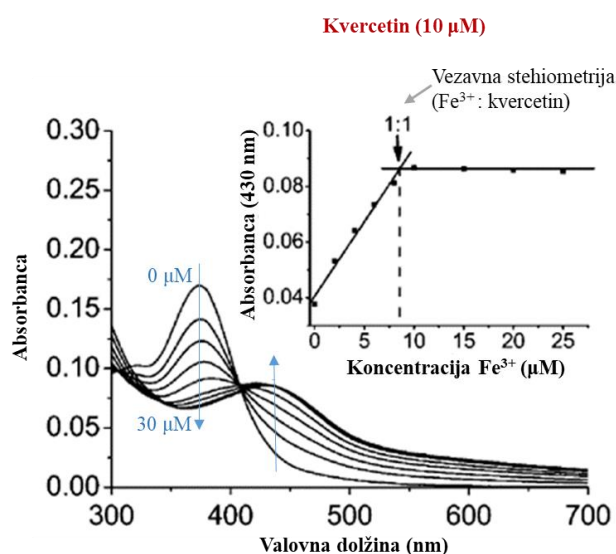
DPPH test je uporaben za določanje antioksidativne kapacitete tako hidrofilnih kot lipofilnih antioksidantov (19).

### 1.8.2 UV-Vis spektrofotometrična titracija vzorcev z $\text{Fe}^{3+}$ ioni

Poleg sposobnosti redukcije radikalov prispeva k antioksidativnim lastnostim fenolov tudi sposobnost keliranja kovinskih ionov (26). Z UV-Vis spektrofotometrično titracijo lahko raziskujemo sposobnost spojin za vezavo različnih ionov kovin, kot so  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ... v kelatne komplekse (27, 28).

Fenoli (ligandi) imajo značilne absorpcijske pasove v UV oziroma vidnem delu spektra (26). Ob dodatku  $\text{Fe}^{3+}$  ionov v raztopino spojine opazimo v UV-Vis spektru nov absorpcijski vrh pri določeni valovni dolžini, kar kaže na nastanek kelatnega kompleksa med preiskovano spojino in  $\text{Fe}^{3+}$  ioni. Nato izrišemo titracijsko krivuljo v odvisnosti od koncentracije  $\text{Fe}^{3+}$  ionov in absorbance pri ustrezni valovni dolžini, ki jo odčitamo iz novega naraščajočega absorpcijskega vrha. Vezavno stehiometrijo med preučevanim antioksidantom in  $\text{Fe}^{3+}$  ioni določimo na podlagi sprememb v absorbanci titracijske krivulje (27, 28).

Guo M. in sodelavci so ugotovili nastanek kompleksa 1 : 1 ( $\text{Fe}^{3+}$  : kvercetin, množinsko razmerje) z UV-Vis spektrofotometrično titracijo v 20 mM kalij-fosfatnem pufru s pH 7,2 (Slika 8). Z ESI-masno spektrometrijo pa so ugotovili, da kvercetin tvori komplekse z železom v razmerju 1 : 1 in 1 : 2 ( $\text{Fe}^{3+}$  : kvercetin) (28).



Slika 8: Titracija kvercetina z  $\text{Fe}^{3+}$  v 20 mM kalij-fosfatnem pufru s pH 7,2. Zgoraj desno na sliki je titracijska krivulja: absorbanca kompleksa kvercetin- $\text{Fe}^{3+}$  pri 430 nm v odvisnosti od koncentracije  $\text{Fe}^{3+}$  (0 – 30 μM) (prirejeno po 28).

## 2. NAMEN DELA

V okviru magistrske naloge bomo ugotavljali ali standardiziran izvleček oleuropeina, ekstrakti iz oljčnih listov in vzorec »terana«, pridobljen iz ovojnic grozdja po stiskanju, izkazujejo antioksidativno delovanje. Rastlinske ekstrakte smo dobili od firme IME-Insol d.o.o, katere cilj je predelava rastlinskih odpadkov v uporabne izdelke z dodano vrednostjo. Kemijska sestava ekstraktov še ni znana, saj želimo s preliminarnimi testi ugotoviti, ali ekstrakti sploh imajo antioksidativno delovanje oziroma kakšna je njihova antioksidativna kapaciteta. Kot standarda bomo uporabili  $\alpha$ -tokoferol in kvercetin, s katerima bomo preverili ustreznost analiznih metod za vrednotenje antioksidativnih lastnosti. Antioksidativno delovanje bomo v omenjenih vzorcih ocenili na osnovi meritev sposobnosti redukcije radikala DPPH, kinetike redukcije DPPH in UV-Vis spektrofotometrične titracije vzorcev z  $\text{Fe}^{3+}$  ioni, s katero bomo preverili zmožnost kelacije železovih ionov. Na podlagi rezultatov pridobljenih z redukcijo DPPH bomo vzorce razvrstili glede na antioksidativno kapaciteto (izraženo kot  $\text{EC}_{50}$ ) po antioksidativni učinkovitosti. Spremljali bomo kinetiko redukcije DPPH pri različnih koncentracijah izbranih vzorcev in izračunali hitrostne konstante reakcij ter izrisali grafe titracijskih krivulj pri določeni valovni dolžini za vse izbrane vzorce. Preko sprememb v absorbanci titracijskih krivulj pa bomo določili vezavno stehiometrijo med vzorcem/standardom in  $\text{Fe}^{3+}$ .

Zanimali so nas različni mehanizmi delovanja antioksidantov, zato smo izvedli različne teste. Poleg antioksidativne kapacitete, je pomembna tudi hitrost redukcije in časovni profil hitrosti reakcije ter seveda kelacija kovinskih ionov, kjer imamo drugačen mehanizem antioksidativnega delovanja.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1 TOPILA IN REAGENTI

Preglednica I: Prikaz topil in reagentov, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu.

| Ime                          | Kemijska formula     | Molska masa (g/mol) | Proizvajalec                           |
|------------------------------|----------------------|---------------------|----------------------------------------|
| 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil | $C_{18}H_{12}N_5O_6$ | 394,32              | Sigma-Aldrich                          |
| Metanol                      | $CH_3OH$             | 32,04               | CARLO ERBA Reagents                    |
| MiliQ® prečiščena voda       | $H_2O$               | 18,00               | Pripravljena na Fakulteti za farmacijo |
| Natrijev hidroksid           | $NaOH$               | 40,00               | Merck                                  |
| Železov(III) klorid          | $FeCl_3$             | 162,21              | ACROS Organics                         |
| Ocetna kislina               | $CH_3COOH$           | 60,05               | Merck                                  |
| Natrijev acetat              | $CH_3COONa$          | 82,03               | Merck                                  |

#### Priprava raztopine 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila (DPPH) v metanolu:

V 25 mL merilno bučko smo natehtali 6,90 mg DPPH in dodali približno 15 mL metanola. Merilno bučko smo zaprli, premešali in sonicirali v ultrazvočni kopeli, da so se raztopili vsi kristalčki DPPH (bistra vijolična raztopina). Z metanolom smo dopolnili merilno bučko do oznake, zamašili in dobro premešali. Tako smo pripravili 700  $\mu$ M osnovno raztopino DPPH, ki smo jo zaščitili pred svetlobo z aluminijasto folijo ter jo hranili v hladilniku pri temperaturi 2-8 °C.

Za pripravo delovne raztopine DPPH s koncentracijo 140  $\mu$ M smo v 10 mL penicilinko odpipetirali 4 mL metanola in 1 mL 700  $\mu$ M osnovne raztopine DPPH. Penicilinko smo zaprli s pokrovčkom in ovili z aluminijasto folijo. 140  $\mu$ M raztopino DPPH smo uporabili pri določanju antioksidativne kapacitete ter pri spremljanju kinetike redukcije DPPH.

Pred začetkom izvedbe omenjenih metod smo posneli UV-Vis spekter raztopine DPPH in določili valovno dolžino maksimuma absorpcije. In sicer smo v kiveto odpipetirali 1 mL metanola in 1 mL 140  $\mu$ M raztopine DPPH ter z UV-Vis spektrofotometrom posneli

absorpcijski spekter v območju 350-800 nm. Absorpcijski maksimum raztopine DPPH je bil pri 517 nm, zato smo meritve kinetike redukcije DPPH in določanja sposobnosti redukcije DPPH izvajali pri tej valovni dolžini.

#### **Metanol:**

Metanol smo uporabili kot topilo za pripravo vzorcev, standardov in raztopine DPPH.

#### **MiliQ® prečiščena voda:**

Prečiščeno vodo pripravljeno z aparaturo za reverzno osmozo MiliQ® smo uporabili pri pripravi vzorcev, ki so bili v metanolu slabo topni (motni vzorci) ter pri pripravi acetatnega pufra.

#### **Natrijev hidroksid (NaOH):**

Uporabili smo 0,1 M NaOH pri pripravi vzorcev, ki so bili slabo topni v metanolu.

#### **1 mM raztopina FeCl<sub>3</sub>:**

Za pripravo 5 mM raztopine FeCl<sub>3</sub> smo v 10 mL penicilinko natehtali 5,32 mg FeCl<sub>3</sub> ter odpipetirali 6,56 mL 50 mM acetatnega pufra s pH 3,5. Volumen dodanega acetatnega pufra smo preračunali s pomočjo formule:  $V = \frac{m}{M_r * c}$ . Nato smo v penicilinko odpipetirali 1 mL 5 mM raztopine FeCl<sub>3</sub> in ji dodali 4 mL 50 mM acetatnega pufra s pH 3,5. Pripravili smo 1 mM raztopino FeCl<sub>3</sub> (redčili smo 1 : 5).

#### **1,5 mM raztopina FeCl<sub>3</sub>:**

Za pripravo 1,5 mM raztopine FeCl<sub>3</sub> smo v 10 mL penicilinko natehtali 2,14 mg FeCl<sub>3</sub> ter odpipetirali 8,80 mL 50 mM acetatnega pufra s pH 3,5. Volumen dodanega acetatnega pufra smo preračunali s pomočjo formule:  $V = \frac{m}{M_r * c}$ . 2,5 mM; 3,75 mM in 7,5 mM raztopine FeCl<sub>3</sub> smo pripravili po enakem postopku kot 1,5 mM raztopino FeCl<sub>3</sub>.

#### **Priprava 50 mM acetatnega pufra s pH 3,5:**

Najprej smo pripravili 0,1 M raztopino očetne kisline. V 200 mL merilno bučko smo odpipetirali 1,14 mL očetne kisline (izračunali smo maso očetne kisline (1,2 g):  $m = c * M_r * V$  in preko enačbe:  $V = m/\rho$  preračunali dodani volumen očetne kisline) in z MiliQ®

prečiščeno vodo dopolnili merilno bučko do oznake. Merilno bučko smo zamašili in dobro premešali.

Nato smo pripravili 0,1 M raztopino natrijevega acetata. V 25 mL merilno bučko smo natehtali 205,08 mg natrijevega acetata in z MiliQ® prečiščeno vodo dopolnili merilno bučko do oznake. Merilno bučko smo zamašili in večkrat premešali.

V 600 mL čašo smo z merilnim valjem odmerili 190 mL pripravljene raztopine očetne kisline in 10 mL pripravljene raztopine natrijevega acetata. Pripravili smo 0,1 M acetatni pufer, ki smo ga nato 2-krat redčili, tako da smo dodali 200 mL MiliQ® prečiščene vode. S pH metrom smo pomerili pH pripravljenega acetatnega pufra, ki smo ga nato shranili v 500 mL merilno bučko in ustrezno označili.

### **3.2 MERILNI PRIPOMOČKI IN APARATI**

Pri laboratorijskem delu smo uporabili naslednje pripomočke:

- polavtomatske pipete BRAND Transferpette® S: 10 - 100 µL, 100 - 1000 µL in 0,5 - 5 mL; Thermo SCIENTIFIC FINNPIPETTE® F2 1 - 10 µL,
- nastavke za pipete BRAND®,
- 5 in 10 mL penicilinke neoLAB,
- 1,5 mL plastične semi-mikro kivete BRAND®,
- kiveto iz kvarčnega stekla,
- mikrotitrne plošče TPP® s 96 vdolbinicami,
- parafilm BEMIS®,
- aluminijasta folija,
- laboratorijsko steklovino, kovinske žličke, plastični zamaški različnih proizvajalcev,
- osebna zaščitna sredstva.

Pri laboratorijskem delu smo uporabili naslednje aparate:

- analitski tehnici AG245 in AT261 DeltaRange® proizvajalca METTLER TOLEDO
- ultrazvočno kopel Sonis 3 proizvajalca ISKRA Pio,
- UV-Vis spektrofotometer Cary 50 Conc proizvajalca VARIAN,
- spektrofotometrični čitalec mikrotitrskih ploščic Synergy HT Hybrid Reader proizvajalca BioTek®
- pH meter MP 220 proizvajalca Mettler-Toledo

### 3.3 RAČUNALNIŠKA PROGRAMSKA OPREMA

- Za določitev valovne dolžine maksimuma absorpcije raztopine DPPH na spektrofotometru in pri UV-Vis spektrofotometrični titraciji vzorcev z  $\text{Fe}^{3+}$  ioni smo uporabili program Cary WinUV (Scan). Pri meritvah kinetike redukcije DPPH pa program Advanced (Kinetics).
- S spektrofotometričnim čitalcem mikrotitrskih ploščic in programom GEN5 203 smo izmerili absorbance vzorcev in standardov pri valovni dolžini 517 nm in iz dobljenih rezultatov izračunali vrednosti  $\text{EC}_{50}$ .
- Za risanje grafov, analizo meritev absorbanc in izračun statističnih parametrov smo uporabili program Microsoft Excel 2016.

### 3.4 OPIS IN PRIPRAVA VZORCEV IN STANDARDOV

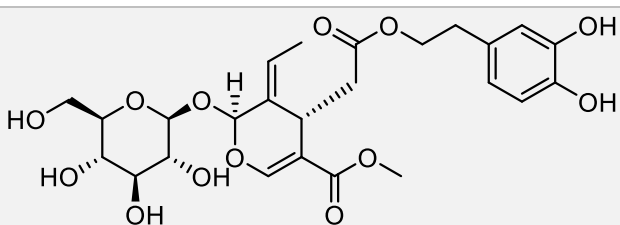
#### 3.4.1 Opis vzorcev

Preiskovali smo 7 suhih ekstraktov iz oljčnih listov (v nadaljevanju vzorci od **1** do **7**) in standardiziran suhi izvleček **oleuropeina** (po evropski farmakopeji vsebuje standardiziran izvleček iz oljčnih listov najmanj 16% oleuropeina), ki ima že znanstveno dokazano antioksidativne učinke (29). Preiskovali smo še vzorec »terana« (vzorec **8**), pridobljen iz ovojnic grozdja po stiskanju. Rastlinske ekstrakte (Slika 9) smo dobili od firme IME-Insol d.o.o, ki se ukvarja s ponovno uporabo tehnoloških odpadkov rastlin, tako da pridobiva izvlečke s superkritično ekstrakcijo s  $\text{CO}_2$ . Kemijska struktura oleuropeina je prikazana v Preglednici II.



Slika 9: Prikaz preiskovanih vzorcev.

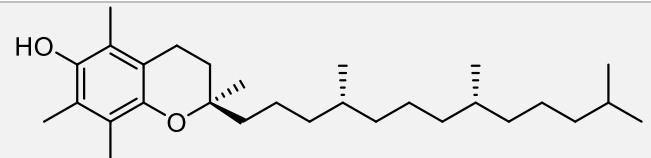
Preglednica II: Prikaz strukturnih lastnosti in molske mase oleuropeina.

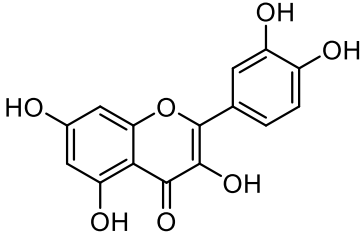
| Spojina    | Kemijska formula                                | Molska masa (g/mol) | Kemijska struktura in IUPAC ime spojine                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|------------|-------------------------------------------------|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Oleuropein | C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>13</sub> | 540,51              |  <p>metil (4<i>S</i>,5<i>E</i>,6<i>S</i>)-4-[2-[2-(3,4-dihidoksifenil)etoksi]-2-oksoetil]-5-etiliden-6-[(2<i>S</i>,3<i>R</i>,4<i>S</i>,5<i>S</i>,6<i>R</i>)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)oksan-2-il]oksi-4<i>H</i>-piran-3-karboksilat</p> |

### 3.4.2 Opis standardov

Za standard smo uporabili učinkovit lipidotopni antioksidant  **$\alpha$ -tokoferol**, 95%, proizvajalca ACROS Organics, ki je pri sobni temperaturi viskozna rumena tekočina in antioksidant **kvercetin**,  $\geq 95\%$ , proizvajalca Sigma-Aldrich, ki je pri sobni temperaturi bela praškasta snov (Preglednica III).

Preglednica III: Prikaz strukturnih lastnosti in molskih mas  $\alpha$ -tokoferola in kvercetina.

| Spojina             | Kemijska formula                               | Molska masa (g/mol) | Kemijska struktura in IUPAC ime spojine                                                                                                                                                 |
|---------------------|------------------------------------------------|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $\alpha$ -tokoferol | C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub> | 430,71              |  <p>(2<i>R</i>)-2,5,7,8-tetrametil-2-[(4<i>R</i>,8<i>R</i>)-4,8,12-trimetiltridecil]-6-kromanol</p> |

|           |                                                |        |                                                                                                                                            |
|-----------|------------------------------------------------|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kvercetin | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub> | 302,24 | <br>2-(3,4-dihidroksifenil)-3,5,7-trihidroksikromen-4-on |
|-----------|------------------------------------------------|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

### 3.4.3 Antioksidativna sposobnost redukcije radikala DPPH

#### 3.4.3.1 Priprava raztopin vzorcev

Vzorci **3**, **6**, **7** smo sušili z oljno vakuumsko črpalko pri sobni temperaturi do konstantne mase, ker so vsebovali zaostanek topila. Za meritve smo v 5 mL penicilinko natehtali približno natančno 1,00 do 2,00 mg vzorcev **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7** in **8**. Za pripravo 3 mL raztopin vzorcev smo kot topilo uporabili metanol. Za vsak vzorec smo s pomočjo enačbe  $\gamma = m/V$  izračunali masno koncentracijo osnovne raztopine. Pripravljene raztopine vzorcev smo sonicirali v ultrazvočni kopeli, dokler se niso v celoti raztopili. Osnovne raztopine vzorcev smo z metanolom redčili, tako da smo dobili za vsak vzorec po sedem različnih koncentracij, ki smo jih uporabili za spektroskopske meritve.

#### 3.4.3.2 Priprava raztopin standardiziranega izvlečka oleuropeina

Pripravili smo 812 µg/mL raztopino standardiziranega izvlečka **oleuropeina** v metanolu. V 5 mL penicilinko smo natehtali 1,86 mg vzorca, mu dodali 2,29 mL metanola (z enačbo  $\gamma = m/V$  smo izračunali masno koncentracijo osnovne raztopine) ter raztopino sonicirali v ultrazvočni kopeli tako dolgo, dokler se ves vzorec ni raztopil. Nato smo z redčenjem v metanolu pripravili ustrezne koncentracije, ki so bile v linearnem območju metode.

#### 3.4.3.3 Priprava raztopin standarda $\alpha$ -tokoferola

Za standard smo uporabili 1,50 mM raztopino  $\alpha$ -tokoferola, ki smo jo pripravili v metanolu. V 5 mL penicilinko smo natehtali 1,87 mg  $\alpha$ -tokoferola, mu dodali 2,89 mL metanola (potreben volumen metanola smo preračunali s pomočjo formule  $V = \frac{m}{M_r * c}$ ) ter raztopino sonicirali v ultrazvočni kopeli tako dolgo, dokler se ves  $\alpha$ -tokoferol ni raztopil. Nato smo z

redčenjem v metanolu pripravili ustrezne koncentracije standarda, ki smo jih uporabili za meritve.

### **3.4.4 Spremljanje kinetike redukcije DPPH**

#### **3.4.4.1 Priprava raztopin vzorcev**

Za meritve kinetike redukcije DPPH smo pripravili po 5 različnih koncentracij vsakega preiskovanega vzorca. In sicer smo za vzorce **1, 3, 4, 5, 6, 7, 8** pripravili raztopino s koncentracijo okrog vrednosti  $EC_{50}$  (po 90 minutah inkubacije), dve raztopini s koncentracijo nad  $EC_{50}$  in dve raztopini pod to vrednostjo. Pri vzorcu **2** smo pripravili le eno raztopino s koncentracijo nad vrednostjo  $EC_{50}$ , saj je bila osnovna raztopina s koncentracijo 817  $\mu\text{g/mL}$  močno rumene barve ter vizualno vidna prisotnost kristalov vzorca, kar je pomenilo lom svetlobe na trdnih delcih in s tem ustvarjanje šuma.

Osnovne raztopine vzorcev smo pripravili tako, da smo v 25 mL erlenmajerico natehtali približno natančno 5 mg vzorca. Za pripravo raztopin vzorcev smo kot topilo uporabili metanol. Volumen dodanega metanola je bil od 6 – 10 mL, odvisno kolikšno koncentracijo osnovne raztopine smo želeli. Za vsak vzorec smo s pomočjo enačbe  $\gamma = m/V$  izračunali masno koncentracijo osnovne raztopine, glede na natančen volumen metanola, ki smo ga odpipetirali in natehtano maso vzorca. Pripravljene raztopine vzorcev smo sonicirali v ultrazvočni kopeli, dokler se niso v celoti raztopili. Osnovne raztopine vzorcev smo z metanolom redčili, tako da smo dobili za vsak vzorec po pet različnih koncentracij, ki smo jih uporabili za meritve.

#### **3.4.4.2 Priprava raztopin standardiziranega izvlečka oleuropeina**

Pripravili smo 865  $\mu\text{g/mL}$  osnovno raztopino standardiziranega izvlečka **oleuropeina** v metanolu. V 25 mL erlenmajerico smo natehtali 10 mg vzorca, mu dodali 11,6 mL metanola (s pomočjo enačbe  $\gamma = m/V$  smo izračunali masno koncentracijo osnovne raztopine) ter raztopino sonicirali v ultrazvočni kopeli tako dolgo, dokler se ves vzorec ni raztopil. Nato smo z redčenjem v metanolu pripravili ustrezne koncentracije, ki smo jih uporabili za meritve kinetike.

### 3.4.5 UV-Vis spektrofotometrična titracija vzorcev z Fe<sup>3+</sup> ioni

#### 3.4.5.1 Priprava raztopin vzorcev

Pripravili smo 2,16 mg/mL osnovnih raztopin vzorcev 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 in 8. V 10 mL penicilinko smo natehtali približno natančno 10 mg vzorca. S formulo  $V = m/\gamma$  smo preračunali ustrezen volumen metanola, ki smo ga odpipetirali v penicilinko z natehtanim vzorcem ter pripravljeno raztopino sonicirali v ultrazvočni kopeli, dokler se ves vzorec ni raztopil. 2,16 mg/mL raztopine vzorcev 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 smo nato redčili z acetatnim pufrom (50 mM; pH 3,5) in pripravili raztopine vseh vzorcev s koncentracijo 108 µg/mL. Vzorec 2 smo še 2-krat redčili z acetatnim pufrom (50 mM; pH 3,5), da smo dobili raztopino s koncentracijo 54,1 µg/mL. Vzorec 3 pa 3-krat redčili z acetatnim pufrom (50 mM; pH 3,5), da smo dobili raztopino s koncentracijo 36,0 µg/mL.

#### 3.4.5.2 Priprava raztopine standardiziranega izvlečka oleuropeina

2,16 mg/mL osnovno raztopino standardiziranega izvlečka oleuropeina v metanolu smo pripravili tako, da smo v 10 mL penicilinko natehtali 11,06 mg vzorca, mu dodali 5,12 mL metanola ter raztopino sonicirali v ultrazvočni kopeli, dokler se ves vzorec ni raztopil. Osnovno raztopino s koncentracijo 2,16 mg/mL smo nato redčili z acetatnim pufrom (50 mM; pH 3,5) do 21,6 µg/mL koncentracije, ki smo jo uporabili za meritve.

#### 3.4.5.3 Priprava raztopine standarda kvercetina

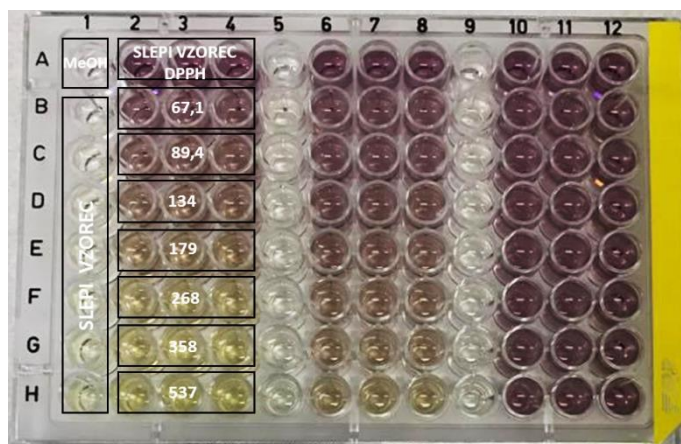
1,00 mM osnovno raztopino kvercetina smo pripravili tako, da smo v 10 mL penicilinko natehtali 1,50 mg kvercetina, mu dodali 4,96 mL metanola ter raztopino sonicirali v ultrazvočni kopeli, dokler se ves kvercetin ni raztopil. 1,00 mM osnovno raztopino smo nato redčili z acetatnim pufrom (50 mM; pH 3,5) do 10 µM koncentracije, ki smo jo uporabili za meritve.

### 3.5. IZVEDBA METOD EKSPERIMENTALNEGA DELA

#### 3.5.1 Postopek določanja antioksidativne sposobnosti redukcije radikala DPPH

Za spektroskopske meritve vsakega vzorca in standarda smo pripravili sedem različnih koncentracij, kot smo to že predhodno opisali v pripravi raztopin vzorcev in standarda. Na mikrotitrsko ploščico smo v triplikatih nanesti po 150  $\mu\text{L}$  raztopine vzorca določene koncentracije in dodali po 150  $\mu\text{L}$  140  $\mu\text{M}$  raztopine DPPH, ter inkubirali 30 minut v temi pri sobni temperaturi. Nato smo s spektrofotometričnim čitalcem mikrotitrskih ploščic Synergy HT Hybrid Reader in programom GEN5 203 izmerili absorbance pri valovni dolžini 517 nm. Postopek merjenja absorbanc smo ponovili še po 60 in 90 minutah od začetka inkubacije. Rezultate smo podali kot povprečne vrednosti treh izmerjenih absorbanc ob določenem času.

Na mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinicami smo v triplikatih nanesti vzorce, standard in reagente (Slika 10, Preglednica IV).



Slika 10: Mikrotitrsko ploščica z reakcijami med DPPH in različnimi koncentracijami treh preiskovanih vzorcev. V vdolbinico B smo v triplikatih nanesti najnižjo koncentracijo, v vdolbinico H pa najvišjo koncentracijo vzorca.

Preglednica IV: Prikaz reakcijskih mešanic nanosenih na mikrotitrsko ploščico.

| Reakcijska raztopina         | Sestavine                                             |
|------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Preiskovani vzorec/standard  | 150 $\mu\text{L}$ vzorca + 150 $\mu\text{L}$ DPPH     |
| Slepi vzorec (ozadje vzorca) | 150 $\mu\text{L}$ vzorca + 150 $\mu\text{L}$ metanola |
| Slepi vzorec DPPH            | 150 $\mu\text{L}$ DPPH + 150 $\mu\text{L}$ metanola   |
| Metanol (ozadje DPPH)        | 300 $\mu\text{L}$ metanola                            |

### 3.5.1.1 Izračun vrednosti EC<sub>50</sub>

Izračunali smo povprečje treh izmerjenih absorbanc in odšteli absorbanco slepega vzorca (ozadje vzorca) določene koncentracije vzorca po Enačbi 1:

$$\bar{A} = \frac{(A_1 + A_2 + A_3)}{3} - A \text{ (slepega vzorca)} \quad \text{Enačba 1}$$

$A_1, A_2, A_3$  – izmerjene absorbance triplikata določene koncentracije vzorca

$A$  (slepega vzorca) – absorbanca določene koncentracije vzorca brez DPPH

Iz dobljenih vrednosti absorbanc smo izračunali delež preostalega (nereduciranega) DPPH v reakcijski raztopini z Enačbo 2:

$$\% \text{ preostalega DPPH} = \frac{\bar{A} \text{ (preiskovanega vzorca)}}{\bar{A}_0 \text{ (absorbanca slepega vzorca DPPH)}} * 100 \quad \text{Enačba 2}$$

$\bar{A}$  – povprečje treh izmerjenih absorbanc določene koncentracije vzorca izračunano po enačbi 1

$\bar{A}_0$  – povprečje treh izmerjenih absorbanc raztopine DPPH brez vzorca izračunano po enačbi 1

$$SN^2 = \frac{1}{n-2} \left[ \sum (y - \bar{y})^2 - \frac{[\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})]^2}{\sum (x - \bar{x})^2} \right] \quad \text{Enačba 3 (30)}$$

$n$  – velikost vzorca,

$y$  – matrika ali obseg odvisnih podatkovnih točk,

$\bar{y}$  – srednja vrednost  $y$ ,

$x$  – matrika ali obseg neodvisnih podatkovnih točk.

$\bar{x}$  – srednja vrednost  $x$ ,

Nato smo za vsak preiskovani vzorec s pomočjo programa Microsoft Excel 2016 narisali graf: odstotek nereduciranega DPPH v odvisnosti od uporabljene koncentracije preiskovanega vzorca. S pomočjo statistične funkcije STEYX smo izračunali še standardne napake (SN) predvidenih vrednosti  $y$  za vsak  $x$  v regresijski analizi (Enačba 3 (30)). Iz enačbe linearne funkcije za posamezen vzorec pa smo izračunali vrednost EC<sub>50</sub> skupaj s standardno napako. EC<sub>50</sub> je koncentracija vzorca, ki reducira 50 % začetne koncentracije DPPH (18).

### 3.5.2 Postopek meritve kinetike redukcije DPPH

Za meritve kinetike smo pripravili pet različnih koncentracij vsakega vzorca, kot smo to že predhodno opisali v pripravi raztopin vzorcev. Pripravili smo tudi 140  $\mu\text{M}$  delovno raztopino DPPH. V kiveto smo odpipetirali 1 mL preiskovanega vzorca določene koncentracije in jo vstavili v UV-Vis spektrofotometer. V isto kiveto smo dodali 1 mL 140  $\mu\text{M}$  raztopine DPPH, s pipeto dobro premešali in takoj začeli z meritvijo. Med potekom meritev smo imeli kiveto pokrito s teflonskim pokrovčkom, da ni prišlo do izhlapevanja topila in posledično do zvišanih absorbanč. Absorbanco smo merili 90 minut, vsakih 5 sekund. Meritve smo izvajali pri valovni dolžini 517 nm na sobni temperaturi.

Pred vsako meritvijo kinetike preiskovanega vzorca smo preverili stabilnost DPPH-ja v metanolu. V kiveto smo odpipetirali 1 mL metanola in 1 mL 140  $\mu\text{M}$  raztopine DPPH, premešali, kiveto pokrili ter takoj začeli z meritvijo. Absorbanco, ki je bila ves čas konstantna, smo merili 90 minut vsakih 5 sekund.

Rezultate smo podali v obliki grafov izmerjene absorbanče v odvisnosti od časa za vsako koncentracijo vseh preiskovanih vzorcev ter izračunali hitrostne konstante.

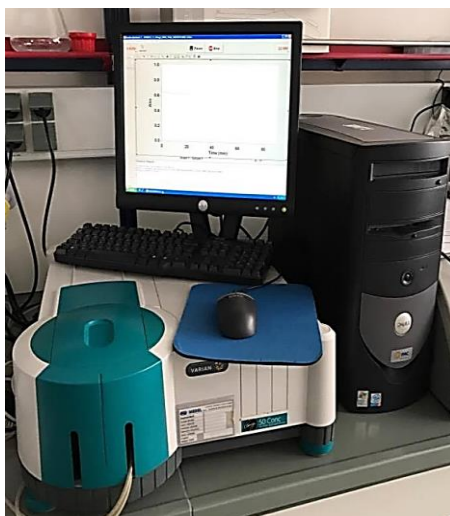
#### 3.5.2.1 Izračun hitrostnih konstant

Za vsak vzorec smo iz kinetike redukcije DPPH izračunali hitrostne konstante za hitro in počasno reakcijsko kinetiko. Najprej smo narisali graf odvisnosti časa od  $\ln[(1 - \text{Abs}_1 / \text{Abs}) / (1 - \text{Abs}_1 / \text{Abs}_0)]$  za hitro in počasno kinetiko za vsako koncentracijo. Abs nam predstavlja absorbanco ob danem času,  $\text{Abs}_1$ : limitna vrednost pri najvišji koncentraciji in  $\text{Abs}_0$ : absorbanca ob času 0 minut. Naklone iz logaritemskih funkcij smo vnesli v graf v odvisnosti od koncentracij raztopin vzorca za hitro in počasno kinetiko posebej ter prilegali z linearno funkcijo. Dobili smo enačbo premice, ki nam je predstavljala rešitev (hitrostna konstanta = naklon \* [vzorca]  $\pm$  nek člen). Hitrostne konstante dobimo iz naklonov logaritemskih funkcij v odvisnosti od koncentracij preiskovanega vzorca. Za primerjavo med vzorci smo vse točke dodali na skupni graf posebej za hitro in posebej za počasno reakcijsko kinetiko (31, 32, 33).

### 3.5.3 Postopek UV-Vis spektrofotometrične titracije vzorcev z $\text{Fe}^{3+}$ ioni

V stekleno kiveto smo odpipetirali 3 mL vzorca/standarda ustrezne koncentracije (raztopine so morale biti bistre, brez zračnih mehurčkov in termostatisane na sobno temperaturo), jo vstavili v UV-Vis spektrofotometer ter posneli absorpcijski spekter v območju med 250-800 nm (Slika 11). Nato smo k vzorcu/standardu dodali raztopino  $\text{FeCl}_3$  z določeno koncentracijo, pomešali s pipeto, inkubirali 5 minut na sobni temperaturi in ponovno posneli absorpcijski spekter. K standardiziranemu izvlečku **oleuropeina** smo dodali 1,5 mM raztopino  $\text{FeCl}_3$ , k standardu kvercetin 1 mM raztopino  $\text{FeCl}_3$ , k vzorcem **1, 4, 5, 6, 7, 8** 7,5 mM raztopino  $\text{FeCl}_3$ , k vzorcu **2** 3,75 mM in vzorcu **3** 2,5 mM raztopino  $\text{FeCl}_3$ . Koncentracijo dodanega  $\text{FeCl}_3$  v reakcijsko raztopino vzorca/standarda smo postopoma zviševali in vsakič posneli absorpcijski spekter. Upoštevali smo naslednja množinska razmerja kvercetin/železo; 1:0.25, 1:0.5, 1:0.75, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5.

Tvorbo kompleksov med vzorci in  $\text{Fe}^{3+}$  ioni smo spremljali preko sprememb v UV-Vis absorpcijskem spektru. Iz njega smo odčitali valovno dolžino naraščajoče krivulje (novonastalega vrha), ki kaže na nastanek kelatnega kompleksa med preiskovanim vzorcem in  $\text{Fe}^{3+}$  ioni. Nato smo v programu Microsoft Excel 2016 za vsak preiskovani vzorec izrisali titracijsko krivuljo: absorbanca kompleksa standard/vzorec- $\text{Fe}^{3+}$  pri odčitani valovni dolžini v odvisnosti od koncentracije  $\text{Fe}^{3+}$  ionov. Narisali smo premici, ki se najbolj prilegata točkam, in preko sprememb v absorbanci (prelomov premic) določili vezavno stehiometrijo med vzorcem/standardom in  $\text{Fe}^{3+}$  (27, 28).



Slika 11: UV-Vis spektrofotometer Cary 50.

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 ANTIOKSIDATIVNA SPOSOBNOST REDUKCIJE RADIKALA DPPH

Z DPPH testom smo vzorcem določili antioksidativno kapaciteto po določenem času. Vzorce, standard in reagente smo v triplicatih nanесли na mikrotitrne ploščice s 96 vdolbinicami. Nato smo s spektrofotometričnim čitalcem mikrotitrskih ploščic izmerili absorbance pri 517 nm po 30, 60 in 90 minutni inkubaciji. Rezultate smo podali v obliki grafov deleža nereduciranega DPPH-ja v odvisnosti od uporabljenih koncentracij preiskovanega vzorca. Za vzorce smo pripravili različne koncentracije, ki so bile čim bližje vrednosti  $EC_{50}$ . Nazadnje smo iz enačbe linearne funkcije izračunali koncentracijo vzorca, ki reducira 50 % začetne koncentracije DPPH ( $EC_{50}$ ) in rezultate podali v obliki  $EC_{50} \pm$  standardna napaka.

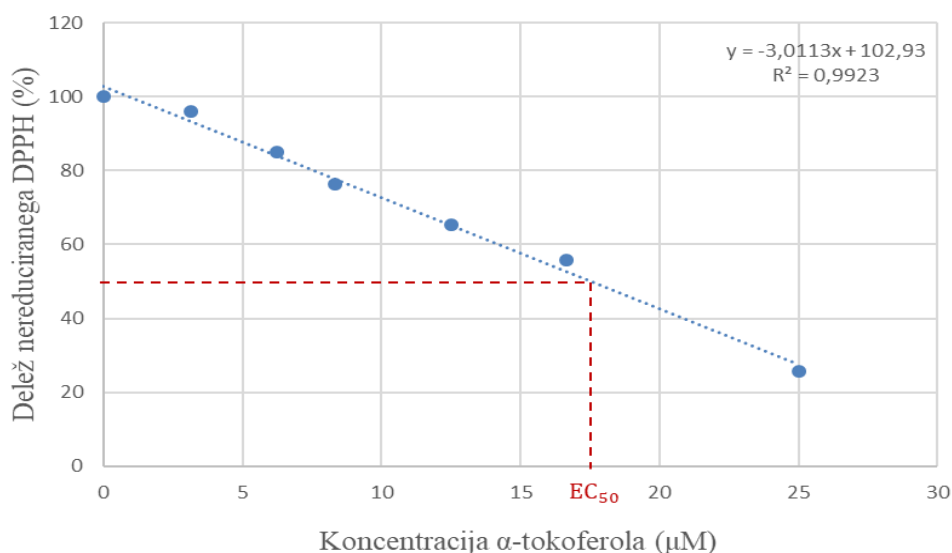
#### 4.1.1 Standard $\alpha$ -tokoferol

Za standard smo uporabili  $\alpha$ -tokoferol, ki ga uvrščamo med nizkomolekularne antioksidante eksogenega izvora. Najbogatejši prehranski viri vitamina E so pšenični kalčki, rastlinska olja ( $\alpha$ -tokoferol prevladuje v mandljevem in sončničnem olju), oreški (največ v mandljih in lešnikih) in zelena listnata zelenjava (3).

Preglednica V: Rezultati meritev absorbanc pri DPPH testu za standard  $\alpha$ -tokoferol.

| c $\alpha$ -tokoferola<br>( $\mu$ M) v reakcijski<br>zmesi z DPPH | c DPPH ( $\mu$ M) v<br>reakcijski zmesi z<br>$\alpha$ -tokoferolom | Absorbanca | Delež<br>nereduciranega<br>DPPH (%) |
|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|------------|-------------------------------------|
| 0                                                                 | 70                                                                 | 0,634333   | 100                                 |
| 3,13                                                              | 70                                                                 | 0,609667   | 96,1                                |
| 6,25                                                              | 70                                                                 | 0,539      | 85,0                                |
| 8,35                                                              | 70                                                                 | 0,485      | 76,5                                |
| 12,5                                                              | 70                                                                 | 0,413667   | 65,2                                |
| 16,7                                                              | 70                                                                 | 0,353333   | 55,7                                |
| 25                                                                | 70                                                                 | 0,162667   | 25,6                                |

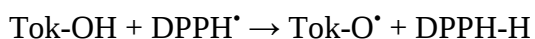
V Preglednici V so prikazane absorbance, ki smo jih izmerili po 60 minutni inkubaciji reakcijske raztopine in deleži nereduciranega DPPH-ja. Z višanjem koncentracije  $\alpha$ -tokoferola v reakcijski zmesi se večja delež reduciranega DPPH-ja oziroma pada delež nereduciranega DPPH-ja. Pri risanju grafa odvisnosti deleža nereduciranega DPPH od koncentracije  $\alpha$ -tokoferola in statistični obdelavi podatkov smo upoštevali šest koncentracij  $\alpha$ -tokoferola, saj je bila ena točka izven linearnega območja. Za natančnejši izračun vrednosti  $EC_{50}$  je potrebna linearna odvisnost med koncentracijo antioksidanta in deležem nereduciranega DPPH (20). Absorbanco smo merili le po 30 in 60 minutni inkubaciji, saj je  $\alpha$ -tokoferol že popolnoma reducirjal DPPH po 30 minutah in absorbanca s časom ni več upadala. Mishra K. in ostali so ugotovili, da je reakcijski čas  $\alpha$ -tokoferola za redukcijo DPPH  $< 30$  minut, zato  $\alpha$ -tokoferol uvrščamo med antioksidante s hitro reakcijsko kinetiko (18).



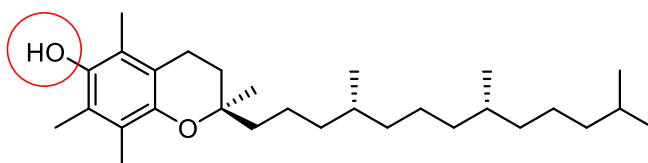
Slika 12: Delež nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije  $\alpha$ -tokoferola.

Vrednost  $EC_{50}$  za  $\alpha$ -tokoferol je skupaj s standardno napako  $17,6 \pm 0,8 \mu\text{M}$  oziroma  $7,580 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$  (Slika 12). Različni avtorji v študijah navajajo različne vrednosti  $EC_{50}$  za  $\alpha$ -tokoferol, ki se gibljejo od  $18,2 \mu\text{M}$  pa do  $21,4 \mu\text{M}$ , kar je posledica različnih reakcijskih pogojev (18, 34, 35). Raziskovalne skupine uporabljajo različne koncentracije raztopine DPPH ( $22,5 - 250 \mu\text{M}$ ), inkubacijske čase (od 5 minut do 1 ure), reakcijska topila (metanol, etanol, mešanica metanola z acetatnim pufrom) in pH reakcijske raztopine (priporočen pH je  $5,0 - 6,5$ ) (22, 23). Previsoke koncentracije DPPH v reakcijski raztopini dajejo absorbance  $>1$ , kar vpliva na zanesljivost (točnost) spektrofotometričnih meritev (22). Priporočena koncentracija raztopine DPPH je v območju med  $50$  in  $100 \mu\text{M}$  (23). Prav tako sta Sharma

in Bhat ugotovila, da na vrednost  $EC_{50}$  za standarde antioksidante lahko bistveno vpliva izbira topila (22). Priporočeno je merjenje absorbanc v končni točki po vzpostavitvi dinamičnega ravnotežja (ko je absorbanca konstantna), saj le tako reakcija med DPPH in antioksidantom poteče do konca (18). Rezultat različnih reakcijskih pogojev je različna vrednost  $EC_{50}$  za standarde antioksidante in tako so rezultati med laboratoriji neprimerljivi (22). Naša vrednost  $EC_{50}$  za  $\alpha$ -tokoferol sovпада z literaturnimi vrednostmi, kar potrjuje ustreznost izbrane metode za določanje sposobnosti redukcije DPPH, zato smo nadaljevali meritve na vzorcih. Za učinkovito antioksidativno delovanje spojin je pomembno število hidroksilnih skupin, njihovi medsebojni položaji in konjugirane dvojne vezi (35). Za antioksidativno delovanje  $\alpha$ -tokoferola je pomembna fenolna –OH skupina (donor vodika ali elektrona) vezana na kromanski obroč (Slika 13).  $\alpha$ -Tokoferol v reakciji z radikalom donira H-atom in nastali tokoferilni radikal je resonančno stabiliziran z delokalizacijo nesparjenega elektrona po aromatskem obroču in tako je tokoferilni radikal manj reaktiven (Reakcija 6) (3).



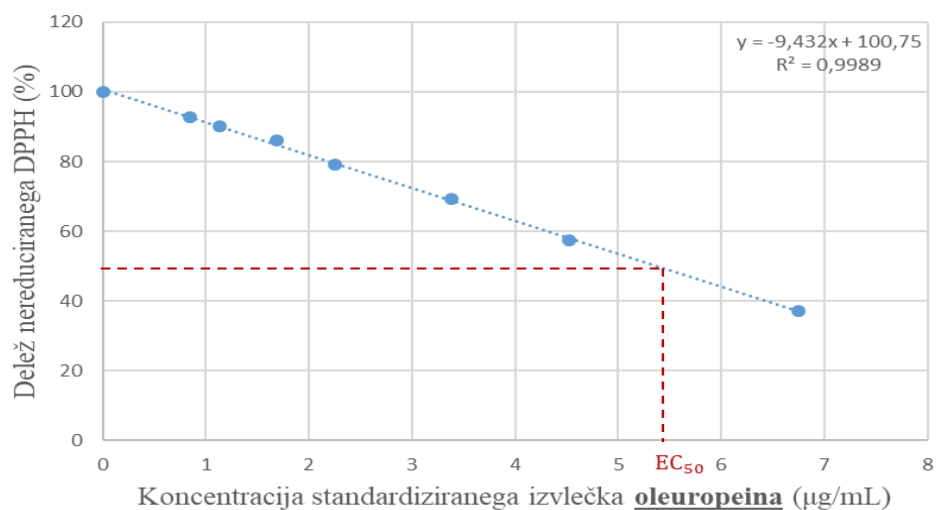
Reakcija 6



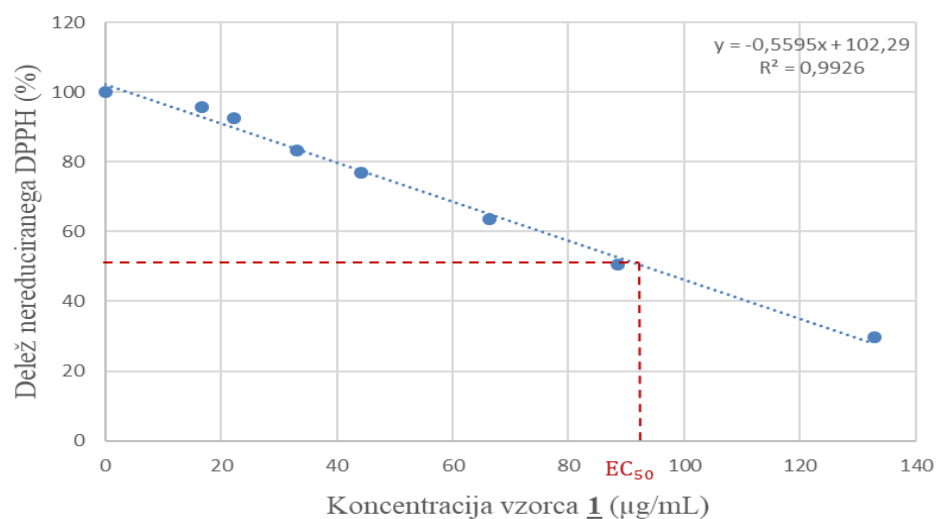
Slika 13: Prikaz hidroksilne skupine v molekuli  $\alpha$ -tokoferola, ki je bistvena za antioksidativno delovanje.

#### 4.1.2 Preiskovani vzorci

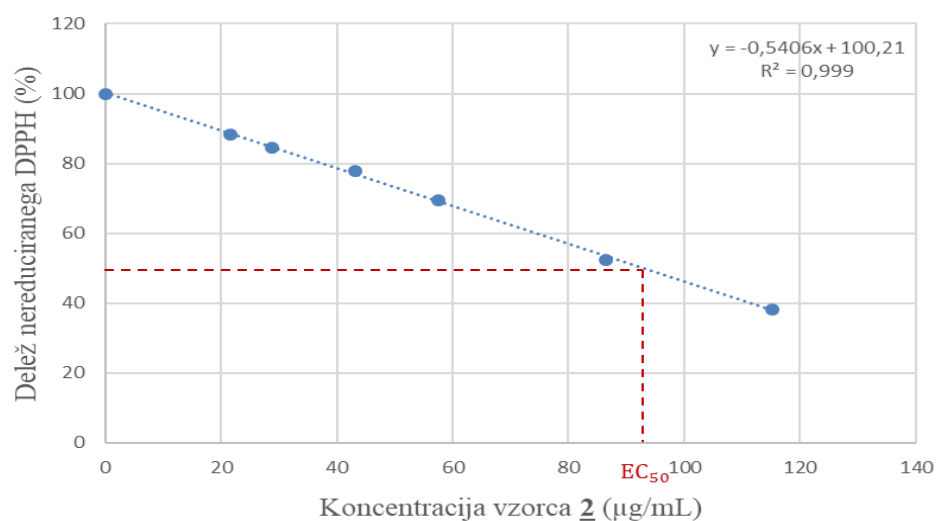
Rezultate redukcije radikala DPPH smo predstavili v obliki grafov deleža nereduciranega DPPH-ja v odvisnosti od uporabljene koncentracije preiskovanega vzorca (Slika 14 – 23). Slika 24 pa prikazuje vrednosti  $EC_{50}$  skupaj s standardnimi napakami vseh vzorcev **1** – **8**, standardiziranega izvlečka **oleuropeina** in  $\alpha$ -tokoferola.



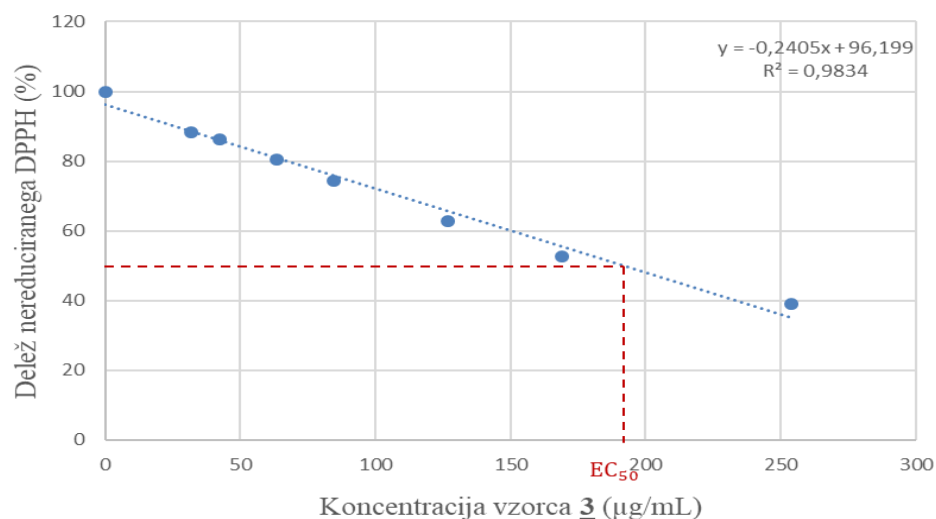
Slika 14: Delež nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije standardiziranega izvlečka oleuropeina.



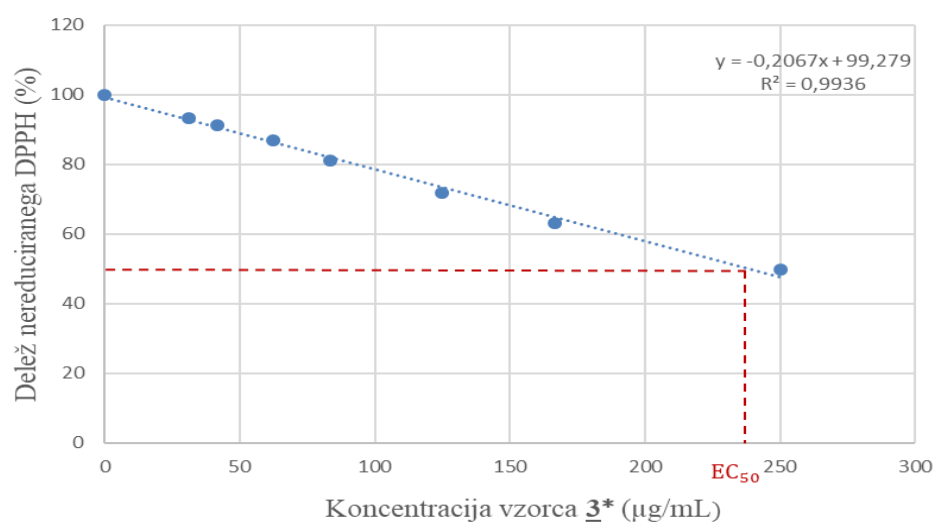
Slika 15: Delež nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca 1.



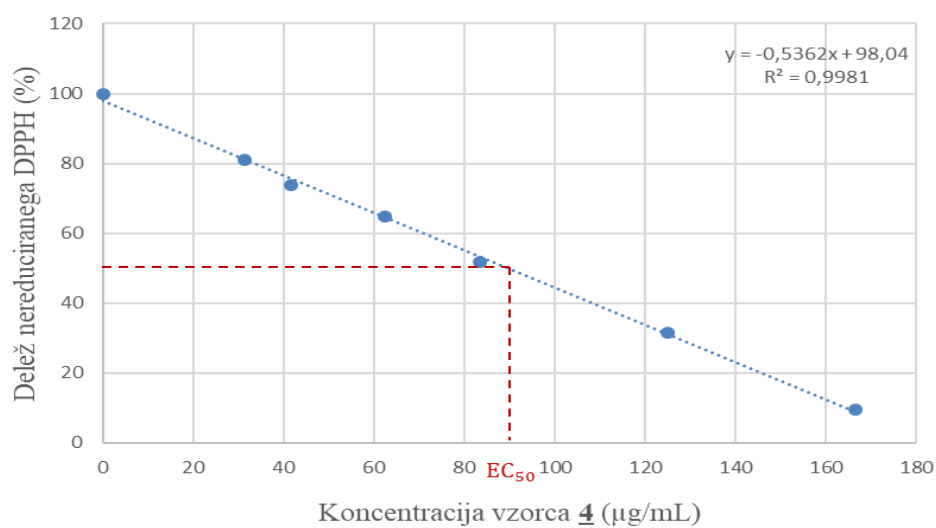
Slika 16: Delež nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca 2.



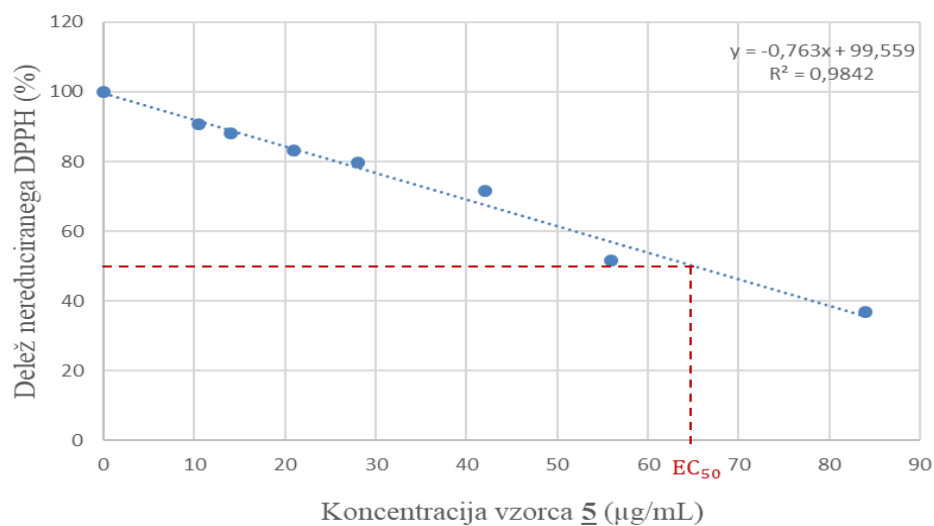
Slika 17: Delež nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca 3.



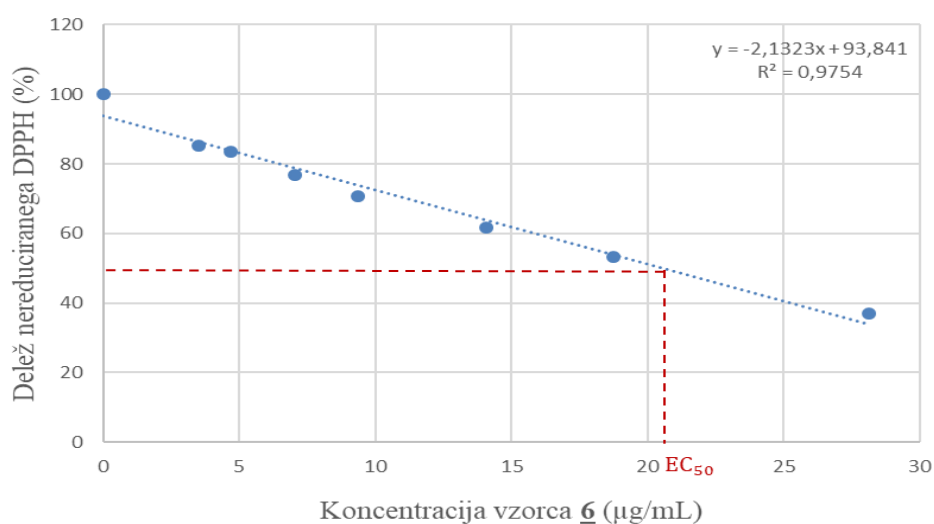
Slika 18: Delež nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca 3\* pri paralelnem testiranju.



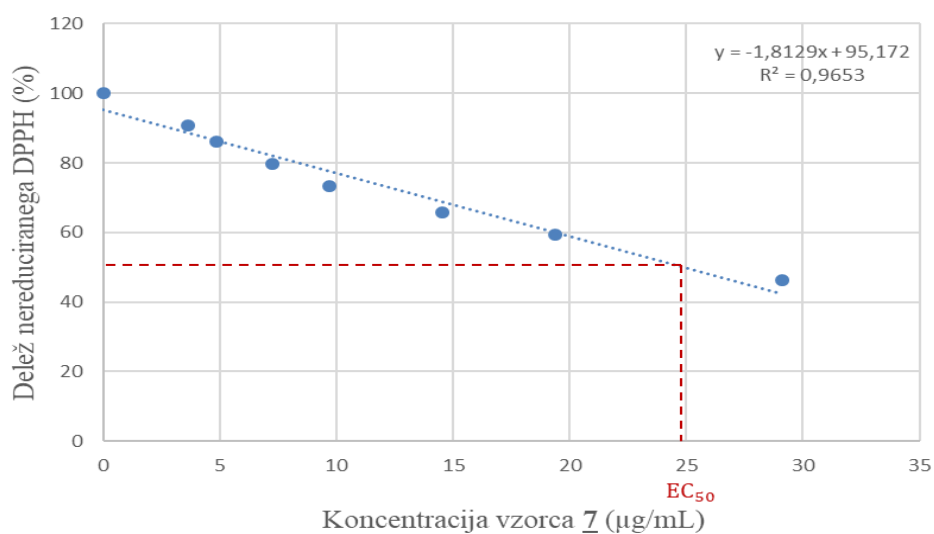
Slika 19: Delež nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca 4.



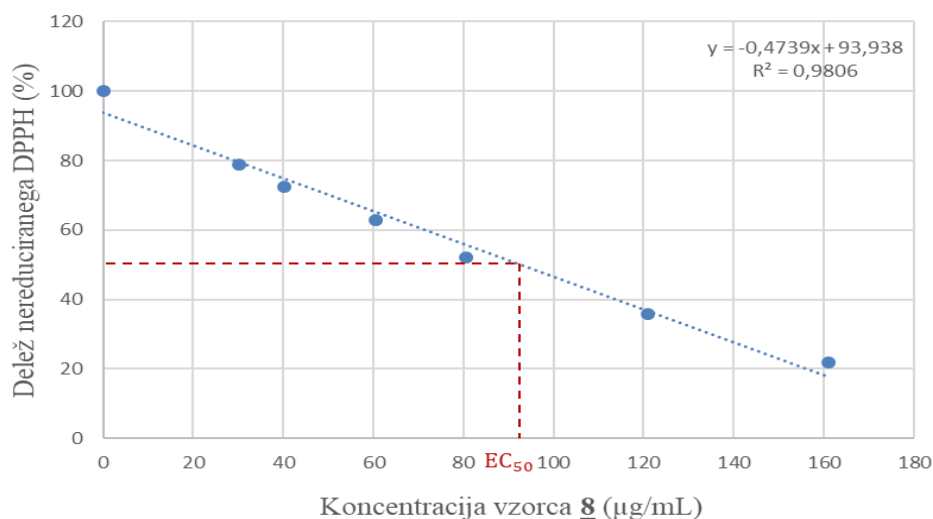
Slika 20: Delež nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca 5.



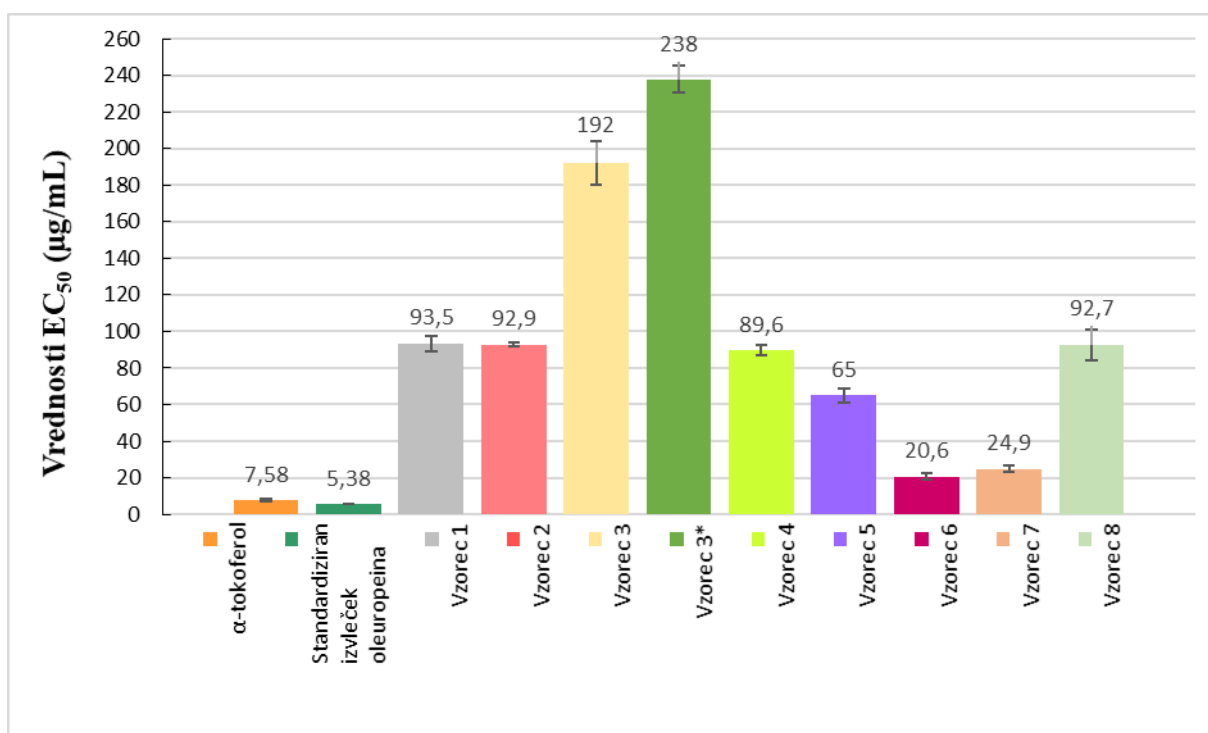
Slika 21: Delež nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca 6.



Slika 22: Delež nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca 7.



Slika 23: Delež nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca 8.



Slika 24: Grafični prikaz vrednosti EC<sub>50</sub> skupaj s standardnimi napakami za α-tokoferol, standardiziran izvleček oleuropeina in vzorce 1 – 8.

#### 4.1.3 Komentar rezultatov redukcije radikala DPPH

Z DPPH testom smo določili celokupno antioksidativno kapaciteto, izraženo z vrednostjo EC<sub>50</sub>. Nižja, kot je vrednost EC<sub>50</sub>, boljša je antioksidativna kapaciteta preiskovanega vzorca. Večja, kot je antioksidativna kapaciteta vzorca, svetleje je obarvana reakcijska raztopina. Zanimalo nas je, kateri vzorec izkazuje najboljše antioksidativne lastnosti. Rezultate vzorcev 1 – 8 smo primerjali glede na standardiziran izvleček oleuropeina.

Standardiziran izvleček **oleuropeina** ( $EC_{50}$ :  $5,38 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$ ) ima boljše antioksidativno delovanje kot  $\alpha$ -tokoferol ( $EC_{50}$ :  $7,58 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$ ), saj ima na fenilnem obroču vezani 2 prosti –OH skupini, eno na *meta* in drugo na *para* mestu. Oleuropein v reakciji z radikalom lahko donira 2 H-atoma.  $\alpha$ -tokoferol ima le eno –OH skupino vezano na aromatski obroč in tako lahko donira le en H-atom, posledično ima manjšo antioksidativno kapaciteto. Jakost antioksidativnega delovanja je v pozitivni povezavi s številom –OH skupin. Torej večje, kot je število –OH skupin vezanih na aromatski obroč, boljši reducent je, ker lahko v reakciji z radikalom donira več H-atomov (22). Tudi literaturni podatek kaže, da sta fenolni spojini listov oljke oleuropein in hidroksitirozol bolj učinkovita antioksidanta kot standarda  $\alpha$ -tokoferol in butil-hidroksitoluen (36). Obied H. K. in ostali so z DPPH testom prav tako ovrednotili antioksidativno aktivnost oleuropeina ( $EC_{50}$ :  $7,58 \pm 0,38 \mu\text{g/mL}$ ) (37). Vrednost  $EC_{50}$  za oleuropein je primerljiva z našim rezultatom (razlog za minimalno odstopanje lahko poiščemo v uporabljenih reakcijskih pogojih, napakah pri pipetiranju). Pri **oleuropeinu** smo na začetku vzeli previsoke koncentracije, in sicer smo pripravili naslednje razredčine s koncentracijami: 270  $\mu\text{g/mL}$ , 180  $\mu\text{g/mL}$ , 135  $\mu\text{g/mL}$ , 90,0  $\mu\text{g/mL}$ , 67,5  $\mu\text{g/mL}$ , 45,0  $\mu\text{g/mL}$ , 33,8  $\mu\text{g/mL}$ . Priloga I prikazuje rezultat, ki smo ga dobili s spektroskopskimi meritvami, in glede na to smo naslednjič vzeli nižje koncentracije (Slika 14), saj je oleuropein pri visokih koncentracijah hitro reagiral (takojšnje razbarvanje vijolične barve).

Kot topilo za raztapljanje vzorcev smo vzeli metanol, saj so bili vsi vzorci v njem dobro topni, z izjemo vzorcev **2** in **3**. Kljub soniciranju v ultrazvočni kopeli nismo dobili bistre raztopine vzorca **2**, zato smo v osnovno raztopino dodali še 3,0 mL metanola in postopoma dodajali enako količino prečiščene vode, ker smo hoteli ugotoviti ali je morda topen v mešanici metanola in vode ter tako povečali topnost. Vzorec **3** je po raztapljanju v metanolu tvoril prenasičeno raztopino in je po določenem času kristaliziral pri sobni temperaturi. Vsak dan smo svežo pripravljeno raztopino DPPH ovili v aluminijasto folijo in zaprli s steklenim zamaškom, saj so Ozcelik B. in sodelavci ugotovili, da se absorbanca raztopine DPPH zniža za 20 %, po 120 minutah izpostavljenosti dnevni svetlobi. Absorbanco raztopine DPPH prav tako zniža izpostavljenost kisiku, ki se v ozračju nahaja v tripletnem stanju. Tripletni kisik kot biradikal direktno reagira z DPPH ob prisotnosti svetlobe in povzroči padec absorbance (25).

Linearna regresija ( $R^2 > 0,96$ ) je pokazala dobro prileganje točk na premico pri vseh vzorcih (18). Zaradi višje stopnje linearne povezanosti smo pri statistični obdelavi podatkov

upoštevali le prvih 6 razredčin (raztopino z najvišjo koncentracijo smo izpustili) vzorcev **2**, **4** in **8**. Za natančnejši izračun  $EC_{50}$  smo upoštevali, da je vsaj ena točka pod vrednostjo  $EC_{50}$  in vsaj ena nad njo.

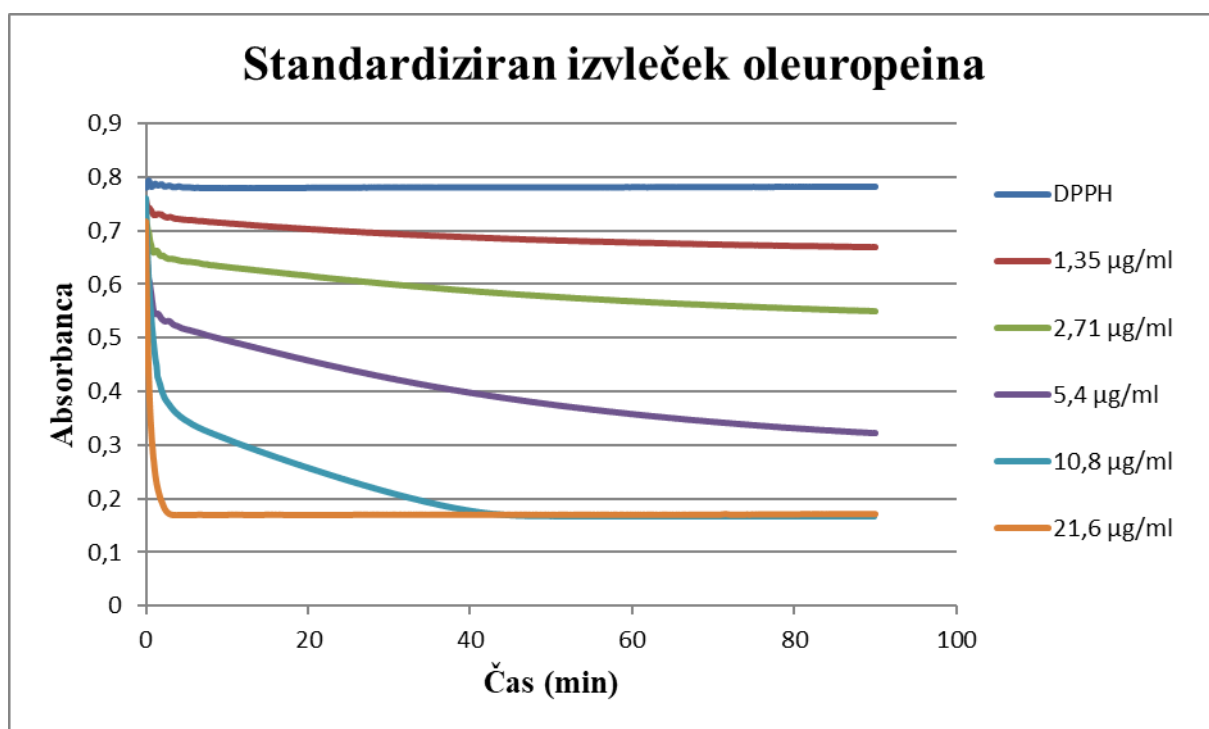
Za fenolne spojine iz listov oljke je znano, da imajo dobre antioksidativne lastnosti. Fenolni antioksidanti so dobri donorji H-atomov ali elektronov in nastali fenolatni radikal je dokaj stabilen. Zaradi resonančne delokalizacije nesparjenega elektrona po aromatskem obroču nastali radikal ni dovolj reaktiven, da bi odtegnil H-atom in na ta način sprožil nadaljevanje oksidacije (3).

Vsi vzorci **1** – **8** so imeli slabšo antioksidativno kapaciteto kot standardiziran izvleček **oleuropeina**. Najvišjo antioksidativno kapaciteto ima vzorec **6**, ki ima najnižjo vrednost  $EC_{50}$ :  $20,6 \pm 1,6$   $\mu\text{g/mL}$ . Najnižjo antioksidativno kapaciteto pa ima vzorec **1** ( $EC_{50}$ :  $93,5 \pm 4,1$   $\mu\text{g/mL}$ ), če izvzamemo vzorec **3**. Za vzorec **3** pri koncentracijah razredčin: 259  $\mu\text{g/mL}$ , 173  $\mu\text{g/mL}$ , 129  $\mu\text{g/mL}$ , 86,3  $\mu\text{g/mL}$ , 64,7  $\mu\text{g/mL}$ , 43,1  $\mu\text{g/mL}$ , 32,4  $\mu\text{g/mL}$  in prav tako pri visokih koncentracijah razredčin: 767  $\mu\text{g/mL}$ , 511  $\mu\text{g/mL}$ , 383  $\mu\text{g/mL}$ , 256  $\mu\text{g/mL}$ , 192  $\mu\text{g/mL}$ , 128  $\mu\text{g/mL}$ , 95,8  $\mu\text{g/mL}$  nismo dobili ustreznih rezultatov, saj vzorec **3** tudi v visokih koncentracijah ni reduciral več kot 40 % DPPH v reakcijski zmesi. Pri testiranju vzorca **3** smo dobili povsem različne vrednosti  $EC_{50}$ ; in sicer 199  $\mu\text{g/mL}$  in 489  $\mu\text{g/mL}$ . Zato smo naredili še paralelno testiranje in iz vrednosti  $EC_{50}$  smo ugotovili, da vzorca **3** in **3\*** (\* pomeni paralelna analiza vzorca **3**) nista primerljiva, kljub enakim pogojem dela. Po določenem času je prišlo do kristalizacije vzorca **3**, kar je bilo tudi vizualno vidno (nehomogena raztopina). To je razlog, da rezultati paralelnega testiranja niso primerljivi. Vzorci **1**, **2**, **4** in **8** so imeli podobno antioksidativno kapaciteto, in sicer so se vrednosti  $EC_{50}$  gibale med 89,6 in 93,5  $\mu\text{g/mL}$ . Vzorec **5** je imel nižjo vrednost  $EC_{50}$  (65  $\mu\text{g/mL}$ ) kot vzorci **1**, **2**, **4**, **8** in višjo kot vzorca **6** in **7**. Vzorec **7** ( $EC_{50}$ :  $24,9 \pm 2,0$ ) pa je izkazal podobno sposobnost reduciranja DPPH kot vzorec **6** ( $EC_{50}$ :  $20,6 \pm 1,6$ ). Pri vzorcu **5** pri visokih koncentracijah raztopin (537  $\mu\text{g/mL}$ , 358  $\mu\text{g/mL}$ , 268  $\mu\text{g/mL}$ , 179  $\mu\text{g/mL}$ , 134  $\mu\text{g/mL}$ , 89,4  $\mu\text{g/mL}$ , 67,1  $\mu\text{g/mL}$ ) nismo bili v linearnem območju (vse točke niso ležale na premici) (Priloga II). Zato smo testiranje vzorca **5** ponovili, tako da smo izpustili tri najvišje koncentracije (točke, ki izstopajo iz linearnega modela), in tako dobili rezultat z manjšo napako (Slika 20). V reakcijski mešanici je tako ostalo dovolj DPPH, da smo ostali v linearnem območju (38). Prav tako smo imeli tudi pri vzorcu **6** in **7**, težave z linearnostjo pri

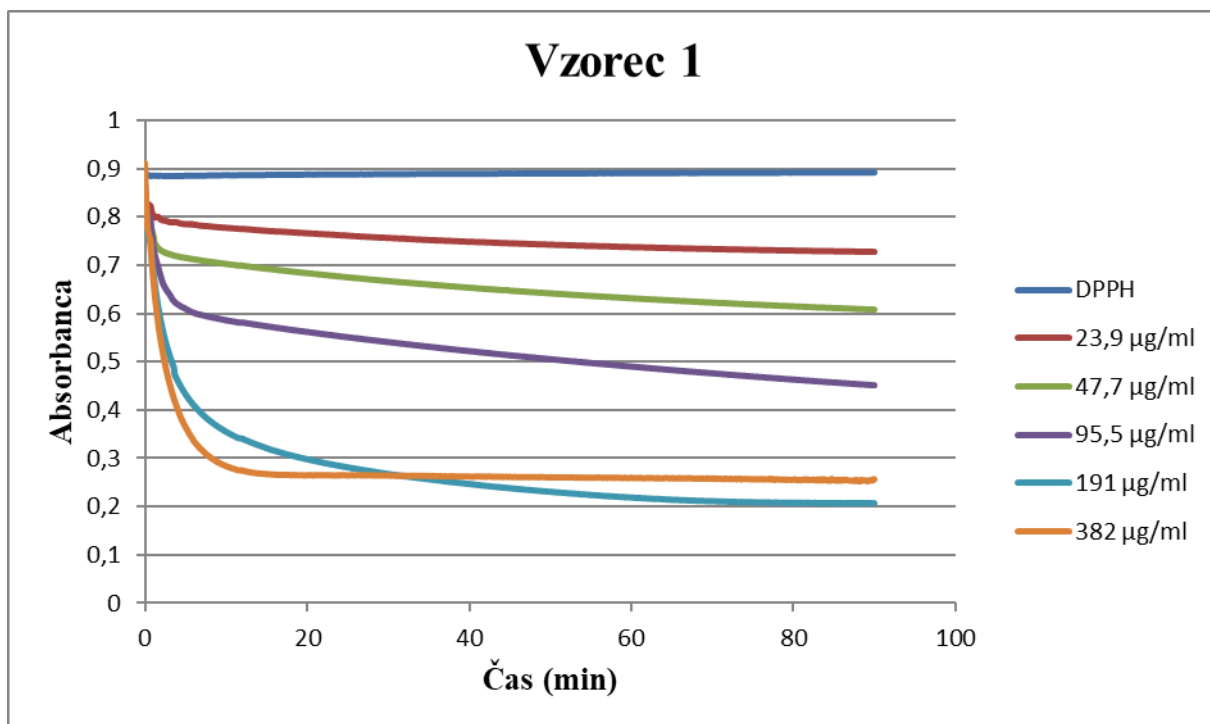
visokih koncentracijah raztopin, zato smo pripravili raztopine z nižjimi koncentracijami (Slika 21 in 22).

## 4.2 MERITVE KINETIKE REDUKCIJE DPPH

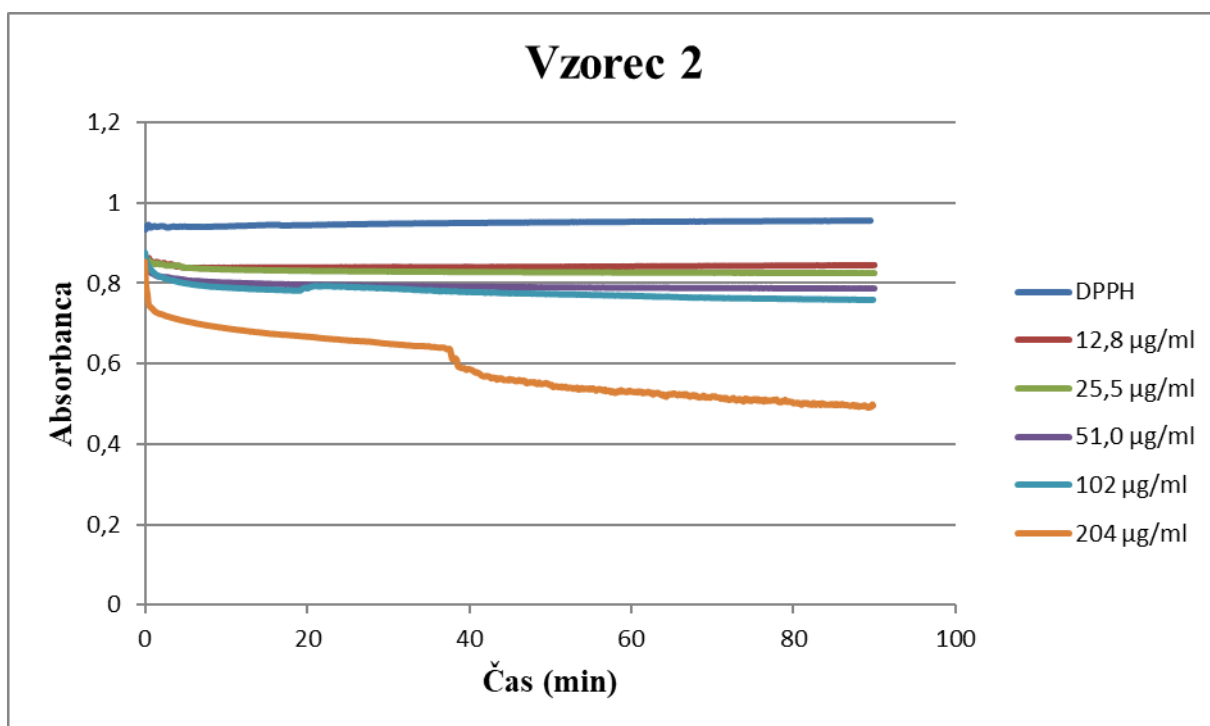
Z meritvami kinetike smo želeli izmeriti časovni profil hitrosti reakcije med vzorcem in radikalom DPPH v prvih 90 minutah. Pred vsako meritvijo kinetike preiskovanega vzorca smo preverili stabilnost DPPH-ja v metanolu. S tem smo preverili, da DPPH med meritvami ne reagira s kisikom ali svetlobo in da je padec absorbance izključno posledica reakcije med DPPH in vzorci. Reakcijsko kinetiko smo merili tako, da smo v kiveto z raztopino vzorca določene koncentracije dodali raztopino DPPH, premešali, kiveto pokrili ter takoj začeli s spektrofotometrično meritvijo absorbance pri 517 nm. Slike 25 – 33 predstavljajo rezultate meritev kinetike redukcije DPPH preiskovanih vzorcev.



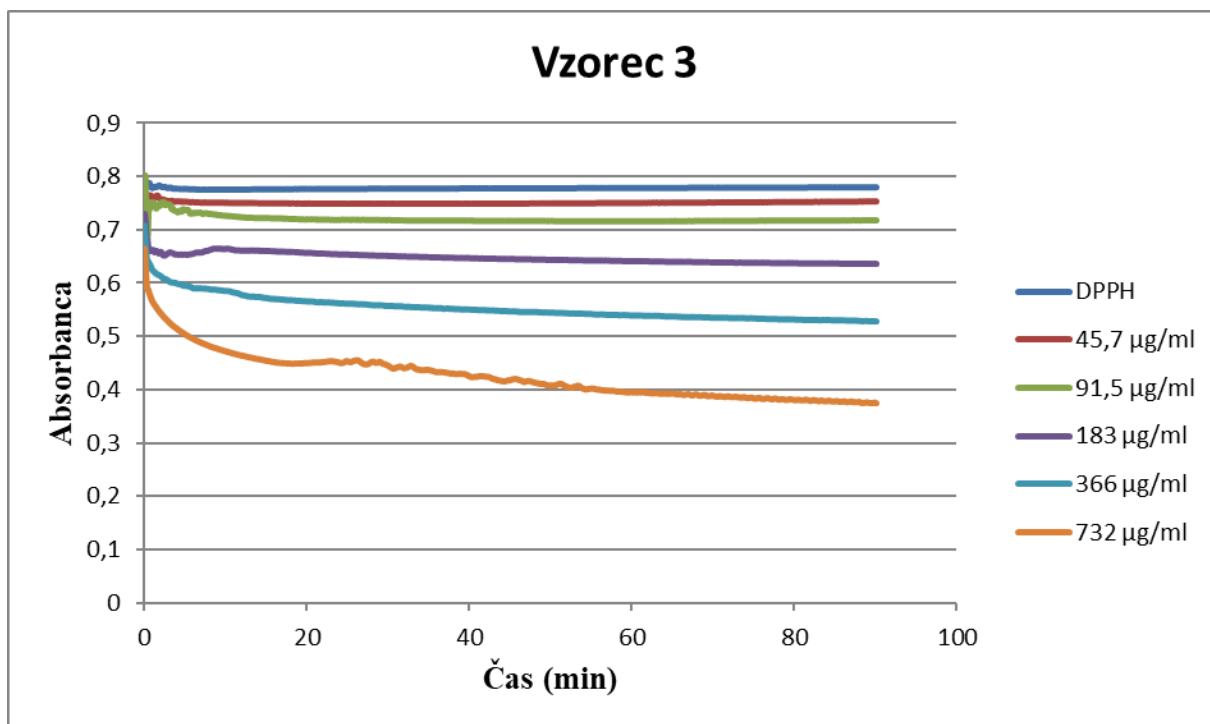
Slika 25: Kinetika redukcije DPPH s standardiziranim izvlečkom oleuropeina pri petih različnih koncentracijah.



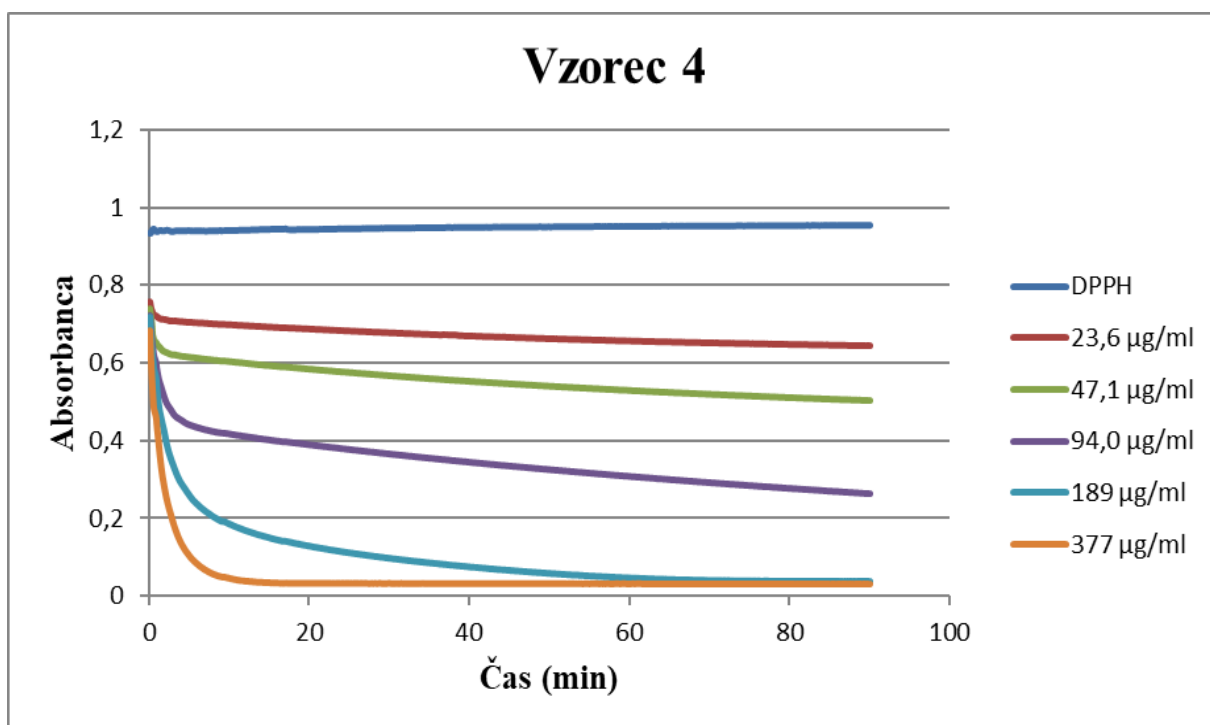
Slika 26: Kinetika redukcije DPPH z vzorcem 1 pri petih različnih koncentracijah.



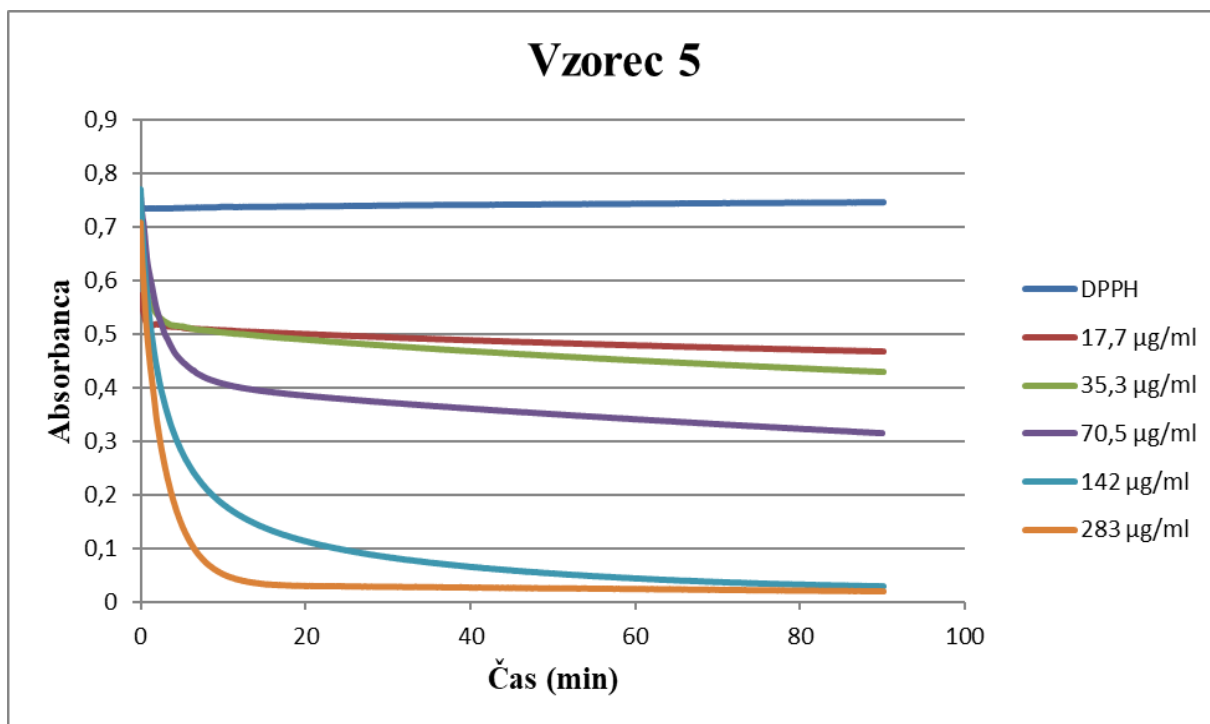
Slika 27: Kinetika redukcije DPPH z vzorcem 2 pri petih različnih koncentracijah.



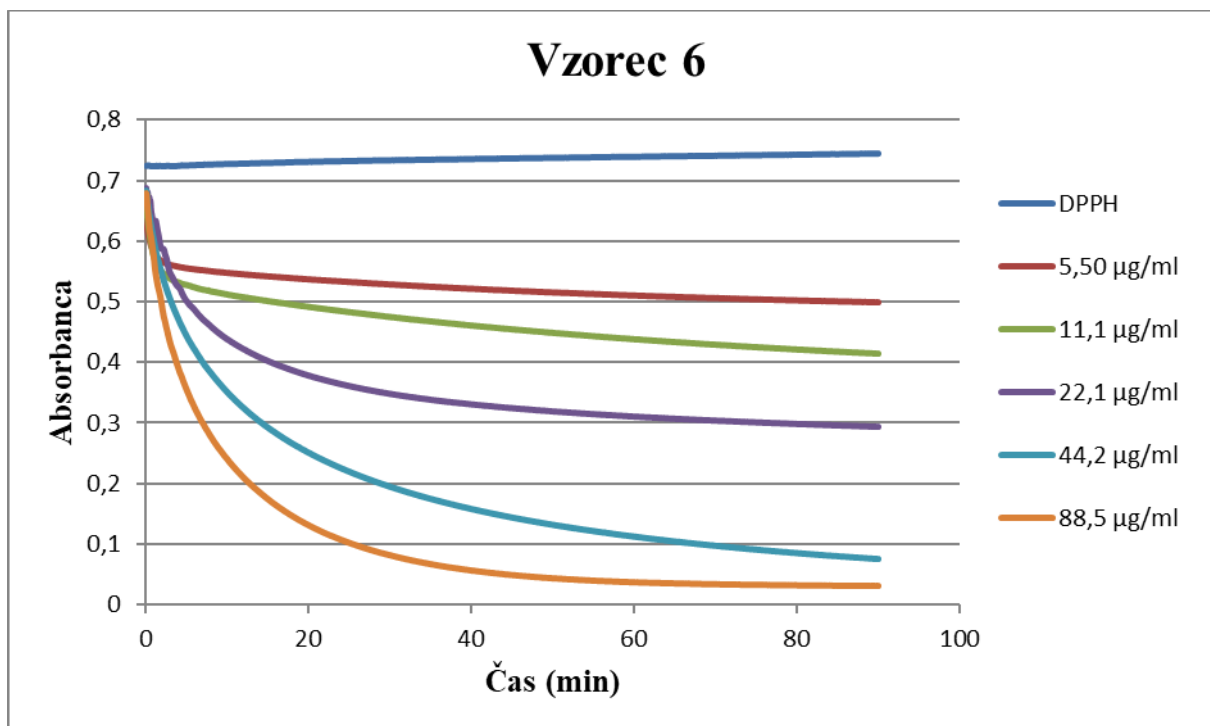
Slika 28: Kinetika redukcije DPPH z vzorcem 3 pri petih različnih koncentracijah.



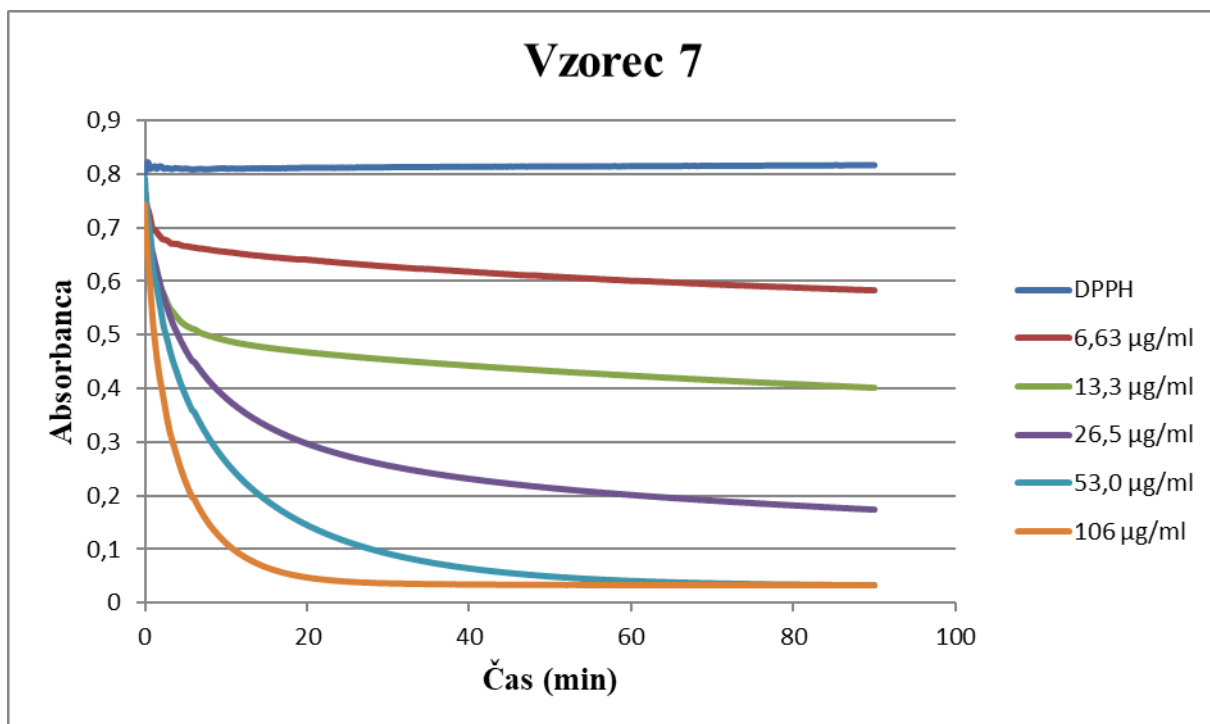
Slika 29: Kinetika redukcije DPPH z vzorcem 4 pri petih različnih koncentracijah.



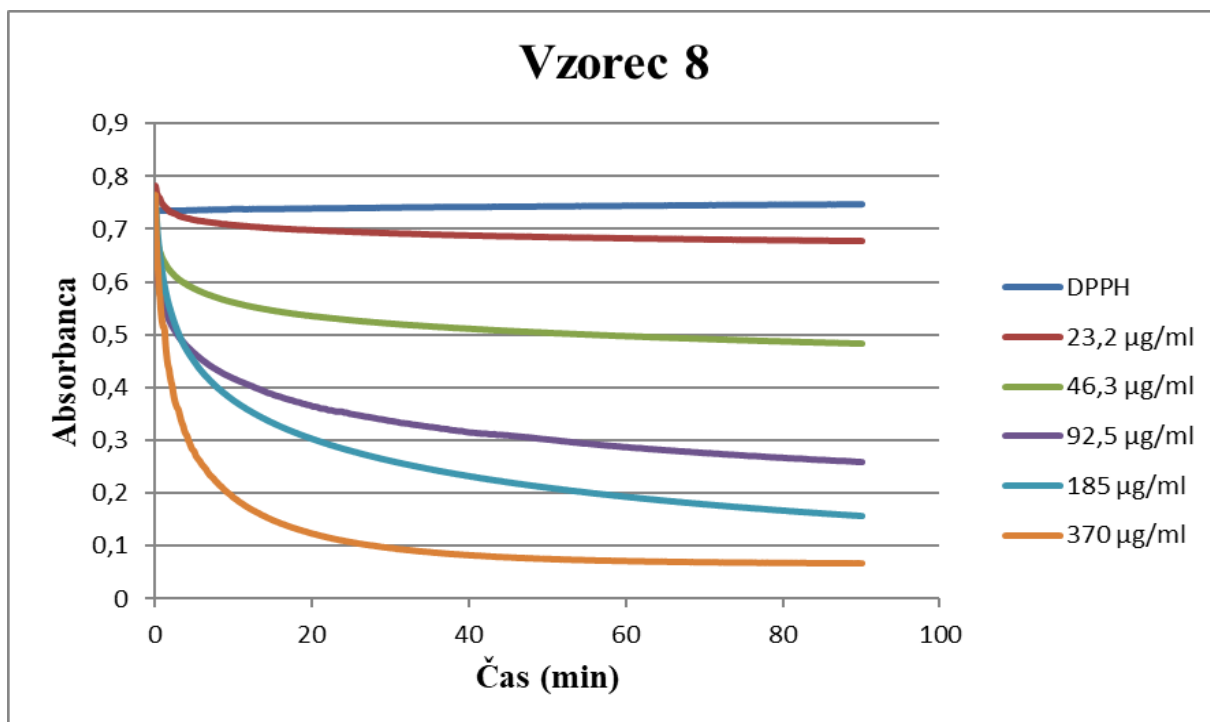
Slika 30: Kinetika redukcije DPPH z vzorcem 5 pri petih različnih koncentracijah.



Slika 31: Kinetika redukcije DPPH z vzorcem 6 pri petih različnih koncentracijah.



Slika 32: Kinetika redukcije DPPH z vzorcem 7 pri petih različnih koncentracijah.



Slika 33: Kinetika redukcije DPPH z vzorcem 8 pri petih različnih koncentracijah.

#### 4.2.1 Komentar meritev kinetike redukcije DPPH

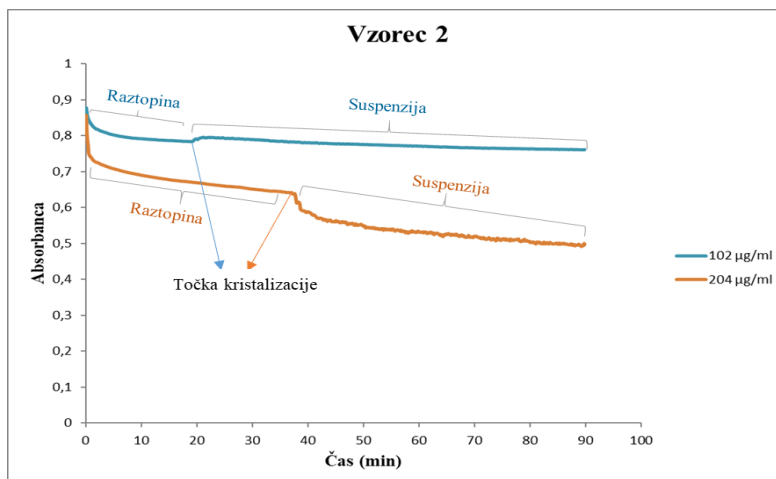
Reakcijski mehanizem med antioksidantom in DPPH je odvisen od strukturne konformacije antioksidanta. Nekatere spojine zelo hitro reagirajo z radikalom DPPH, reducirajo toliko molekul DPPH, kolikor imajo prostih hidroksilnih skupin. Za večino primerov fenolnih spojin pa so reakcije počasnejše in zdi se, da so mehanizmi bolj kompleksni (21). Pri nekaterih vzorcih smo opazili takojšen strm padec absorbance, torej hitro reakcijsko kinetiko. Za dosego platoja so potrebovali manj kot 30 minut, kar kaže na to, da je reakcija potekla do konca. Med tem, ko so nekateri vzorci v določenih koncentracijah pokazali kombinacijo hitre in počasne reakcijske kinetike. Avtorji so antioksidante razdelili v več kategorij, glede na to, koliko časa so potrebovali za dosego platoja oziroma vzpostavitev dinamičnega ravnotežja:

- a) antioksidanti s hitro reakcijsko kinetiko: hiter začetni upad absorbance, plato dosežejo v  $< 30$  minutah,
- b) antioksidanti s srednjo reakcijsko kinetiko: počasnejši, postopen upad absorbance, za dosego platoja potrebujejo od 30 minut do 1 ure,
- c) antioksidanti s počasno reakcijsko kinetiko: zelo počasen upad absorbance, za dosego platoja potrebujejo  $> 1$  uro,
- d) nereaktivni antioksidanti: zelo majhen upad absorbance ali pa sploh ne pride do upada absorbance skozi celoten reakcijski čas (90 minut),
- e) antioksidanti z dvostopenjsko (sestavljeno) reakcijsko kinetiko: začetni hiter, strm padec absorbance; nato počasna reakcijska kinetika (upoštevanje naklona krivulj kinetike) (18, 31).

Z meritvami kinetike redukcije radikala DPPH smo opazovali, kako različna koncentracija vzorcev vpliva na hitrost in končno absorbanco. Ugotovili smo, da višja, kot je koncentracija vzorca, hitreje poteka redukcija in več radikala DPPH se reducira. Reakcijski čas za dosego platoja je odvisen od koncentracije vzorca. Torej višja, kot je koncentracija vzorca, hitreje doseže plato. Rezultati so pokazali različne reakcijske krivulje med različnimi koncentracijami vzorcev (Slike 25 – 33).

Reakcija standardiziranega izvlečka oleuropeina z DPPH je zelo hitra in doseže plato že po 3 minutah pri najvišji koncentraciji (21,6  $\mu\text{g/ml}$ ), zato ga uvrščamo med hitro reakcijsko kinetiko. Pri koncentraciji 10,8  $\mu\text{g/ml}$  izkazuje dvostopenjsko reakcijsko kinetiko, saj ima

na začetku hiter, strm padec absorbance, po 3 minutah pa absorbanca postopoma upada in na koncu po 50 minutah doseže plato. Tudi reakcijska krivulja koncentracije 5,4  $\mu\text{g/ml}$  izkazuje dvostopenjsko kinetiko, in prav tako kot pri koncentracijah 2,71  $\mu\text{g/ml}$  in 1,35  $\mu\text{g/ml}$  opazimo, da ne doseže platoja v času 90 minut (Slika 25). Vzorec 1 pri najvišji koncentraciji izkazuje hitro reakcijsko kinetiko, saj doseže plato v  $< 20$  minutah. Pri koncentraciji 191  $\mu\text{g/ml}$  imamo dvostopenjsko kinetiko in na koncu doseže dinamično ravnotežje po 80 minutah spremljanja kinetike. Pri 95,5  $\mu\text{g/ml}$  in najnižjih dveh koncentracijah (sestavljena reakcijska kinetika) bi za dosego platoja potrebovali več kot 90 minut reakcijskega časa (Slika 26). Pri vzorcih 2 in 3 smo prav tako izvedli meritve kinetike redukcije DPPH, ker nas je zanimalo, kako se bosta vzorca obnašala, glede na to, da po raztapljanju v metanolu kristalizirata (Slika 27 in 28). Pri vzorcu 2 lahko določimo točko kristalizacije, kjer raztopina prehaja v suspenzijo (Slika 34).



Slika 34: Grafični prikaz izmerjenih absorbanc v odvisnosti od časa za vzorec 2.

Kljub soniciranju v ultrazvočni kopeli nismo dobili bistre raztopine vzorca 3, zato smo za zbistritev in nastanek soli dodali 2 kapljici 0,1 M NaOH. Vzorec se kljub temu ni zbistril, a smo vseeno začeli z meritvijo. Ker je vzorec 3 v obliki suspenzije, so krivulje zašumljene (Slika 28), saj na delcih prihaja do sipanja svetlobe.

Pri vzorcu 4 reakcijski čas 90 minut ni dovolj za dosego platoja v primeru nizkih koncentracij (23,6-94,0  $\mu\text{g/ml}$ ). Pri 189  $\mu\text{g/ml}$  imamo v prvi stopnji strm padec absorbance, v drugi stopnji pa postopen počasen upad absorbance, po 70 minutah pa doseže plato. Pri 377  $\mu\text{g/ml}$  pa imamo hitro kinetiko, ker doseže plato v  $< 30$  minutah (Slika 29). In prav tako kot vzorci **oleuropein**, 1, 4, 5, in 7 pri najvišji koncentraciji izkazuje hitro reakcijsko kinetiko, saj za

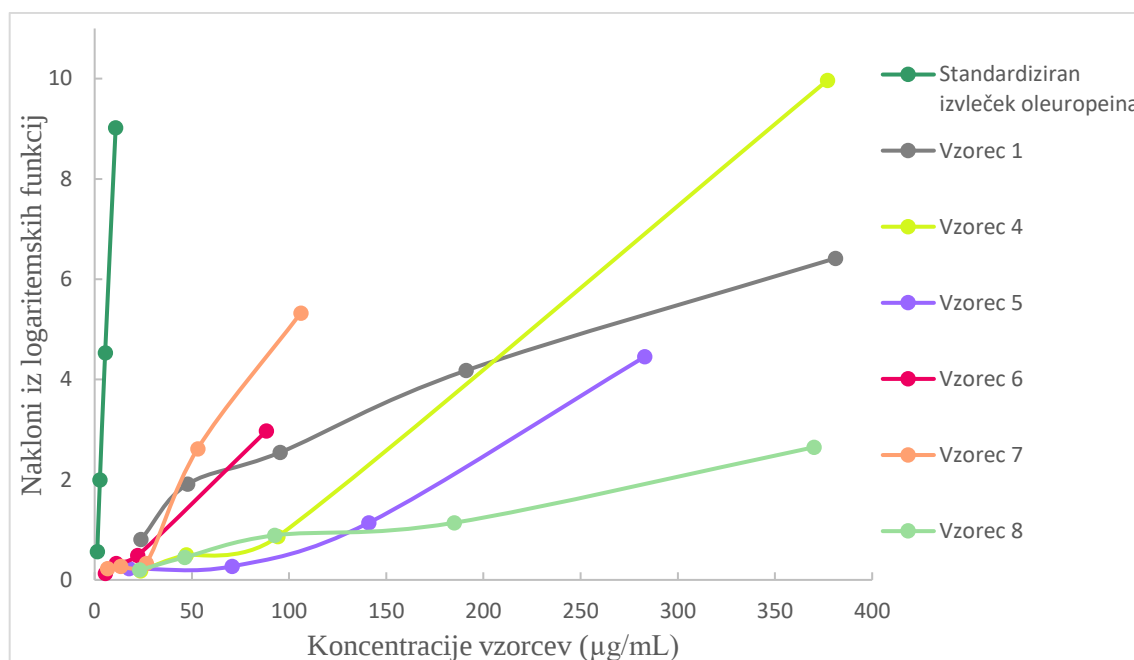
dosego platoja potrebujejo < 30 minut. Antioksidanti so v tako visokih koncentracijah, da je ves DPPH zreduciran. Pri vzorcu 5 opazimo, da pri koncentracijah 17,7-142 µg/ml izkazuje sestavljeno reakcijsko kinetiko, in pri 142 µg/ml doseže plato po približno 80 minutah spremljanja kinetike (Slika 30). Pri vzorcu 6 opazimo pri vseh koncentracijah sestavljeno kinetiko. Pri najvišji koncentraciji pa doseže vzpostavitev dinamičnega ravnotežja po 70 minutah (Slika 31). Vzorec 7 v primeru koncentracij v razponu 6,63 do 53,0 µg/ml uvrstimo med sestavljeno reakcijsko kinetiko, pri 106 µg/ml pa izkazuje hitro kinetiko (plato po < 30 minutah spremljanja kinetike redukcije) (Slika 32). Vzorec 8 izkazuje kombinacijo hitre in počasne kinetike, pri najvišji koncentraciji doseže plato v < 70 minuti spremljanja kinetike (Slika 33). Pri najvišjih koncentracijah pri vzorcih **oleuropeina**, 1, 4, 5, 7 smo lahko s podrobnejšo analizo, iz grafov logaritemskih funkcij v odvisnosti od časa ugotovili, da imajo hitro in počasno reakcijsko kinetiko. Čeprav jih glede na to, koliko časa potrebujejo za dosego platoja, uvrščamo med hitro reakcijsko kinetiko.

Za izračun hitrostnih konstant smo narisali grafe  $\ln[(1 - \text{Abs}_1/\text{Abs})/(1 - \text{Abs}_1/\text{Abs}_0)]$  v odvisnosti od časa (Priloga III), posebej za hitro in počasno kinetiko za vsako koncentracijo (Priloga IV in V). Naklone iz logaritemskih funkcij smo vnesli v graf v odvisnosti od koncentracije za hitro in počasno kinetiko posebej ter prilegali z linearno funkcijo (Priloga VI in VII). Dobili smo enačbo premice, kjer nam y predstavlja hitrostno konstanto, x pa koncentracijo preiskovanega vzorca (Preglednica VI).

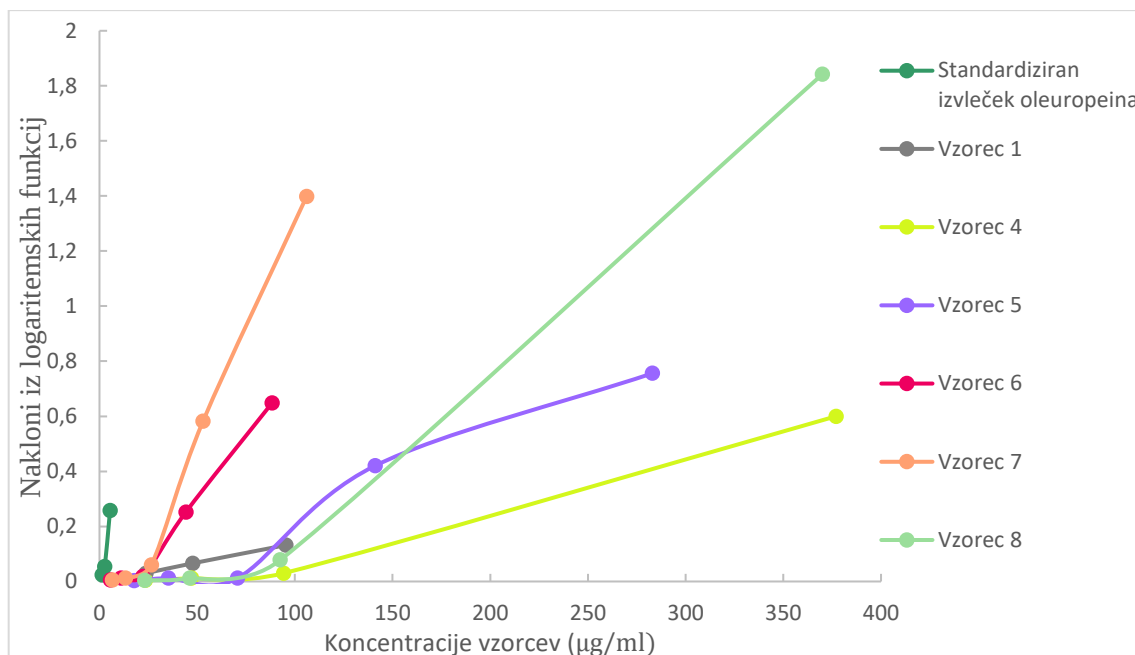
**Preglednica VI: Prikaz hitrostnih konstant.**

| Vzorec                                     | Hitrostne konstante za hitro reakcijsko kinetiko | Hitrostne konstante za počasno reakcijsko kinetiko |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Standardiziran izvleček <b>oleuropeina</b> | $y = 0,8873x - 0,4681$                           | $y = 0,0603x - 0,0782$                             |
| <u>1</u>                                   | $y = 0,0148x + 0,9759$                           | $y = 0,0014x - 0,0029$                             |
| <u>4</u>                                   | $y = 0,0287x - 1,0111$                           | $y = 0,0018x - 0,0783$                             |
| <u>5</u>                                   | $y = 0,0168x - 0,625$                            | $y = 0,0031x - 0,0953$                             |
| <u>6</u>                                   | $y = 0,0347x - 0,1217$                           | $y = 0,0081x - 0,0915$                             |
| <u>7</u>                                   | $y = 0,0546x - 0,4929$                           | $y = 0,0148x - 0,1948$                             |
| <u>8</u>                                   | $y = 0,0067x + 0,1014$                           | $y = 0,0056x - 0,2583$                             |

Hitrostna konstanta je podana kot enačba premice in se spreminja s koncentracijo. Gre za dokaj linearen odnos koncentracije s hitrostno konstanto. Da bi lahko vzorce med seboj primerjali, smo vse krivulje za počasno reakcijsko kinetiko in hitro reakcijsko kinetiko podali v dveh grafih (Slika 35 in 36). Ker nimamo pri vseh vzorcih enakih koncentracij, smo si izbrali dve koncentraciji (50  $\mu\text{g/mL}$  in 250  $\mu\text{g/mL}$ ), pri katerih jih bomo primerjali med seboj. Iz Slike 35 in 36 smo ugotovili, da večja, kot je koncentracija preiskovanega vzorca večji, strmejši je naklon in s tem je večja hitrostna konstanta (ta nam pove, kako hitra je reakcija vzorca z radikalom). Zaradi boljše statistike (bolj natančen odnos naklonov v odvisnosti od koncentracije vzorcev) bi bilo treba pri vsaki koncentraciji izvesti po 3 meritve, hkrati pa bi morali pripraviti več raztopin vzorcev z različnimi koncentracijami, da bi dobili več eksperimentalnih točk.



Slika 35: Graf naklonov logaritemski funkcij za hitro reakcijsko kinetiko v odvisnosti od koncentracij.



Slika 36: Graf naklonov logaritemski funkcij za počasno reakcijsko kinetiko v odvisnosti od koncentracij.

Za standardiziran izvleček **oleuropeina** lahko opazimo, da že pri zelo nizkih koncentracijah hitro reagira z DPPH (Slika 35 in 36).

Večja, kot je hitrostna konstanta, hitrejša je reakcija vzorca z DPPH, boljše antioksidativno delovanje ima preiskovani vzorec. Vzorce lahko razvrstimo na podlagi hitrostnih konstant od tistih z najhitrejšim antioksidativnim delovanjem (vzorec z največjo hitrostno konstanto), do tistih z najpočasnejšim antioksidativnim delovanjem (vzorec z najmanjšo hitrostno konstanto) pri določeni koncentraciji; posebej za hitro in počasno kinetiko:

Hitra kinetika: 50 µg/mL: 7 > 1 > 6 > 8 > 4 > 5.

250 µg/mL: 4 > 1 > 5 > 8.

Počasna kinetika: 50 µg/mL: 7 > 6 > 1 > 5 > 8 > 4.

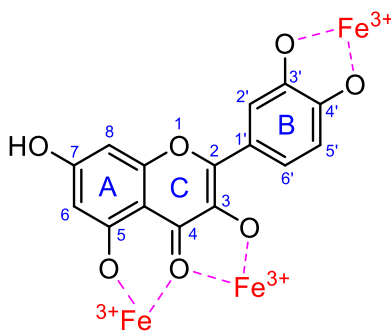
250 µg/mL: 8 > 5 > 4.

### 4.3 UV-VIS SPEKTROFOTOMETRIČNA TITRACIJA VZORCEV Z $\text{Fe}^{3+}$ IONI

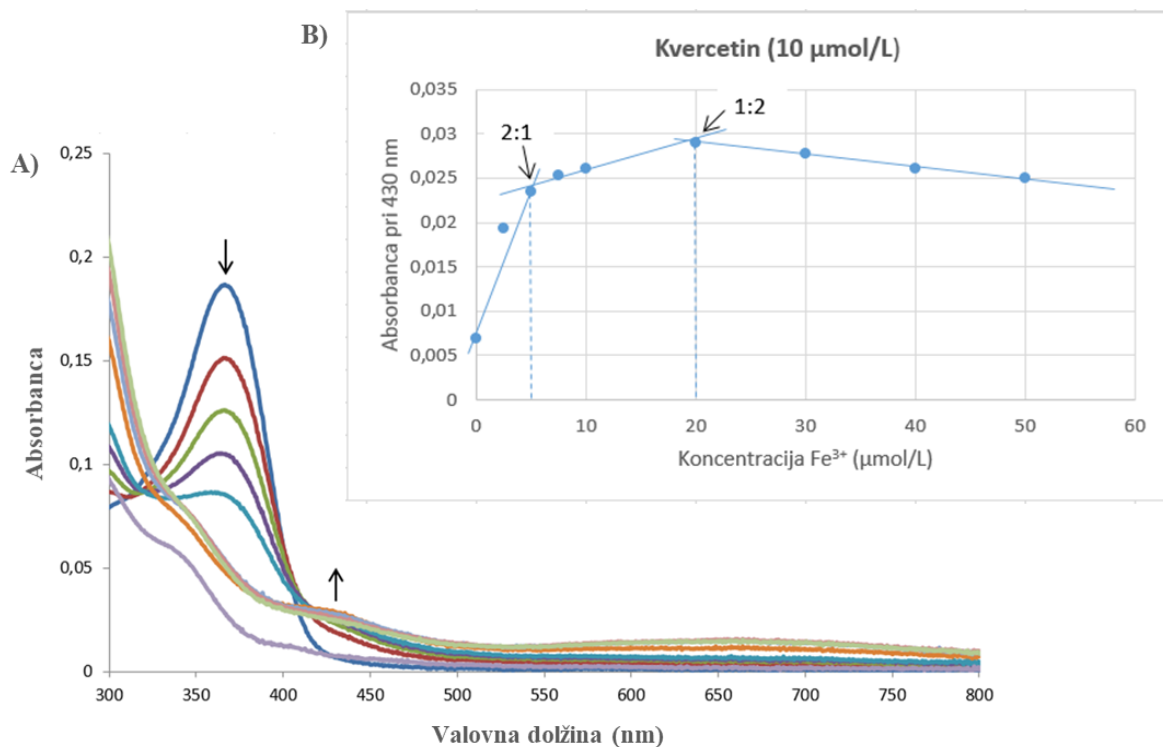
Pomemben mehanizem delovanja antioksidantov je kelacija železovih in bakrovih ionov, tako da ti ne vstopajo v redoks reakcije. Z UV-Vis spektrofotometrično titracijo smo preučevali sposobnost vzorcev za tvorbo kompleksov z  $\text{Fe}^{3+}$ . Najprej smo posneli absorpcijski spekter raztopine vzorca. Ko v raztopino vzorca dodamo raztopino  $\text{FeCl}_3$ , se v absorpcijskem spektru pojavi nov vrh pri določeni valovni dolžini, ki kaže na nastanek kompleksa med vzorcem in  $\text{Fe}^{3+}$ . Narisali smo titracijsko krivuljo in določili vezavno stehiometrijo med vzorcem in  $\text{Fe}^{3+}$ .

#### 4.3.1 Standard kvercetin

Za standard smo uporabili kvercetin, ki ga uvrščamo med rastlinske polifenole (flavonole). Kvercetin je *in vitro* učinkovit antioksidant in ga v višjih koncentracijah najdemo v čebuli, rdečem vinu, čaju, jagodičevju (8) ... Ima sposobnost keliranja  $\text{Fe}^{2+}$  in  $\text{Fe}^{3+}$  ionov in tako onemogoči nastanek  $\text{OH}^\bullet$  v Fentonovi reakciji (28). Kvercetin se veže na kovinski kation preko dveh atomov, je torej dvovezni (bidentatni) ligand (39). Verjetna so tri vezavna mesta na kvercetinu za vezavo  $\text{Fe}^{3+}$ .  $\text{Fe}^{3+}$  se na kvercetin najverjetneje veže preko karbonilne skupine in proste 3-OH skupine (obroč C) ali preko kateholnega dela molekule (obroč B), manj jasna pa je antioksidativna vloga 5-OH skupine na obroču A (Slika 37) (3, 28). Kvercetin v mikromolarnih koncentracijah lahko popolnoma inhibira Fentonovo reakcijo (28).



Slika 37: Vezavna mesta  $\text{Fe}^{3+}$  na primeru kvercetina (3).

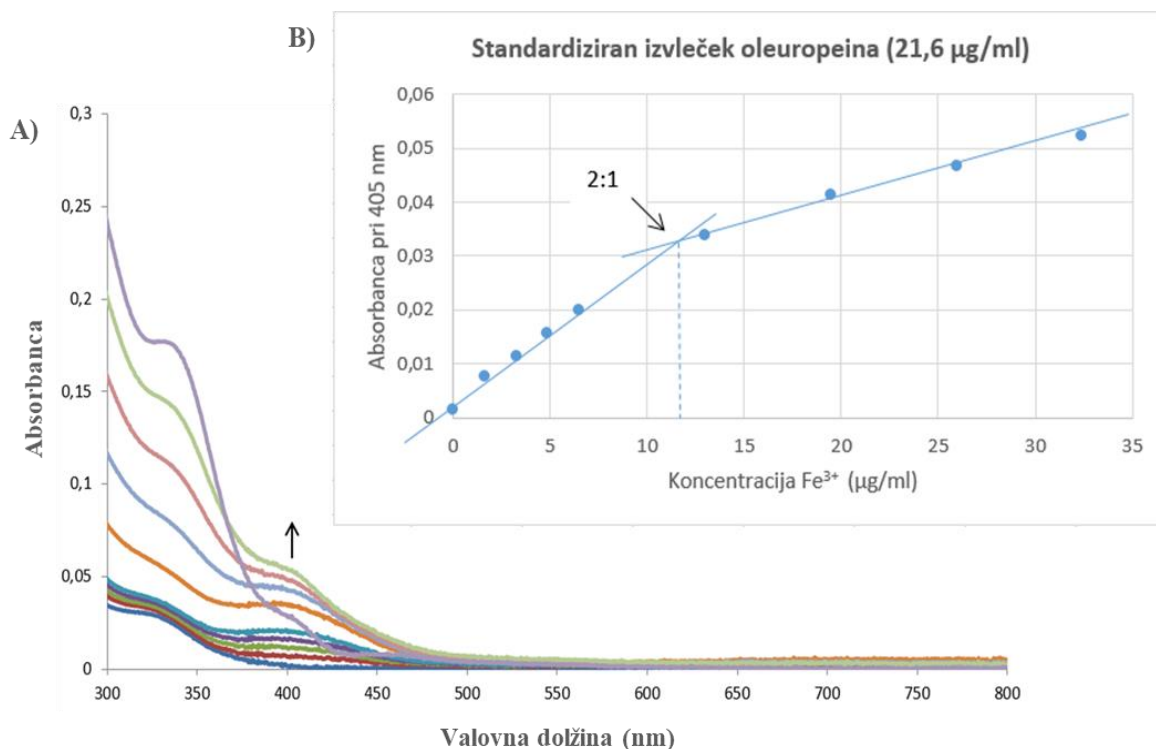


Slika 38: A) UV-Vis spektrofotometrična titracija 10  $\mu\text{M}$  kvercetina ob prisotnosti 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 20, 30, 40 in 50  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$ . B) Titracijska krivulja: absorbanca kompleksa kvercetin- $\text{Fe}^{3+}$  pri 430 nm v odvisnosti od koncentracije  $\text{Fe}^{3+}$ .

UV-Vis spektrofotometrično titracijo vzorcev/standarda z  $\text{Fe}^{3+}$  smo izvedli v 50 mM acetatnem pufru s pH 3,5. Z dodajanjem  $\text{Fe}^{3+}$  smo izmerili padec absorbance prostega kvercetina pri valovni dolžini 369 nm in nastajanje novega absorpcijskega vrh pri 430 nm, ki kaže na nastanek kompleksov med kvercetinom in  $\text{Fe}^{3+}$  ioni (Slika 38A). Nato smo v programu Excel izrisali titracijsko krivuljo pri 430 nm in preko sprememb v absorbanci določili nastanek kompleksov v množinskem razmerju 2 : 1 in 1 : 2 (kvercetin :  $\text{Fe}^{3+}$ ) (Slika 38B).

### 4.3.2 Preiskovani vzorci

#### Standardiziran izvleček oleuropeina



Slika 39: A) UV-Vis spektrofotometrična titracija 21,6 µg/mL standardiziranega izvlečka oleuropeina ob prisotnosti 0, 1,62, 3,24, 4,87, 6,49, 13, 19,5, 26 in 32,4 µg/mL Fe<sup>3+</sup>. B) Titracijska krivulja: absorbanca kompleksa standardiziranega izvlečka oleuropeina-Fe<sup>3+</sup> pri 405 nm v odvisnosti od koncentracije Fe<sup>3+</sup>.

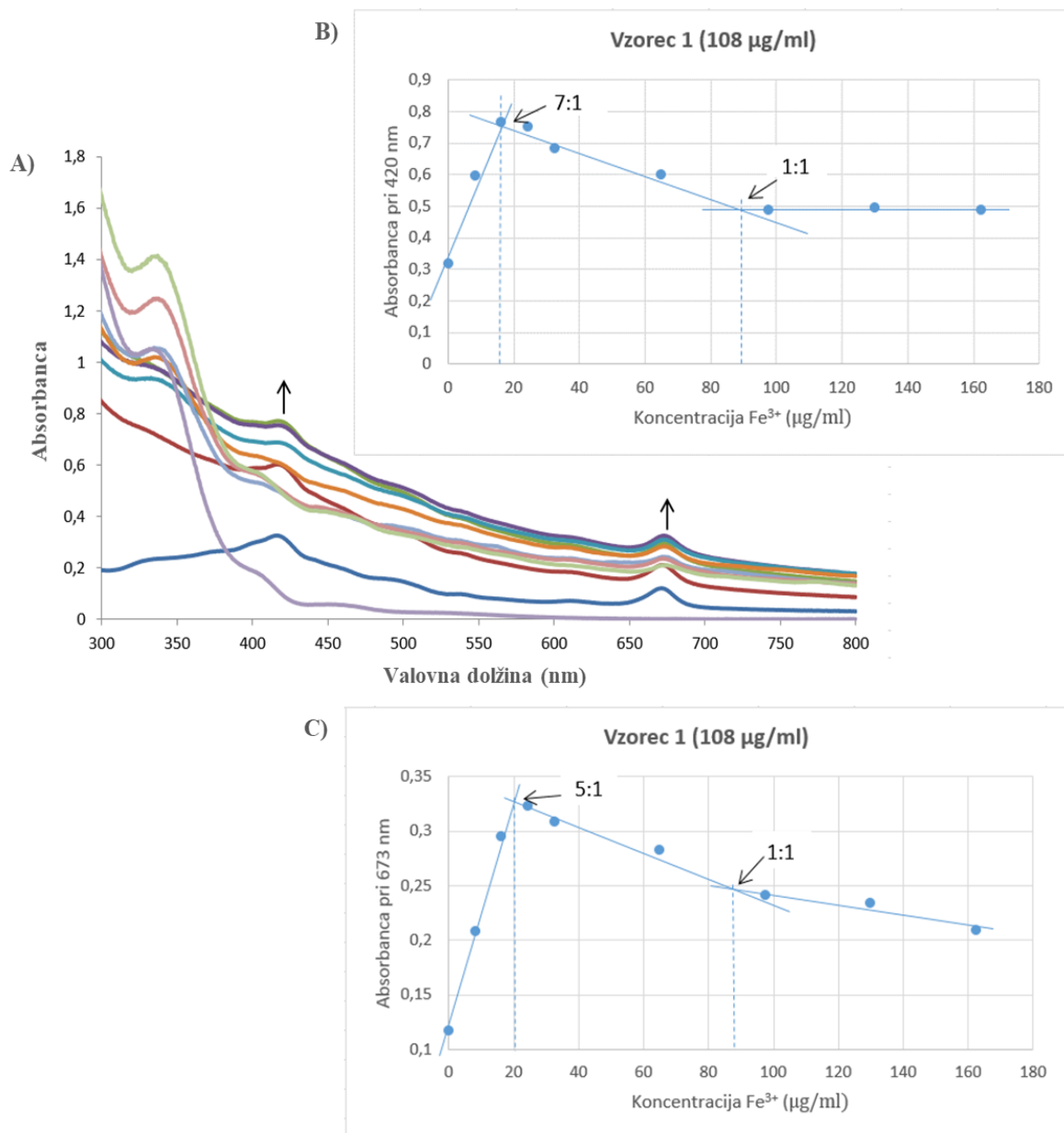
Ker ne poznamo sestave naših vzorcev, ne poznamo molekulskih mas za spojine. Zato ne moremo predvidevati, kakšno je množinsko razmerje oziroma razmerje med molekulami. Lahko pa določimo masno razmerje med vzorcem in železovimi ioni (ligand : kovinski ion).

Serijski UV-Vis spektrometrični standardiziranega izvlečka oleuropeina titriranega z Fe<sup>3+</sup> je prikazana na Sliki 39A. Po dodatku Fe<sup>3+</sup> vidimo nastajanje novega vrha pri 405 nm. Masno razmerje 2 : 1 (standardiziran izvleček oleuropeina : Fe<sup>3+</sup>) smo določili preko sprememb v absorbanco pri valovni dolžini 405 nm (Slika 39B).

#### Vzorec 1

Na Sliki 40A imamo dobljeni absorpcijski spekter vzorca 1 ob dodatku različnih koncentracij Fe<sup>3+</sup>. Pri valovni dolžini 420 nm je prišlo do maksimalne absorbance pri masnem razmerju 7 : 1 (vzorec 1 : Fe<sup>3+</sup>). Nato pa je absorbanca upadala do masnega razmerja 1 : 1, in v prisotnosti 90 µg/mL Fe<sup>3+</sup> smo dosegli plato (Slika 40B). Lahko je več vzrokov za

upadanje absorbance: zaradi večanja koncentracije  $\text{Fe}^{3+}$  smo oksidirali vse fenolne  $-\text{OH}$  skupine, ki pa slabše vežejo železove ione kot reducirana oblika fenola. Vsekakor je treba upoštevati možnost redoks reakcije med fenoli in  $\text{Fe}^{3+}$ . V spektru vzorca 1 zaznamo tudi pri 673 nm absorpcijski vrh pri masnem razmerju 5:1 in tudi tukaj nato absorbanca upada (Slika 40C).



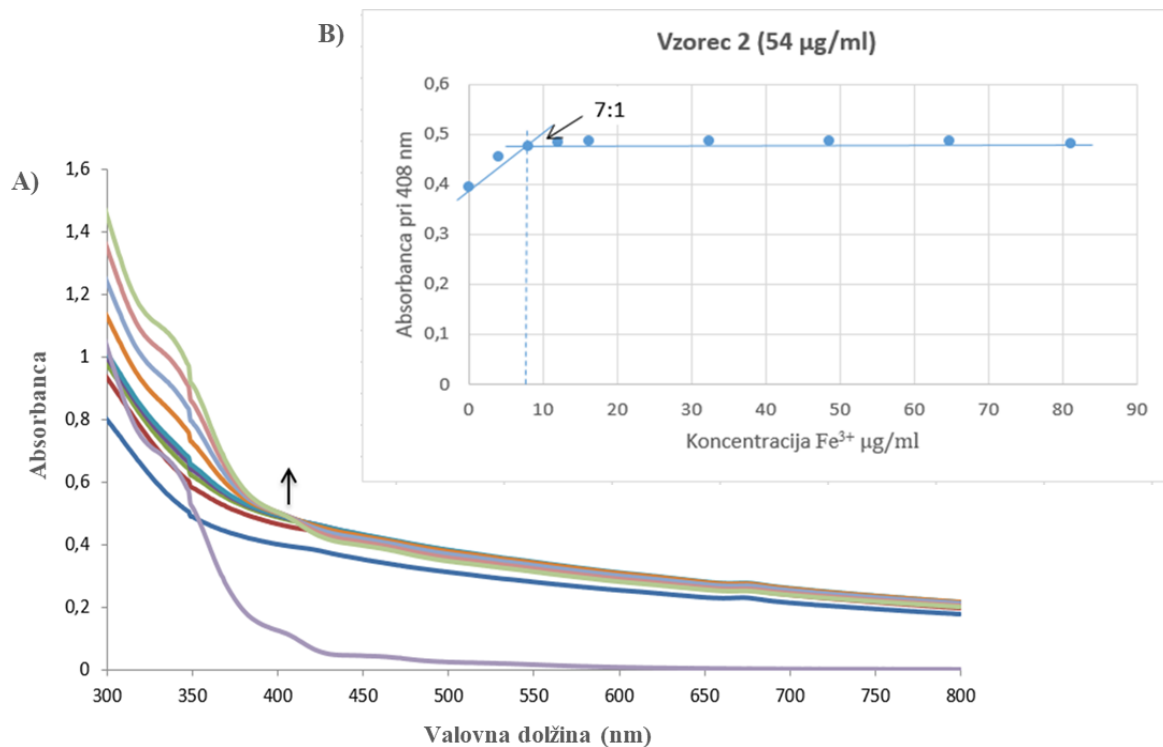
Slika 40: A) UV-Vis spektrofotometrična titracija 108 µg/mL vzorca 1 ob prisotnosti 0, 8.11, 16.2, 24.3, 32.4, 64.9, 97.3, 130, 162 µg/mL  $\text{Fe}^{3+}$ . B) Titracijska krivulja: absorbanca kompleksa vzorca 1- $\text{Fe}^{3+}$  pri 420 nm v odvisnosti od koncentracije  $\text{Fe}^{3+}$ . C) Titracijska krivulja: absorbanca kompleksa vzorca 1- $\text{Fe}^{3+}$  pri 673 nm v odvisnosti od koncentracije  $\text{Fe}^{3+}$ .

### Vzorca 2 in 3

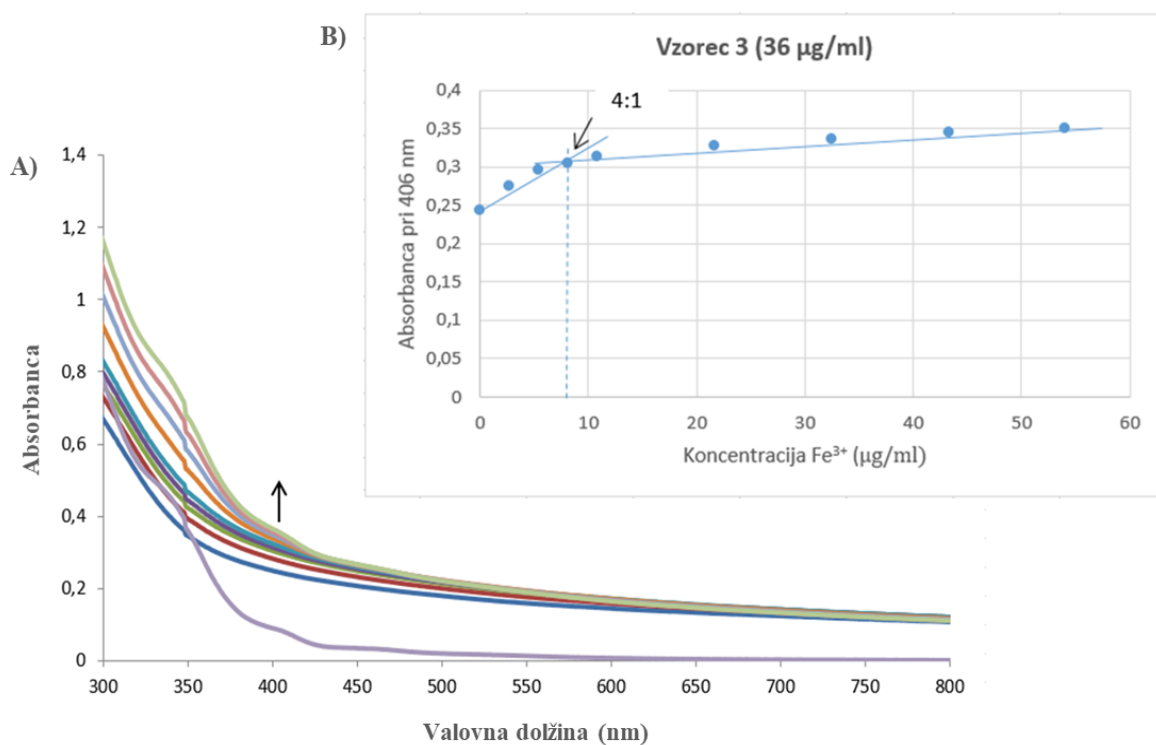
Pri vzorcih 2 in 3 smo pripravili manj koncentrirane raztopine za meritve. Ker sta bili osnovni raztopini s koncentracijo 2,16 mg/mL pri obeh vzorcih motni, smo jima dodali po 2 kapljici 0,1 M NaOH in ponovno sonicirali v ultrazvočni kopeli (vzorca smo izpostavili visoko intenzivnemu ultrazvočnemu valovanju, ki povzroči, da delci med seboj trkajo). Ni prišlo do spremembe v zbistritvi, a smo kljub temu nadaljevali z redčenjem. Po določenem času smo pri osnovnih raztopinah vzorcev 2 in 3 opazili kristalizacijo. Ker smo pri spektrofotometričnih meritvah raztopin vzorcev 2 in 3 s koncentracijo 108 µg/mL, dobili visoke absorbance ( $> 2$ ) smo pripravili nižje koncentracije raztopin (54 µg/mL za vzorec 2 in 36 µg/mL za vzorec 3), da smo dobili absorbanco okoli 1.

Absorpcijski spekter vzorca 2 je po dodatku  $\text{Fe}^{3+}$  naraščal (Slika 41A). Absorpcijska spektra vzorca 2 in 3 sta si podobna (Slika 41A in Slika 42A). Pri vzorcu 2 je pri 408 nm prišlo do maksimalne absorbance pri masnem razmerju 7 : 1 (vzorec 2 :  $\text{Fe}^{3+}$ ), nato pa smo dosegli plato pri 12 µg/mL  $\text{Fe}^{3+}$  (Slika 41B). Pri vzorcu 3 je v grafu odvisnosti absorbance pri 406 nm od koncentracije  $\text{Fe}^{3+}$  prišlo do spremembe v naklonu pri masnem razmerju 4 : 1 (vzorec 3 :  $\text{Fe}^{3+}$ ), absorbanca je nato naraščala do koncentracije 54 µg/mL  $\text{Fe}^{3+}$  in dosegla plato (Slika 42B).

Pri valovni dolžini 350 nm se preklopita žarnici v UV-Vis spektrofotometru. V tem območju je prišlo do električnih motenj (preskoki pri krivuljah) zaradi preklopa UV oziroma VIS žarnice.



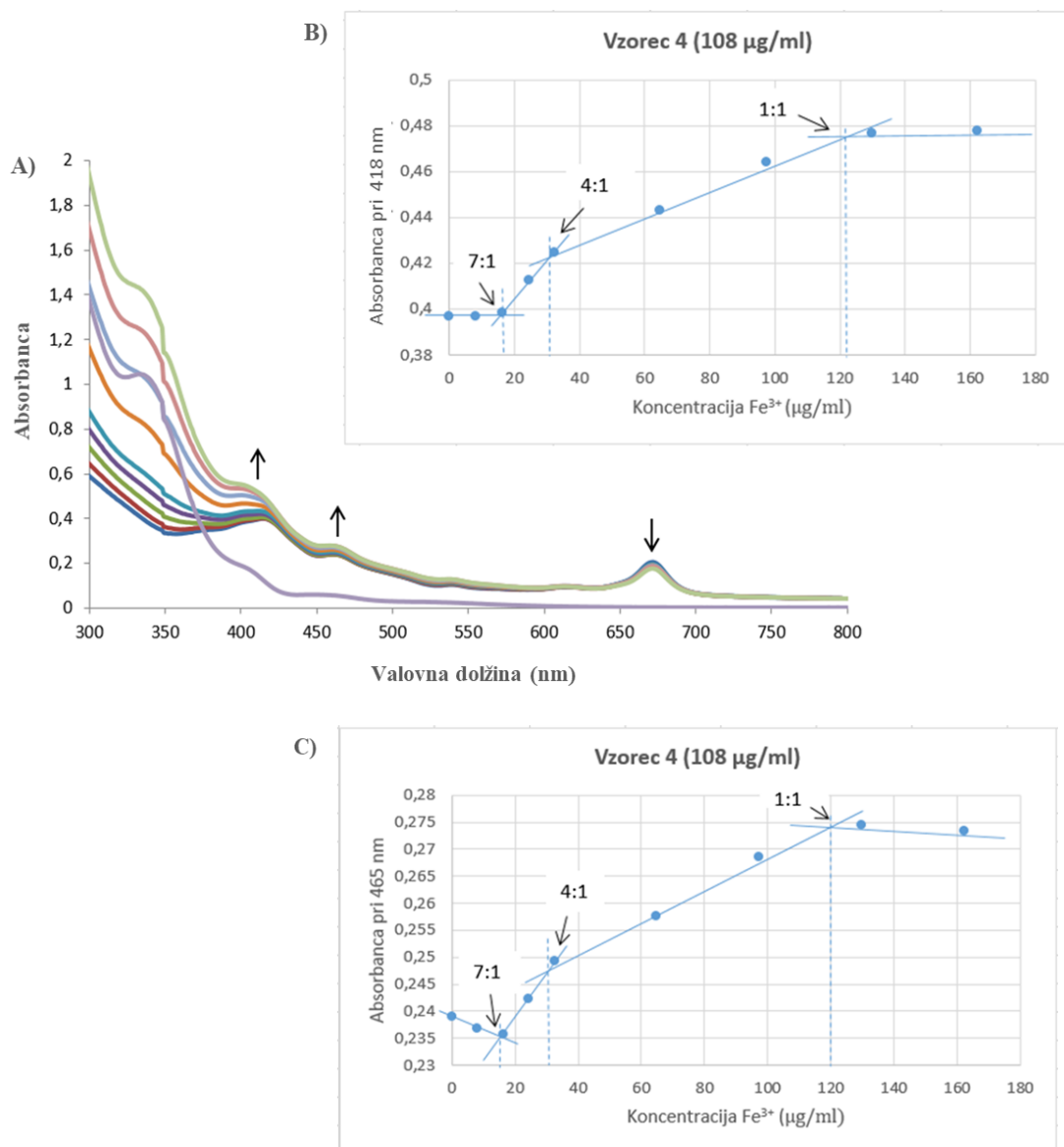
Slika 41: A) UV-Vis spektrofotometrična titracija 54  $\mu\text{g/mL}$  vzorca 2 ob prisotnosti 0, 4.06, 8.11, 12.2, 16.2, 32.4, 48.7, 64.9, 81.1  $\mu\text{g/mL}$   $\text{Fe}^{3+}$ . B) Titracijska krivulja: absorbanca kompleksa vzorca 2- $\text{Fe}^{3+}$  pri 408 nm v odvisnosti od koncentracije  $\text{Fe}^{3+}$ .



Slika 42: A) UV-Vis spektrofotometrična titracija 36  $\mu\text{g/mL}$  vzorca 3 ob prisotnosti 0, 2.70, 5.41, 8.11, 10.8, 21.6, 32.4, 43.3, 54.1  $\mu\text{g/mL}$   $\text{Fe}^{3+}$ . B) Titracijska krivulja: absorbanca kompleksa vzorca 3- $\text{Fe}^{3+}$  pri 406 nm v odvisnosti od koncentracije  $\text{Fe}^{3+}$ .

## Vzorec 4

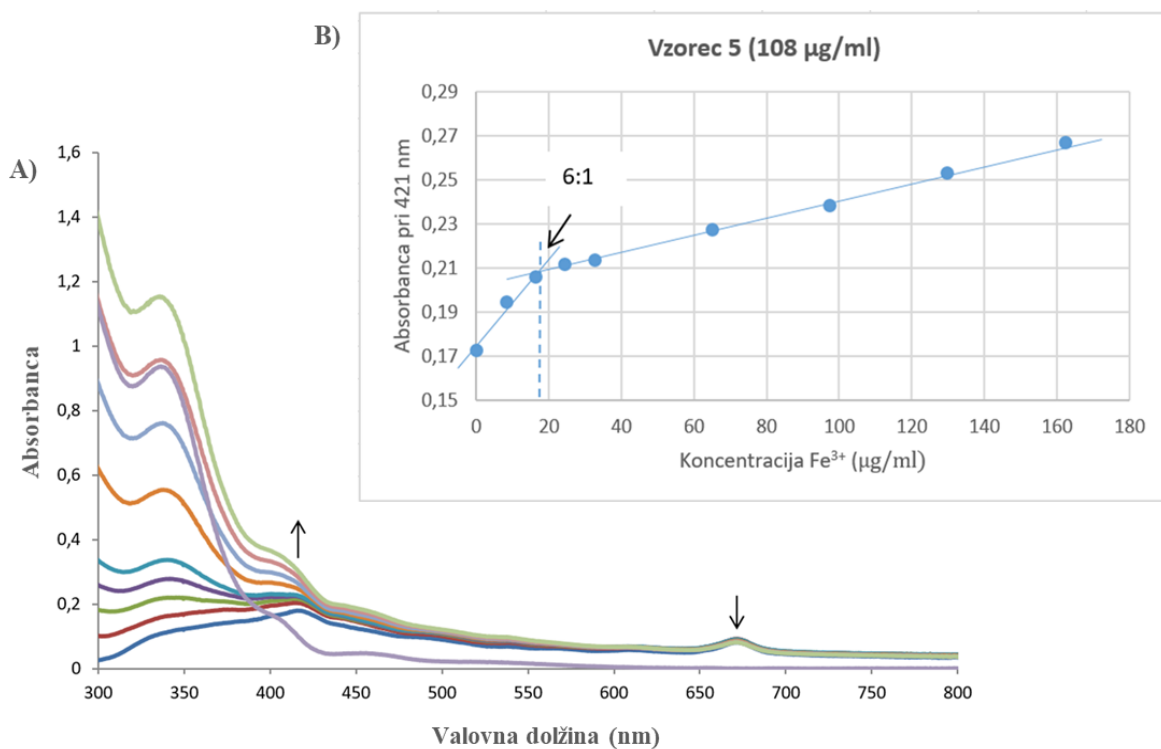
V UV-Vis spektru vzorca 4 ob dodatku različnih koncentracij  $\text{Fe}^{3+}$  smo zaznali padec absorbance pri 673 nm in nastanek dveh naraščajočih vrhov pri 418 nm in 465 nm (Slika 43A). Pri obeh valovnih dolžinah smo nato izrisali titracijski krivulji in določili masna razmerja 7 : 1, 4 : 1, 1 : 1 med vzorcem 4 in  $\text{Fe}^{3+}$  (Slika 43B in C). Absorbanca je pri 418 nm naraščala vse do koncentracije 130  $\mu\text{g/mL}$   $\text{Fe}^{3+}$ , pri kateri smo dosegli plato (Slika 43B). Tudi pri vzorcu 4 ima preklop žarnic v UV-Vis spektrofotometru vpliv na absorpcijski spekter (preskoki pri 350 nm).



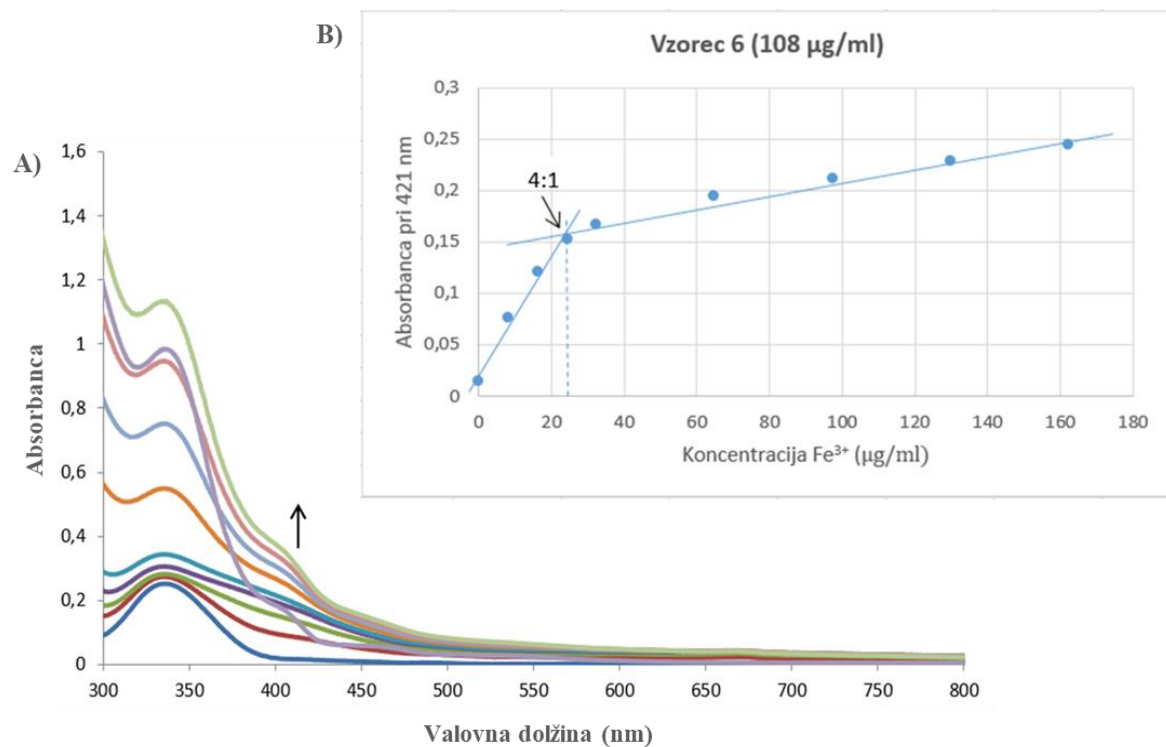
Slika 43: A) UV-Vis spektrofotometrična titracija 108  $\mu\text{g/mL}$  vzorca 4 ob prisotnosti 0, 8.11, 16.2, 24.3, 32.4, 64.9, 97.3, 130, 162  $\mu\text{g/mL}$   $\text{Fe}^{3+}$ . B) Titracijska krivulja: absorbanca kompleksa vzorca 4- $\text{Fe}^{3+}$  pri 418 nm v odvisnosti od koncentracije  $\text{Fe}^{3+}$ . C) Titracijska krivulja: absorbanca kompleksa vzorec 4- $\text{Fe}^{3+}$  pri 465 nm v odvisnosti od koncentracije  $\text{Fe}^{3+}$ .

## Vzorca 5 in 6

V UV-Vis spektru vzorca 5 ob dodatku naraščajočih koncentracij  $\text{Fe}^{3+}$  opazimo naraščanje absorbance pri 421 nm in padec absorbance pri 675 nm (Slika 44A). Iz titracijske krivulje smo določili masno razmerje 6 : 1 (vzorec 5 :  $\text{Fe}^{3+}$ ) (Slika 44B). Na sliki 45A smo po dodatku  $\text{Fe}^{3+}$  v absorpcijskem spektru vzorca 6 opazili naraščanje absorbance pri 421 nm. Pri 421 nm smo določili masno razmerje 4 : 1 (vzorec 6 :  $\text{Fe}^{3+}$ ) (Slika 45B).



Slika 44: A) UV-Vis spektrofotometrična titracija 108 µg/mL vzorca 5 ob prisotnosti 0, 8.11, 16.2, 24.3, 32.4, 64.9, 97.3, 130, 162 µg/mL  $\text{Fe}^{3+}$ . B) Titracijska krivulja: absorbanca kompleksa vzorca 5- $\text{Fe}^{3+}$  pri 421 nm v odvisnosti od koncentracije  $\text{Fe}^{3+}$ .

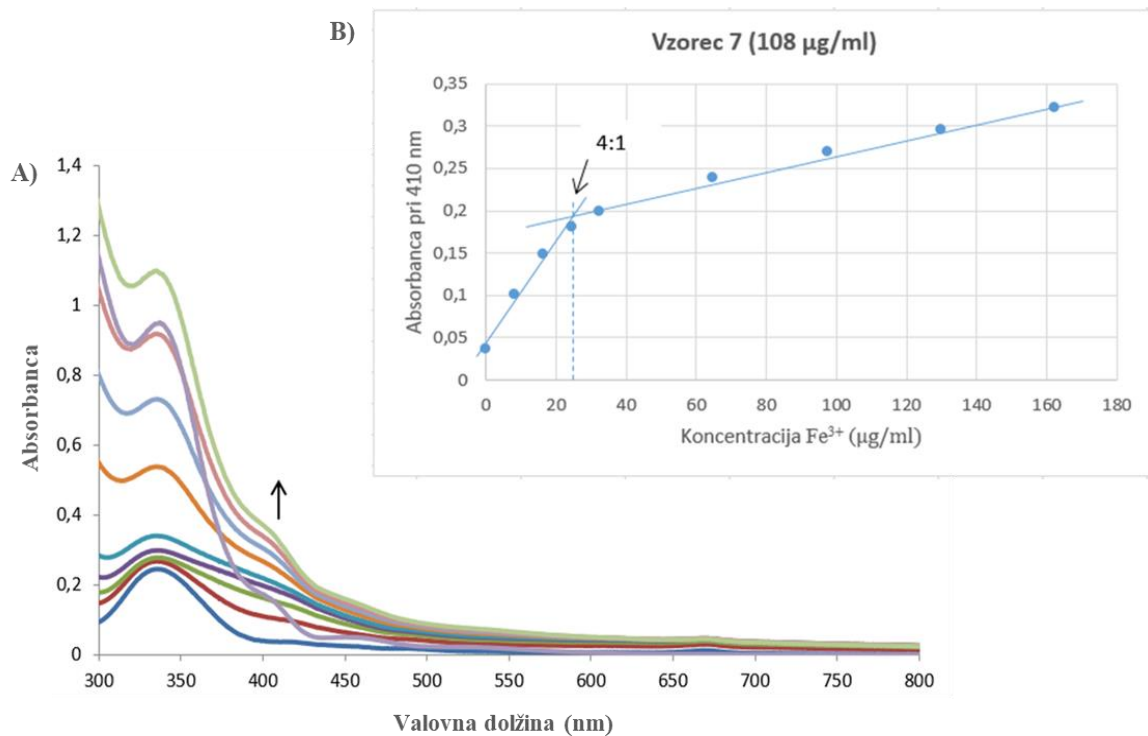


Slika 45: A) UV-Vis spektrofotometrična titracija 108  $\mu\text{g/ml}$  vzorca 6 ob prisotnosti 0, 8.11, 16.2, 24.3, 32.4, 64.9, 97.3, 130, 162  $\mu\text{g/ml}$   $\text{Fe}^{3+}$ . B) Titracijska krivulja: absorbanca kompleksa vzorca 6- $\text{Fe}^{3+}$  pri 421 nm v odvisnosti od koncentracije  $\text{Fe}^{3+}$ .

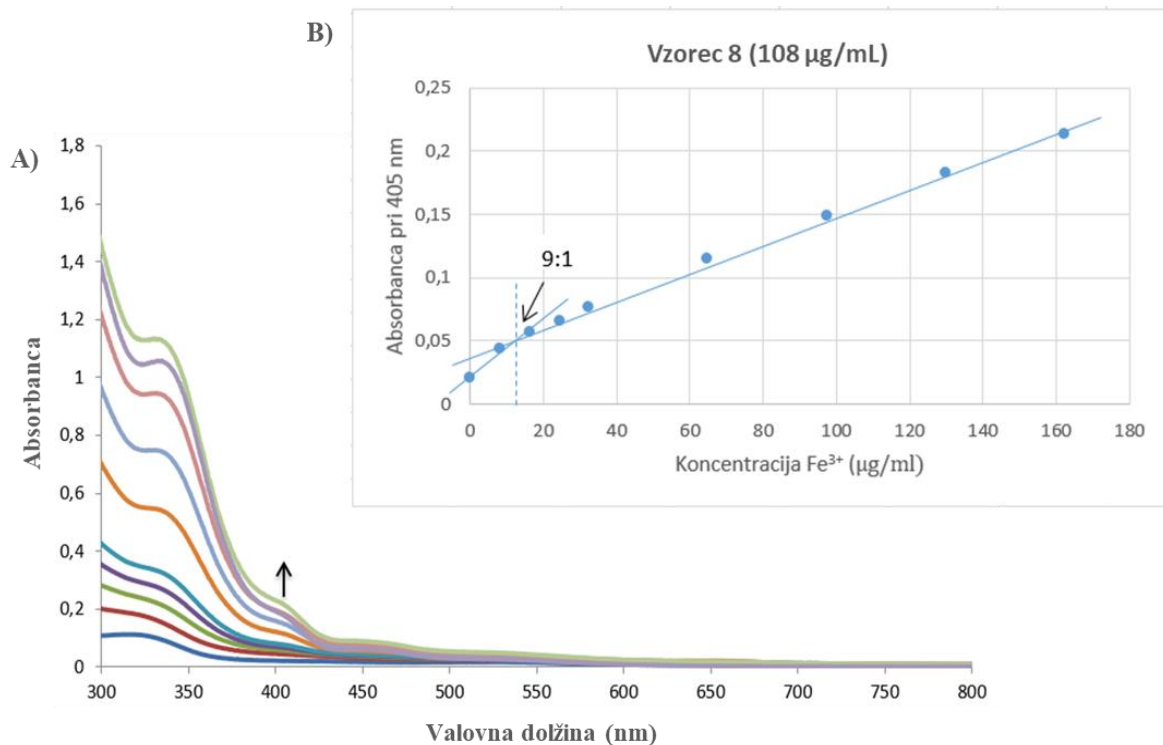
### Vzorca 7 in 8

Podoben absorpcijski spekter kot pri vzorcu 6, opazimo tudi pri vzorcu 7. Naraščajoči vrh pri vzorcu 7 opazimo pri 410 nm (Slika 46A). Pri tej valovni dolžini smo v odvisnosti od koncentracije  $\text{Fe}^{3+}$  nato izrisali titracijsko krivuljo in določili masno razmerje 4 : 1 (Slika 46B).

Pri vzorcu 8 po dodatku  $\text{Fe}^{3+}$  ionov opazimo naraščanje absorbance pri 405 nm (Slika 47A). V titracijski krivulji smo opazili majhno spremembo v naklonu in določili smo masno razmerje 9 : 1 (vzorec 8 :  $\text{Fe}^{3+}$ ) (Slika 47B).



Slika 46: A) UV-Vis spektrofotometrična titracija 108 µg/mL vzorca 7 ob prisotnosti 0, 8.11, 16.2, 24.3, 32.4, 64.9, 97.3, 130, 162 µg/mL  $\text{Fe}^{3+}$ . B) Titracijska krivulja: absorbanca kompleksa vzorca 7- $\text{Fe}^{3+}$  pri 410 nm v odvisnosti od koncentracije  $\text{Fe}^{3+}$ .



Slika 47: A) UV-Vis spektrofotometrična titracija 108 µg/mL vzorca 8 ob prisotnosti 0, 8.11, 16.2, 24.3, 32.4, 64.9, 97.3, 130, 162 µg/mL  $\text{Fe}^{3+}$ . B) Titracijska krivulja: absorbanca kompleksa vzorca 8- $\text{Fe}^{3+}$  pri 405 nm v odvisnosti od koncentracije  $\text{Fe}^{3+}$ .

## 5. SKLEP

V magistrski nalogi smo ovrednotili antioksidativne lastnosti sedmim ekstraktom iz oljčnih listov, standardiziranemu izvlečku oleuropeina in vzorcu »terana«, pridobljenem iz ovojnic grozdja po stiskanju na tri različne načine, in sicer: s antioksidativno sposobnostjo redukcije radikala DPPH, kinetiko redukcije DPPH in UV-Vis spektrofotometrično titracijo vzorcev z  $\text{Fe}^{3+}$  ioni.

Na podlagi rezultatov DPPH testa lahko vzorce razvrstimo glede na antioksidativno kapaciteto v naslednjem vrstnem redu: standardiziran izvleček **oleuropeina** > vzorec **6** > vzorec **7** > vzorec **5** > vzorec **4** > vzorec **8** > vzorec **2** > vzorec **1**. Vzorci si po vrsti sledijo od tistega z najnižjo vrednostjo  $\text{EC}_{50}$  (visoka antioksidativna kapaciteta vzorca) in nazadnje do vzorca, ki ima najvišjo vrednost  $\text{EC}_{50}$  (preiskovani vzorec z najnižjo antioksidativno kapaciteto).

S spremljanjem kinetike reakcije med DPPH in različnimi koncentracijami vzorcev smo ugotovili, da večja kot je koncentracija vzorca, hitreje poteka redukcija radikala DPPH. Najboljše antioksidativno delovanje je izkazal standardiziran izvleček **oleuropeina**. Pri nizki koncentraciji (50  $\mu\text{g/mL}$ ) je v hitri reakcijski kinetiki najhitreje z DPPH reagiral vzorec **7**, najpočasneje pa vzorec **5**. Pri visoki koncentraciji (250  $\mu\text{g/mL}$ ) pa je najhitreje reagiral vzorec **4** in najpočasneje vzorec **8**. V počasni reakcijski kinetiki pri nizki koncentraciji se je najboljše izkazal vzorec **7**, najpočasnejše antioksidativno delovanje pa je imel vzorec **4**. Pri visoki koncentraciji pa je najhitreje reagiral vzorec **8**, najpočasneje pa vzorec **4**.

Z UV-Vis spektrofotometrično titracijo vzorcev z  $\text{Fe}^{3+}$  smo ugotovili, da vsi vzorci tvorijo kelatne komplekse v različnih masnih razmerjih.

Za nadaljevanje te raziskave bi bilo smiselno analizirati kvantitativno in kvalitativno sestavo ekstraktov. S kromatografsko metodo (tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti) bi ločili spojine v zmesi med seboj in nadaljnje bi z metodo detekcije (masni spektrometer) identificirali (določili bi molekulsko maso in zgradbo spojin) posamezne spojine v zmesi ekstraktov. Ker pri gojenju, obrezovanju oljk in pridobivanju oljčnega olja pride do velikih količin tehnološkega odpada, bi bilo smiselno, da izkoristimo prisotne antioksidante in ekstrakte oljčnih listov uporabimo v npr. prehranskih dopolnilih ali kozmetiki, saj imajo veliko koristnih bioloških učinkov. Že z obrezovanjem ene oljke letno proizvedemo približno 25 kg odpada (vejice, listi oljke) (13).

## 6. LITERATURA

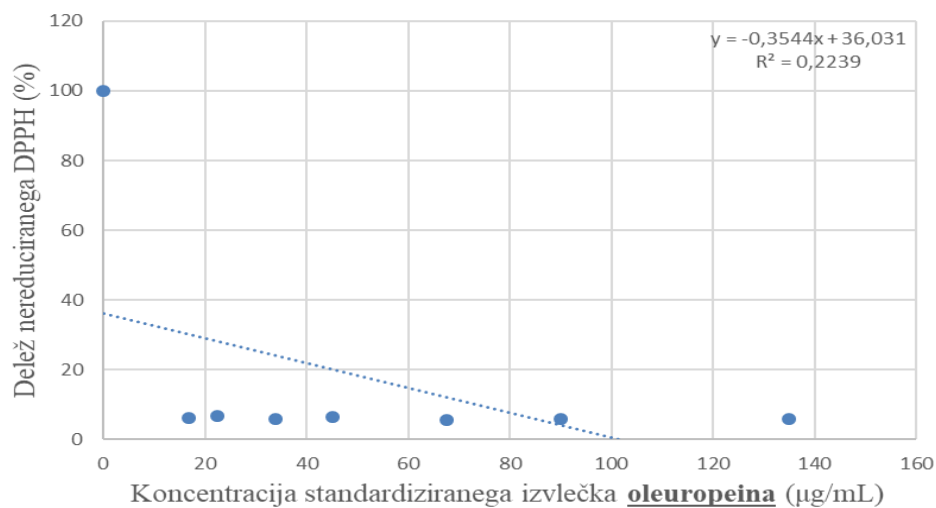
1. Mravljak J: Radikali in oksidativni stres. Farmacevtski vestnik 2015; 66: 127-132.
2. Osredkar J: Oksidativni stres. Zdravstveni vestnik 2012; 81: 393–406.
3. Pečar S, Mravljak J: Šumi življenja ali radikali in druge reaktivne snovi v telesu, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2015: 35, 36, 161, 162, 176, 184–189, 200, 219–227.
4. Pečar S: Radikali v našem življenju. Kemija v šoli 2006; 18(3): 13–19.
5. Obreza A, Mravljak J, Perdih F: Farmacevtska kemija I, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2014: 8–11, 39.
6. [http://www.ffa.unilj.si/fileadmin/datoteke/FK/Gradiva\\_FK/2010/Seminarji/Antioksidanti.pdf](http://www.ffa.unilj.si/fileadmin/datoteke/FK/Gradiva_FK/2010/Seminarji/Antioksidanti.pdf), dostopano: januar 2018.
7. Young IS, Woodside JV: Antioxidants in health and disease. J Clin Pathol 2001; 54: 176–186.
8. Halliwell B, Gutteridge J: Free radicals in biology and medicine, Oxford University Press Inc., New York, 2007: 179-180.
9. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Kelacija>, dostopano: marec 2015.
10. Perron N R, Brumaghim J L: A Review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. Cell Biochemistry and Biophysics 2009; 53: 79–80.
11. Barbaro B, Toietta G, Maggio R, Arciello M, Tarocchi M, Galli A, Balsano C: Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health. Int J Mol Sci 2014; 15: 18508–18524.
12. Kočevlar Glavač N, Janeš D: Sodobna kozmetika: sestavine naravnega izvora, 1. izd., Širimo dobro besedo, Ljubljana, 2015: 778.
13. Abaza L, Taamalli A, Nsir H, Zarrouk M: Olive tree (*Olea europaea* L.) leaves: Importance and advances in the analysis of phenolic compounds. Antioxidants 2015; 4: 682–698.
14. Omar S H: Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. Saudi Pharmaceutical Journal 2010; 18: 111–121.
15. Bulotta S, Celano M, Lepore S M, Montalcini T, Pujia A, Russo D: Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hidroxytyrosol: focus on

- protection against cardiovascular and metabolic diseases. *Journal of Translational Medicine* 2014; 12: 1–9.
16. Kovačič U: Temelji patofiziologije s fiziologijo za študente zdravstvenih ved, poglavje: Vnetje, 1. ponatis, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2015: 81.
  17. Mravljak J: Reaktivni kisikovi in dušikovi intermediati (izročki predavanj o antioksidantih in oksidativnem stresu), Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2016/17.
  18. Mishra K, Ojha H, Chaudhury N K: Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry* 2012; 130(4): 1036–1043.
  19. Kedare S B, Singh R P: Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol* 2011; 48(4): 412–422.
  20. Carmona-Jiménez Y, García-Moreno M V, Igartuburu J M, Barroso C G: Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products. *Food Chemistry* 2014; 165: 198–204.
  21. Bondet V, Brand-Williams W, Berset C: Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensm Wiss u Technol* 1997; 30(6): 609–615.
  22. Sharma O P, Bhat T K: DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* 2009; 113: 1202–1205.
  23. Molyneux P: The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol* 2004; 26(2): 211–219.
  24. <https://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-and-chronic-degenerative-diseases-a-role-for-antioxidants/chemistry-of-natural-antioxidants-and-studies-performed-with-different-plants-collected-in-mexico>, dostopano: julij 2017.
  25. Ozcelik B, Lee J H, Min D B: Effects of light, oxygen, and pH on the absorbance of 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of Food Science* 2003; 68(2): 487–490.
  26. Paiva-Martins F, Gordon M H: Interactions of ferric ions with olive oil phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 2005; 53(7): 2704–2709.
  27. Geng J, Li M, Wu L, Ren J, Qu X: Liberation of copper from amyloid plaques: making a risk factor useful for Alzheimer's disease treatment. *Journal of Medicinal Chemistry* 2012; 55: 9146–9155.

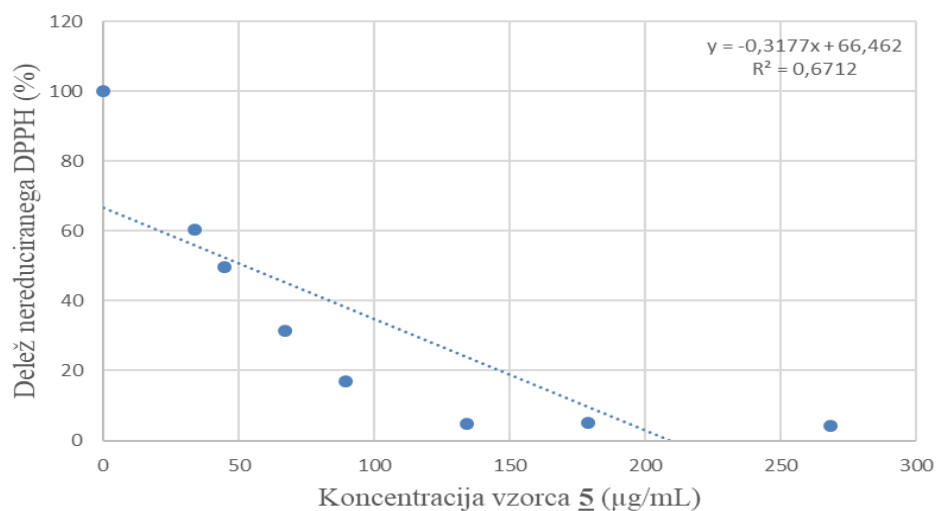
28. Guo M, Perez C, Wei Y, Rapoza E, Su G, Bou-Abdallah F, Chasteen N D: Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry's bio-effects. Dalton Transactions 2007; 4951–4961.
29. European Pharmacopoeia 8.0: Olive leaf dry extract. 04/2009: 2313; 1337.
30. <https://support.office.com/sl-si/article/STEYX-funkcija-STEYX-6ce74b2c-449d-4a6e-b9ac-f9cef5ba48ab>, dostopano: julij 2017.
31. Xie J, Schaich K M: Re-evaluation of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity. J. Agric. Food Chem. 2014; 64(19): 4251–4260.
32. Foti M C, Daquino C, DiLabio G A, Ingold K U: Kinetics of the oxidation of quercetin by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (dpph). Organic letters 2011; 13(18): 4826–4829.
33. Chat O A, Najar M H, Dar A A: Evaluation of reduction kinetics of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical by flavonoid glycoside Rutin in mixed solvent based micellar media. Colloids and Surfaces A Physicochem Eng Asp 2013; 436: 343–353.
34. Liss P, Hansell P, Bruley D F, Harrison D K: Oxygen transport to tissue XXX, Springer Science & Business Media, New York, 2009: 113.
35. Seljak L: Sinteza in vrednotenje antioksidativnih lastnosti derivatov 5-benzilidenbarbiturne in 5-benzilidentioibarbiturne kisline (diplomska naloga), Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2015.
36. Assessment report on *Olea europaea* L., folium. European Medicines Agency 2017; 1–45.
37. Obied H K, Prenzler P D, Konczak I, Rehman A, Robards K: Chemistry and bioactivity of olive biophenols in some antioxidant and antiproliferative *in vitro* bioassays. Chem Res Toxicol 2009; 22: 227–234.
38. Piskule P: Vrednotenje antioksidativnih lastnosti pri izbranih 5-benzilidenrodaninih s kinetiko redukcije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila (diplomska naloga), Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2016.
39. Bravo A, Anaconda J R: Metal complexes of the flavonoid quercetin: antibacterial properties. Transition Metal Chemistry 2001; 26:20–23.

## PRILOGE

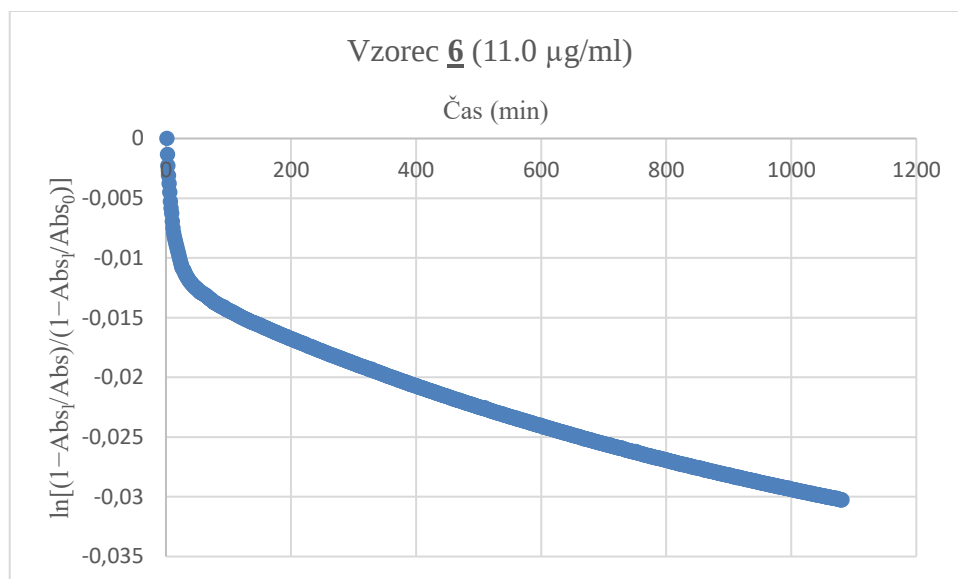
**Priloga I:** Primer vzorca, ki je pri visokih koncentracijah hitro reduciral DPPH.



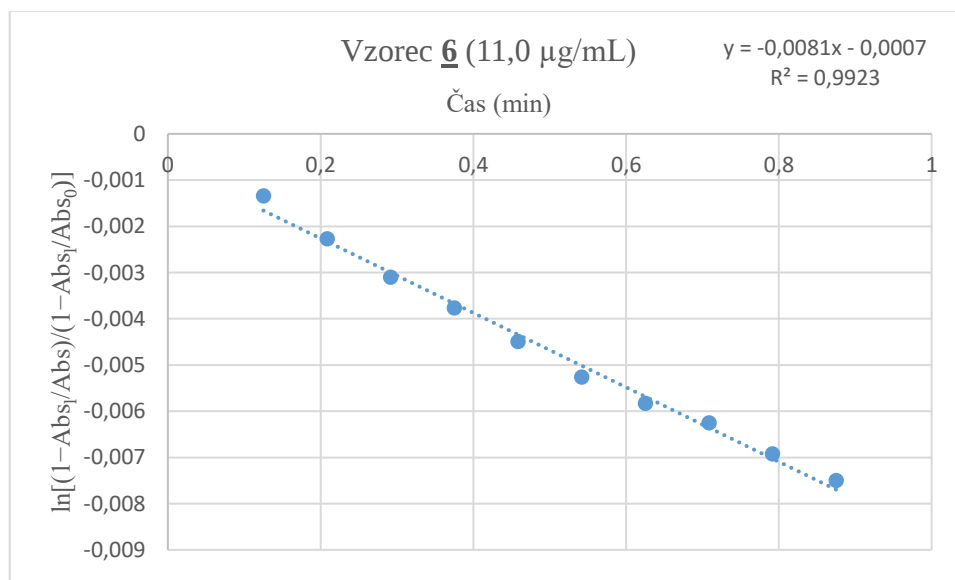
**Priloga II:** Delež nereduciranega DPPH v odvisnosti od koncentracije vzorca 5.



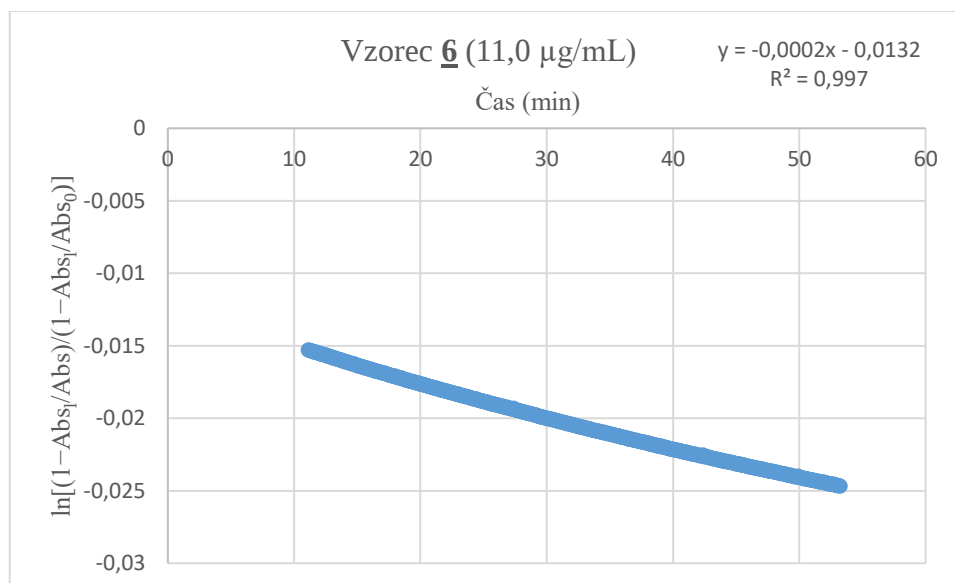
**Priloga III:** Prikaz vrednosti  $\ln[(1 - \text{Abs}_t / \text{Abs}) / (1 - \text{Abs}_t / \text{Abs}_0)]$  v odvisnosti od časa v vseh 90 minutah reakcije redukcije DPPH z vzorcem **6** pri koncentraciji 11,0 µg/ml.



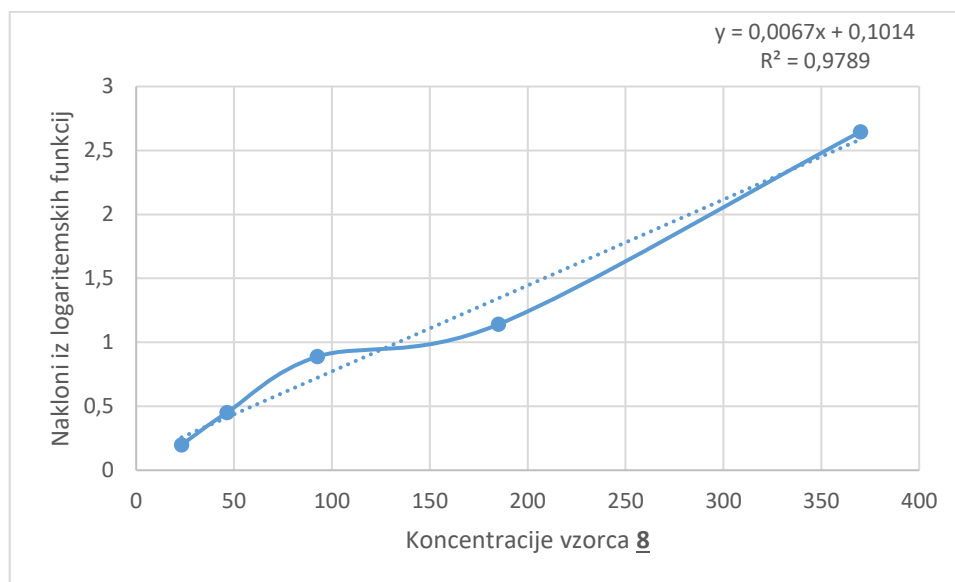
**Priloga IV:** Prikaz vrednosti  $\ln[(1 - \text{Abs}_t / \text{Abs}) / (1 - \text{Abs}_t / \text{Abs}_0)]$  v odvisnosti od časa za hitro reakcijsko kinetiko vzorca **6** pri koncentraciji 11,0 µg/ml.



**Priloga V:** Prikaz vrednosti  $\ln[(1-Abs_t/Abs)/(1-Abs_t/Abs_0)]$  v odvisnosti od časa za počasno reakcijsko kinetiko vzorca 6 pri koncentraciji 11,0 µg/ml.



**Priloga VI:** Graf naklonov iz logaritemskih funkcij za hitro kinetiko v odvisnosti od koncentracij raztopin vzorca 8.



**Priloga VII:** Graf naklonov iz logaritemskih funkcij za počasno kinetiko v odvisnosti od koncentracij raztopin vzorca 8.

