

UNIVERZA V LJUBLJANI
FALULTETA ZA FARMACIJO
Univerzitetni program farmacije

DARJA KRAKAR

**OPTIMIZACIJA METOD ZA UGOTAVLJANJE
ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI IZVLEČKA LUBJA NAVADNE
JELKE (*ABIES ALBA* MILL.)**

**OPTIMIZATION OF METHODS FOR DETERMINATION OF
ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SILVER FIR BARK EXTRACT
(*ABIES ALBA* MILL.)**

DIPLOMSKO DELO

Ljubljana, januar 2011

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko biologijo.

ZAHVALA

Za strokovno pomoč in nasvete pri izdelavi dipomske naloge se iskreno zahvaljujem mentorju prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm. in somentorici asist. dr. Nini Kočever Glavač, mag. farm.

Zahvaljujem se tudi vsem zaposlenim na Katedri za farmacevtsko biologijo.

Hvala moji družini, ker ste mi stali ob strani ter me podpirali.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Nine Kočever Glavač, mag. farm.

Darja Krakar

Predsednik komisije:izr. prof. dr. Janja Marc, mag.farm., spec. med. biokem.

Član komisije:izr. prof. dr. Aleš Obreza, mag.farm.

Ljubljana, januar 2011

VSEBINA

1	UVOD.....	1
1.1	Radikali.....	1
1.2	Oksidativni stres.....	4
1.3	Antioksidanti.....	6
1.4	Polifenolne spojine kot antioksidanti.....	11
1.4.1	Flavonoidi.....	11
1.4.2	Čreslovine.....	12
1.5	Navadna jelka.....	14
1.6	Piknogenol.....	16
2	NAMEN DELA.....	17
3	MATERIALI IN METODE.....	18
3.1	RASTLINSKI MATERIAL.....	18
3.2	KEMIKALIJE.....	18
3.3	APARATURE IN OPREMA.....	19
3.4	METODE.....	20
3.4.1	Metoda za določanje reducirajoče moči antioksidanta.....	20
3.4.2	Metoda za določanje antioksidativne aktivnosti z β -karotenom.....	20
3.4.3	Metoda za določanje antioksidativne aktivnosti s tioacianatom.....	21
3.4.4	Metoda za določanje antioksidativne aktivnosti z 2-deoksi- <i>D</i> -ribozo.....	21
3.4.5	DPPH metoda za določanje antioksidativne aktivnosti.....	22
3.4.6	ABTS metoda za določanje antioksidativne aktivnosti.....	23
3.4.7	Metoda za določanje antioksidativne aktivnosti z NADH.....	23
4	EKSPERIMENTALNO DELO.....	24
4.1	Metoda za določanje reducirajoče moči antioksidanta.....	24
4.2	Metoda za določanje antioksidativne aktivnosti z β -karotenom.....	26
4.3	Metoda za določanje antioksidativne aktivnosti s tioacianatom.....	28
4.4	Metoda za določanje antioksidativne aktivnosti z 2-deoksi- <i>D</i> -ribozo.....	29
4.5	DPPH metoda za določanje antioksidativne aktivnosti.....	31
4.6	ABTS metoda za določanje antioksidativne aktivnosti.....	33
4.7	Metoda za določanje antioksidativne aktivnosti z NADH.....	35
5	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	37
5.1	Metoda za določanje reducirajoče moči antioksidanta.....	37
5.2	Metoda za določanje antioksidativne aktivnosti z β -karotenom.....	39
5.3	Metoda za določanje antioksidativne aktivnosti s tioacianatom.....	41
5.4	Metoda za določanje antioksidativne aktivnosti z 2-deoksi- <i>D</i> -ribozo.....	43
5.5	DPPH metoda za določanje antioksidativne aktivnosti.....	46
5.6	ABTS metoda za določanje antioksidativne aktivnosti.....	48
5.7	Metoda za določanje antioksidativne aktivnosti z NADH.....	50
6	SKLEPI.....	52
7	LITERATURA.....	53

POVZETEK

Kisik se je v zemeljski atmosferi pojavil pred približno dvema milijardama let. Tekom evolucije so ga organizmi začeli uporabljati in izkoriščati v svojih biokemičnih procesih. Pojav kisika pa hkrati pomeni tudi nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti in poškodb, ki nastanejo zaradi njihovega delovanja. Organizmi so se zato prilagodili in razvili številne obrambne mehanizme, s pomočjo katerih nadzirajo nastajanje in odstranjevanje radikalov. Uspešno obrambo pred radikali predstavljajo antioksidanti, ki so lahko v telesu že prisotni ali pa jih je potrebno vnašati v telo s hrano. Najbolj poznani naravni antioksidanti so vitamin C, vitamin E in β -karoten. Manj znani, a kljub temu zelo učinkoviti antioksidanti, pa so polifenolne spojine. Na tržišču obstaja prehransko dopolnilo iz izvlečka obmorskega bora, Pycnogenol[®], ki vsebuje flavonoide, oligomerne proantocianidine in fenolne kisline. Namen diplomske naloge je bil razviti skupino metod za ugotavljanje antioksidativne aktivnosti izvlečka lubja navadne jelke. V okviru tega smo izvedli primerjavo antioksidativne aktivnosti izvlečka lubja navadne jelke z aktivnostjo piknogenola ter z antioksidanti, ki jih v največji meri vnašamo v organizem s hrano ali fitofarmaceutskimi pripravki (vitaminom C, α -tokoferolom in butilhidroksianizolom). S primerjavo smo želeli ugotoviti, ali izvleček lubja navadne jelke izkazuje antioksidativno aktivnost, ki je primerljiva aktivnosti piknogenola, in predstavlja alternativni vir polifenolnih antioksidantov iz obmorskega bora. Antioksidativno aktivnost smo določili z metodami, ki temeljijo na lovljenju radikalov (DPPH-, ABTS-metoda, metoda za določanje antioksidativne aktivnosti z 2-deoksi-*D*-ribozo, metoda za določanje antioksidativne aktivnosti z NADH), redukcijski reakciji (metoda za določanje reducirajoče moči antioksidanta) ter na principu oksidacije v hidro- in lipofilnih raztopinah (metoda za določanje antioksidativne aktivnosti z β -karotenom, metoda za določanje antioksidativne aktivnosti s tioacianatom). Antioksidativno aktivnost smo pri vseh metodah določali spektrofotometrično.

Pri metodi za določanje reducirajoče moči antioksidanta ter pri metodi s tioacianatom ne pride do bistvenih razlik v antioksidativni aktivnosti med piknogenolom, izvlečkom lubja navadne jelke, BHA in vitaminom C. Pri metodi z 2-deoksi-*D*-ribozo ima izvleček lubja jelke pri nižjih koncentracijah 0,87-kratno antioksidativno aktivnost glede na piknogenol, pri 4-kratnem povišanju koncentracije pa je antioksidativna aktivnost le 0,61-kratna glede na piknogenol. Izvleček lubja jelke ima pri metodi z β -karotenom pri nizkih koncentracijah 1,26-kratno antioksidativno aktivnost glede na piknogenol, pri povišanju koncentracije pa

je antioksidativna aktivnost le 0,8-kratna glede na piknogenol. Pri metodi ABTS in metodi z NADH ima izvleček lubja navadne jelke pri nižjih koncentracijah višjo antioksidativno aktivnost kot pri višjih. Antioksidativna aktivnost izvlečka lubja jelke je pri metodi ABTS 1,89-krat višja, pri metodi z NADH pa 1,66-krat višja glede na antioksidativno aktivnost piknogenola. Pri metodi DPPH pa izkazuje izvleček lubja jelke večjo antioksidativno aktivnost tako pri visokih kot pri nizkih koncentracijah. Na podlagi rezultatov diplomskega dela smo prišli do zaključka, da je za rutinsko določanje antioksidativne aktivnosti izvlečka lubja navadne jelke najprimernejša DPPH-metoda in da je navadna jelka lahko alternativni vir obmorskemu boru za pridobivanje proantocianidinov.

ABSTRACT

Oxygen appeared in earth atmosphere approximately two billion years ago. During the evolution the organisms started to use and utilize it in their biochemical processes. The appearance of oxygen simultaneously means the creation of reactive oxygen species and injuries that are a consequence of its activity. This is the reason why the organisms had adjusted and developed numerous defence mechanisms, which are helping to control the occurring and removing free radicals. A successful defense from free radicals represent antioxidants, that can be already present in the body or can be brought in with food. The most known natural antioxidants are vitamin C, vitamin E in β -caroten. The less known, but still very effective antioxidants are polyphenols. On the market we can also find a nutritional supplement from French maritime pine bark called Pycnogenol[®], which contains flavonoids, proanthocyanidins and phenolic acids.

The purpose of my diploma was to develop a group of methods for determination of antioxidant activity of silver fir bark extract. Within this framework we did a comparison of the antioxidant activity of the silver fir bark extract with the activity of pycnogenol and also with the antioxidants that are mostly brought in our organism with food or with fitofarmaceutical products (vitamin C, α -tocopherol and BHA). With this comparison we wanted to determine whether does the extract from silver fir bark displays an antioxidant activity that can be compared with the activity of pycnogenol and if it represent an alternative source of polyphenolic antioxidants of the French maritime pine. We were measuring the antioxidant activity with methods that are based on radical scavenging effect (DPPH-, ABTS-method, method for the determination of antioxidant activity with 2-deoksi-D-ribose, method for the determination of antioxidant activity with NADH), on determination of the reducing power (reducing power assay) and on principle of oxidation in hydro and lipophilic solutions (methods for the determination of antioxidant activity with β -karotenom, methods for the determination of antioxidant activity with thiocyanate). By all methods we have determined the antioxidant activity spectrophotometrically.

By using the method for determine the reducing power of antioxidants and the method with thiocyanat we got no relevant differences in antioxidant activity between pycnogenol, silver fir bark extract, BHA and vitamin C. By the method with 2-deoksi-D-ribose has the extract from silver fir bark at lower concentrations 0,87-times antioxidant activity considering on the pycnogenol. With 4-times the increase in concentration is the antioxidant activity only 0,61-times considering on the pycnogenol. The extract of silver fir bark has by the method

with β -carotene at lower concentrations 1,26-times antioxidant activity considering on the pycnogenol, with increasing the concentration is the antioxidant activity only 0,8-times considering on the pycnogenol. By the ABTS and the NADH method has the extract of silver fir bark at lower concentrations higher antioxidant activity than at higher concentrations. The antioxidant activity of the extract of silver fir bark by the ABTS method is 1,89-times higher and by the NADH method is 1,66-times higher considering on the antioxidant activity of pycnogenol. By the DPPH method the extract of silver fir bark shows greater antioxidant activity at high and low concentrations. Based on results of my diploma we have come to conclusion that the best method for routine determining of the antioxidant activity of silver fir bark extract is the DPPH-method and that a silver fir can be an alternative source for the French maritime pine for production of proantocianidinis.

SEZNAM OKRAJŠAV

A – absorbanca

AA – antioksidativna aktivnost

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

ABTS^{•+} – 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)

BHA – butilhidroksianizol

DPPH – 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin

EDTA – etilendiaminotetraocetna kislina

LP – lipidna peroksidacija

NADH – nikotinamid adenin dinukleotid

NBT – nitromodro-tetrazolijev klorid

PMS – fenazin metosulfat

RONs - reaktivne kisikove in dušikove zvrsti

ROS – reaktivne kisikove zvrsti

RSD – relativna standardna deviacija

t – čas

TBA – 2-tiobarbiturna kislina

TCA – triklorocetna kislina

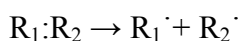
1 UVOD

1.1 RADIKALI

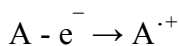
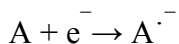
Radikali so atomi, ioni, spojine ali kompleksi, ki imajo vsaj na enem od energijskih nivojev en nesparjen elektron, ki je v večini primerov tudi vzrok za njihovo kemično reaktivnost. Izrazito kratkoživi radikali imajo razpolovni čas v območju mikro- do milisekund, medtem ko je za nitroksidne radikale znano, da se obnašajo kot stabilne spojine z daljšim razpolovnim časom.

Radikali lahko nastanejo:

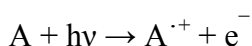
1) s homolizno cepitvijo kovalentne vezi zaradi termičnih vplivov ali elektromagnetnega sevanja (nastane nevtralni radikal)



2) v reakcijah enoelektronske redukcije (nastane radikal anion) ali enoelektronske oksidacije (nastane radikal kation)



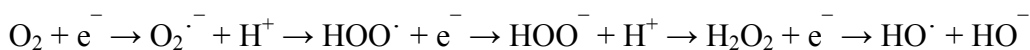
3) z ionizirajočim sevanjem – žarki γ in x , žarki β z veliko energijo (nastane radikal kation)



(h = Planckova konstanta, ν = frekvenca elektromagnetnega sevanja)

V telesu radikali nastajajo predvsem v enoelektronskih reakcijah oksidacij in redukcij.

Kisik je molekula, ki se v encimsko kontroliranih štirih enoelektronskih redukcijah reducira do vode. V primeru, da kisik vseh štirih elektronov ne sprejme, pride do tvorbe kisikovih radikalov. Le-ti pa so vzrok ali posledica številnih bolezni (1).

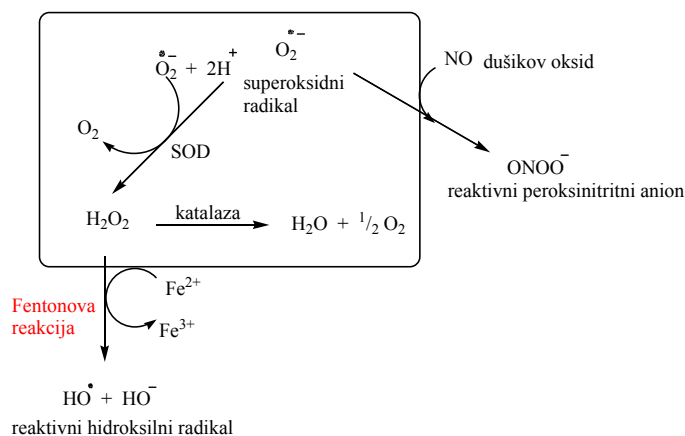


Reaktivne kisikove zvrsti (ROS) so snovi, ki v organizmu nenehno nastajajo in pod določenimi pogoji lahko vodijo do tvorbe radikalov.

Preglednica I: Pregled nekaterih kisikovih radikalov in ROS (1)

Kisikovi radikali		ROS	
O ₂	kisik (v tripletnem stanju)	¹ O ₂	singletni kisik
O ₂ ^{•-}	superoksidni anionski radikal	O ₃	ozon
HO [•]	hidroksilni radikal	H ₂ O ₂	vodikov peroksid
HOO [•]	hidroperoksidni radikal	HOCl	hipoklorna kislina
ROO [•]	peroksidni radikal	ROOH	hidroperoksid
RO [•]	alkoksidni radikal	ROOR	peroksid
ArO [•]	ariloksidni radikal		
UQ [•]	semikinonski radikal		
¹ O ₂ [•]	vzbujena oblika singletnega kisika		

Superoksidni anionski radikal (O₂^{•-}, superoksid) nastane pri enoelektronski redukciji molekule kisika. Ta reakcija poteka v mitohondrijih, endoplazemskem retikulumu, celičnih membranah aktiviranih fagocitov, peroksisomih, plazemskih membranah kot tudi pri avtooksidaciji hemoglobina, mioglobina, hidrokinonov, kateholaminov in tiolov. Možni so še številni drugi načini. Z večino sestavin celice reagira relativno počasi, kajti prisotnost naboja omejuje njegovo gibljivost skozi biološke membrane. Superoksidni radikal se v seriji dveh zaporednih reakcij pretvori do vode in kisika. V prvi stopnji pride pod vplivom encima superoksid-dismutaze (SOD) do tvorbe kisika in vodikovega peroksida. V drugi stopnji pa pride do pretvorbe vodikovega peroksida v molekulo vode in kisika, kar poteka pod vplivom encima katalaze. Pri prekomernem nastajanju ROS pa se omenjena obramba zasiti, zato začnejo nastajati drugi reaktivni radikali in intermedijati (npr. hidroksilni radikali in peroksinitritni anion), ki delujejo toksično na celico (1, 2).



Slika 1: Razstrupljanje superoksidnega radikala in nastanek reaktivnih kisikovih in dušikovih zvrsti (RONS)(2)

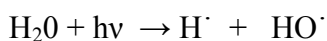
Vodikov peroksid (H_2O_2) nastane iz superoksida v reakciji dismutacije. Viri H_2O_2 pa so tudi razne oksidaze. Vodikov peroksid ni radikal. Je nevtralna spojina, ki je po velikosti podobna vodni molekuli. Omenjeni lastnosti mu omogočata vodi podobno gibljivost po tkivih. Na vodikov peroksid so občutljivi encimi, ki imajo v aktivnem mestu proste sulfhidrilne skupine (npr. gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza), medtem ko naj ne bi imel vpliva na oksidativne spremembe DNA, lipidov in proteinov. Kljub omenjeni neaktivnosti pa lahko vodikov peroksid ob stiku s kovinskimi ioni prehodnih elementov razpade na izredno aktivni hidroksilni radikal (to je le ena izmed možnih poti razgradnje H_2O_2).

Hidroksilni radikal (HO^{\bullet}) uvrščamo med zelo reaktivne radikale, saj reagira skoraj z vsemi vrstami celičnih sestavin (lipidi, fosfolipidi, polisaharidi, proteini, nukleinskimi kislinami). V telesu nastaja na tri načine:

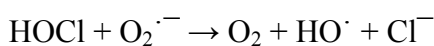
a) v **Fentonovi reakciji** iz H_2O_2 , ki jo katalizirajo kovinski ioni, predvsem železovi (Fe^{2+}) in bakrovi (Cu^+) ioni



b) s **homolitsko cepitvijo kovalentne vezi** vode zaradi ionizirajočega sevanja



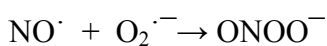
c) v **reakciji superoksida s hipoklorno kislino**, ki jo tvorijo mieloperoksidaze fagocitov



Med **reaktivne dušikove zvrsti** (RNS) sodijo tudi zelo reaktivni radikali. V to skupino uvrščamo dušikov oksid (NO^\cdot) in peroksinitrit (ONOO^-).

Dušikov oksid nastaja v organizmu pri oksidaciji aminokislina *L*-arginina. Reakcijo katalizira encim NO-sintaza. Glede na mikrookolje je lahko NO^\cdot pretvorjen v različne druge reaktivne dušikove zvrsti, kot so nitrozilov kation (NO^+), nitroksidni anion (NO^-) ali peroksinitrit (ONOO^-). Najpomembnejši funkciji NO sta nadzor tonusa krvnih žil ter nadzor adhezije trombocitov.

Peroksinitrit nastaja v reakciji med superoksidnim radikalom in dušikovim oksidom.



Omenjena reakcija poteče izredno hitro. Nastali peroksinitritni anion je eden najmočnejših oksidantov v celici in je po zadnjih odkritjih ravno začetnik oksidativnega stresa, ki vodi v poškodbo DNA in celičnih membran.

Peroksinitrit pa izkazuje tudi protimikrobni učinek in je pomembno sredstvo makrofagov za uničenje mikrobov. Povzroči lipidno peroksidacijo, oksidacijo in nitracijo različnih beljakovin ter inaktivacijo encimov, kar vodi do nekroze celice (4, 5).

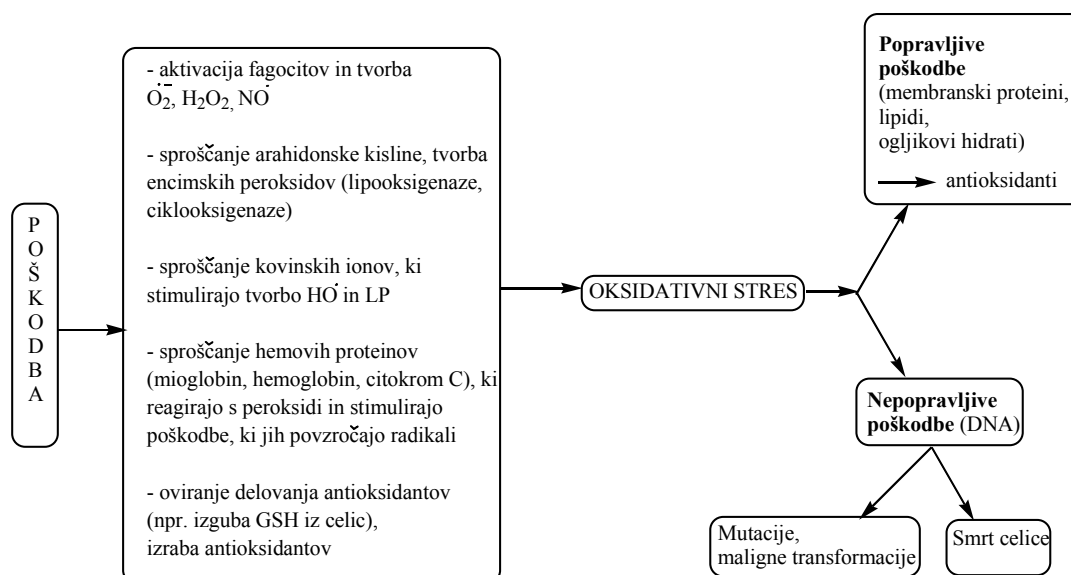
1.2 OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres je posledica porušanja ravnotežja med prooksidativnimi in antioksidativnimi procesi v celici. Radikali in reaktivni intermediati, ki pri tem nastajajo, imajo pomembno vlogo pri sproženju začetka bolezenskega procesa. Za porušenje ravnotežja pa je lahko odgovornih več razlogov:

- Okvara ali zmanjšana prisotnost encimov, ki so odgovorni za odstranjevanje radikalov (SOD, katalaze, glutathion-peroksidaze)
- Zaradi zmanjšanega/motenega vnosa antioksidantov s hrano
- Zaradi povečane produkcije ROS in RNS (psihični stres, ekstremne fizične obremenitve, radioaktivno sevanje, toksini, kronični vnetni procesi)

Ko se oksidativni stres izraža v manjšem obsegu, so se celice sposobne same ubraniti posledic učinkov radikalov, in sicer s pomočjo razpoložljivih antioksidantov. Pri

oksidativnem stresu večjega obsega pa pride do motenj v presnovi celice, do poškodb DNA, do lipidne peroksidacije in poškodb membranskih transportnih sistemov (Slika 2).

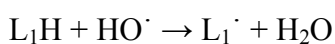


Slika 2: Poškodba tkiva in oksidativni stres (1)

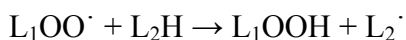
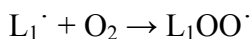
Lipidna peroksidacija (LP) je serija radikalskih in oksidativnih sprememb polinenasičenih maščobnih kislin, ki na koncu privedejo do razpada membranske strukture in spremembe njene funkcije. Za iniciacijo LP sta dovolj reaktivna le hidroksilni radikal in singletni kisik. Pri širitvi procesa LP imajo pomembno vlogo tudi lipidni in drugi sekundarno nastali radikali kot tudi Fe^{2+} in Cu^+ ioni (sproščanje iz skladišč ob poškodbah, vnetjih). Končni produkti LP so različni aldehidi, ketoni, epoksidi, nižje maščobne kisline in različni krajši ogljikovodiki. Posledica razgradnje verig maščobnih kislin, ki sestavljajo membranske fosfolipide, je zmanjšanje membranske viskoznosti in povečanje prepustnosti za snovi, ki skozi membrano v normalnih pogojih ne prehajajo. LP prizadene tudi proteine in njihovo funkcijo (sprememba strukture, modifikacija posameznih aminokislin in prečnega povezovanja). Proces LP se ustavi, ko je eden od substratov porabljen ali pa ko antioksidanti nevtralizirajo vse nastale radikale.

Proces lipidne peroksidacije poteka v treh fazah:

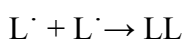
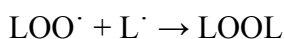
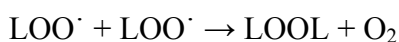
a) **iniciacija** – nastanek lipidnih radikalov



b) **verižna reakcija** – lipidni radikali niso stabilni in po reakciji s kisikom se tvorijo lipidni hidroperoksidi



c) **prekinitev** – pri reakciji dveh radikalov nastane stabilna spojina



Poškodbe DNA (mutacije) so tudi povezane z radikali in mnogi raziskovalci jih povezujejo z zgodnjimi stadiji razvoja rakavih obolenj. Poškodbe DNA nastanejo, ko radikali odtegnejo H^+ iz deoksiriboze ali iz ene izmed nukleinskih baz. Posledica je fragmentacija DNA in odcepitev/sprememba nukleinske baze. DNA sicer ima encimske sisteme, ki so zmožni popraviti/odpraviti radikalske poškodbe, vendar je njihova aktivnost obratnosorazmerna s starostjo in stopnjo oksidativnega stresa.

Z radikali je povezanih veliko bolezni in pri večini so radikali posledica LP. Pogosto pa ni povsem jasno, ali je lipidna peroksidacija vzrok poškodbe tkiv ali le posledica. Znano pa je, da ima LP glavno vlogo pri revmatoidnem artritisu, aterosklerozi, pri degeneraciji srca, možganov ter hrbtenjače po ishemični poškodbi. Učinkovito zaščito pred škodljivimi vplivi radikalov na organizem pa predstavljajo antioksidanti (1,2,5,6).

1.3 ANTIOKSIDANTI

Antioksidant je vsaka snov, ki je sposobna že v nizki koncentraciji opazno zadržati ali zavreti oksidacijo drugih snovi v celici. Molekula antioksidanta donira enega svojih elektronov radikalu, ob tem pa sama postane stabilen, nereaktiven radikal. Antioksidantov ne moremo uživati na zalogo, kajti prevelike količine lahko vodijo v ravno nasprotno učinke in lahko celo povzročijo oksidativni stres. Delujejo lahko na različne načine:

- Zmanjšujejo lokalne koncentracije kisika
- Lovijo radikale in preprečijo sproženje LP

- Vežejo kovinske ione
- Razgrajujejo perokside
- Prekinjajo verižne reakcije

Pri procesu lipidne oksidacije lahko posamezen antioksidant deluje hkrati na več načinov, in sicer poleg keliranja kovinskih ionov in lovljenja radikalov lahko tudi razgrajuje prisotne perokside. Pogosto je pri delovanju antioksidanta vključen več kot le en sam mehanizem delovanja - pravimo, da pride do sinergističnega delovanja. Pogosta razdelitev antioksidantov je tudi na *primarne* (preprečijo prekinitev verige pri lipidni peroksidaciji) in *sekundarne* antioksidante (zmanjšajo stopnjo verižne reakcije). Vendar imajo določeni antioksidanti tako primarno kot sekundarno aktivnost. In ravno zaradi sinergizma in vključevanja več mehanizmov delovanja hkrati je potrebno in nujno določevati antioksidativno aktivnost z različnimi testi (7).

Glede na mehanizem delovanja ločimo antioksidante na več skupin:

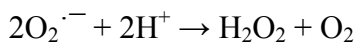
a) **Preventivni antioksidanti** vežejo nase ione kovin prehoda (predvsem Fe^{2+} in Cu^{+}) in posledično preprečijo njihovo interakcijo z vodikovim peroksidom in superoksidnim radikalom, ki vodi do nastanka nevarnih hidroksilnih radikalov. V to skupino uvrščamo predvsem proteine, kot so transferin (veže železov ion), ceruloplazmin (veže baker) in albumin.

b) **Encimski antioksidanti** se nahajajo v celicah in katalizirajo pretvorbo radikalov in RONS v manj reaktivne produkte. V to skupino uvrščamo superoksid-dismutazo, glutation-peroksidazo in katalazo.

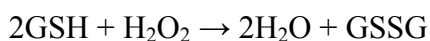
Superoksid-dismutazo (SOD) uvrščamo v družino metaloproteinov. Razlikujemo 3 tipe SOD encimov:

- Cu/Zn – SOD
- Mn – SOD
- Fe – SOD (le v prokariontskih celicah)

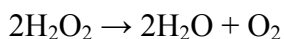
Kinetično je SOD znan kot eden izmed najhitrejših encimov v naravi. SOD katalizira reakcijo, v kateri iz molekule superoksida nastane molekula H_2O_2 in kisika. Na ta način prepreči tvorbo hidroksilnega radikala.



Glutation-peroksidaza je encim, ki katalizira reakcijo glutationa (GSH) in vodikovega peroksida, pri čemer kot produkta nastaneta voda in glutation disulfid (GSSG).

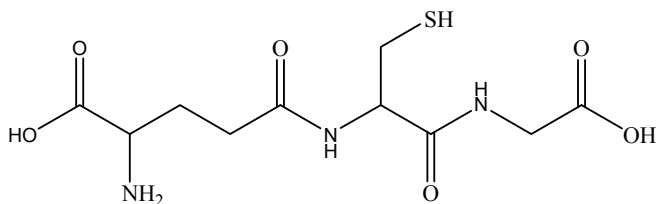


Katalaza sodeluje pri pretvorbi toksičnega vodikovega peroksida v vodo in kisik.



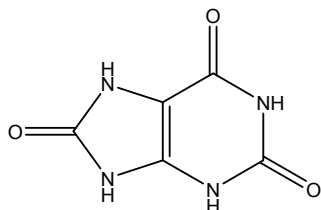
c) "**Pravi**" *antioksidanti* (tudi žrtveni ali daritveni) so donorji elektronov, ki reagirajo z radikali, preden le-ti reagirajo z drugimi molekulami. Tak antioksidant se oksidira v relativno stabilen in nereaktiven radikal, ki se ali regenerira ali pa izloči iz organizma. V to skupino uvrščamo tako endogene antioksidante (glutation, sečno kislino, ubikinon) kot tudi eksogene antioksidante (vitamin C, vitamin E, β -karoten, fenolne spojine, polifenole, organske kisline) (1, 2, 5, 8).

Glutation (GSH; **Slika 3**) je vodotopni tripeptid s prosto sulfhidrilno (-SH) skupino. Obstaja v reducirani (GSH) in oksidirani (GSSG) obliki. Je učinkovit lovilec hidroksilnih radikalov, reagira s singletnim kisikom in je tudi substrat za glutacion-peroksidazo in dehidroaskorbat-reduktazo. Je tudi kofaktor številnih encimov (glioksilaze, prostaglandin endoperoksid izomeraze idr.) in ima pomembno vlogo pri razgradnji inzulina, pesticidov in drugih ksenobiotikov (1).



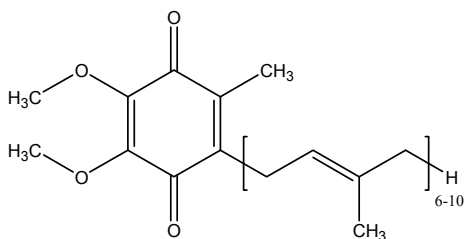
Slika 3: Glutation (9)

Sečna kislina (Slika 4) je končni produkt presnove purina. Njena glavna vloga je zaščita membran eritrocitov pred LP. Je dober lovilec singletnega kisika, peroksilnih radikalov in hipoklorne kisline(1).



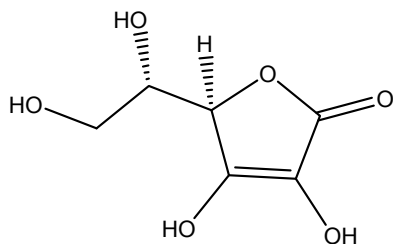
Slika 4: Sečna kislina (9)

Ubikinon oziroma koencim Q (**Slika 5**) je učinkovit pri nevtralizaciji različnih radikalov, in sicer regenerira α -tokoferilni radikal v α -tokoferol, reagira z lipidnimi in peroksilnimi radikali in je lovilce superoksidnega radikala. Sposobnost nevtralizacije radikalov ima zaradi reakcije, ki poteče v dveh stopnjah: najprej sprejme elektron in preide v dihidrokinonsko obliko (ubikinol), ki se nato z oksidacijo vrne v prvotno obliko (1).

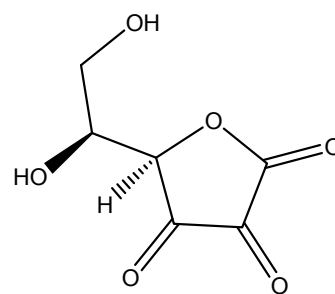


Slika 5: Ubikinon (9)

Vitamin C je vodotopen vitamin, ki se v organizmu nahaja v ravnotežju dveh oblik, in sicer reducirani (*L*-askorbinska kislina, **Slika 6**) in oksidirani obliki (*L*-dehidroaskorbinska kislina, **Slika 7**). Reakcijo oksidacije katalizira encim *L*-askorbat-oksidaaza. Pomanjkanje askorbinske kisline lahko povzroči anemijo, zmanjšano absorpcijo železa iz črevesja ter skorbut. Vitamin C lahko deluje tudi prooksidativno. Do omenjenega delovanja pride, ko je koncentracija vitamina C majhna v primerjavi s koncentracijo kovinskega iona (Fe^{3+}). Glavni viri vitamina C so sadje in zelenjava (1).

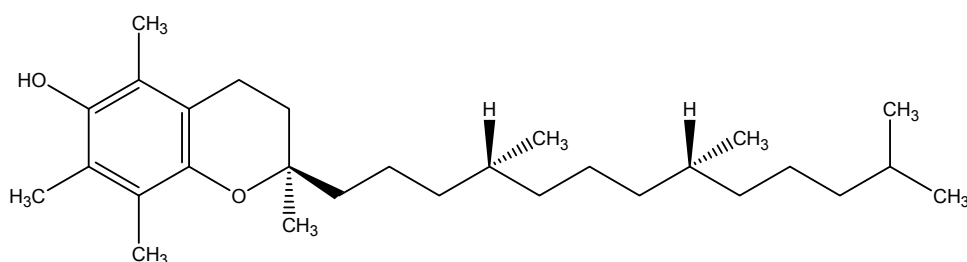


Slika 6: Askorbinska kislina (9)



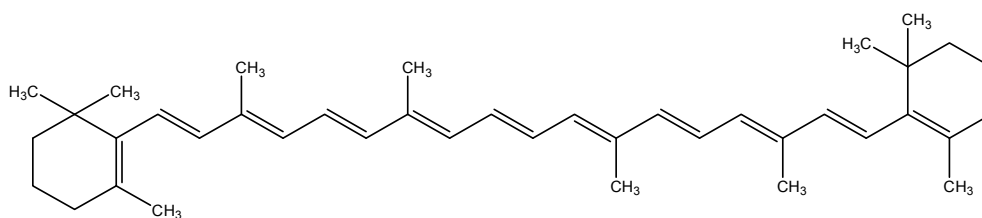
Slika 7: Dehidroaskorbinska kislina (9)

Vitamin E (Slika 8) je splošni skupni izraz za vse biološko aktivne tokoferole, tokotrienole in njihove derivate. Biološko najpomembnejšo vlogo in največjo aktivnost pa ima α -tokoferol, ki značilno inhibira LP. Vitamin E je fenolni antioksidant. Reagira s singletnim kisikom, s superoksidom, s hidroksilnim radikalom ter reducira bakrove ione pri oksidaciji lipidov. Najpomembnejšo vlogo pa ima pri izredno hitri reakciji s sekundarnimi peroksilnimi in alkoksilnimi radikali. Pomanjkanje vitamina E je zelo redko. V določenih primerih ter ob odsotnosti regeneracijskega sistema pa lahko deluje tudi prooksidativno. Viri vitamina E so predvsem rastlinska olja (1, 10).



Slika 8: Vitamin E (9)

β -karoten (Slika 9) uvrščamo med karotenoide. Le-ti so skupina naravnih lipofilnih snovi rastlinskega izvora. Karotenoidi so dobri lovci radikalov pri nizkih parcialnih tlakih kisika (t. j. v zdravem tkivu), medtem ko pri visokih parcialnih pritiskih izkazujejo prooksidativno delovanje. β -karoten je prekurzor vitamina A, ki nastane pod vplivom encima dioksidaze. Je najpomembnejši karotenoid in zelo dober lovilc singletnega kisika ter halogeniranih peroksilnih radikalov. Glavni viri β -karotena so sveže sadje in zelenjava (1, 10).



Slika 9: β karoten (9)

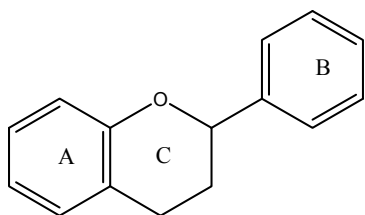
1.4 POLIFENOLNE SPOJINE KOT ANTIOKSIDANTI

Polifenoli sestavljajo heterogeno skupino spojin, katerih molekule vsebujejo dve ali več fenolnih skupin. Njihova sinteza poteka po šikimatni in fenilpropidni poti. Po šikimatni poti tekom reakcije iz ogljikovih hidratov nastanejo šikimska kislina, aminokislina fenilalanin ter cimetna kislina. Od tu dalje pa poteka fenilpropidna pot, ki vodi do nastanka polifenolnih spojin. Med polifenolne spojine uvrščamo fenolne kisline, kumarine, stilbene, tanine (t. j. čreslovine), flavonoide, lignane in kinone. Izmed omenjenih spojin pa pomembnejše antioksidativno delovanje izkazujejo predvsem fenolne kisline, flavonoidi in čreslovine.

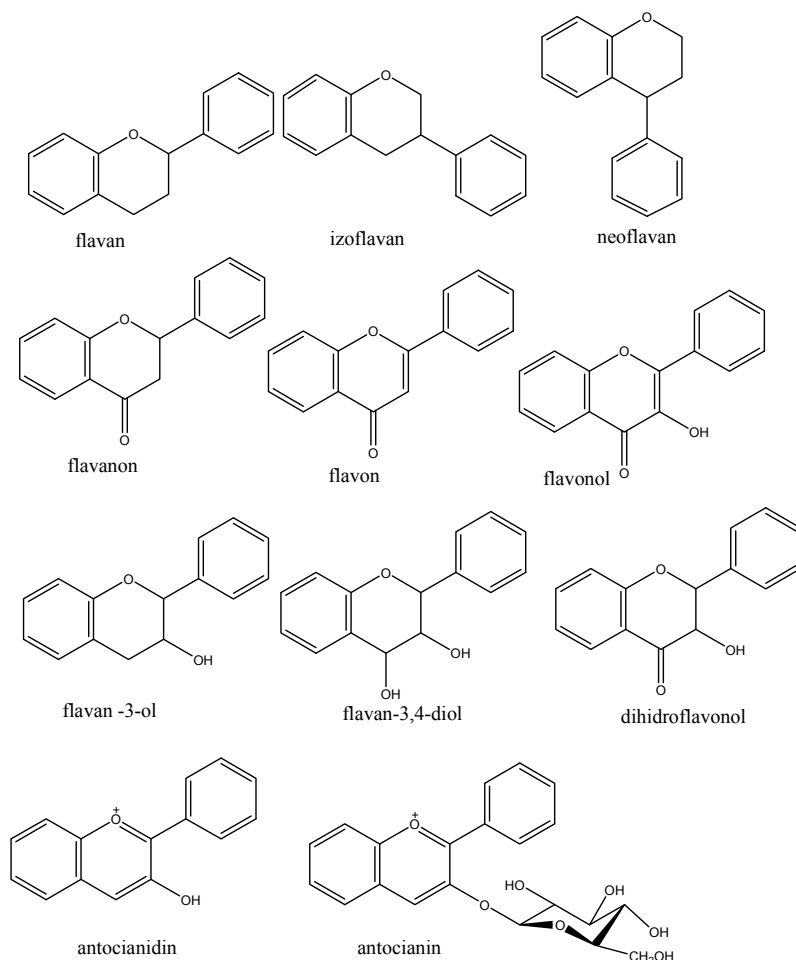
1.4.1 Flavonoidi

Flavonoidi so polifenolne spojine s strukturo 2-fenilbenzopirana ali flavana (**Slika 10**). Kot rastlinski pigmenti dajejo barvo cvetovom, plodovom in listom. Flavonoidi so v rastlinah pogosto v obliki glikozidov. Najpogostejši so *O*-glikozidi, možna pa je tudi *C*-glikozidna vez. Glavne skupine flavonoidov se razlikujejo v heterocikličnem obroču C in jih delimo na *flavone*, *flavonole*, *izoflavone*, *antociane*, *flavanole* in *flavanone* (**Slika 11**). Osnovne strukture so nato na obroču A in B substituirane s hidroksilnimi skupinami, sladkorji in metoksi skupinami. Flavonoide lahko delimo tudi glede na stopnjo polimerizacije na *monomere*, *oligomere* in *polimere*. Oligomeri in polimeri se imenujejo proantocianidini. Flavonoidi preprečujejo lipidno peroksidacijo, ker so lovilci superoksida, hidroksilnega radikala in zaradi sposobnosti keliranja kovinskih ionov. V visokih koncentracijah pa se antioksidativna sposobnost lahko pretvori v prooksidativno delovanje.

V dnevni prehrani človeka je približno 1 g flavonoidov. Glavni viri se nahajajo le v živilih rastlinskega izvora, in sicer sadju (rdečem grozdu, češnjah, robidah, jagodah), pijači (rdečem vinu, zelenem in črnem čaju, pivu), čokoladi in zelenjavi.



Slika 10: 2-fenilbenzopiran (11)



Slika 11: Flavonoidi kot derivati različnih struktur (11)

1.4.2 Čreslovine

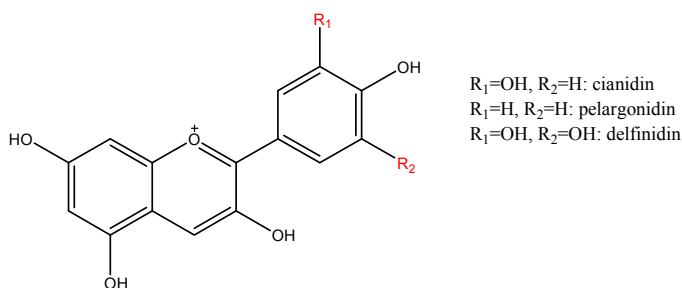
Drugo poimenovanje za čreslovine je izraz tanini. Čreslovine so že od nekdaj pomembne zaradi svojega strojilnega učinka, kajti s pomočjo taninov iz kože dobimo usnje. Strojilni učinek je posledica nastajanja stabilnih kovalentnih vezi med čreslovini in kolagenskimi vlakni v koži, kar poveča odpornost kože oz. usnja. Čreslovine obarjajo tudi pektine,

celulozo in beljakovine. Ta lastnost jim daje trpek okus in adstringentni učinek. Čreslovine delimo v dve skupini, ki se razlikujeta tako v strukturi kot v biogenetskem izvoru:

- Hidrolizirajoče čreslovine (galotanini, elagotanini)
- Kondenzirane čreslovine (proantocianidini, katehini)

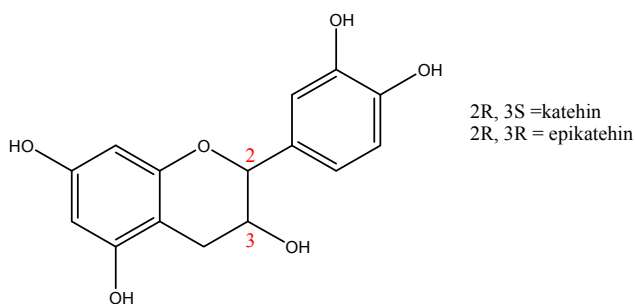
Čreslovine se v terapiji uporabljajo predvsem zaradi adstringentnega delovanja. Notranje delujejo kot antidiaroiiki, zunanje pa zaustavljajo manjše krvavitve ter delujejo antiseptično. S stališča antioksidativnega delovanja so pomembne kondenzirane čreslovine.

Kondenzirane čreslovine imenujemo tudi proantocianidini in so dimeri, oligomeri in polimeri katehina in epikatehina. Glede na to, kakšen antocianidin nastane iz polimera pri segrevanju, jih delimo na *procianidine*, *prodelfinidine* in *propelargonidine* (Slika 12).



Slika 12: Strukture različnih antocianidinov (12)

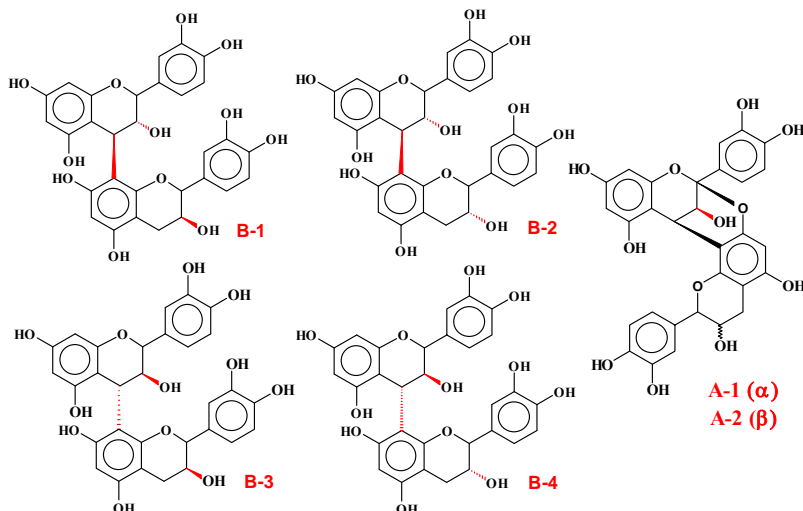
Najpogostejše kondenzirane čreslovine so procianidini. Ker nastanejo iz katehina in epikatehina (Slika 13), jih imenujemo tudi katehinske čreslovine.



Slika 13: Struktura katehina in epikatehina (12)

Dimerne procianidine ločimo na tip A in tip B. Med dimere tipa A uvrščamo A-1 in A-2 dimere, ki so povezani z dvema vezema: C_4-C_8 in C_2-O-C_7 . A-1 dimeri se povezujejo z α -vezmi, A-2 dimeri pa z β -vezmi. Najenostavnejši dimeri so B-1, B-2, B-3 in B-4, ki se

razlikujejo v tem, ali sta med seboj povezana dva katehina, dva epikatehina ali katehin in epikatehin, in v α - ali β -konfiguraciji vezi C4-C8 (**Slika 14**). Oligomeri nastajajo s postopnim dodajanjem flavonoidnih enot. Polimeri vsebujejo vse do 50 enot. Poznani so tudi O- in C-glikozidi kondenziranih čreslovin (1, 12, 13, 14).



Slika 14: Primeri dimernih procianidinov (12)

Proantocianidini se v hrani in pijačah ponavadi nahajajo skupaj s katehini. Živila, ki vsebujejo veliko proantocianidinov so sadje, rdeče vino, čaj ter čokolada. Redno uživanje temne čokolade predstavlja enega od najpomembnejših virov katehina in epikatehina, za katera je znano, da sta zelo močna antioksidanta.

1.5 NAVADNA JELKA

Navadna jelka (*Abies alba* Mill., **Slika 15**) je iglasto drevo s ploščatimi iglicami in gladkim belkasto sivim lubjem. Uvrščamo jo v deblo Pinophyta (iglavci), red Pinales (borovci), družino Pinaceae (borovke) in rod *Abies* (jelka). Imenujejo jo tudi bela jelka ali pa hoja. Svoje ime *Abies alba* je drevo dobilo po dveh srebrno belih črtah na spodnji strani iglic, medtem ko je zgornja stran iglic temno zelena. Občutljiva je na nizke zimske temperature in pozni pomladanski mraz, zahteva pa veliko vlage in toplote. Raste v srednji in južni Evropi, in sicer predvsem v goratem svetu Pirenejev, Alp in Karpatov. Navadno uspeva skupaj z bukvi in smreko, ponekod pa je v posebnih ekoloških razmerah lahko tudi prevladujoča vrsta drevesne plasti.

Zraste 50 m visoko, lahko celo do 80 m. Krošnja je pri odrasli jelki ovalna, v starosti pa sploščena. Obseg debla je 0,5–4 m. Igllice so dolge 15–30 mm, razporejene v dveh vrstah, ploske, zgoraj bleščeče temno zelene, spodaj z dvema belima progama. Pri mladem drevesu je skorja gladka, sivkasto bela, s smolnimi žlezami, kasneje pa razpoka in izloča smolo. Storži so pokončni, dolgi 10–16 cm in razpadejo na drevesu. Les je rdečkasto bele ali skoraj bele barve z modrikastim odtenkom. Navadna jelka je enodomna in vetrocvetna vrsta, cveti aprila in maja. Branike so izrazite.



Slika 15: Navadna jelka (*Abies alba* Mill.) (15)

Skorja navadne jelke vsebuje smolne kanale, iz katerih pridobivamo terpentin in terpentinovo eterično olje. Terpentin oziroma balzam borovcev pridobivajo z zarezovanjem v skorjo debel. Terpentin nato podvržejo destilaciji z vodno paro in pri tem pridobijo terpentinovo eterično olje ter kolofonijo kot zaostanek. Očiščeno terpentinovo eterično olje vsebuje predvsem α - in β -pinen (monoterpenska ogljikovodika) in ga uporabljamo predvsem kot ekspektorans in rubefaciens. Kolofonijo sestavljajo predvsem diterpenske kisline, uporabljamo pa jo v industrijske namene (15, 16, 17, 18, 19).

1.6 PIKNOGENOL

Za izraz piknogenol je bilo prvotno predvideno, da služi kot strokovno ime za skupino polifenolnih spojin. Danes pa se nanaša na izvleček skorje obmorskega bora (*Pinus maritima*, **Slika 16**), ki je patentiran pod tržnim imenom Pycnogenol[®]. Pknogenol je v uporabi po vsem svetu kot prehransko dopolnilo. Raziskave kažejo, da ima veliko antioksidativno aktivnost kot tudi druge biološke aktivnosti, ki pa niso neposredno povezane s sposobnostjo lovljenja radikalov, npr. zaviranje encimske aktivnosti in modulacija izražanja genov.

Pknogenol pridobivajo le iz skorje obmorskega bora, ki raste v pokrajini Gaskoniji v Franciji. Čistoto in kakovost izvlečka nadzoruje Francosko združenje za norme (AFNOR). Pknogenol pridobivajo z vodno ekstrakcijo skorje obmorskega bora. Kemična sestava pknogenola še ni povsem pojasnjena, znano pa je, da so glavne sestavine flavonoidi (katehin, epikatehin, taksifolin), proantocianidini in fenolne kisline (kavna kislina, ferulna kislina, p-hidroksibenzojska kislina). Poleg antioksidativne aktivnosti, ki je posledica keliranja kovinskih ionov in lovljenja radikalov ima pknogenol pomemben vpliv tudi na bolezni kardiovaskularnega sistema (aterosklerozo) ter na vnetne procese. Deluje kot inhibitor encima angiotenzin-konvertaze in inhibitor zlepljanja trombocitov (20).



Slika 16: Obmorski bor (*Pinus maritima*) (27)

2 NAMEN DELA

Namen našega dela je razviti skupino metod za ugotavljanje antioksidativne aktivnosti izvlečka lubja navadne jelke. V okviru tega bomo izvedli primerjavo antioksidativne aktivnosti izvlečka lubja navadne jelke z aktivnostjo piknogenola ter z antioksidanti, ki jih v največji meri vnašamo v organizem s hrano ali fitofarmaceutskimi pripravki (vitaminom C, α -tokoferolom in butilhidroksianizolom).

Antioksidativno aktivnost bomo določali z več metodami, in sicer z:

- metodo za določanje reducirajoče moči antioksidanta;
- metodo za določanje antioksidativne aktivnosti z 2-deoksi-*D*-ribozo;
- metodo za določanje antioksidativne aktivnosti z β -karotenom
- metodo za določanje antioksidativne aktivnosti s tiocianatom
- DPPH-metodo;
- ABTS-metodo in z
- metodo za določanje antioksidativne aktivnosti z NADH.

Metode določanja antioksidativne aktivnosti izvlečka lubja navadne jelke bomo optimizirali in ovrednotili njihovo ponovljivost.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

Uporabili smo izvleček lubja navadne jelke, ki so ga izolirali na Katedri za farmacevtsko biologijo Fakultete za farmacijo.

3.2 KEMIKALIJE

- Pycnogenol® French Maritime pine bark extract, Biolandes, (Le Sen, Francija)
- Izvleček lubja navadne jelke, (Fakulteta za farmacijo)
- Butilhidroksianizol, (SERVA)
- *L*-askorbinska kislina, Sigma-Aldrich, (Steinheim, Nemčija)
- *D*- α -tokoferol, Sigma-Aldrich, (Steinheim, Nemčija)
- Natrijev hidrogenfosfat dihidrat, analizna čistoča, Sigma-Aldrich, (Steinheim, Nemčija)
- Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, analizna čistoča, Kemika, (Zagreb, Hrvaška)
- Železov(III) klorid heksahidrat, granulated, purum, Sigma-Aldrich, (Steinheim, Nemčija)
- Etilendiamintetraoetna kislina, natrijeva sol, dihidrat, 99+%, Sigma-Aldrich, (Steinheim, Nemčija)
- Natrijev hidroksid, brezvodne pelete, analizna čistoča, Carlo Erba reagenti, (Rodano, Italija)
- 2-deoksi-*D*-riboza, Sigma-Aldrich, (Steinheim, Nemčija)
- 2-tiobarbiturna kislina, reagent za askorbinsko kislino, Merck KGaA, (Darmstadt, Nemčija)
- Vodikov peroksid 30% raztopina v vodi, analizna čistoča, Merck KGaA, (Darmstadt, Nemčija)
- 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina) diamonijeva sol, čista, Sigma-Aldrich, (Steinheim, Nemčija)
- Amonijev persulfat, Sigma-Aldrich, (Steinheim, Nemčija)

- Železov(II) klorid tetrahidrat, analizna čistoča, Merck KGaA, (Darmstadt, Nemčija)
- Amonijev tiocianat, analizna čistoča, Merck KGaA, (Darmstadt, Nemčija)
- Metanol, analizna čistoča, Carlo Erba reagenti, (Rodano, Italija)
- Triklorocetna kislina, analizna čistoča, Merck KGaA, (Darmstadt, Nemčija)
- Linolna kislina, Sigma-Aldrich, (Steinheim, Nemčija)
- Fenazin monosulfat, $\geq 90\%$ (UV), Sigma-Aldrich, (Steinheim, Nemčija)
- Kalijev heksacianoferrat(III), analizna čistoča, Kemika, (Zagreb, Hrvaška)
- Nikotinamid adenin dinukleotid, reducirana dinatrijeva sol (NADH), 97% čistoča, Sigma-Aldrich, (Steinheim, Nemčija)
- Nitrotetrazolijev klorid modro, $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, (Steinheim, Nemčija)
- Kloroform, analizna čistoča, Carlo Erba reagenti, (Rodano, Italija)
- Tween 20, Fluka, Chemika, Sigma-Aldrich, (Steinheim, Nemčija)
- Etanol, absolutni, analizna čistoča, Carlo Erba reagenti, (Rodano, Italija)
- Klorovodikova kislina, 37%, analizna čistoča, Carlo Erba reagenti, (Rodano, Italija)
- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin, analizna čistoča, Sigma-Aldrich, (Steinheim, Nemčija)
- β -karoten, Sigma-Aldrich, (Steinheim, Nemčija)

3.3 APARATURE IN OPREMA

- Avtomatske pipete, Biohit-Proline, Biohit, (Helsinki, Finska)
- Nastavki za pipete, Saerstedt, (Numbrecht, Nemčija)
- Analizna tehnica Mettler Toledo XS205 Dual range
- Digestorij Variolab Mobilien W90, Waldner, (Wangen, Nemčija)
- Hladilnik, $+4^{\circ}\text{C}$, Gorenje, (Velenje, Slovenija)
- Zamrzovalnik, -20°C , Gorenje, (Velenje, Slovenija)
- UV/VIS spektrofotometer Lambda Bio+, Perkin Elmer, (Massachussetts, ZDA)
- Ultrazvočna kadička Bandelin Sonorex Digitec
- Rotavapor R-200, Büchi, (Flawil, Švica)
- Kuhalnik Clatronic, (Kempen, Nemčija)
- Spektrofotometer Safire 2, Tecan (Männedorf, Švica)
- Centrifuga 5804 R, Eppendorf (Hamburg, Nemčija)
- Grelna plošča – Camag TLC Plate Heater III, Camag (Muttentz, Švica)
- Inkubator WTC binder

- Mikrotitrne ploščice
- Programska oprema ChemDraw Ultra 7.0.1

3.4 METODE

Preglednica II: Delitev metod za določanje antioksidativne aktivnosti glede na mehanizem delovanja (7)

Mehanizem delovanja antioksidanta	Metode za določanje antioksidativne aktivnosti
Redukcijska reakcija	<ul style="list-style-type: none"> • Metoda za določanje reducirajoče moči antioksidanta
Oksidacija v hidro- in lipofilnih raztopinah ter emulzijah maščobnih kislin in fosfolipidov	<ul style="list-style-type: none"> • Metoda za določanje antioksidativne aktivnosti z β-karotenom • Metoda za določanje antioksidativne aktivnosti s tiocianatom
Lovljenje radikalov	<ul style="list-style-type: none"> • Metoda za določanje antioksidativne aktivnosti z 2-deoksi-<i>D</i>-ribozo • DPPH-metoda za določanje antioksidativne aktivnosti • ABTS-metoda za določanje antioksidativne aktivnosti • Metoda za določanje antioksidativne aktivnosti z NADH

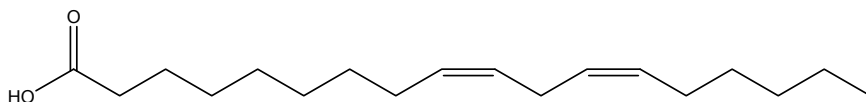
3.4.1 Metoda za določanje reducirajoče moči antioksidanta

Prisotnost antioksidanta v raztopini povzroči redukcijo kalijevega fericianida (oblika Fe^{+3}) v kalijev ferocianid (oblika Fe^{+2}). Reducirana oblika železovega iona reagira z železovim (III) kloridom in nastane kompleks $\text{Fe}^{+3} - \text{Fe}^{+2}$. Kompleks ima absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 700 nm. Barva nastale raztopine je odvisna od reducirajoče moči antioksidanta, in sicer se spreminja od zelenega do modrega odtenka. Absorbanca je premosorazmerna reducirajoči moči antioksidanta (22).

3.4.2 Metoda za določanje antioksidativne aktivnosti z β -karotenom

Molekula β -karotena se med oksidacijo, povzročeno s povišano temperaturo, v odsotnosti antioksidanta hitro razbarva. Prisotnost antioksidanta pa zmanjša obsežnost oksidacije molekule β -karotena, in sicer z nevtralizacijo radikalov, nastalih pri oksidaciji linolne kisline, kot tudi vseh ostalih potencialno prisotnih radikalov v sistemu.

Pri oksidaciji linolne kisline pride na mestu C-11 med dvema dvojnima vezema do odcepitev vodikovega atoma iz aktivne bis-alilne metilne skupine (**Slika 17**). Pri tem nastanejo pentadienilni radikali, ki imajo veliko težnjo do reakcije z nenasičeno molekulo β -karotena. Ko molekula β -karotena izgubi konjugacijo, karotenoidi izgubijo značilno oranžno obarvanje. Reakcijo spremljamo spektrofotometrično (22).

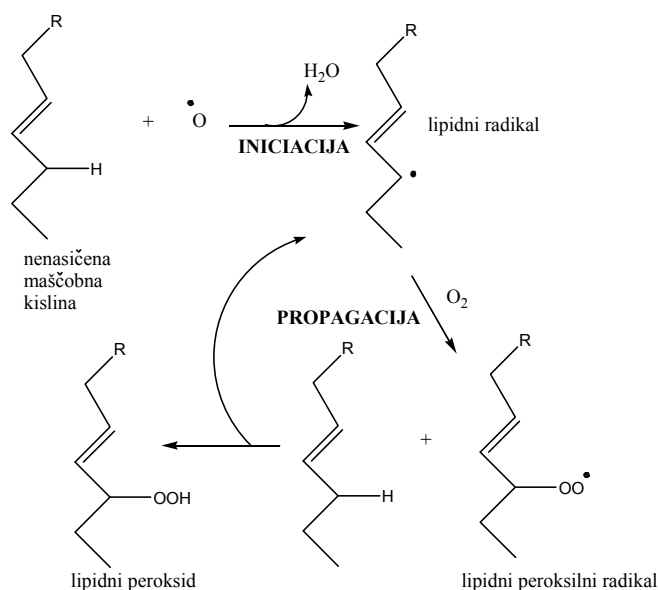


Slika 17: Struktura linolne kisline (9)

3.4.3 Metoda za določanje antioksidativne aktivnosti s tioacianatom

Tiocianatna metoda se uporablja za merjenje ravni peroksidov v začetni fazi oksidacije lipidov. Lipidna peroksidacija poteče, ko radikal napade nenasičeno maščobno kislino (**Slika 18**). Sprosti se voda in nastane lipidni ogljikov radikal, ki reagira s kisikom.

Posledica je nastanek lipidnega peroksilnega radikala. Le-ta lahko napade druge maščobne kisline in tako nadaljuje verigo omenjenih reakcij (24).



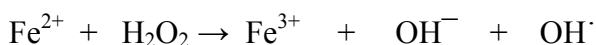
Slika 18: Mehanizem lipidne peroksidacije (24)

3.4.4 Metoda za določanje antioksidativne aktivnosti z 2-deoksi-D-ribozo

Fe^{3+} ion in EDTA v prisotnosti askorbinske kisline tvorita kompleks Fe^{+2} -EDTA. Po inkubaciji z vodikovim peroksidom pri pH 7,4 pride do nastanka kompleksa Fe^{+3} -EDTA in hidroksilnih radikalov (OH^\cdot). Le-te uvrščamo med ene najbolj reaktivnih kisikov spojin.

OH⁻ cepijo molekulo 2-deoksi-*D*-riboze v fragmente, ki pri segrevanju z 2-tiobarbiturno kislino (TBA) pri nizkem pH tvori rožnato obarvan kromogen. Ena izmed reakcij, ki potečejo, pa se imenuje Fentonova reakcija. Bistveno vlogo pri omenjeni reakciji ima askorbinska kislina, ki omogoči nastanek OH⁻ iz vodikovega peroksida, s tem ko povzroči začetno pretvorbo Fe³⁺ iona v Fe²⁺ obliko.

Po dodatku antioksidanta k raztopini 2-deoksi-*D*-riboze pride do zmanjšane obarvanja raztopine. Reakcijo spremljamo spektrofotometrično pri valovni dolžini 535 nm (23).

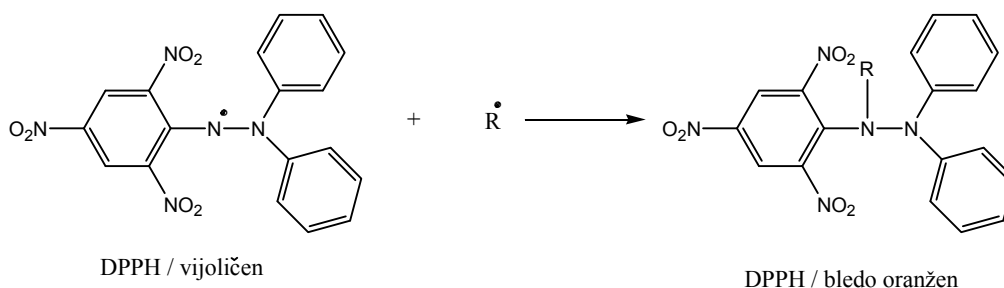


Fentonova reakcija

3.4.5 DPPH metoda za določanje antioksidativne aktivnosti

Molekula 1,1-difenil-2-pikrilhidrazina (DPPH) je stabilen radikal (**Slika 19**). Prosti elektron je delokaliziran po celotni molekuli, kar daje molekuli stabilnost in intenzivno vijolično obarvanje. Reakcijo spremljamo spektrofotometrično, in sicer pri valovni dolžini 517 nm. Po dodatku antioksidanta k raztopini DPPH pride do nastanka reducirane oblike DPPH in posledično do razbarvanja raztopine (**Slika 19**). Iz molekule antioksidanta pa nastane nov radikal, ki zopet reagira z novo molekulo DPPH.

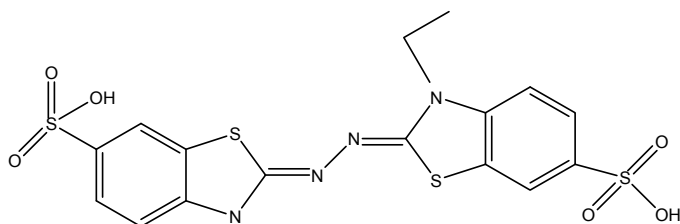
Stehiometrija reakcije je odvisna od števila vodikovih atomov, ki jih antioksidant lahko donira. Če antioksidant donira 2 atoma, potem je stehiometrija 2:1, kar pomeni, da ena molekula antioksidanta reducira 2 molekuli DPPH. Z DPPH reagirajo glutation, aromatski amini, tokoferoli in polihidroksi aromatske spojine. Pred izvedbo reakcije pa je potrebno odstraniti nekatere anorganske ione nizkih valenc (v večji meri se to nanaša na Fe²⁺ ion), saj lahko motijo potek reakcije (25, 26).



Slika 19: Reakcija DPPH radikala z antioksidantom (26)

3.4.6 ABTS metoda za določanje antioksidativne aktivnosti

2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina) (ABTS) (**Slika 20**) se po dodatku amonijevega persulfata pretvori v 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) ($\text{ABTS}^{\cdot+}$). Nastali radikal je modre barve in ima absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 734 nm. Z $\text{ABTS}^{\cdot+}$ reagirajo fenoli, tioli in vitamin C. Ko raztopini $\text{ABTS}^{\cdot+}$ dodamo antioksidant, pride do nastanka reducirane oblike molekule in zaradi tega do razbarvanja raztopine. Reakcijo zaznamo s padcem absorbance. Tvorba $\text{ABTS}^{\cdot+}$ radikalov (pred dodatkom antioksidanta) zmanjša možnost vpliva ostalih spojin na nastanek radikalov (3).

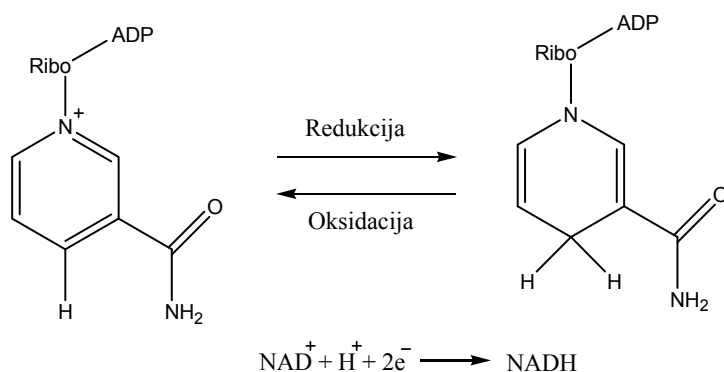


Slika 20: ABTS ali 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina) (9)

3.4.7 Metoda za določanje antioksidativne aktivnosti z NADH

Superoksidni anionski radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$) nastanejo po dodatku fenazin metosulfata (PMS) k nikotinamid adenin dinukleotidu (NADH) ob prisotnosti kisika. $\text{O}_2^{\cdot-}$ nato povzročijo nastanek reducirane oblike molekule nitromodro-tetrazolijevega klorida (NBT). To opazimo kot vijolično obarvan kompleks. Absorpcijski maksimum obarvanega kompleksa merimo pri valovni dolžini 560 nm.

Ob prisotnosti antioksidanta pride do manjše intenzivnosti obarvanja kompleksa. Večje je zmanjšanje intenzivnosti obarvanja, večjo sposobnost lovljenja $\text{O}_2^{\cdot-}$ ima antioksidant (3,27).



Slika 21: Reakcija oksidacije in redukcije NADH

4 EKSPERIMENTALNO DELO

Kjer ni posebej navedeno, je z izrazom npr. 1-odstotna raztopina mišljen masno-volumski delež (m/V).

4.1 METODA ZA DOLOČANJE REDUCIRAJOČE MOČI ANTIOKSIDANTA

Reducirajočo moč antioksidantov (RM) smo določali spektrofotometrično. Kot standard smo uporabili butilhidroksianizol (BHA), kontrolna raztopina pa je bila 50-odstotni metanol. Po opravljeni analizi smo glede na izračunano vrednost RM med seboj primerjali izvleček lubja navadne jelke, piknogenol, BHA in askorbinsko kislino.

Reagenti:

- 1-odstotna raztopina $K_3Fe(CN)_6$: 1 g $K_3Fe(CN)_6$ smo zatehtali v 100 mL merilno bučko in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.
- 10-odstotna raztopina triklorocetne kisline (TCA): 10 mL TCA smo odpipetirali v čašo ter dodali 90 mL prečiščene vode.
- 0,1-odstotna raztopina $FeCl_3$: 166,54 mg $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ smo zatehtali v 100 mL merilno bučko in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.
- 0,1 M fosfatni pufer s pH 7,0
- 50-odstotna (V/V) raztopina metanola

Osnovna raztopina piknogenola

10 mg piknogenola smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili s 50-odstotno raztopino metanola do oznake.

Osnovna raztopina izvlečka lubja navadne jelke

10 mg izvlečka jelkega lubja smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili s 50-odstotno raztopino metanola do oznake.

Osnovna raztopina BHA

10 mg BHA smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili s 50-odstotno raztopino metanola do oznake.

Osnovna raztopina askorbinske kisline

10 mg askorbinske kisline smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili s 50-odstotno raztopino metanola do oznake.

Kontrolna raztopina

V čašo smo odpipetirali 10 mL metanola in 10 mL prečiščene vode. 25 μ L raztopine 50-odstotnega metanola smo dodali 25 μ L 0,1 M fosfatnega pufra (pH 7,0) in 50 μ L 1-odstotne raztopine $K_3Fe(CN)_6$.

Vzorčne raztopine

Osnovne raztopine smo ustrezno razredčili s 50-odstotno raztopino metanola, da smo dobili koncentracije 1,0; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2 in 0,1 mg/mL. 25 μ L posamezne razredčitve smo dodali 25 μ L 0,1 M fosfatnega pufra (pH 7,0) in 50 μ L 1-odstotne raztopine $K_3Fe(CN)_6$.

Postopek izvedbe

Kontrolno in vzorčne raztopine smo postavili za 20 minut v inkubator s temperaturo 50 °C. Po izteku časa smo kontrolni in vzorčnim raztopinam dodali 25 μ L 10-odstotne raztopine TCA in 100 μ L prečiščene vode ter jim izmerili absorbanco pri valovni dolžini 700 nm. Po opravljeni meritvi smo raztopinam dodali še 25 μ L 0,1-odstotne raztopine $FeCl_3$ ter ponovno izmerili vrednost absorbance pri valovni dolžini 700 nm. Vrednost absorbance je premosorazmerna z reducirajočo močjo antioksidanta, t.j. večja je vrednost absorbance, večjo reducirajočo moč ima antioksidant.

Enačba 1: Izračun RM vrednosti

$$RM = (A_2 \text{ vzorec} - A_1 \text{ vzorec}) / (A_2 \text{ kontrola} - A_1 \text{ kontrola})$$

A_2 vzorec, kontrola - absorbanca raztopine, merjena po dodatku 0,1% raztopine $FeCl_3$

A_1 vzorec, kontrola - absorbanca raztopine, merjena pred dodatkom 0,1% raztopine $FeCl_3$

4.2 METODA ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI Z β -KAROTENOM

Antioksidativno aktivnost smo določali spektrofotometrično. Kot standard smo uporabili BHA, kontrolna raztopina pa je bila 0,4-odstotna raztopina Tween 20. Po opravljeni analizi smo med seboj primerjali aktivnost izvlečka lubja navadne jelke s piknogenolom, z BHA in askorbinsko kislino.

Reagenti:

- 0,2-odstotna raztopina β -karotena v kloroformu: 2,0 mg β -karotena smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili s kloroformom (CHCl_3) do oznake.
- Linolna kislina
- 0,4-odstotna (V/V) raztopina Tween 20: v 50 mL merilno bučko smo odpipetirali 181 μL Tween 20 in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.

Osnovna raztopina piknogenola

5 mg piknogenola smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili z 0,4-odstotno raztopino Tween 20 do oznake.

Osnovna raztopina izvlečka lubja navadne jelke

5 mg izvlečka jelkeinega lubja smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili z 0,4-odstotno raztopino Tween 20 do oznake.

Osnovna raztopina BHA

5 mg BHA smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili z 0,4-odstotno raztopino Tween 20 do oznake.

Osnovna raztopina askorbinske kisline

5 mg askorbinske kisline smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili z 0,4-odstotno raztopino Tween 20 do oznake.

Najprej je bilo potrebno pripraviti raztopino, ki je vsebovala radikale, ki nastanejo pri peroksidaciji linolne kisline. 2,2 μL linolne kisline smo dodali 18,1 μL 0,4-odstotne

raztopine Tween 20 in 100 μL 0,2-odstotna raztopina β -karotena v kloroformu. Po odstranitvi CHCl_3 s pomočjo rotavaporja smo zaostanek raztopili v 5 mL prečiščene vode in dobro premešali. Odvzeli smo 200 μL alikvota pripravljene raztopine (x) in jih dodali kontrolni in vzorčnim raztopinam.

Kontrolna raztopina

40 μL 0,4-odstotni raztopini Tween 20 smo dodali 200 μL alikvota pripravljene raztopine (x).

Vzorčne raztopine

Osnovne raztopine piknogenola in izvlečka jelkinega lubja smo ustrezno redčili z 0,4-odstotno raztopino Tween 20, da smo dobili koncentracije 0,20; 0,10; 0,05 in 0,01 mg/mL. 40 μL posamezne redčitve smo dodali 200 μL alikvota pripravljene raztopine (x).

Osnovne raztopine BHA in askorbinske kisline pa smo ustrezno redčili z 0,4-odstotno raztopino Tween 20, da smo dobili koncentracije 0,01; 0,005 in 0,001 mg/mL. 40 μL posamezne redčitve smo dodali 200 μL alikvota pripravljene raztopine (x).

Postopek izvedbe

Kontrolno in vzorčne raztopine smo inkubirali 120 minut pri temperaturi 50 °C.

Absorbanco raztopin smo merili v 15-minutnih intervalih pri valovni dolžini 470 nm. Prva meritev je bila takoj po pripravi raztopin ($t = 0$ min) in zadnja po 120 minutah.

Enačba 3: Izračun odstotka inhibicije razbarvanja β -karotena

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

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

$A_{t=0}$ – absorbanca raztopine ob času 0 min

$A_{t=t}$ – absorbanca raztopin ob času 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 in 120 min

t – čas

4.3 METODA ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI S TIOACIANATOM

Odstotek inhibicije peroksidacije linolne kisline smo določali spektrofotometrično. Kot standard smo uporabili BHA, kontrolna raztopina pa je bil 0,1 M fosfatni pufer s pH 7,0. Med seboj smo primerjali aktivnost piknogenola z izvlečkom lubja navadne jelke ter z BHA in askorbinsko kislino.

Reagenti:

- 2,51-odstotna raztopina linolne kisline v 96-odstotnem (V/V) etanolu: 270 μ L linolne kisline smo odpipetirali v 10 mL merilno bučko in dopolnili z 96-odstotnim etanolom do oznake.
- 30-odstotna raztopina NH_4SCN : 3,0 g NH_4SCN smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.
- 0,02 M raztopina FeCl_2 v 3,5-odstotni (V/V) raztopini HCl: 40,0 mg $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ smo zatehtali v 100 mL merilno bučko, dodali 950 μ L 37-odstotne raztopine HCl in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.
- 0,1 M fosfatni pufer s pH=7,0

Osnovna raztopina piknogenola

2 mg piknogenola smo zatehtali v 1 mL epico in dopolnili s 96-odstotnim etanolom do oznake.

Osnovna raztopina izvlečka lubja navadne jelke

2 mg izvlečka jelkeinega lubja smo zatehtali v 1 mL epico in dopolnili s 96-odstotnim etanolom do oznake.

Osnovna raztopina BHA

2 mg BHA smo zatehtali v 1 mL epico in dopolnili s 96-odstotnim etanolom do oznake.

Osnovna raztopina askorbinske kisline

2 mg askorbinske kisline smo zatehtali v 1 mL epico in dopolnili s 96-odstotnim etanolom do oznake.

Kontrolna raztopina

400 μL 0,1 M fosfatnega pufru (pH=7,0) smo dodali 410 μL 2,51-odstotne raztopine linolne kisline v 96-odstotnem etanolu, 800 μL 0,1 M fosfatnega pufru (pH=7,0) in 390 μL prečiščene vode.

Vzorčne raztopine

Osnovne raztopine smo nato ustrezno redčili s 96-odstotnim etanolom, da smo dobili koncentracije 2,0; 1,0 in 0,5 mg/mL. 400 μL posamezne redčitve smo dodali 410 μL 2,51-odstotne raztopine linolne kisline v 96-odstotnem etanolu, 800 μL 0,1 M fosfatnega pufru (pH=7,0) in 390 μL prečiščene vode.

Postopek izvedbe

Kontrolno in vzorčne raztopine smo tesno zaprli in inkubirali 24 ur v temnem prostoru pri temperaturi 37 °C. K 10 μL posamezne vzorčne raztopine in kontrolni raztopini smo dodali 970 μL 75-odstotnega etanola (V/V), 10 μL 30-odstotne raztopine NH_4SCN in 10 μL 0,02 M raztopine FeCl_2 v 3,5-odstotni raztopini HCl. Točno 3 minute po dodatku 0,02 M raztopine FeCl_2 v 3,5-odstotni raztopini HCl smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 500 nm.

Enačba 5: Izračun odstotka inhibicije peroksidacije linolne kisline

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

4.4 METODA ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI Z 2-DEOKSI-D-RIBOZO

Odstotek inhibicije oksidacije 2-deoksi-*D*-riboze oz. odstotek inhibicije nastanka hidroksilnih radikalov (OH^\cdot) smo določali spektrofotometrično. Kot standard smo uporabili BHA, kontrolna raztopina pa je bil 0,2 M fosfatni pufer s pH 7,4. Po opravljeni analizi smo glede na odstotek inhibicije nastanka OH^\cdot med seboj primerjali izvleček lubja navadne jelke s pknogenolom, z BHA in vitaminom E. Zelo pomembno pri tej metodi je, da sta 1 mM raztopina askorbinske kisline in 1 mM raztopina FeCl_3 vsak dan sveže pripravljene. V nasprotnem primeru reakcija ne poteče kot tudi ne v primeru, če 1 mM raztopino FeCl_3 pripravimo v 0,2 M fosfatnem pufru (pH 7,4). V omenjenem primeru pride do nastanka oborine, medtem ko je vodna raztopina 1 mM FeCl_3 oranžno obarvana.

Reagenti:

- 1 mM raztopina askorbinske kisline: 17,6 mg askorbinske kisline smo zatehtali v 100 mL merilno bučko in dopolnili z 0,2 M fosfatnim pufrom (pH=7,4) do oznake.
- 1 mM raztopina etilendiaminotetraacetne kisline (EDTA): 37,22 mg EDTA smo zatehtali v 100 mL merilno bučko in dopolnili z 0,2 M fosfatnim pufrom (pH=7,4) do oznake.
- 1 mM raztopina FeCl₃: 13,52 mg FeCl₃ smo zatehtali v 100 mL merilno bučko in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.
- 14 mM raztopina 2-deoksi-D-riboze: 187,78 mg 2-deoksi-D-riboze smo zatehtali v 100 mL merilno bučko in dopolnili z 0,2 M fosfatnim pufrom (pH=7,4) do oznake.
- 10 mM raztopina H₂O₂: 23,25 µL vodne raztopine H₂O₂ smo odpipetirali v 100 mL merilno bučko in dopolnili z 0,2 M fosfatnim pufrom (pH=7,4) do oznake.
- 10-odstotna raztopina TCA z 0,5-odstotno raztopino 2-tiobarbiturine kisline (TBA): v 50 mL merilno bučko smo zatehtali 5 g TCA in 0,25 g TBA ter dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.
- 0,2 M fosfatni pufer s pH=7,4

Osnovna raztopina piknogenola

10 mg piknogenola smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili z 0,2 M fosfatnim pufrom (pH 7,4) do oznake.

Osnovna raztopina izvlečka lubja navadne jelke

10 mg izvlečka jelkinega lubja smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili z 0,2 M fosfatnim pufrom (pH=7,4) do oznake.

Osnovna raztopina BHA

10 mg BHA smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili z 0,2 M fosfatnim pufrom (pH 7,4) do oznake.

Osnovna raztopina vitamina E

10 mg vitamina E smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili z 0,2 M fosfatnim pufrom (pH 7,4) do oznake.

Kontrolna raztopina

300 μL 0,2 M fosfatnega puфра (pH 7,4) smo dodali 200 μL 1mM raztopine FeCl_3 , 100 μL 1 mM raztopine askorbinske kisline, 100 μL 1 mM raztopine EDTA, 200 μL 14 mM raztopine 2-deoksi-*D*-riboze in 100 μL 10 mM raztopine vodikovega peroksida (le-ta povzroči začetek reakcije).

Vzorčne raztopine

Osnovne raztopine smo ustrezno razredčili z 0,2 M fosfatnim puфrom (pH=7,4), da smo dobili koncentracije 1,0; 0,5; 0,25 in 0,125 mg/mL. 200 μL posamezne redčitve smo dodali 100 μL 0,2 M fosfatnega puфра (pH=7,4), 200 μL 1mM raztopine FeCl_3 , 100 μL 1mM raztopine askorbinske kisline, 100 μL 1mM raztopine EDTA, 200 μL 14 mM raztopine 2-deoksi-*D*-riboze in 100 μL 10 mM raztopine vodikovega peroksida.

Postopek izvedbe

Kontrolno in vzorčne raztopine smo inkubirali 60 minut pri temperaturi 37 °C. Raztopinam smo nato dodali reagent, ki potek reakcije zaustavi, in sicer 1 mL 10-odstotne TCA z 0,5-odstotno TBA. Raztopine smo za 30 minut izpostavili vreli vodi in jih ohladili na ledu. Absorbanco smo merili pri valovni dolžini 535 nm.

Enačba 2: Izračun odstotka inhibicije oksidacije 2-deoksi-*D*-riboze

$$\% \text{ inhibicije} = ((A_{\text{kontrola}} - A_{\text{vzorca}}) / A_{\text{kontrola}}) * 100$$

4.5 DPPH METODA ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

Antioksidativno aktivnost antioksidantov smo določali sprektrofotometrično. Kot standard smo uporabili BHA, slepi vzorec je bila prečiščena voda, kontrolna raztopina pa galna kislina. Med seboj smo po antioksidativni aktivnosti primerjali izvleček lubja navadne jelke s piknogenolom, z BHA in askorbinsko kislino.

Reagenti:

- Raztopina 1,1-difenil-2-pikrilhidrazina (DPPH): 2 mg DPPH smo zatehtali v 50 mL merilno bučko in dopolnili z metanolom do oznake. Raztopina DPPH na svetlobi ni

stabilna in zato smo jo hranili v hladilniku ovito v alufolijo. Vsak dan smo pripravili svežo raztopino.

- Metanol

Osnovna raztopina piknogenola

10 mg piknogenola smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.

Osnovna raztopina izvlečka lubja navadne jelke

10 mg izvlečka jelkega lubja smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.

Osnovna raztopina BHA

10 mg BHA smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.

Osnovna raztopina askorbinske kisline

10 mg askorbinske kisline smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.

Kontrolna raztopina

10 mg galne kisline smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake. 9 μ L raztopine galne kisline smo dodali 225 μ L raztopine DPPH v metanolu.

Slepi vzorec

225 μ L raztopine DPPH v metanolu smo dodali 9 μ L prečiščene vode.

Vzorčne raztopine

Osnovne raztopine smo nato ustrezno redčili s prečiščeno vodo, da smo dobili koncentracije 0,20; 0,15 in 0,10 mg/mL. 9 μ L posamezne razredčitve smo zmešali z 225 μ L raztopine DPPH v metanolu.

Postopek izvedbe

Po 30 minutni inkubaciji na sobni temperaturi smo vzorčnim raztopinam, slepemu vzorcu in kontrolni raztopini izmerili absorbanco pri valovni dolžini 517 nm.

Izračun antioksidativne aktivnosti proti DPPH radikalom temelji na enačbi 6:

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

4.6 ABTS METODA ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

Antioksidativno aktivnost polifenolnih spojin smo določali sprektrofotometrično. Kot standard smo uporabili BHA, slepi vzorec je bila prečiščena voda, kontrolna raztopina pa galna kislina v koncentraciji 1 mg/mL. Med seboj pa smo po antioksidativni aktivnosti primerjali izvleček lubja navadne jelke s piknogenolom, z BHA in askorbinsko kislino. Test smo izvajali v mikrotitrski ploščici z volumnom 250 μ L.

Reagenti:

- 7 mM raztopina 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina) (ABTS): 38,42 mg ABTS smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.
- 140 mM raztopina amonijevega persulfata: 63,9 mg amonijevega persulfata smo zatehtali v 2 mL epico in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.
- Etanol

Osnovna raztopina piknogenola

10 mg piknogenola smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.

Osnovna raztopina izvlečka lubja navadne jelke

10 mg izvlečka jelkinega lubja smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.

Osnovna raztopina BHA

10 mg BHA smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.

Osnovna raztopina askorbinske kisline

10 mg askorbinske kisline smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.

Kontrolna raztopina

10 mg galne kisline smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake. 6,2 μ L raztopine galne kisline smo dodali 241,8 μ L raztopine ABTS^{•+}.

Vzorčne raztopine

Osnovne raztopine smo nato ustrezno redčili s prečiščeno vodo, da smo dobili koncentracije 125; 62,5; 31,25; 15,63 in 7,8 μ g/mL. 6,2 μ L posamezne redčitve smo dodali 241,8 μ L raztopine ABTS^{•+}.

Postopek izvedbe

Kontrolno in vzorčne raztopine smo shranili v temnem prostoru. Po preteku 6 min smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 734 nm.

Predhodno pa je bilo potrebno pripraviti raztopino ABTS^{•+}. To smo storili tako, da smo 10 mL 7 mM raztopine ABTS dodali 178 μ L 140 mM raztopine amonijevega persulfata. Raztopino smo inkubirali 16 ur na sobni temperaturi v temnem prostoru. ABTS^{•+} raztopino smo nato razredčili z etanolom, da je absorbanca ustrezala vrednosti 0,7 pri valovni dolžini 734 nm.

Antioksidativno aktivnost piknogenola, izvlečka jelkinega lubja, BHA in askorbinske kisline smo izračunali po sledeči enačbi 7:

$$AA = (A_{\text{kontrola}} - A_{\text{vzorec}}) / (A_{\text{kontrola}} - A_{\text{max.galna}}) * 100$$

4.7 METODA ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI Z NADH

Odstotek inhibicije superoksidnega radikala ($O_2^{\cdot-}$) smo določali spektrofotometrično. Kot standard smo uporabili BHA, kontrolna raztopina pa je bil 0,1 M fosfatni pufer s pH 7,4. Med seboj smo po odstotku inhibicije nastanka $O_2^{\cdot-}$ primerjali izvleček lubja navadne jelke s piknogenolom, z BHA in askorbinsko kislino. Zelo pomembno pri tem testu je, da so vsi reagenti razen 0,1 M fosfatnega pufera (pH 7,4) sveže pripravljene tik pred izvedbo metode.

Reagenti:

- 156 $\mu\text{mol/l}$ raztopina nitromodro-tetrazolijevega klorida (NBT): 1,28 mg NBT smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili z 0,1 M fosfatnim pufrom do oznake.
- 468 $\mu\text{mol/l}$ raztopina nikotinamid adenin dinukleotida (NADH): 3,47 mg NADH smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili z 0,1 M fosfatnim pufrom do oznake.
- 60 $\mu\text{mol/l}$ raztopina fenazin metosulfata (PMS): 1,84 mg PMS smo zatehtali v 100 mL merilno bučko in dopolnili z 0,1 M fosfatnim pufrom do oznake.
- 0,1 M fosfatni pufer s pH=7,4

Osnovna raztopina piknogenola

10 mg piknogenola smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili z 0,1 M fosfatnim pufrom (pH=7,4) do oznake.

Osnovna raztopina izvlečka lubja navadne jelke

10 mg izvlečka jelkega lubja smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili z 0,1 M fosfatnim pufrom (pH=7,4) do oznake.

Osnovna raztopina BHA

10 mg BHA smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili z 0,1 M fosfatnim pufrom (pH=7,4) do oznake.

Osnovna raztopina askorbinske kisline

10 mg askorbinske kisline smo zatehtali v 10 mL merilno bučko in dopolnili z 0,1 M fosfatnim pufrom (pH=7,4) do oznake.

Kontrolna raztopina

50 μ L 0,1 M fosfatnega puфра (pH=7,4) smo dodali 100 μ L 156 μ M raztopine NBT in 100 μ L 468 μ M raztopine NADH.

Vzorčne raztopine

Osnovne raztopine smo nato ustrezno redčili z 0,1 M fosfatnim pufrom (pH=7,4), da smo dobili koncentracije 100; 80; 60 in 40 μ g/mL. 50 μ L posamezne redčitve smo dodali 100 μ L 156 μ M raztopine NBT in 100 μ L 468 μ M raztopine NADH.

Postopek izvedbe

Reakcija v kontrolni in vzorčnih raztopinah začne teči po dodatku 10 μ L 60 μ M PMS. Po 5 minutni inkubaciji pri sobni temperaturi smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 560 nm.

Enačba 8: Določitev odstotka inhibicije nastanka superoksidnega radikala pod vplivom izvlečka lubja navadne jelke, piknogenola, BHA in askorbinske kisline

$$\% \text{ inhibicije } O_2^{\cdot -} = ((A_{\text{kontrola}} - A_{\text{vzorec}}) / A_{\text{kontrola}}) * 100$$

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

Test za vsako vzorčno raztopino različne koncentracije kot tudi kontrolno raztopino smo izvedli neodvisno in v celoti trikrat. Za končni izračun smo uporabili povprečje omenjenih treh vrednosti.

V okviru delne validacije smo ovrednotili dnevno in meddnevno ponovljivost metod. Pri tem smo posamezno metodo izvedli neodvisno in v celoti trikrat za vsako vzorčno raztopino različne koncentracije kot tudi kontrolno raztopino. Za končni izračun smo uporabili povprečje treh meritev. Rezultate podamo kot relativno standardno deviacijo (RSD) podatkov. V našem primeru si želimo metodo, pri kateri je RSD za dnevno in meddnevno ponovljivost $\leq 10\%$, vendar je dopustno odstopanje, ko je RSD $\leq 20\%$.

Dnevna ponovljivost metode označuje natančnost metode znotraj kratkega časovnega obdobja (v našem primeru znotraj enega dne).

Meddnevna ponovljivost je definirana kot dolgoročna natančnost izmerjenih podatkov. Ugotoviti želimo ali bo metoda zagotavljala enake in ponovljive rezultate znotraj istega laboratorija tudi po končanem razvoju metode. Ponovljivost metode moramo preizkusiti v več zaporednih dnevih.

5.1 METODA ZA DOLOČANJE REDUCIRAJOČE MOČI ANTIOKSIDANTA

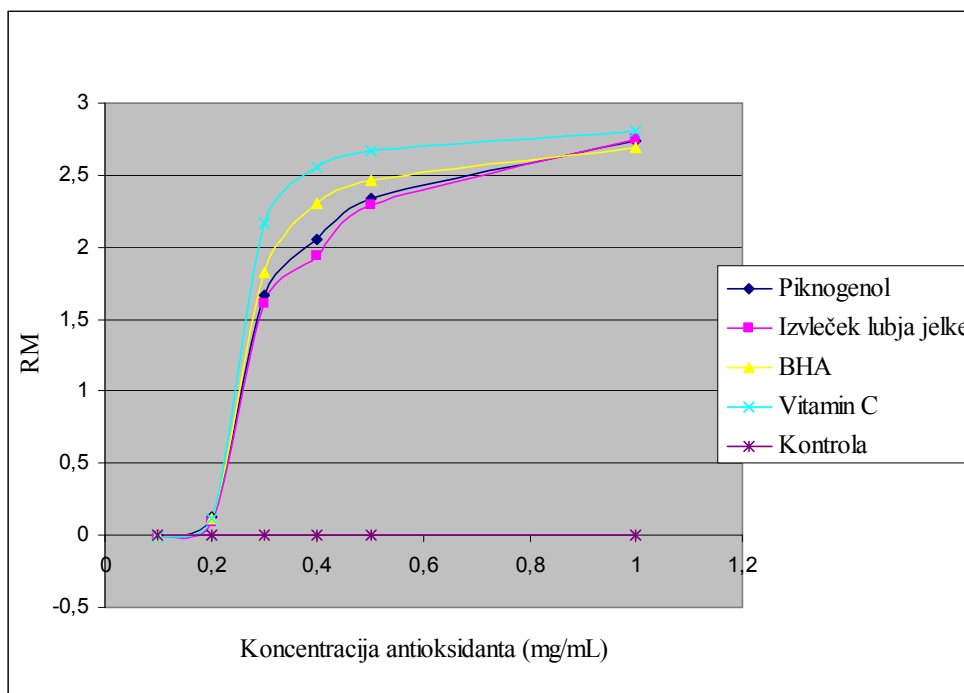
Princip metode

Prisotnost antioksidanta povzroči redukcijo Fe^{3+} iona v Fe^{2+} ion, ki nato reagira z FeCl_3 . Pri tem pride do nastanka $\text{Fe}^{+2}\text{-Fe}^{+3}$ kompleksa in le-to lahko nato spremljamo spektrofotometrično.

Zaradi nelinearnosti metode v koncentracijskem območju 0,1–1,0 mg/mL smo kot merilo za antioksidativno aktivnost vzorcev uporabili IC_{50} . IC_{50} ($1/2$ maksimalne inhibitorne koncentracije) je merilo uspešnosti spojin pri reakcijah inhibicije. To kvantitativno merilo

kaže, koliko določene snovi (inhibitorja) je potrebno za zaviranje biološkega procesa ali sestavnega dela procesa, in sicer za polovico.

Pri metodi za določanje reducirajoče moči antioksidanta IC_{50} predstavlja koncentracijo, s katero dosežemo polovico maksimalne antioksidativne aktivnosti (**Slika 22**).



Slika 22: Graf reducirajoče moči v odvisnosti od koncentracije (mg/mL) antioksidantov

Vrednosti IC_{50} (**Preglednica III**) so si med seboj zelo podobne. IC_{50} izvlečka lubja navadne jelke je le za 1,4 % višji od IC_{50} piknogenola. Nekoliko nižji IC_{50} v primerjavi z izvlečkom navadne jelke pa imata BHA (4,2 % nižja vrednost) in vitamin C (7,4 % nižja vrednost).

Preglednica III: Vrednosti IC_{50} za posamezni vzorec

Vzorec	IC_{50} (mg/mL)
Izvleček lubja navadne jelke	0,284
Piknogenol	0,280
BHA	0,272
Vitamin C	0,263

Glede na rezultate validacije dnevne in meddnevne ponovljivosti (**Preglednica IV**) lahko rečemo, da metoda daje dobro ponovljive rezultate.

Preglednica IV: Validacija dnevna in meddnevne ponovljivosti

Vzorec (mg/mL)	Dnevna ponovljivost (%)	Meddnevna ponovljivost (%)
Izvleček lubja navadne jelke (1,0)	1,5	3,6
Izvleček lubja navadne jelke (0,5)	1,1	7,1
Izvleček lubja navadne jelke (0,4)	2,1	14,2
Izvleček lubja navadne jelke (0,3)	4,8	15,0
Izvleček lubja navadne jelke (0,2)	3,5	11,4
Izvleček lubja navadne jelke (0,1)	0,6	5,4
Piknogenol (1,0)	2,2	2,4
Piknogenol (0,5)	0,6	6,2
Piknogenol (0,4)	3,7	14,4
Piknogenol (0,3)	4,6	12,1
Piknogenol (0,2)	4,2	6,9
Piknogenol (0,1)	9,5	13,7
BHA (1,0)	0,8	3,9
BHA (0,5)	1,2	1,7
BHA (0,4)	1,0	2,1
BHA (0,3)	1,9	3,7
BHA (0,2)	0,7	3,9
BHA (0,1)	7,4	8,7
Vitamin C (1,0)	1,2	6,1
Vitamin C (0,5)	2,6	5,4
Vitamin C (0,4)	1,9	1,5
Vitamin C (0,3)	2,2	10,1
Vitamin C (0,2)	8,8	20,0
Vitamin C (0,1)	4,6	10,1

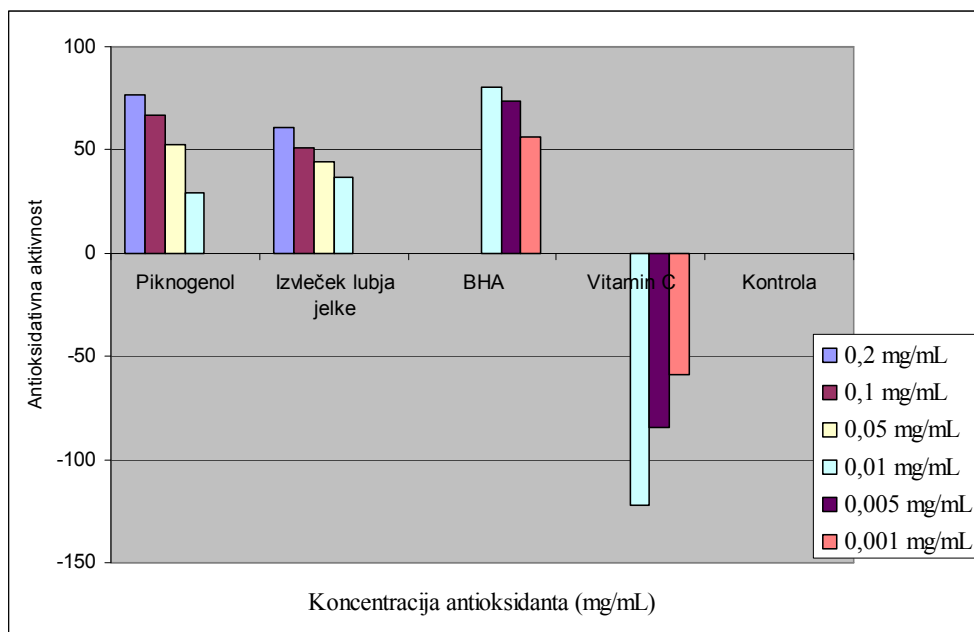
5.2 METODA ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI Z β -KAROTENOM

Princip metode

Pri razpadu linolne kisline se tvorijo radikali in le-ti nato reagirajo z β -karotenom. Pri tem pride do razbarvanja oranžnega β -karotena. Ob prisotnosti antioksidanta pa pride do nevtralizacije radikalov, tako tistih iz linolne kisline, kot tudi vseh ostalih, ki nastanejo tekom reakcije.

Iz **Slike 24** je razvidno, da z naraščanjem koncentracije antioksidanta narašča tudi antioksidativna aktivnost. Največjo antioksidativno aktivnost izkazuje BHA, in sicer že pri koncentraciji 0,01 mg/mL. Nad to koncentracijo dosežejo vrednosti plato. Antioksidativna aktivnost izvlečka lubja navadne jelke je pri koncentraciji 0,01 mg/mL 1,26-krat večja kot pri piknogenolu enake koncentracije (**Preglednica VIII**). Pri povišanju koncentracije na

0,2 mg/mL pa antioksidativna aktivnost pade, in sicer na 0,8-kratno vrednost. Iz tega lahko sklepamo, da ima izvleček lubja navadne jelke veliko afiniteto do radikalov, ki oksidirajo β -karoten in povzročijo razbarvanje raztopine, medtem ko je njegova kapaciteta manjša. Pri vitaminu C pride do prooksidativnega delovanja pri vseh uporabljenih koncentracijah (0,001–0,2 mg/mL), poleg tega pa tudi pri nižjih koncentracijah, ki smo jih preverjali med optimizacijo metode (rezultatov ne prikazujemo).



Slika 24: Graf antioksidativne aktivnosti v odvisnosti od koncentracije (mg/mL) antioksidantov

Preglednica VIII: Antioksidativna aktivnost vzorcev po metodi za določanje antioksidativne aktivnosti z β -karotenom

Vzorec (mg/mL)	Antioksidativna aktivnost (AA v %)	AA glede na piknogenol
Piknogenol (0,20)	76,6	1
Piknogenol (0,01)	29,4	1
Izvleček lubja navadne jelke (0,20)	61,1	0,80
Izvleček lubja navadne jelke (0,01)	37,0	1,26
BHA (0,01)	80,4	2,73
Vitamin C (0,01)	-122,4	-4,16

Glede na to, da so odstopanja rezultatov (**Preglednica IX**), ki smo jih določili v okviru dnevne in meddnevne ponovljivosti relativno visoka, je metoda za določanje antioksidativne aktivnosti z β -karotenom manj primerna.

Preglednica IX: Validacija dnevna in meddnevne ponovljivosti

Vzorec (mg/mL)	Dnevna ponovljivost (%)	Meddnevna ponovljivost (%)
Izvleček lubja navadne jelke (0,2)	2,4	17,6
Izvleček lubja navadne jelke (0,01)	5,3	24,0
Izvleček lubja navadne jelke (0,05)	7,2	30,0
Izvleček lubja navadne jelke (0,01)	9,0	26,3
Piknogenol (0,2)	20,1	33,2
Piknogenol (0,1)	25,2	46,3
Piknogenol (0,05)	26,8	48,0
Piknogenol (0,01)	49,4	22,3
BHA (0,01)	4,5	14,6
BHA (0,005)	7,1	15,6
BHA (0,001)	52,3	22,3
Vitamin C (0,01)	16,3	20,6
Vitamin C (0,005)	14,8	34,4
Vitamin C (0,001)	11,3	64,1

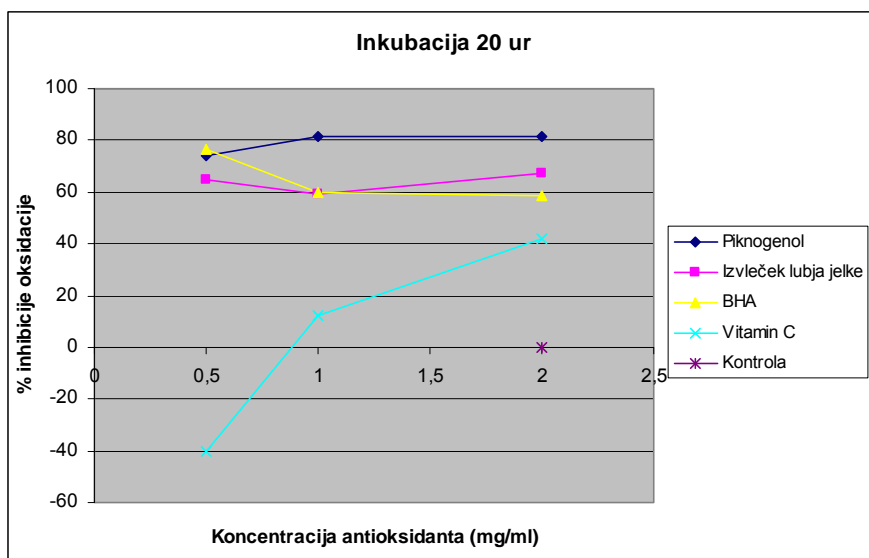
5.3 METODA ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI S TIOACIANATOM

Princip metode

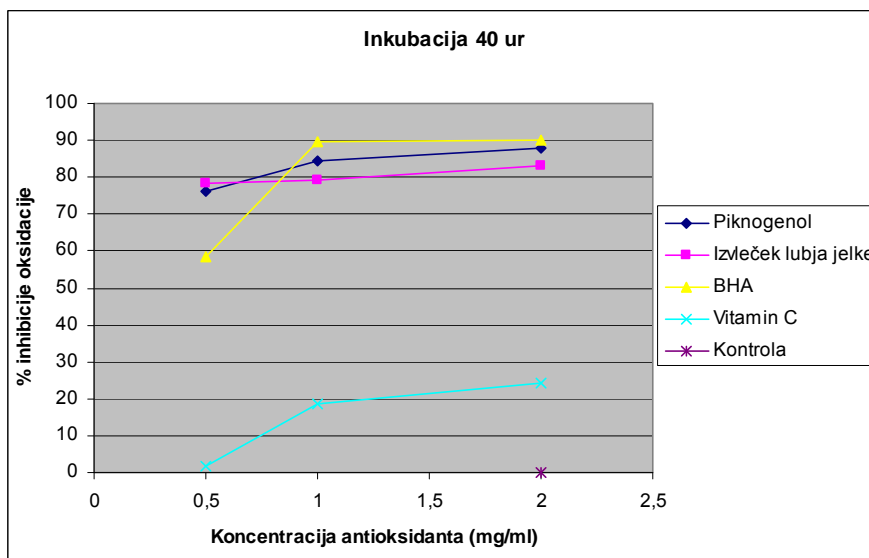
Pri lipidni peroksidaciji nastajajo peroksidi, ki povzročijo oksidacijo Fe^{2+} iona v Fe^{3+} ion. Fe^{3+} ion v obliki železovega(III) tiocianata pa določamo spektrofotometrično.

Pri tiocianatni metodi so meritve absorbanc vzorcev potekale po 20 in 40 urah po inkubaciji. Iz **Slike 25** in **Slike 26** je razvidno, da z naraščajočo koncentracijo antioksidantov narašča tudi odstotek inhibicije oksidacije linolne kisline tako po 20 kot po 40 urah. Edina izjema je BHA, pri katerem je po 20 urah inkubacije odstotek inhibicije oksidacije linolne kisline obratno sorazmeren s koncentracijo. Po 20 urah se pri vitaminu C v koncentraciji 0,5 mg/mL izkaže celo prooksidativno delovanje. Pri nizkih koncentracijah se kaže trend, da bi lahko imel izvleček lubja navadne jelke večjo antioksidativno aktivnost kot piknogenol (**Slika 26**).

Iz **Preglednice X** je razvidno, da so izvleček lubja jelke, piknogenol in BHA pri tiocianatni metodi po antioksidativni aktivnosti med seboj primerljivi. Antioksidativna aktivnost izvlečka lubja jelke in BHA pri koncentracijah 0,5 mg/mL in 2 mg/mL se relativno glede na piknogenol spremeni od 0,95–1,03, kar predstavlja le največ 5-odstotno razliko.



Slika 25: Graf antioksidativne aktivnosti v odvisnosti od koncentracije antioksidantov (inkubacija 20 ur)



Slika 26: Graf antioksidativne aktivnosti v odvisnosti od koncentracije antioksidantov (inkubacija 40 ur)

Preglednica X: Antioksidativna aktivnost (AA) vzorcev po metodi za določanje antioksidativne aktivnosti s tiocianatom po 40h

Vzorec (mg/mL)	Antioksidativna aktivnost (AA v %)	AA glede na piknogenol
Piknogenol (2,0)	87,7	1
Piknogenol (0,5)	76,1	1
Izvleček lubja navadne jelke (2,0)	83,1	0,95
Izvleček lubja navadne jelke (0,5)	78,4	1,03
BHA (2,0)	90,2	1,03
Vitamin C (2,0)	24,0	0,27

Preglednica XI: Validacija dnevna in meddnevne ponovljivosti

Vzorec (mg/mL)	Dnevna ponovljivost (%)	Meddnevna ponovljivost (%)
Izvleček lubja navadne jelke (2,0)	224,0	11,2
Izvleček lubja navadne jelke (1,0)	172,8	17,7
Izvleček lubja navadne jelke (0,5)	4780,1	29,6
Piknogenol (2,0)	456,2	19,2
Piknogenol (1,0)	249,4	28,7
Piknogenol (0,5)	49,1	29,5
BHA (2,0)	811,2	7,7
BHA (1,0)	247,0	7,9
BHA (0,5)	457,8	85,8
Vitamin C (2,0)	333,6	117,0
Vitamin C (1,0)	155,6	126,8
Vitamin C (0,5)	158,9	917,7

Glede na to, da so odstopanja rezultatov, ki smo jih določili v okviru dnevne in meddnevne ponovljivosti (**Preglednica XI**) relativno visoka, je tiocianatna metoda za določanje antioksidativne aktivnosti manj primerna.

5.4 METODA ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI Z 2-DEOKSI-D-RIBOZO

Princip metode

Pri Fentonovi reakciji nastanejo hidroksilni radikali, ki oksidirajo 2-deoksi-*D*-ribozo. Dodatek antioksidanta k raztopini 2-deoksi-*D*-riboze povzroči zmanjšano oksidacijo 2-deoksi-*D*-riboze. Reakcijo spremljamo spektrofotometrično

Preglednica V prikazuje primerjavo metod za določanje odstotka inhibicije oksidacije 2-deoksi-*D*-riboze glede na različne literaturne vire (28–33). Omenjena metoda nam je povzročila največ težav pri izvedbi, kajti podatki v literaturi so bili nepopolni ali pa so bile podane koncentracije, ki so bile za naše vzorce popolnoma neustrezne. Metodo smo nato prilagodili po literaturnem viru (23), v katerem je bil naveden poskus, ki je bil popolnoma izvedljiv v celoti.

Preglednica V: Primerjava metod za določanje odstotka inhibicije oksidacije 2-deoksi-*D*-riboze

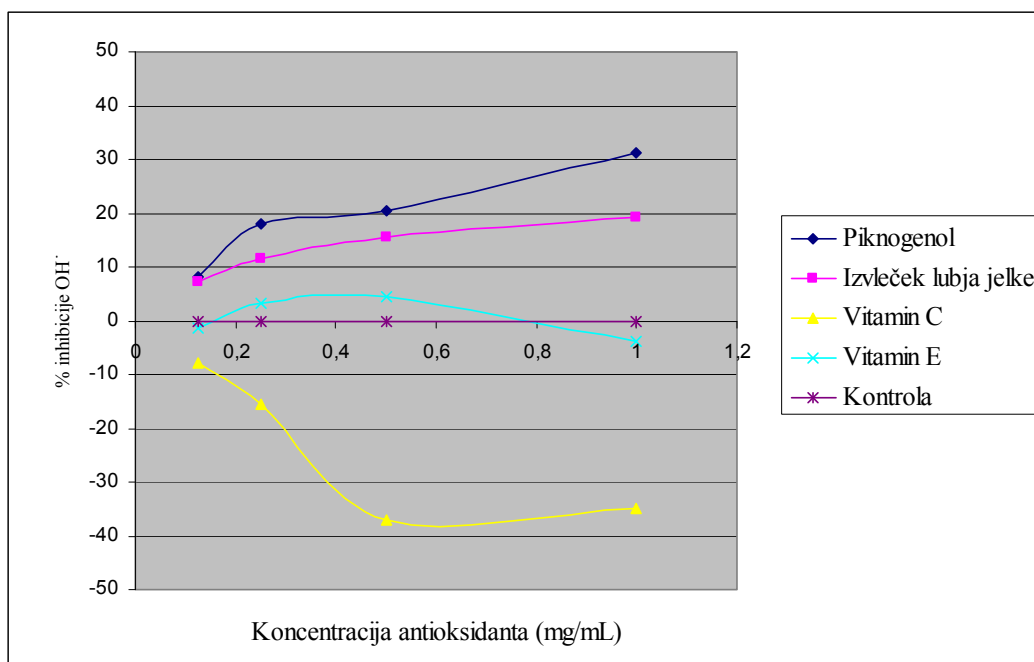
Reagenti*	Uporabljena metoda (23)	Metoda 1 (28)	Metoda 2 (29)	Metoda 3 (30)	Metoda 4 (31)	Metoda 5 (32)	Metoda 6 (33)
FeCl ₃ (mM)	0,100	0,0333	0,00038		0,050	0,0333	9,40
FeSO ₄ (mM)				0,500	0,100		
Vitamin C (mM)	0,050	0,0333	0,00038		0,050	0,0333	0,0375 **
EDTA (mM)	0,050	0,0347	0,00039	0,5	0,052	0,0333	0,038
H ₂ O ₂ (mM)	0,5	1	0,0038	0,5 **	0,5	0,33	1,05
2-deoksi- <i>D</i> -riboza (mM)	1,4	0,00083	0,0106	0,5	1,4	0,93	1,05
Fosfatni pufer (mM)	10	20	20	20	20	20	10
Vzorec	+	+	+	+	+	+	+
Inkubacija	60 min, 37 °C	60 min, 37 °C	30 min, 37 °C	4 h, 37 °C	60 min, 37 °C	60 min, sobna T	60 min, 37 °C
TBA (v 0,05 M NaOH) % (m/v)		0,33				0,33	0,31
TBA % (m/v)	0,125		0,38	0,25	0,25		
TCA % (m/v)	2,5	0,93		0,70 ***	5	0,93	0,88
NaOH (M)			0,38				
H ₃ PO ₄ % (m/v)			3,77				
Segrevanje	100 °C 30 min	100 °C 15 min	85 °C 20 min	100 °C 10 min	100 °C 15 min	100 °C 30 min	80 °C 20 min
Ohladitev (led)	+	+		+			+
Absorbanca (nm)	535	532	535	520	532	535	532

* Končne koncentracije reagentov, preračunane na celotni volumen reakcijske zmesi

** Začne reakcijo

*** Konča reakcijo

Slika 23 prikazuje odvisnost inhibicije oksidacije 2-deoksi-*D*-riboze od koncentracije antioksidantov. Z naraščanjem koncentracije sorazmerno narašča tudi odstotek inhibicije oksidacije 2-deoksi-*D*-riboze oz. antioksidativna aktivnost, razen pri vitaminih C in E, ki pri višjih koncentracijah spodbudita nastajanje hidroksilnega radikala ter posledično povečata obarvanje reakcijske raztopine oz. izkazujeta prooksidativno delovanje.



Slika 23: Graf inhibicije oksidacije 2-deoksi-*D*-riboze v odvisnosti od koncentracije (mg/mL) antioksidantov

Številčne vrednosti prikazujemo v **Preglednici VI**. Piknogenol povzroči največji odstotek inhibicije oksidacije 2-deoksi-*D*-riboze, in sicer 31,1 %, sledi pa mu izvleček lubja navadne jelke z 19,1 % (pri koncentraciji 1,00 mg/mL). Vitamina C in E delujeta pri tej koncentraciji prooksidativno. Povečanje antioksidativne aktivnosti piknogenola v odvisnosti od povečanja koncentracije je bolj izrazito kot pri izvlečku lubja jelke. Tako ima izvleček lubja jelke pri koncentraciji 0,250 mg/mL 0,87-kratno aktivnost piknogenola, pri štirikrat večji koncentraciji (1,00 mg/mL) pa ima le še 0,61-kratno aktivnost.

Preglednica VI: Antioksidativna aktivnost (AA) vzorcev po metodi za določanje antioksidativne aktivnosti z 2-deoksi-*D*-ribozo

Vzorec (mg/mL)	Antioksidativna aktivnost (AA v %)	AA glede na piknogenol
Piknogenol (1,00)	31,1	1
Piknogenol (0,250)	17,9	1
Izvleček lubja navadne jelke (1,00)	19,1	0,61
Izvleček lubja navadne jelke (0,250)	15,5	0,87
Vitamin C (1,00)	-34,8	-1,12
Vitamin E (1,00)	-3,8	-0,12

Metoda ne daje dobro ponovljivih rezultatov (**Preglednica VII**).

Preglednica VII: Validacija dnevna in meddnevne ponovljivosti

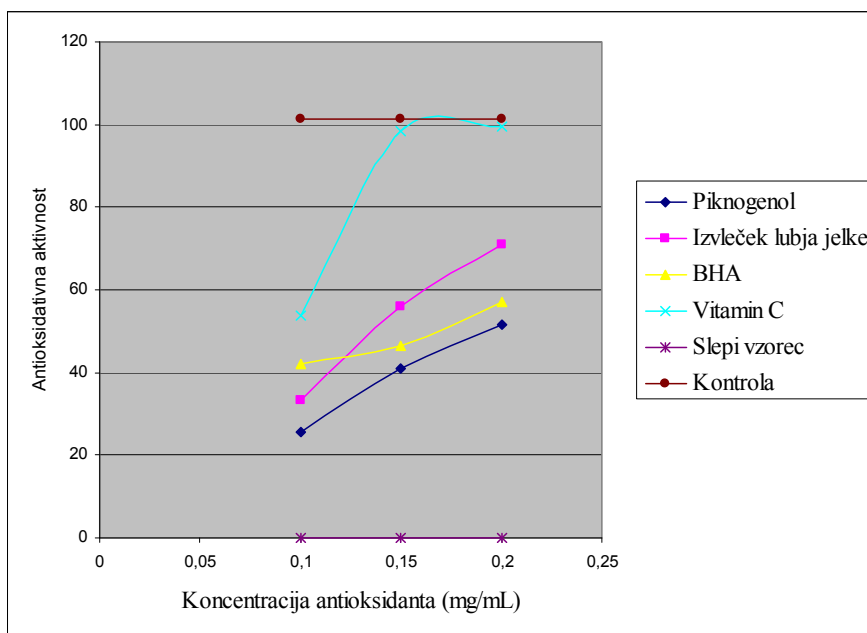
Vzorec (mg/mL)	Dnevna ponovljivost (%)	Meddnevna ponovljivost (%)
Izvleček lubja navadne jelke (1,0)	13,7	18,4
Izvleček lubja navadne jelke (0,5)	14,5	18,3
Izvleček lubja navadne jelke (0,25)	35,5	37,3
Izvleček lubja navadne jelke (0,125)	18,5	67,5
Piknogenol (1,0)	51,0	30,4
Piknogenol (0,5)	35,5	27,4
Piknogenol (0,25)	54,2	82,8
Piknogenol (0,125)	28,6	83,1
BHA (1,0)	11,3	52,0
BHA (0,5)	10,5	28,2
BHA (0,25)	43,3	24,4
BHA (0,125)	55,7	67,4
Vitamin E (1,0)	1328,7	295,1
Vitamin E (0,5)	153,5	146,3
Vitamin E (0,25)	1032,2	132,9
Vitamin E (0,125)	90,9	357,7

5.5 DPPH METODA ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

Princip metode

DPPH je stabilen radikal in sprejme vodikov elektron od antioksidanta. Pri omenjeni reakciji pride do redukcije in posledica je sprememba barve iz vijolične v rumeno.

Pri metodi DPPH se pokaže, da ima izjemno sposobnost reagiranja z DPPH-radikali vitamin C (**Slika 27**). Pri koncentraciji 0,15 mg/mL je njegova antioksidativna aktivnost 99-odstotna. Izvleček lubja jelke ima 1,37-krat večjo antioksidativno aktivnost kot piknogenol pri enaki koncentraciji (0,20 mg/mL) (**Preglednica XII**). Pri povišanju koncentracije iz 0,10 mg/mL na 0,20 mg/mL se antioksidativna aktivnost izvlečka iz lubja navadne jelke poveča le za 5 % glede na piknogenol. Metoda DPPH je eden izmed najhitrejših preizkusov za določanje antioksidativne aktivnosti in zato je tudi najpogosteje uporabljena v praksi. Pomembno pa je še dejstvo, da pri metodi DPPH določamo le antioksidativno aktivnost spojin in ne tudi njihovih prooksidativnih lastnosti (28).



Slika 27 Graf antioksidativne aktivnosti v odvisnosti od koncentracije (mg/mL) antioksidantov

Preglednica XII: Antioksidativna aktivnost vzorcev po metodi DPPH

Vzorec (mg/mL)	Antioksidativna aktivnost (AA v %)	AA glede na piknogenol
Piknogenol (0,2)	51,7	1
Piknogenol (0,1)	25,6	1
Izvleček lubja navadne jelke (0,2)	71	1,37
Izvleček lubja navadne jelke (0,1)	33,3	1,3
BHA (0,2)	57	1,1
Vitamin C (0,2)	99	1,9

Metoda daje dobro ponovljive rezultate (Preglednica XIII).

Preglednica XIII: Validacija dnevna in meddnevne ponovljivosti

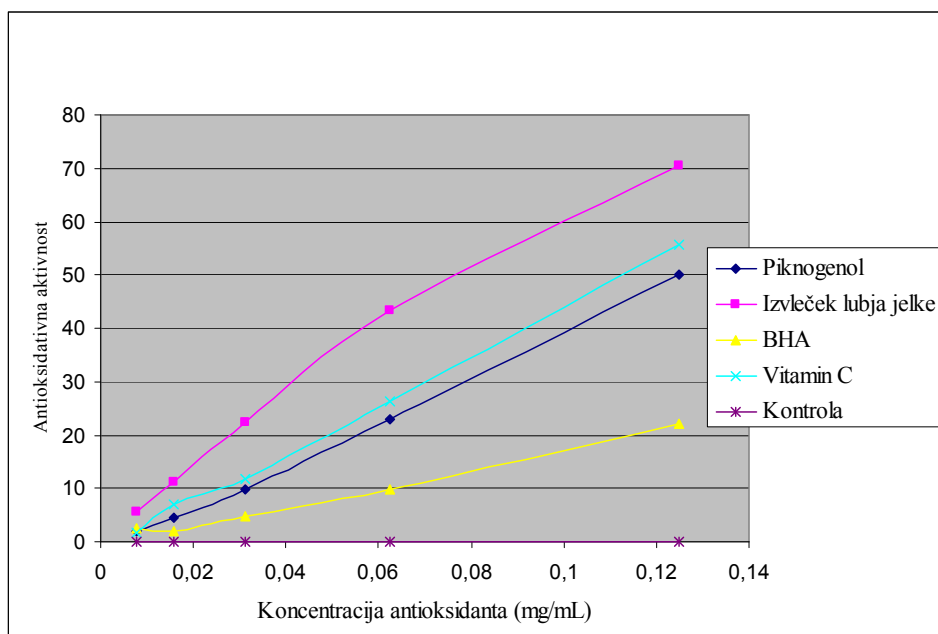
Vzorec (mg/mL)	Dnevna ponovljivost (%)	Meddnevna ponovljivost (%)
Izvleček lubja navadne jelke (0,20)	13,1	8,6
Izvleček lubja navadne jelke (0,15)	8,1	9,6
Izvleček lubja navadne jelke (0,1)	10,4	7,4
Piknogenol (0,20)	13,9	15,5
Piknogenol (0,15)	14,8	11,0
Piknogenol (0,10)	5,1	12,1
BHA (0,20)	1,9	6,6
BHA (0,15)	4,5	8,3
BHA (0,10)	14,2	6,5
Vitamin C (0,20)	0,4	0,6
Vitamin C (0,15)	0,7	0,5
Vitamin C (0,10)	2,8	10,0

5.6 ABTS METODA ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

Princip metode

Amonijev persulfat povzroči nastanek ABTS[•] radikalov. Ko raztopini ABTS[•] dodamo antioksidant, pride do nastanka reducirane oblike molekule in zaradi tega do razbarvanja raztopine. Reakcijo zaznamo s padcem absorbance.

Antioksidativna aktivnost (**Slika 28**) linearno narašča z naraščajočo koncentracijo antioksidanta. Izvleček lubja navadne jelke izkazuje večjo antioksidativno aktivnost kot piknogenol, BHA in vitamin C pri enakih koncentracijah. Pri nižjih koncentracijah antioksidantov (0,0078–0,01563 mg/mL) bistvenih razlik v antioksidativni aktivnosti ne opazimo, medtem ko so le-te pri višjih koncentracijah (0,03125–0,125 mg/mL) bolj izrazite.



Slika 28: Graf antioksidativne aktivnosti v odvisnosti od koncentracije (mg/mL) antioksidantov

Iz **Preglednice XIV** je razvidno, da doseže izvleček lubja navadne jelke svojo največjo antioksidativno aktivnost glede na piknogenol pri koncentraciji 0,0625 mg/mL, in sicer je le-ta 1,89-krat večja kot pri piknogenolu enake koncentracije. Pri koncentraciji 0,125 mg/mL se razmerje zniža na 1,41-kratno aktivnost.

Preglednica XIV: Antioksidativna aktivnost vzorcev po metodi ABTS

Vzorec (mg/mL)	Antioksidativna aktivnost (AA v %)	AA glede na piknogenol
Piknogenol (0,125)	50	1
Piknogenol (0,0625)	22,9	1
Izvleček lubja navadne jelke (0,125)	70,4	1,41
Izvleček lubja navadne jelke (0,0625)	43,2	1,89
BHA (0,125)	22,2	0,44
Vitamin C (0,125)	55,8	1,12

Metoda daje slabo ponovljive rezultate tako pri določanje dnevne kot meddnevne ponovljivosti (**Preglednica XV**).

Preglednica XV: Validacija dnevna in meddnevne ponovljivosti

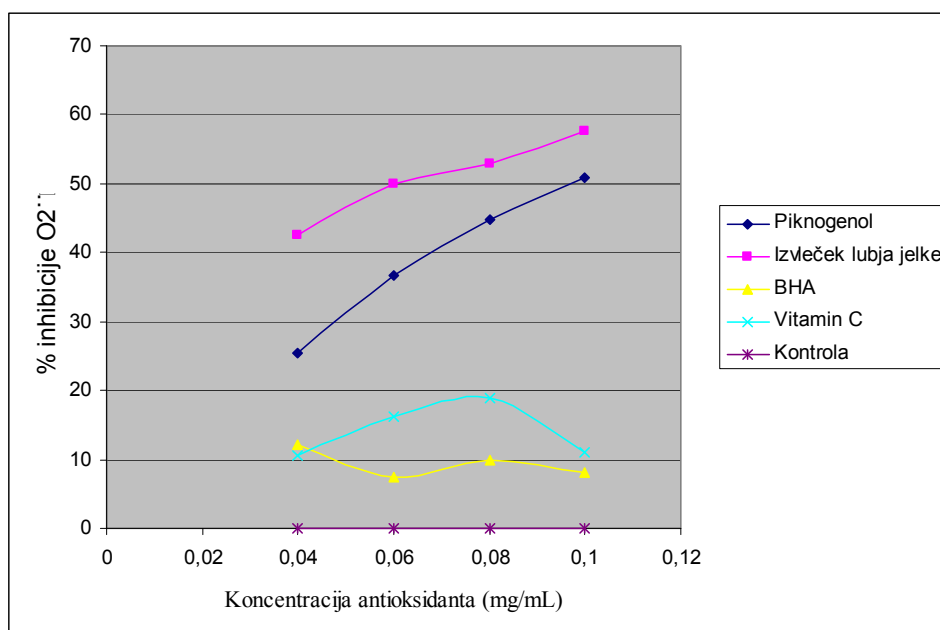
Vzorec (mg/mL)	Dnevna ponovljivost (%)	Meddnevna ponovljivost (%)
Izvleček lubja navadne jelke (0,125)	5,5	1,9
Izvleček lubja navadne jelke (0,0625)	5,9	2,8
Izvleček lubja navadne jelke (0,03125)	10,2	2,9
Izvleček lubja navadne jelke (0,01563)	14,7	11,3
Izvleček lubja navadne jelke (0,0078)	96,5	33,4
Piknogenol (0,125)	10,2	8,3
Piknogenol (0,0625)	5,2	0,5
Piknogenol (0,03125)	10,5	5,9
Piknogenol (0,01563)	20,1	21,4
Piknogenol (0,0078)	31,7	35,2
BHA (0,125)	5,3	8,1
BHA (0,0625)	33,1	39,1
BHA (0,03125)	97,6	66,8
BHA (0,01563)	184,5	99,0
BHA (0,0078)	184,4	56,5
Vitamin C (0,125)	4,0	7,3
Vitamin C (0,0625)	4,9	13,1
Vitamin C (0,03125)	16,3	30,5
Vitamin C (0,01563)	31,1	50,2
Vitamin C (0,0078)	330,9	130

5.7 METODA ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI Z NADH

Princip metode

PMS povzroči oksidacijo NADH in pri tem nastane reducirana oblika PMS. Le-ta pa povzroči pretvorbo oksidiranega NBT-ja v reducirano obliko, kar se pokaže kot nastanek kompleksa vijolične barve.

Z naraščanjem koncentracije antioksidanta narašča odstotek inhibicije superoksidnega radikala ($O_2^{\cdot-}$) in posledično njegova antioksidativna aktivnost. Izvleček lubja navadne jelke ima boljšo antioksidativno aktivnost kot piknogenol, BHA in vitamin C. Največja razlika pri odstotku inhibicije $O_2^{\cdot-}$ radikala se kaže pri koncentraciji 0,04 mg/mL, in sicer je pri piknogenolu ta vrednost 25,5 %, medtem ko je pri izvlečku lubja navadne jelke 42,5 %. Pri koncentraciji 0,10 mg/mL pa ta razlika ni več tako velika, kajti odstotek inhibicije $O_2^{\cdot-}$ je pri piknogenolu 51 %, pri izvlečku lubja jelke pa 57,7 %. Vitamin C doseže največji odstotek inhibicije $O_2^{\cdot-}$ pri koncentraciji 0,080 mg/mL, in sicer 18,9 %, potem pa odstotek inhibicije pade na 11,1 %. Nasprotno se pri BHA z naraščajočo koncentracijo odstotek inhibicije $O_2^{\cdot-}$ znižuje.



Slika 29: Graf odstotka inhibicije superoksidnega radikala v odvisnosti od koncentracije (mg/mL) antioksidantov

Iz **Preglednice XVI** je razvidno, da ima izvleček lubja navadne jelke pri koncentraciji 0,04 mg/mL občutno večjo antioksidativno aktivnost v primerjavi s piknogenolom, BHA in vitaminom C enake koncentracije.

Preglednica XVI: Antioksidativna aktivnost vzorcev po metodi za določanje antioksidativne aktivnosti z NADH

Vzorec (mg/mL)	Antioksidativna aktivnost (AA v %)	AA glede na piknogenol
Piknogenol (0,100)	50,96	1
Piknogenol (0,040)	25,52	1
Izvleček lubja navadne jelke (0,100)	57,73	1,13
Izvleček lubja navadne jelke (0,040)	42,47	1,66
BHA (0,100)	8,18	0,16
Vitamin C (0,100)	11,06	0,22

Rezultati dnevne in meddnevne ponovljivosti (**Preglednica XVII**) kažejo, da metoda ne daje ponovljivih rezultatov.

Preglednica XVII: Validacija dnevne in meddnevne ponovljivosti

Vzorec (mg/mL)	Dnevna ponovljivost (%)	Meddnevna ponovljivost (%)
Izvleček lubja navadne jelke (0,1)	1,9	1,8
Izvleček lubja navadne jelke (0,08)	2,7	2,9
Izvleček lubja navadne jelke (0,06)	6,2	7,2
Izvleček lubja navadne jelke (0,04)	18,0	21,4
Piknogenol (0,1)	8,7	4,4
Piknogenol (0,08)	9,0	4,5
Piknogenol (0,06)	0,8	10,1
Piknogenol (0,04)	8,5	2,1
BHA (0,1)	73,1	56,4
BHA (0,08)	5,6	56,3
BHA (0,06)	37,8	48,7
BHA (0,04)	16,9	26,4
Vitamin C (0,1)	83,6	80,0
Vitamin C (0,08)	11,0	54,2
Vitamin C (0,06)	15,8	22,5
Vitamin C (0,04)	26,6	30,0

6 SKLEPI

- 1) Pri metodi za določanje reducirajoče moči antioksidanta in metodi za določanje antioksidativne aktivnosti s tiocianatom nismo dokazali bistvenih razlik med antioksidativno aktivnostjo piknogenola in izvlečka lubja navadne jelke.
- 2) Pri metodi za določanje antioksidativne aktivnosti z 2-deoksi-*D*-ribozo je antioksidativna aktivnost izvlečka lubja navadne jelke glede na aktivnost piknogenola nižja za 28 %.
- 3) Izvleček lubja navadne jelke ima pri metodi za določanje antioksidativne aktivnosti z β -karotenom pri nižji koncentraciji 1,26-kratno aktivnost glede na piknogenol. Pri povišanju koncentracije pa je antioksidativna aktivnost le še 0,8-kratna glede na antioksidativno aktivnost piknogenola. Zaključimo lahko, da ima izvleček lubja navadne jelke večjo afiniteto do radikalov, ki oksidirajo β -karoten, vendar pa je njegova kapaciteta manjša v primerjavi s piknogenolom.
- 4) Največje antioksidativne aktivnosti izvlečka lubja navadne jelke v primerjavi z drugimi proučevanimi vzorci smo dobili z metodama DPPH in ABTS ter z metodo z NADH. Antioksidativna aktivnost izvlečka lubja navadne jelke je pri metodi DPPH za povprečno 33,5 % boljša kot pri piknogenolu, pri metodi z NADH za povprečno 39,5 % in pri metodi ABTS za povprečno 65 %.
- 5) Metodi, ki dajeta dobre dnevne in meddnevne ponovljive rezultate sta metoda za določanje reducirajoče moči antioksidanta ter DPPH metoda za določanje antioksidativne aktivnosti. Med slabo ponovljive metode pa uvrščamo metodo za določanje antioksidativne aktivnosti z 2-deoksi-*D*-ribozo, z β -karotenom, s tiocianatom, z NADH ter ABTS metodo.
- 6) Na osnovi zaključkov, do katerih smo prišli tekom diplomskega dela menimo, da je navadna jelka lahko alternativni vir obmorskemu boru za pridobivanje proantocianidinov.

7 LITERATURA

- 1) Manček B, Pečar S: Radikali in zaščita pred poškodbami z radikali v bioloških sistemih. *Farm Vestn* 2001; 52: 133-144.
- 2) Perdih A, Pečar S: Katalitični antioksidanti kot nove zdravilne učinkovine. *Farm Vestn* 2006; 57: 24-29.
- 3) Sanchez-Moreno C: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Science and Technology International* 2002; 8: 121.
- 4) Druge W: Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function, *Physiological Reviews* 2002; 1: 47-95.
- 5) Pečar S: Antioksidanti. *Prehranska dopolnila-zdravila ali hrana*. Fakulteta za farmacijo 2001; 97-104
- 6) Tišler M: *Organska kemija*. 3. izdaja, Državna založba Slovenije, Ljubljana 1991; 177-192.
- 7) Moure A, Cruz J.M, Franco D, Dominguez J.M, Sineiro J, Dominguez H, Nunez M. J, Parajo J. C: Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry* 2001; 72: 145-171
- 8) http://redox.site50.net/online%20kursevi/antioxidanti%20online/antioxidanti.php#p_r_aox_zas_neen Datum dostopa: 2.10.2010
- 9) *The Merck Indeks*, 12th Ed; Merck Research Laboratories Division of Merck & Co.; Inc Whitehouse Station, NJ
- 10) Bast A, Haenen G.R.M.M: The toxicity of antioxidants and their metabolites. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2002; 11: 251–258
- 11) <http://www.enzyme-database.org/reaction/phenol/glossary/> Datum dostopa: 6.10.2010
- 12) www.farma-drustvo.si/gradivo_p/...2006/xv_creslovine.ppt Datum dostopa: 6.10.2010
- 13) Vrhovšek U: Funkcionalna hrana, 21. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož. 2001
- 14) Zule J, Kozjan G: Polifenoli v različnih vrstah macesna (*Larix* spp.). *Zbornik gozdarstva in lesarstva* 2008; 86: 51-58
- 15) <http://www.gobe.si/Drevesa/AbiesAlba> Datum dostopa: 3.10.2010
- 16) http://en.wikipedia.org/wiki/Abies_alba Datum dostopa: 3.10.2010

- 17) Petauer T: Leksikon rastlinskih bogastev. 1.izdaja. Tehniška založba Slovenije, Ljubljana 1993; 11: 438.
- 18) Diaci J: Ohranitveno gospodarjenje z jelko : zbornik razširjenih povzetkov predavanj / XXVII. Gozdarski študijski dnevi. Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire, Ljubljana, 2009
- 19) www.sibirski-cedra.com/attachment.php?id_attachment=28 Datum dostopa: 4.10.2010
- 20) Packer L, Rimbach G, Virgili F: Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, Pycnogenol. *Free Radical Biology & Medicine* 1999; 27: 704-724.
- 21) <http://www.evergreenspecies.com/2008/05/maritime-pine-pinus-pinaster.html> Datum dostopa: 5.10.2010
- 22) Amarowicz R, Pegg R.B, Rahimi-Moghaddam P, Barl B, Weil J.A: Free-radical scavenging capacity and antioksidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry* 2004; 84: 551-562.
- 23) Stoilova I, Krastanov A, Stoyanova A, Denev P, Gargova S: Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*). *Food Chemistry* 2007; 102: 764–770.
- 24) http://sl.wikipedia.org/wiki/Reaktivna_kisikova_spojina Datum dostopa: 1.10.2010
- 25) Kastelic J: Optimizacija izolacije proantocijanidinov iz skorje navadne smreke (*Picea abies*, (L)Karst.). Diplomsko delo, Ljubljana 2008.
- 26) Molyneux P: The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar J. Sci. Technol.* 2004; 26: 211-219.
- 27) Nishimiki M, Rao N.A, Yagi K: The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulphate and molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 1972; 46: 849-853.
- 28) Awah F.M, Uzoegwu P.N, Oyugi J.O, Rutherford J, Ifeonu P, Yao X. J, Fowke K. R, Eze M.O: Free radical scavenging activity and immunomodulatory effect of *Stachytarpheta angustifolia* leaf extract. *Food Chemistry* 2010; 119: 1409-1416
- 29) Marquele F. D, Di Mambro V. M, Georgetti S. R, Casagrande R, Valim Y. M. L, Fonseca M. J. V: Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2005; 39: 455-462

- 30) Sakanaka S, Tachibana Y, Okada Y: Preparation and antioxidant properties of extract of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food Chemistry* 2005; 89: 569-575
- 31) Peng S, Zhao M: *Pharmaceutical Bioassays: Methods and Applications*. Published by John Willy & Sons. Inc. Hoboken, New Jersey, 2009
- 32) Halliwell B, Gutteridge J. M, Aruoma O. I: The deoxyribose method: a simple "test - tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.* 1987; 165: 215-219
- 33) Yan X, Nagata T, Fan X: Antioxidative activities in some common seaweeds. *Plant Foods for Human Nutrition* 1998; 52: 253–262