

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VALERIJA KRAMARIČ

**DIPLOMSKA NALOGA**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VALERIJA KRAMARIČ

**VREDNOTENJE STABILNOSTI IN ANTIOKSIDATIVNE  
UČINKOVITOSTI RESVERATROLA V SAMOMIKROEMULGIRAJOČIH  
SISTEMIH**

**EVALUATION OF STABILITY AND ANTIOXIDANT EFFICIENCY OF  
RESVERATROL IN SELF-MICROEMULSIFYING DRUG DELIVERY  
SYSTEMS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, Katedri za farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvom prof. dr. Mirjane Gašperlin, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Mirjam Gosenca, mag. farm..

### **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Mirjani Gašperlin, mag. farm., in somentorici asist. dr. Mirjam Gosenca, mag. farm., za dosegljivost, strokovne nasvete in usmerjanje pri izdelavi diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi strokovnima sodelavkama na Katedri za farmacevtsko tehnologijo Tatjani Hrovatič in Mojci Keržan za pomoč pri raziskovalnem delu. Najlepša hvala tudi mojim bližnjim, ki so me spodbujali in verjeli vame tekom celotnega študija.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Mirjane Gašperlin, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Mirjam Gosenca, mag. farm..

Valerija Kramarič

### **Diplomska komisija:**

Predsednica: prof. dr. Marija Sollner Dolenc, mag. farm.

Mentorica: prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm.

Somentorica: asist. dr. Mirjam Gosenca, mag. farm.

Članica: doc. dr. Mojca Lunder, mag.farm.

**VSEBINA**

|  |            |
|--|------------|
| <b>POVZETEK</b> .....  | <b>III</b> |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | <b>IV</b>  |
| <b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....   | <b>VI</b>  |
| <b>1 UVOD</b> .....  | <b>1</b>   |
| 1.1 <i>IN VITRO</i> DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI.....                       | 1          |
| 1.1.1 Metode na osnovi reakcij s stabilnimi organskimi radikali.....                   | 2          |
| 1.1.2 Metode na osnovi redukcije kovinskih ionov .....                                 | 4          |
| 1.1.3 Metode na osnovi lipidne peroksidacije .....                                     | 6          |
| 1.1.4 Kompetitivne metode z odstranjevanjem peroksil radikala .....                    | 9          |
| 1.1.5 Metode na osnovi odstranjevanja ostalih biološko pomembnih ROS.....              | 12         |
| 1.1.6 Metode za določanje sposobnosti keliranja kovinskih ionov .....                  | 13         |
| 1.2 RESVERATROL.....   | 13         |
| 1.3 SAMOMIKROEMULGIRAJOČI SISTEMI .....  | 14         |
| <b>2 NAMEN DELA</b> .....  | <b>16</b>  |
| <b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....   | <b>17</b>  |
| 3.1 MATERIALI .....  | 17         |
| 3.1.1 Sestavine SMES z vgrajenim resveratrolom .....                                   | 17         |
| 3.1.2 Ostali materiali .....   | 19         |
| 3.2 NAPRAVE.....   | 20         |
| 3.3 METODE.....  | 21         |
| 3.3.1 Priprava SMES in vgradnja resveratrola .....                                     | 21         |
| 3.3.2 Spremljanje funkcionalne in kemijske stabilnosti resveratrola v SMES.....        | 21         |
| 3.3.3 Priprava osnovne raztopine vzorcev SMES+RSV v metanolu za nadaljnje analize..... | 22         |
| 3.3.4 Določanje kemijske stabilnosti resveratrola s HPLC analizo.....                  | 22         |
| 3.3.5 Analiza antioksidativne učinkovitosti resveratrola z DPPH metodo.....            | 23         |
| 3.3.6 Analiza antioksidativne učinkovitosti resveratrola s FTC metodo.....             | 25         |
| <b>4 REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....   | <b>28</b>  |
| 4.1 ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST RESVERATROLA .....                                    | 28         |
| 4.1.1 Proučevanje antioksidativne učinkovitosti resveratrola z DPPH metodo .....       | 29         |
| 4.1.2 Proučevanje antioksidativne učinkovitosti resveratrola s FTC metodo .....        | 32         |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 4.2      | FUNKCIONALNA IN KEMIJSKA STABILNOST RESVERATROLA V SMES.....   | 42        |
| 4.2.1    | Vrednotenje funkcionalne stabilnosti resveratrola v SMES z DPPH metodo v primerjavi s kemijsko stabilnostjo, določeno s HPLC ..... | 43        |
| 4.2.2    | Vrednotenje funkcionalne stabilnosti resveratrola v SMES s FTC metodo..  | 48        |
| <b>5</b> | <b>SKLEP .....</b>   | <b>53</b> |
| <b>6</b> | <b>VIRI IN LITERATURA .....</b>  | <b>54</b> |

## POVZETEK

V zadnjih letih so aktualne raziskave na področju preprečevanja in zdravljenja različnih s starostjo povezanih bolezni s peroralno dostavo eksogenih antioksidantov. Eden izmed najpogosteje proučevanih antioksidantov je naravni polifenol resveratrol, ki izkazuje antioksidativno, protivnetno in protitumorno delovanje. Resveratrol je slabo topen v vodi in v veliki meri podvržen predsistemskemu metabolizmu, kar sta glavna vzroka za zelo nizko biološko uporabnost po peroralni aplikaciji. Eden izmed možnih pristopov za izboljšanje biološke uporabnosti resveratrola je vgradnja v samomikroemulgirajoče sisteme (SMES), ki v prebavnem traktu v stiku s prebavnimi sokovi in pod vplivom peristaltičnega gibanja hitro in spontano tvorijo mikroemulzije tipa olje v vodi.

V diplomskem delu smo vrednotili funkcionalno stabilnost resveratrola, vgrajenega v SMES, s komplementarnima *in vitro* metodama za določanje antioksidativne učinkovitosti, in sicer z difenilpikrilhidrazilno (DPPH) in feritiocianatno (FTC) metodo. Funkcionalno stabilnost smo vrednotili preko primerjave antioksidativne učinkovitosti resveratrola, vgrajenega v SMES, s sveže pripravljenimi raztopinami resveratrola. Z DPPH metodo smo uspeli določiti tudi linearni model, s pomočjo katerega lahko opredelimo koncentracijo resveratrola iz določene antioksidativne učinkovitosti. Nasprotno je antioksidativna učinkovitost resveratrola, določena s FTC metodo, zelo variirala zaradi kompleksnosti poteka lipidne peroksidacije v emulziji linolne kisline.

Resveratrol smo vgrajevali v sedem SMES z različno kvantitativno sestavo sicer enakih sestavin (Kolliphor<sup>®</sup> RH 40, Kolliphor<sup>®</sup> EL, Capmul<sup>®</sup> MCM EP, ricinusovo olje) in spremljali funkcionalno stabilnost pri sobni temperaturi (25 °C) in 37 °C tekom devet tedenskega staranja zaščiteno pred svetlobo. Primerjalno smo določali tudi kemijsko stabilnost resveratrola s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti. Ugotovili smo, da pri nobenem sistemu ali temperaturi ni bilo opaznih sprememb v kemijski ali funkcionalni stabilnosti resveratrola, kar bi bilo potrebno potrditi tudi tekom daljšega obdobja.

Zaključimo lahko, da je DPPH metoda primerna za določanje funkcionalne stabilnosti resveratrola. Nasprotno bi s FTC metodo lahko zaznali le večje spremembe v funkcionalni stabilnosti preko primerjave s hkrati testirano svežo raztopino, tako da je za večjo uporabnost metode potrebna nadaljnja optimizacija le-te.

**KLJUČNE BESEDE:** *resveratrol, samomikroemulgirajoči sistemi, antioksidativna učinkovitost, difenilpikrilhidrazilna metoda, feritiocianatna metoda*

## ABSTRACT

In recent years, there has been much research in the field of prevention and treatment of various age-related diseases by oral administration of exogenous antioxidants. Natural polyphenol resveratrol is one of the most commonly studied antioxidants which exhibits antioxidant, anti-inflammatory and antitumour activity. Resveratrol is poorly soluble in water and largely exposed to first-pass metabolism that are main causes for its poor oral bioavailability. One of the possible approaches to improve its oral bioavailability is incorporation into selfmicroemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) that rapidly and spontaneously form oil-in-water microemulsions in gastrointestinal tract due to contact with intestinal fluids and agitation provided by the gastrointestinal motility.

In our thesis functional stability of resveratrol incorporated into SMEDDS was evaluated by complementary *in vitro* methods for assessment of antioxidant efficiency, namely diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) and ferric thiocyanate (FTC) method. Functional stability was evaluated by comparing antioxidant efficiency of resveratrol incorporated into SMEDDS with freshly prepared solutions of resveratrol. By using the DPPH method, linear model for defining resveratrol concentration from certain antioxidant efficiency was determined. On the other hand, antioxidant efficiency of resveratrol determined by the FTC method was highly variable due to complexity of lipid peroxidation in the linoleic acid emulsion.

Resveratrol was incorporated into seven SMEDDS, which differ in the quantitative composition of otherwise identical components (Kolliphor<sup>®</sup> RH 40, Kolliphor<sup>®</sup> EL, Capmul<sup>®</sup> MCM EP, castor oil) and assessed for its functional stability during nine weeks of storage at room temperature (25 °C) and 37 °C protected from light. For comparison, chemical stability of resveratrol was determined by high performance liquid chromatography. No evident changes in the chemical or functional stability of resveratrol in neither of the systems or temperatures tested were observed, nevertheless long term stability should be confirmed in further studies.

It can be concluded that the DPPH method is suitable for evaluation of functional stability of resveratrol. On the other hand, only significant changes in functional stability can be detected with the FTC method through comparison with simultaneously tested fresh solution. Therefore further optimization is needed to improve the usefulness of the latter method.

**KEY-WORDS:** *resveratrol, selfmicroemulsifying drug delivery systems, antioxidant efficiency, diphenylpicrylhydrazyl method, ferric thiocyanate method.*



**SEZNAM OKRAJŠAV**

|                  |   |
|------------------|---|
| (S)ET            | prenos (enega) elektrona ( <i>»(single) electron transfer«</i> )                        |
| AAPH             | 2,2`-azobis(2-amidinopropan) diklorid   |
| ABTS             | 3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina   |
| AMVN             | 2,2`-azobis(2,4-dimetilvaleronitril)  |
| AO               | antioksidant  |
| AOU              | antioksidativna učinkovitost  |
| BU               | biološka uporabnost   |
| CUPRAC           | <i>»Cupric ion reducing antioxidant capacity«</i>                                       |
| DMPD             | N,N-dimetilbenzen-1,4-diamin  |
| DPPH             | 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil  |
| EC <sub>50</sub> | koncentracija potrebna za 50 % učinek ( <i>»half maximal efficient concentration«</i> ) |
| ESR              | elektronska spinska resonanca   |
| FCR              | Folin-Ciocalteu reagent   |
| FOX              | <i>»Ferrous oxidation xylenol orange«</i>   |
| FRAP             | <i>»Ferric reducing-antioxidant power«</i>  |
| FTC              | feritiocianatna metoda  |
| GC               | plinska kromatografija  |
| HAT              | prenos vodikovega atoma ( <i>»hydrogen atom transfer«</i> )                             |
| HLB              | hidrofilno-lipofilno ravnotežje   |
| HORAC            | <i>»Hydroxyl radical averting capacity«</i>   |
| HPLC             | tekočinska kromatografija visoke ločljivosti  |
| KMBA             | $\alpha$ -keto- $\gamma$ -metiltiobutanojska kislina                                    |
| LO $\cdot$       | lipidni alkoksil radikal  |
| LOO $\cdot$      | lipidni peroksil radikal  |
| LOOH             | lipidni hidroperoksid   |
| LP               | lipidna peroksidacija   |
| MDA              | malondialdehid  |
| O/V              | olje v vodi   |
| ORAC             | <i>»Oxygen radical absorbance capacity«</i>   |
| PAS              | površinsko aktivna snov   |
| PDI              | polidisperzni indeks  |
| ROO $\cdot$      | peroksil radikal  |
| ROS              | reaktivne kisikove zvrsti   |

---

|                  |   |
|------------------|---|
| RSV              | resveratrol   |
| SD               | standardni odklon   |
| SMES             | samomikroemulgirajoči sistem                                  |
| SMES+RSV         | samomikroemulgirajoči sistem z vgrajenim resveratrolom (10 %) |
| TBA              | tiobarbiturna kislina ( <i>»thiobarbituric acid«</i> )        |
| TEAC             | <i>»Trolox equivalent antioxidant capacity«</i>               |
| TOSC             | <i>»Total oxidant scavenging capacity«</i>                    |
| TPTZ             | 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazin                            |
| TRAP             | <i>»Total radical-trapping antioxidant parameter«</i>         |
| $\lambda_{\max}$ | valovna dolžina absorpcijskega maksimuma                      |

# 1 UVOD

## 1.1 *IN VITRO* DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI

Reaktivne kisikove zvrsti (ROS), med katere uvrščamo radikale in nekatere druge reaktivne spojine, nastajajo pri normalnih fizioloških procesih v telesu. Za preprečevanje škodljivega vpliva teh spojin na celične sestavine, kot so lipidi, DNK, proteini in ogljikovi hidrati, ima celica na voljo obrambne mehanizme za odstranjevanje ROS. Mednje sodijo zaščita z encimi (superoksid dismutaza, katalaza, peroksidaze), endogenimi antioksidanti (AO) (glutation, sečna kislina, koencim Q, bilirubin) in eksogenimi AO, ki jih v telo vnesemo s prehrano (vitamina C in E, karotenoidi, različne fenolne in žveplove spojine). Ob porušenju ravnotežja med nastajanjem ROS in njihovim odstranjevanjem preko omenjenih mehanizmov govorimo o oksidativnem stresu (1). Ta je povezan z mnogimi boleznimi, kot so ateroskleroza, diabetes, nevrodegenerativne in kronične vnetne bolezni ter nekatere vrste rakavih obolenj. V bolezenskih stanjih je nastajanje ROS nenadzorovano, zato so aktualne raziskave o pomenu dodatnega vnosa AO in posredno tudi potreba po zanesljivih in enostavnih metodah za določanje antioksidativne učinkovitosti (AOU) (1-4). AO je vsaka snov, ki je sposobna že v nizki koncentraciji (v primerjavi s koncentracijo substrata, ki je tarča radikalov) opazno zadržati ali zavreti oksidacijo substrata (1). Primarni AO (AH) prekinjajo verižne reakcije tako, da odstranjujejo radikale ( $R^\cdot$ ) z njihovo pretvorbo v stabilnejše produkte (RH), sami pa tvorijo manj reaktiven radikal ( $A^\cdot$ ) /reakcija 1/, sekundarni ali preventivni AO pa preprečujejo nastanek radikalov preko različnih mehanizmov (npr. keliranje kovinskih ionov, deaktivacija singletnega kisika, encimske pretvorbe ROS itd.) (4-6).



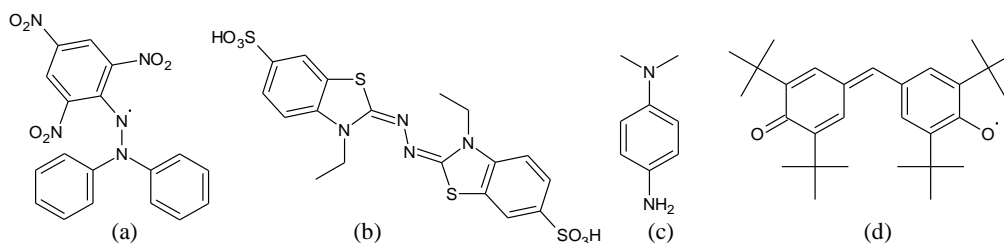
Za AOU se v literaturi pojavlja množica bolj ali manj enakovrednih izrazov, kot so »antioxidant activity, capacity, efficiency, power, potency, ability« itd., ki se nanašajo na različne parametre v odvisnosti od načina njihovega določanja (4, 5, 7). Roginsky in Lissi sta definirala AOU kot sposobnost zaviranja oksidativne razgradnje in poudarila potrebo po razlikovanju med AOU in reaktivnostjo AO do določenega radikala (8). V zadnjih letih je bilo objavljenih večje število preglednih člankov na temo *in vitro* metod za določanje AOU (3-17). Metode se med seboj razlikujejo v reakcijskem mehanizmu, uporabljenih oksidantih in substratih, reakcijskih pogojih, analitskih metodah ter izražanju rezultatov,

večinoma pa so usmerjene v določanje AOU primarnih AO. Posamezni AO lahko deluje po večih mehanizmih in se drugače odziva na različne radikale in oksidante, zato je nemogoče napovedati učinkovitost AO v kompleksnem biološkem sistemu le na osnovi rezultatov ene metode (9). AO, ki je učinkovit v enem sistemu, je lahko popolnoma neučinkovit ali celo povzroči oksidativno poškodbo v drugem sistemu (18). Posledično se priporoča uporaba večih različnih *in vitro* metod (3, 13, 19). Prior s sodelavci je izpostavil potrebo po standardiziranih metodah za določanje AOU, saj zaradi velikega števila metod in variacij znotraj posamezne metode prihaja do neprimerne uporabe le-teh, neskladnih rezultatov in posledično napačnega vrednotenja AOU (9). Glavne pomanjkljivosti *in vitro* metod so odsotnost *in vivo* procesov, kot so absorpcija, distribucija, metabolizem in ekskrecija, ter prisotnosti kompetitivnih encimov in AO (10, 19).

Večina avtorjev deli *in vitro* metode za določanje AOU glede na mehanizem delovanja AO; HAT ali »hydrogen atom transfer« metode merijo sposobnost odstranjevanja radikalov s prenosom vodikovega atoma, medtem ko (S)ET ali »(single) electron transfer« metode merijo redukcijsko sposobnost oz. sposobnost prenosa enega elektrona na tarčno molekulo. HAT in (S)ET mehanizmi skoraj vedno potekajo skupaj, zato je takšna delitev lahko problematična (4, 7, 9, 11). V diplomski nalogi smo povzeli pomembnejše *in vitro* metode za določanje AOU glede na osnovni princip metode.

### 1.1.1 Metode na osnovi reakcij s stabilnimi organskimi radikali

Pogosto uporabljeni model za vrednotenje sposobnosti AO za odstranjevanje radikalov so stabilni organski radikali, kot so DPPH, ABTS<sup>•+</sup>, DMPD<sup>•+</sup> ali galvinoksil (slika 1). DPPH in galvinoksil sta komercialno dostopna, medtem ko je ABTS<sup>•+</sup> in DMPD<sup>•+</sup> potrebno predhodno pripraviti iz ABTS oz. DMPD (20).



**Slika 1:** Kemijske strukture stabilnih organskih radikalov ali spojin, iz katerih jih pripravljamo: (a) 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), (b) 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina) (ABTS), N,N-dimetilbenzen-1,4-diamin (DMPD) in galvinoksil.

AOU vrednotimo s parametri, ki predstavljajo hitrost in obseg reakcije AO z omenjenimi radikali. Omenjeni radikali so obarvani in močno absorbirajo svetlobo v vidnem območju,

zato lahko koncentracijo spremljamo z UV/VIS absorpcijsko spektrofotometrijo; AO namreč neposredno reagira z radikalom in ga reducira do neradikalnega produkta, zaradi česar pride do razbarvanja reakcijske zmesi in s tem zmanjšanja absorbance. Te metode so hitre, poceni, enostavne in zelo občutljive, medtem ko je ena izmed možnih omejitev prisotnost spojin v vzorcu, ki absorbirajo v istem območju kot uporabljeni radikal. V tem primeru je možna detekcija z elektronsko spinsko resonanco (ESR) (5, 11, 20). Vprašljiva je tudi uporabnost teh metod, saj so nebiološki radikali praviloma bistveno večji kot biološki radikali, zato je pomemben dejavnik pri reakciji tudi sterično oviranje. Tako z omenjenimi metodami merimo le sposobnost AO za redukcijo nebioloških radikalov in ne sposobnosti zaviranja oksidativnega procesa (3, 7, 21).

### DPPH metoda

DPPH je organski dušikov radikal (slika 1), ki ima prosti elektron delokaliziran po celotni molekuli, kar je vzrok za intenzivno vijolično obarvanje in stabilnost proti dimerizaciji. Osnova metode je redukcija DPPH do blede rumenega 2,2-difenil-1-pikrilhidrazina ob dodatku AO, radikal, ki nastane iz molekule AO pa lahko vstopa tudi v nadaljnje reakcije, kar vpliva na stehiometrijo reakcije. Reakcija običajno poteka v metanolu ali etanolu, ki ne motita reakcije, dokler ne doseže ravnotežnega stanja, uporabljajo pa se tudi krajši reakcijski časi, kar je problem pri počasi delujočih AO (9, 22). Potek reakcije navadno spremljamo spektrofotometrično z merjenjem padca absorbance med 515 in 528 nm, lahko pa tudi z ESR, jedrsko magnetno resonanco ali amperometrično (3, 12). Redukcijska sposobnost AO se pogosto izraža preko deleža preostalega DPPH (glede na začetno količino), ki je sorazmeren s koncentracijo AO v reakcijski zmesi. Pogosto se uporablja tudi parameter  $EC_{50}$ , ki je definiran kot koncentracija AO potrebna za zmanjšanje začetne koncentracije DPPH za 50 %. Čas, potreben za dosego ravnotežnega stanja za  $EC_{50}$ , je definiran kot  $T_{EC_{50}}$ , uvedli pa so tudi nekatere novejšje parametre, ki vključujejo  $EC_{50}$  in upoštevajo tudi reakcijski čas oz. začetno hitrost reakcije. Delež DPPH,  $EC_{50}$  ter ostali parametri, so odvisni od začetne koncentracije DPPH, kar zelo otežuje primerjavo rezultatov različnih raziskav (3, 4, 8). Večjo primerljivost omogoča izražanje AOU z ekvivalenti standardnega AO (običajno Troloks, ki je hidrofilni derivat vitamina E) (3, 12). DPPH je topen le v organskih topilih, kar omejuje uporabnost metode za določanje hidrofilnih AO. Možna je uporaba vodno-alkoholnih medijev, vendar prevelika vsebnost vode lahko povzroči koagulacijo DPPH (3, 4). Pri spektrofotometričnem določanju je potrebna previdnost zaradi vpliva svetlobe, kisika in vrste topila na absorbanco. Pri

nekaterih AO (npr. evgenol) je reakcija z DPPH reverzibilna, zaradi česar lahko določimo lažno nizko AOU (4, 7).

### ABTS metoda

ABTS<sup>+</sup> je intenzivno modro-zeleno obarvan radikal kation (slika 1), ki ga pred uporabo pripravimo z oksidacijo ABTS, in sicer s kemijskimi reakcijami z različnimi oksidanti (npr. K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, MnO<sub>2</sub>, AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropan) diklorid)), z encimskimi reakcijami ob prisotnosti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (npr. z metmioglobinom, hemoglobinom ali hrenovo peroksidazo) ali elektrokemično (3, 9-11). Osnova metode je redukcija ABTS<sup>+</sup> do ABTS ob dodatku AO. ABTS<sup>+</sup> ima več absorpcijskih maksimumov, ki se pojavljajo pri nekoliko različnih valovnih dolžinah ( $\lambda_{\max}$ ) v različnih topilih, npr. pri 415, 645, 734 in 815 nm v vodi. Padec absorbance spremljamo v določeni časovni točki (največkrat 4-6 minut), vendar lahko reakcije z nekaterimi AO potekajo tudi dlje časa (3, 4, 9). Na začetku so vzorec z AO dodajali pred tvorbo ABTS<sup>+</sup> in merili zakasnitveni čas pri tvorbi radikala, vendar je AO v tem primeru lahko reagiral tudi z uporabljenimi oksidanti. V kolikor so dodajali vzorec šele po nastanku določene količine ABTS<sup>+</sup> in merili preostali ABTS<sup>+</sup> po poteku reakcije, pa se je zanesljivost metode povečala. AOU oz. redukcijska sposobnost AO do ABTS<sup>+</sup> se največkrat izraža relativno glede na Troloks, zato velikokrat srečamo ime TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*) metoda. Ekvivalenti Troloksa predstavljajo koncentracijo Troloksa (v mM), ki povzroči enak padec absorbance kot 1 mM preiskovanega AO (3, 9, 10). ABTS<sup>+</sup> je topen tako v vodnih kot organskih medijih in hitreje reagira z AO kot DPPH, vendar pa je njegova selektivnost manjša (4, 8, 9, 11).

### **1.1.2 Metode na osnovi redukcije kovinskih ionov**

AO so pogosto tudi močni reducenti, zato se za vrednotenje AOU uporabljajo metode, ki merijo sposobnost AO za redukcijo nekaterih kovinskih ionov v nižje valentno stanje. Najpogosteje uporabljena kovinska iona sta Fe<sup>3+</sup> in Cu<sup>2+</sup>, ki se reducirata v bolj reaktivna iona Fe<sup>2+</sup> in Cu<sup>+</sup> v smislu razgradnje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in hidroperoksidov, zato lahko AO, ki so močni reducenti, v nekaterih pogojih izkazujejo prooksidativne učinke (5). Te metode so enostavne, hitre in poceni, vprašljiva pa je njihova uporabnost, saj ne vključujejo ROS in substratov, ki bi jih AO ščitil. Merijo le redukcijsko sposobnost AO, ki ni nujno odsev AOU, saj niso vsi reducenti tudi AO (3, 4, 7, 9). V to skupino lahko uvrstimo tudi metodo za določanje celokupnih fenolov ali FCR (Folin-Ciocalteu reagent) metodo, ki prav tako meri redukcijsko sposobnost vzorca. Osnova metode je prenos elektronov iz fenolnih

spojin in drugih reducentov na Mo(VI) v FCR (kompleksi fosfomolibdične in fosfovolframove kisline), pri čemer nastanejo modri kompleksi z Mo(V) ( $\lambda_{\max} = 750-765$  nm) (3, 7, 9).

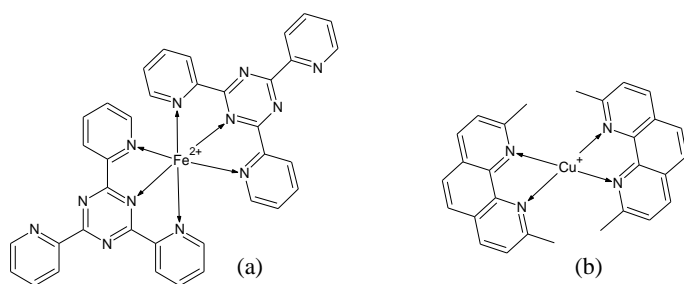
#### FRAP (»Ferric reducing-antioxidant power«) metoda

$\text{Fe}^{3+}$  tvori rumeno obarvan kompleks z dvema molekulama TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazin). Osnova metode je redukcija  $\text{Fe}^{3+}$ , vključenega v omenjeni kompleks, pod vplivom reducenta v kislih pogojih. Kompleks z vključenim  $\text{Fe}^{2+}$  je intenzivno modro obarvan ( $\lambda_{\max} = 593$  nm) (slika 2). Redukcijsko sposobnost AO običajno izrazimo relativno glede na absorbanco standardne raztopine  $\text{Fe}^{2+}$  ali AO (npr. askorbinska kislina). FRAP metoda ne zazna nekaterih AO, kot so tioli, proteini in karotenoidi. Zaradi kratkega reakcijskega časa (običajno 4 minute) izmerjena absorbanca pogosto ni pokazatelj končne reakcije (3, 4, 9).

Obstaja tudi podobna metoda na osnovi sposobnosti AO, da reducira fericianidni anion do ferocianidnega aniona, ki ob dodatku prostih  $\text{Fe}^{3+}$  ionov tvori prusko modrilo ( $\lambda_{\max} = 700$  nm) (11, 15).

#### CUPRAC (»Cupric ion reducing antioxidant capacity«) metoda

Osnova metode je redukcija  $\text{Cu}^{2+}$  v kompleksu z dvema molekulama neokuproina pod vplivom reducenta do  $\text{Cu}^+$ , zaradi katerega je kompleks intenzivno modro obarvan ( $\lambda_{\max} = 450$  nm) (slika 2). Reakcija poteka pri nevtralnem pH, AOU pa največkrat izrazimo kot ekvivalent sečne kisline. Pred neokuproinom so uporabljali sorodno molekulo batokuproin. V nasprotju s FRAP metodo lahko določamo tudi tiolne AO, kinetika reakcij je hitrejša. Zaradi nižjega redoks potenciala  $\text{Cu}^{2+}$  v primerjavi z  $\text{Fe}^{3+}$  so reakcije z njim bolj selektivne (npr. sladkorji in citronska kislina, ki motijo FRAP metodo, ne reagirajo). Tudi pri tej metodi je problematična izbira primerne reakcijskega časa (4, 9, 11, 21).



**Slika 2:** Struktura obarvanih kompleksov (a)  $\text{Fe}^{2+}$  s TPTZ in (b)  $\text{Cu}^+$  z neokuproinom.

### 1.1.3 Metode na osnovi lipidne peroksidacije

Lipidna peroksidacija (LP) je oksidativna razgradnja nenasičenih lipidov, ki lahko poteka po treh poteh, in sicer kot radikalna verižna reakcija, ki jo bomo opisali v nadaljevanju, ter fotooksidacija in encimska oksidacija (6, 17). V iniciacijski fazi pride do homolitičnega odcepa H atoma iz metilenske skupine nenasičenih maščobnih kislin, ki je v  $\alpha$ -položaju glede na dvojno vez (LH) /reakcija 2/. To omogočijo različni iniciatorji, kot so toplota, UV svetloba, ionizirajoče sevanje, kovinski ioni, metaloproteini ali radikali. Nastali lipidni radikal ( $L\cdot$ ) lahko odtegne H atom drugi spojini, toda reagira relativno počasi.



V propagacijski fazi ob dovolj veliki koncentraciji kisika  $L\cdot$  reagira s tripletnim kisikom ( $^3O_2$ ) do nastanka lipidnega peroksil radikala ( $LOO\cdot$ ) /reakcija 3/, ki odtegne H atom drugi lipidni molekuli ( $L_1H$ ) in tvori lipidni hidroperoksid ( $LOOH$ ) /reakcija 4/. Nastane tudi  $L_1\cdot$ , ki nadaljuje verižno reakcijo.



V tej stopnji radikalna verižna reakcija poteka zelo hitro, zato se poveča vsebnost  $LOOH$  v sistemu kot primarnega produkta LP. Običajno pride pri tvorbi  $LOOH$  do stabilizacije  $LOO\cdot$  s premestitvijo dvojne vezi, kar vodi do nastanka konjugiranih dienov in trienov (6). Tudi razpad  $LOOH$  pod vplivom toplote ali katalize kovinskih ionov je lahko vir radikalov /reakciji 5 in 6/, ti. posebna faza razvejanja verige (*»branching«*) (8, 10).

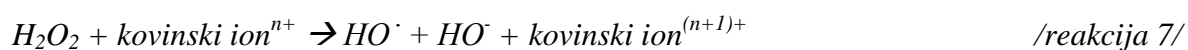


V terminacijski fazi radikali zreagirajo med seboj do neradikalnih produktov. Oksidativni proces se nadaljuje predvsem s pretvorbo  $LOOH$  v sekundarne produkte LP. Glavni mehanizem razgradnje  $LOOH$  je cepitev dvojne vezi, ki je najbližje  $-OOH$  skupini. Nastajajo različne hlapne in nehlapne spojine, npr. ogljikovodiki, aldehidi, alkoholi, ketoni in drugi produkti (6, 10).

AOU lahko določamo na osnovi vpliva AO na kinetiko oz. obseg LP v *in vitro* pogojih, na kar pa močno vpliva izbran sistem, to je lipid, medij in pogoji oksidacije (6, 8, 10). Običajno imajo prednost komercialno dostopni lipidni substrati z definirano sestavo, ki omogočajo večjo ponovljivost. Najpogosteje se uporablja linolna kislina ali njen metilni



ester zaradi enostavnosti in hitre oksidacijske kinetike v primerjavi z manj uporabljenimi trigliceridi. Uporabljajo se tudi biološko pomembnejši substrati, kot so LDL ali mikrosomi, z manj definirano sestavo, ki lahko vsebujejo tudi endogene AO ali prooksidante, zato je mehanizem oksidacije kompleksnejši. Uporabljajo se tudi umetne modelne strukture, kot so liposomi (6, 8). AOU lahko določamo v homogenih raztopinah lipidov v organskih topilih, kjer je pomembna predvsem polarnost topila in sposobnost tvorbe H vezi. V heterogenih sistemih, kot so emulzije ali vodne suspenzije (npr. liposomov ali LDL), pa na LP vplivajo številni dejavniki; npr. lastnosti mejne površine, velikost in porazdelitev dispergirane faze, difuzija kisika, lokacija AO v sistemu in pH disperznega medija (6). Zaradi optimizacije časa analize LP navadno pospešujemo na različne načine. Pospeševanje s toploto poveča razgradnjo LOOH in vpliva na topnost kisika, upoštevati pa je potrebno tudi termostabilnost AO. Pogosto se uporabljajo tudi termolabilne azo spojine, ki s spontano razgradnjo do radikalov in sledečo reakcijo s kisikom tvorijo peroksil radikale ( $ROO\cdot$ ) s konstantno hitrostjo, ki je odvisna od koncentracije azo spojine in temperature. Tako naj bi omogočili potek »kontrolirane verižne reakcije«, ki je manj občutljiva na prisotnost kovinskih ionov ali LOOH in omogoča pridobitev zanesljivih in ponovljivih rezultatov. Žal v tem primeru težko razlikujemo, če AO odstranjuje  $ROO\cdot$ , ki izvirajo iz azo spojine ali lipida. Najbolj znana azo iniciatorja sta vodotopni AAPH in lipidotopni AMVN (2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitril)) (6, 8). Pogost je tudi način iniciacije LP preko tvorbe  $HO\cdot$  na osnovi Fentonove in podobnih reakcij /reakcija 7/.



Uporabljajo se sistemi s  $H_2O_2$  in različnimi kovinskimi ioni, npr.  $Fe^{2+}$  (pogosto  $Fe^{3+}$  v kompleksu z EDTA, ki ga reduciramo z askorbatom),  $Cu^{2+}$  ali  $Co^{2+}$ . Kovinski ioni lahko delujejo prooksidativno in pospešujejo razgradnjo LOOH, zato je kinetika LP kompleksnejša. V sistemih s kovinskimi ioni lahko AO delujejo tudi kot kelatorji kovin, sestavine, kot je askorbat, pa prav tako lahko reagirajo z radikali (1, 6, 8).

Za vrednotenje AOU potrebujemo metode za merjenje obsega LP v prisotnosti in odsotnosti AO. Največ se uporablja pristop merjenja na osnovi tvorbe oksidacijskih produktov (primarnih ali sekundarnih), saj je primeren za vse vrste sistemov. Problem je manko pokazatelja LP, ki bi bil primeren za določanje obsega LP v vseh sistemih, saj tekom LP nastaja veliko različnih, pogosto tudi nestabilnih produktov. Možna sta tudi pristopa na osnovi merjenja porabe kisika ali izgube substrata, ki pa se redkeje uporabljata. LOOH so primarni produkti LP, ki največ povedo o obsegu LP, pod pogojem, da LP ni

preveč napredovala ter da poteka pri dovolj nizkih temperaturah, da njihova razgradnja ni prevelika. Njihova vsebnost se povečuje med propagacijsko fazo in zmanjšuje med terminacijsko fazo. Klasična metoda za določanje LOOH je jodometrična metoda na osnovi oksidacije jodidnih ionov s sledečo titracijo nastalega joda z natrijevim tiosulfatom ob prisotnosti škroba. Metoda je manj uporabna pri heterogenih sistemih, zato je razvoj potekal v smeri alternativnih metod za določanje LOOH, npr. feritocijanatna (FTC) metoda ali drugih primarnih produktov LP, kot so konjugirani dieni. V procesu LP nastaja veliko različnih sekundarnih oksidacijskih produktov (ogljikovodiki, aldehidi, alkoholi, ketoni itd.). Najpogosteje uporabljena metoda izkorišča nastajanje malondialdehida (MDA) tekom LP. Nastale aldehide lahko določamo tudi z anizidinsko metodo, ki temelji na tvorbi Schiffove baze ( $\lambda_{\max} = 350 \text{ nm}$ ) pri reakciji aldehydne skupine z amino skupino p-anizidina. Pogosto je tudi določanje posameznih hlapnih produktov LP, značilnih za določen lipidni substrat (npr. heksanal), s plinsko kromatografijo (GC) (6).

#### FTC metoda

FTC metoda meri sposobnost AO, da inhibira LP na osnovi količine nastalih LOOH, pri čemer izkorišča njihove redoks lastnosti. Osnova metode je oksidacija  $\text{Fe}^{2+}$  do  $\text{Fe}^{3+}$  ionov kot posledica enoelektronske redukcije LOOH, ki ji sledi homolitični razcep LOOH do nastanka lipidnega alkoksil radikala ( $\text{LO}^\cdot$ ) /reakcija 8/.



Nastali  $\text{LO}^\cdot$  je zelo reaktiven in lahko dalje reagira z  $\text{Fe}^{2+}$ , topilom ali LOOH, kar vpliva na stehiometrijo oksidacije  $\text{Fe}^{2+}$  z LOOH, ki je odvisna predvsem od pH, vrste topila in vrste LOOH.  $\text{Fe}^{3+}$  tvorijo rdeče obarvan kompleks s  $\text{SCN}^-$  ( $\lambda_{\max} \sim 500 \text{ nm}$ ). Vsebnost LOOH spremljamo spektrofotometrično, navadno merimo, dokler absorbanca kontrole ne doseže maksimuma, kar označuje konec propagacijske faze. To je pomembno, saj kasneje LOOH dalje reagirajo do sekundarnih produktov LP. Inhibicijo LP v prisotnosti AO zaznamo kot zmanjšano tvorbo rdečega kompleksa. Reagira tudi  $\text{H}_2\text{O}_2$  in drugi peroksidi. Motijo predvsem spojine, ki absorbirajo svetlobo v območju merjenja, problematična pa je lahko tudi avtooksidacija  $\text{Fe}^{2+}$  z atmosferskim kisikom do  $\text{Fe}^{3+}$  (2, 6, 11, 12, 15, 23).

S primerljivo FOX («*Ferrous oxidation xylenol orange*») metodo pa nastale  $\text{Fe}^{3+}$  ione detektiramo v obliki modro-vijoličnega kompleksa s ksilenol oranžnim ( $\lambda_{\max} = 550 \text{ nm}$ ) (6, 12).

### Metoda za določanje konjugiranih dienov

AOU oz. inhibitorni učinek AO na LP lahko določamo tudi preko spremljanja nastanka konjugiranih dienov ( $\lambda_{\max} = 234\text{-}235\text{ nm}$ ). Konjugirane dvojne vezi se normalno ne pojavljajo v nenasičenih maščobnih kislinah, nastanejo pa pri oksidativnih spremembah polinenasičenih maščobnih kislin z 1,4-diensko strukturo. Več kot 90 % LOOH ima konjugirane dvojne vezi kot posledica stabilizacije  $\text{LOO}^\cdot$  s premestitvijo dvojnih vezi. Konjugirane dvojne vezi se ohranijo tudi v nekaterih sekundarnih produktih LP. Uporabljajo se lahko različni lipidni substrati, ki vsebujejo nenasičene maščobne kisline s vsaj dvema dvojnima vezema (npr. linolna kislina). Absorpcijski vrh od konjugiranih dienov se običajno pojavlja kot rama širokega vrha od nekonjugiranih dvojnih vezi (neoksidiranih lipidov) pri 200-210 nm, v tem območju pa absorbirajo tudi mnoge druge spojine, zato je metoda bolj uporabna za enostavne sisteme (6, 10, 12, 21).

### TBA (»Thiobarbituric acid«) metoda

MDA je sekundarni produkt LP, ki se najpogosteje uporablja pri določanju AOU preko inhibicije LP različnih lipidnih substratov (npr. linolna kislina, LDL ali vzorci tkiv). Osnova metode je reakcija med tiobarbiturno kislino (TBA) in MDA do rdečega kondenzacijskega produkta ( $\lambda_{\max} = 532\text{-}535\text{ nm}$ ). Čeprav v literaturi pogosto najdemo podatek, da MDA nastane le iz maščobnih kislin z vsaj tremi dvojnimi vezmi, pa nastaja tudi iz manj nenasičenih maščobnih kislin, le da po drugi reakcijski poti. Reakcija s TBA ni specifična le za MDA, saj reagirajo tudi druge karbonilne spojine (produkti LP ali razgradnje sladkorjev, proteinov itd.). Pomanjkanje specifičnosti je tudi vzrok za pogosto uporabo imena TBARS (»TBA reacting substances«), ki vključuje vse karbonilne spojine, ki reagirajo s TBA. Vprašljiva je tudi reprezentativnost MDA kot pokazatelja LP, saj le-ta ne nastaja pri oksidaciji vseh lipidov, lahko pa je tudi le stranski reakcijski produkt. Selektivnost metode so izboljšali z uporabo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) za določanje produkta reakcije med TBA in MDA (6, 10, 12).

#### **1.1.4 Kompetitivne metode z odstranjevanjem peroksil radikala**

Načeloma je za vsako kompetitivno metodo značilen substrat, ki predstavlja biološke molekule, ki so *in vivo* tarča ROS. AO tekmuje za ROS s substratom, AOU pa določamo na osnovi kvantifikacije spojine, ki omogoča detekcijo (sonda). Največkrat je to substrat ali njegova oksidirana oblika, lahko tudi spojina, ki jo dodamo naknadno po izvedeni reakciji. Različne sonde omogočajo različne načine detekcije, npr. preko UV/VIS absorbance,

fluorescence, kemiluminiscence ali pa z ESR. Pomembno je, da v sistemu ne potekajo druge radikalske reakcije in da AO in substrat ne reagirata med sabo. AOU je odvisna od hitrosti reakcije med ROS in substratom ter med ROS in AO, pomembno pa je tudi koncentracijsko razmerje med substratom in AO (3, 5, 7).

Zaradi kompleksnosti neposrednega merjenja inhibirane LP so razvili kompetitivne metode, ki simulirajo LP. Ključno vlogo pri LP ima  $\text{ROO}^\cdot$ , zato se največ uporabljajo metode na osnovi sposobnosti AO, da odstranjujejo  $\text{ROO}^\cdot$  s prenosom H atoma in tako zaščitijo substrat. Potreben je ustrezn generator  $\text{ROO}^\cdot$ , ki je največkrat termolabilna azo spojina (npr. AAPH ali AMVN) in omogoči konstanten tok  $\text{ROO}^\cdot$  v raztopini nasičeni s kisikom. AO tekmuje s substratom za  $\text{ROO}^\cdot$  in zadrži ali zavre njegovo oksidacijo (3, 7). Metode uporabljajo različne pristope za kvantifikacijo, npr. površina pod krivuljo, zakasnitveni čas ali začetna hitrost reakcije (13). Pri kompetitivnih metodah v sistemu poteka radikalska reakcija brez propagacijske faze, ki je ključna pri LP, zato je vprašljiva uporabnost teh metod. Prav tako je koncentracija substrata običajno nižja kot AO, kar je v nasprotju z definicijo AO in *in vivo* pogojih. Te metode so relativno kompleksne in zamudne ter posledično manj primerne za rutinsko uporabo (3, 7).

#### ORAC (»Oxygen radical absorbance capacity«) metoda

ORAC metoda meri AOU preko inhibicije oksidacije fluorescenčnega substrata, povzročene z  $\text{ROO}^\cdot$  (vir navadno AAPH). Fluorescenčni substrat reagira z  $\text{ROO}^\cdot$  do nefluorescenčnega produkta, kar povzroča upad intenzitete fluorescence s časom (običajno merimo 35 minut). Prisotni AO inhibira oksidacijo substrata in tako zmanjša upad intenzitete fluorescence. V zgodnejših raziskavah so kot fluorescenčni substrat uporabljali protein  $\beta$ -fikoeritrin, zdaj pa se pogosteje uporablja neproteinski substrat fluorescein (slika 3), ki je stabilnejši, manj reaktiven in oksidira do znanih produktov. AOU določimo iz razlike površin pod krivuljama časovnega poteka intenzitete fluorescence vzorca (z AO) in kontrole (brez AO), kar vključuje vpliv AO tako na zakasnitveni čas kot hitrost in obseg oksidacije. Rezultat običajno izrazimo kot ekvivalent Troloksa (3, 7, 9).

#### TRAP (»Total radical-trapping antioxidant parameter«) metoda

TRAP metoda meri sposobnost AO, da inhibira reakcijo med  $\text{ROO}^\cdot$  (vir AAPH) in substratom. Obstaja več različic TRAP metode z različnimi načini detekcije. Pri originalni TRAP metodi, ki so jo razvili za določanje AOU plazme, so merili porabo kisika. Novejše različice metode s fluorimetrično detekcijo so podobne ORAC metodi (npr.  $\beta$ -fikoeritrin).

Kot substrat so uvedli tudi diklorofluorescein diacetat, ki se z  $\text{ROO}^\cdot$  oksidira in hidrolizira do visoko fluorescenčnega produkta diklorofluoresceina ( $\lambda_{\text{max}} = 504 \text{ nm}$ ), torej oksidacijo spremlja porast intenzitete fluorescence ali absorbance. Vsem različicam TRAP metode je skupen način vrednotenja AOU s pomočjo zakasnitvenega časa pri oksidaciji substrata, ki ga povzroči AO, kasnejši učinek AO pa ni upoštevan. AOU se običajno izraža relativno glede na zakasnitveni čas Troloksa (3, 4, 7, 9).

#### Metoda z razbarvanjem $\beta$ -karotena/krokina (» $\beta$ -caroten/crocin-bleaching assay«)

Metoda izkorišča razbarvanje karotenoidov ( $\beta$ -karoten (slika 3) ali krokin) med oksidacijo pod vplivom  $\text{ROO}^\cdot$  (vir AAPH). Razbarvanje  $\beta$ -karotena ( $\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$ ) lahko poteka po več poteh (npr. vpliv svetlobe ali toplote), krokin ( $\lambda_{\text{max}} = 443 \text{ nm}$ ) pa se razbarva samo z radikalsko oksidacijo pod vplivom  $\text{ROO}^\cdot$ , vendar ni komercialno dostopen. Metoda meri zmanjšanje hitrosti razbarvanja  $\beta$ -karotena ali krokina zaradi prisotnosti AO (običajno v linearnem območju med 1. in 10. minuto) (4, 7, 9). Razvili so tudi različico metode, ki ne uporablja kinetičnega pristopa, ampak delež inhibicije razbarvanja v določeni časovni točki (3, 9). Možna je tudi uporaba  $\beta$ -karotena v kombinaciji z linolno kislino, ki tekom LP tvori  $\text{LOO}^\cdot$ . Ti povzročijo razbarvanje  $\beta$ -karotena, kar prisotni AO inhibirajo (6, 12).

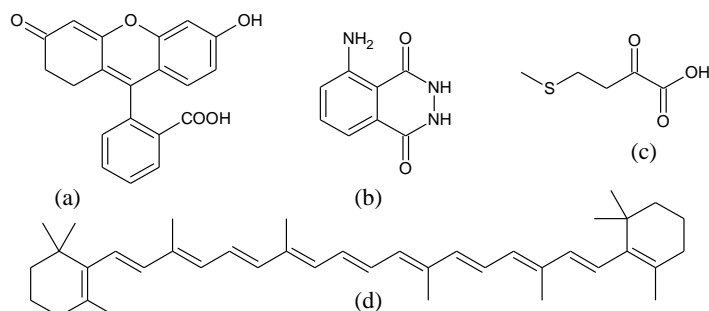
#### TOSC (»Total oxidant scavenging capacity«) metoda

Osnova metode je oksidacija KMBA ( $\alpha$ -keto- $\gamma$ -metiltiobutanojska kislina) (slika 3) do etilena z  $\text{ROO}^\cdot$  (vir AAPH). Časovni potek tvorbe etilena lahko spremljamo z GC in določamo sposobnost AO, da inhibira tvorbo etilena v primerjavi s kontrolo. Za kvantifikacijo AOU metoda uporablja površino pod krivuljo odvisnosti deleža inhibicije tvorbe etilena od reakcijskega časa, ki je lahko do 300 minut. Ta način kvantifikacije omogoča razlikovanje med hitro in počasi delujočimi AO (3, 4, 9).

#### Kemiluminiscenčna metoda

Metoda temelji na zmožnosti luminola (slika 3) in sorodnih spojin (lucigenin, bioluminiscenčni proteini), da oddajajo svetlobo pod vplivom toka radikalov. Radikal reagira s substratom, pri čemer nastanejo zvrsti v vzbujenem stanju, ki pri prehodu v osnovno stanje oddajajo svetlobo nizke intenzitete. Dodatek parajodofenola lahko povzroči nastanek bolj intenzivne, podaljšane in stabilne svetlobne emisije. Uporabljajo se različni viri  $\text{ROO}^\cdot$ , kot so AAPH, hrenova peroksidaza ali sistem s  $\text{H}_2\text{O}_2$  in heminom. AO, ki odstranjujejo radikale, motijo emisijo svetlobe, ki pa se obnovi ob porabi AO. AOU lahko

izrazimo z zakasnitvenim časom, v katerem je emisija svetlobe zavrta, ali pa kot delež inhibicije emisije svetlobe glede na kontrolo brez AO (3, 4, 8, 9).



**Slika 3:** Nekateri pomembnejši substrati pri kompetitivnih metodah na osnovi odstranjevanja  $\text{ROO}^\cdot$ , ki omogočajo različne vrste detekcije: (a) fluorescein, (b) luminol, (c) KMBA, (d)  $\beta$ -karoten.

### 1.1.5 Metode na osnovi odstranjevanja ostalih biološko pomembnih ROS

Za določanje AOU se najpogosteje uporabljajo metode na osnovi odstranjevanja  $\text{ROO}^\cdot$  zaradi njegove ključne vloge pri LP. Poleg  $\text{ROO}^\cdot$  pa oksidativne poškodbe v telesu povzročajo tudi druge ROS, zato mnogi avtorji poudarjajo, da so za celovito ovrednotenje AOU potrebne tudi metode na osnovi odstranjevanja teh ROS (4, 7, 13). Kljub temu je znano, da je vloga eksogenih AO pri odstranjevanju nekaterih ROS *in vivo* manj pomembna;  $\text{HO}^\cdot$  je izredno reaktiven in prednostno reagira s celičnimi sestavinami, ki so prisotne v bistveno višjih koncentracijah,  $\text{O}_2^{\cdot -}$  in  $\text{H}_2\text{O}_2$  pa sta relativno nereaktivna, hkrati pa ju odstranjujejo učinkoviti encimski sistemi (4, 5, 7, 11, 24). V preglednici I so navedene biološko pomembne ROS, za katere smo v literaturi zasledili obstoj teh metod, ter reference člankov, ki omogočajo njihov pregled. Nekatere metode so kompetitivne in merijo sposobnost AO, da zaščiti izbrani substrat pred oksidativno poškodbo z ROS, druge pa merijo le obseg reakcije med AO in ROS (3).

**Preglednica I:** Seznam ROS z razvitimi *in vitro* metodami za vrednotenje sposobnosti AO za njihovo odstranjevanje z referencami.

| ROS                    |                    | Reference           |
|------------------------|--------------------|---------------------|
| $\text{O}_2^{\cdot -}$ | superoksidni anion | 3, 4, 7, 11, 13, 25 |
| $\text{H}_2\text{O}_2$ | vodikov peroksid   | 3, 4, 7, 11, 13, 25 |
| $\text{HO}^\cdot$      | hidroksil radikal  | 3, 4, 7, 13, 25     |
| $^1\text{O}_2$         | singletni kisik    | 3, 4, 7, 11, 13, 25 |
| $\text{ONOO}^-$        | peroksinitrit      | 3, 4, 7, 13, 25     |
| $\text{NO}^\cdot$      | dušikov oksid      | 3, 11               |
| $\text{HOCl}$          | hipoklorna kislina | 3, 25               |

### 1.1.6 Metode za določanje sposobnosti keliranja kovinskih ionov

Kovinski ioni (npr.  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ) lahko delujejo prooksidativno predvsem na osnovi Fentonove in podobnih reakcij /reakcija 7/, pri katerih nastane visoko reaktiven  $\text{OH}\cdot$ . Posledično imajo lahko spojine, ki kelirajo kovinske ione, antioksidativni učinek (11).

#### »Metal chelating activity«

Sposobnost keliranja  $\text{Fe}^{2+}$  lahko določamo na osnovi tvorbe rdeče obarvanega kompleksa s ferozinom ( $\lambda_{\text{max}} = 562 \text{ nm}$ ). V prisotnosti AO oz. drugih kelatorjev le-ti tekmujejo s ferozinom, kar ovira nastanek rdečega kompleksa. Zmanjšanje absorbance glede na kontrolo brez AO je pokazatelj sposobnosti keliranja kovinskih ionov, ki jo lahko podcenimo pri nekaterih AO, saj je določitev odvisna od tvorbenih konstant kompleksov z AO in s ferozinom (11, 14, 15).

#### HORAC (»Hydroxyl radical averting capacity«) metoda

Sposobnost AO za keliranje kovinskih ionov lahko določamo tudi na osnovi sposobnosti zmanjšanja tvorbe  $\text{HO}\cdot$  v reakciji podobni Fentonovi s  $\text{Co}^{2+}$ -kompleksom in  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Nastali  $\text{HO}\cdot$  reagira s fluoresceinom, kar povzroči zmanjšanje intenzitete fluorescence. AOU določimo na osnovi razlike površin pod krivuljama intenzitete fluorescence v odvisnosti od časa med vzorcem z AO, ki kelira  $\text{Co}^{2+}$ , in kontrolo brez AO, rezultate pa običajno izrazimo z ekvivalenti galne kisline (3, 7, 15).

## 1.2 RESVERATROL

V zadnjih letih se AO intenzivno proučujejo kot potencialne učinkovine za zdravljenje različnih s starostjo povezanih bolezni (kardiovaskularne in nevrodegenerativne bolezni, rak ali diabetes tipa 2). Eden izmed najpogosteje proučevanih AO je tudi naravni polifenol resveratrol (RSV) ali 3,5,4'-trihidroksistilben zaradi vrste bioloških učinkov, predvsem antioksidativnega, protivnetnega in protitumornega delovanja. Ostali pomembnejši učinki so tudi spodbujanje vazodilatacije in zaviranje agregacije trombocitov, antidiabetični učinek in fitoestrogensko delovanje (26-30).

RSV uvrščamo v razred II po biofarmaceutskem klasifikacijskem sistemu, to so učinkovine z nizko topnostjo in visoko permeabilnostjo (31). Kljub dobri absorpciji (~ 75 %) je njegova biološka uporabnost (BU) po peroralni aplikaciji manj kot 1 %. Vzrok je obsežen metabolizem prvega prehoda tako v tankem črevesu kot v jetrih (30, 32). Glavni metaboliti

so konjugati RSV z glukuronsko in žveplovo kislino (glukuronidi in sulfati), nekonjugiran RSV pa se veže na plazemske proteine (npr. albumin ali lipoproteini) ali akumulira v nekaterih tkivih (npr. jetra, ledvice). Vse to lahko predstavlja *in vivo* rezervoar učinkovine, vključno z metaboliti, ki lahko sprostijo RSV z dekonjugacijskimi encimi ali pa sami izkazujejo biološko aktivnost. RSV najverjetneje vstopa tudi v enterohepatično cirkulacijo (31-33). Terapevtski potencial RSV je omejen predvsem z njegovo nizko BU, zato so številne raziskave usmerjene v razvoj novih formulacij, ki bi odpravile njegove omejitve, kot sta nizka topnost ali obsežen metabolizem prvega prehoda (31).

### 1.3 SAMOMIKROEMULGIRAJOČI SISTEMI

Po novejših ocenah je med 60-70 % na novo odkritih potencialnih učinkovin slabo topnih v vodi. BU po peroralni aplikaciji takšnih učinkovin je običajno nizka, visoko variabilna in nesorazmerna z apliciranim odmerkom. Pogosto uporabljeni pristop za izboljšanje BU slabo vodotopnih učinkovin je vgradnja v na lipidih osnovane sisteme. V slednjih je učinkovina že raztopljena, zato se izognemo procesu raztapljanja, ki je omejujoč dejavnik pri absorpciji slabo vodotopnih učinkovin in lahko v veliki meri prispeva k neustrezni BU (34-36). Mednje sodijo tudi samomikroemulgirajoči sistemi (SMES); to so izotropne zmesi lipidov, površinsko aktivnih snovi (PAS), enega ali več hidrofilnih sotopil ali koemulgatorjev in učinkovine, ki v stiku z vodnim medijem prebavnega trakta ob rahlem mešanju, ki ga zagotavlja peristaltično gibanje želodca in črevesja, hitro in spontano tvorijo mikroemulzije tipa olje v vodi (O/V). Nastale transparentne mikroemulzije imajo velikost kapljic manjšo od 50 oz. 100 nm z ozko porazdelitvijo velikosti. Učinkovina je že raztopljena v drobnih kapljicah mikroemulzije, ki se porazdelijo po prebavnem traktu in zaradi velike specifične površine omogočajo bolj učinkovito absorpcijo (35, 37).

Samo(mikro)emulgiranje poteče, ko je sprememba entropije zaradi dispergiranja večja od energije, ki je potrebna za povečanje površine ob dispergiranju. Prosta energija je tako negativna ali zelo nizko pozitivna, zato proces poteče spontano oz. že ob rahlem mešanju. Ključno vlogo pri samo(mikro)emulgiranju imajo PAS oz. njihove kombinacije, ki močno znižajo medfazno napetost in s tem tudi energijo potrebno za povečanje površine ob dispergiranju (38, 39). Proces samomikroemulgiranja je zelo specifičen, saj le točno določene kombinacije sestavin pri določenih koncentracijah in razmerjih med sestavinami vodijo do nastanka učinkovitih SMES. Vgradnja učinkovine v sistem lahko vpliva na



učinkovitost samomikroemulgiranja, saj se spremeni optimalno razmerje med sestavinami SMES (38). Pri izbiri sestavin moramo poleg sposobnosti samomikroemulgiranja in raztapljanja izbrane učinkovine upoštevati tudi njihovo farmacevtsko sprejemljivost in varnost (37, 40).

Glavna prednost SMES je izboljšanje BU po peroralni aplikaciji, kar lahko omogočijo na različne načine. Učinkovina je raztopljena v kapljicah mikroemulzije z veliko specifično površino, kar omogoči učinkovitejšo absorpcijo. Sestavine SMES lahko izboljšajo BU tudi preko povečanja permeabilnosti črevesnega epitelija ali tesnih stikov, inhibicije efluksa (P-glikoprotein) in metabolizma (CytP450) učinkovine v enterocitih in povečane absorpcije v limfni obtok, ki obide jetra. Različne raziskave kažejo na to, da SMES omogočijo tudi zmanjšanje variabilnosti v BU in vpliva hrane ter vodijo do bolj ponovljivih plazemskih profilov. SMES omogočajo tudi ciljno dostavo učinkovine k specifičnemu absorpcijskemu oknu v prebavnem traktu. Zaradi enostavne izdelave in možnosti industrijske proizvodnje so SMES primernejši za izboljšanje BU v primerjavi z nekaterimi drugimi dostavnimi sistemi (npr. trdne disperzije, liposomi, nanodelci). SMES lahko učinkovino tudi zaščitijo pred encimsko hidrolizo v prebavnem traktu in so tako primerni za dostavo občutljivih učinkovin, kot so peptidi. Prebava SMES ni nujna za absorpcijo učinkovine, zato je vpliv prebavnega procesa na učinkovitost SMES manjši v primerjavi z drugimi na lipidih osnovanimi sistemi. SMES odlikuje tudi visoka kapaciteta vgraditve hidrofobnih učinkovin celo z vrednostmi logP med 2 in 4, ki se slabo topijo tako v vodi kot naravnih lipidih (34, 35, 37).

SMES so v tekočem agregatnem stanju in jih običajno polnijo v mehke ali trde želatinske kapsule. Slednje imajo nekatere slabosti, kot so visoki stroški proizvodnje ali nekompatibilnost z nekaterimi sestavinami SMES (npr. organska sotpila). V zadnjih letih raziskujejo vgradnjo tekočih SMES v praške ali granule z namenom izdelave trdnih farmacevtskih oblik (npr. tablete, pelete), ki združujejo prednosti SMES (izboljšana topnost in BU) in trdnih farmacevtskih oblik (nizki stroški proizvodnje, lažja procesna kontrola in večja ponovljivost, boljša complianca) (35, 37, 41).

## 2 NAMEN DELA

Pri pripravkih z vgrajenim antioksidantom ločimo dva vidika stabilnosti; kemijska stabilnost zagotavlja ohranjanje ustreznih koncentracij učinkovine v pripravku, funkcionalna stabilnost pa ohranjanje specifične funkcije učinkovine, to je antioksidativne učinkovitosti. Zaradi različnih mehanizmov in določenih omejitev razpoložljivih *in vitro* metod za določanje antioksidativne učinkovitosti se priporoča uporaba večih komplementarnih metod.

Namen diplomskega dela je ovrednotiti stabilnost in antioksidativno učinkovitost resveratrola, vgrajenega v samomikroemulgirajoče sisteme (SMES) za peroralno aplikacijo, ki so bili razviti v okviru predhodnega raziskovalnega dela na Katedri za farmacevtsko tehnologijo.

V raziskavi bomo proučevali funkcionalno in kemijsko stabilnost resveratrola tako z vidika različne sestave SMES kot tudi pogojev shranjevanja (25 °C in 37 °C) v vnaprej določenih časovnih točkah (ob pripravi ter po 2, 5 in 9 tednih staranja) v primerjavi s sveže pripravljeno raztopino resveratrola. Resveratrol bomo vgradili v sedem SMES, ki se med seboj razlikujejo v deležu sicer enakih sestavin. Antioksidativno učinkovitost oz. funkcionalno stabilnost resveratrola bomo proučevali z difenilpikrilhidrazilno (DPPH) in feritiocianatno (FTC) metodo; z DPPH metodo bomo določali sposobnost redukcije DPPH radikala, s FTC pa sposobnost inhibicije s toploto pospešene lipidne peroksidacije v emulziji linolne kisline. Hkrati bomo določali tudi kemijsko stabilnost resveratrola s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti in preverjali skladnost rezultatov glede na določeno funkcionalno stabilnost.

### 3 MATERIALI IN METODE

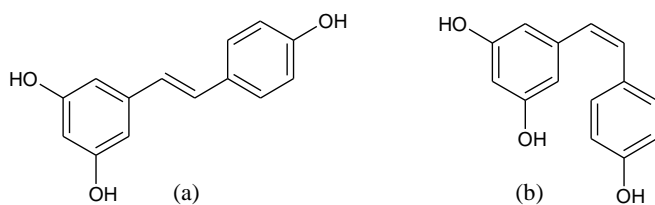
#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Sestavine SMES z vgrajenim resveratrolom

###### Učinkovina

- Resveratrol (ChromaDex Inc., ZDA)

RSV je praškasta snov, umazano bele barve z molekulsko formulo  $C_{14}H_{12}O_3$  in molekulsko maso 228,25 g/mol. Topen je v lipidih in organskih topilih (npr. ~ 50 mg/mL v etanolu), vendar zelo slabo topen v vodi (~ 0,03 mg/mL) (31). RSV obstaja v trans- in cis- izomerni obliki (slika 4); trans- oblika je stabilnejša in tudi pogostejša v rastlinah, posledično pa je tudi njena biološka aktivnost bolj raziskana (26, 33). Pri delu smo uporabili trans-RSV s stopnjo čistote > 97 % glede na specifikacijo proizvajalca.



**Slika 4:** Strukturni formuli (a) trans- in (b) cis-resveratrola.

###### Lipofilna faza

- Capmul<sup>®</sup> MCM EP (Abitec Corporation, ZDA)

Capmul<sup>®</sup> MCM EP s kemijskim imenom gliceril monokaprilat monokaprinat sestavljajo mono- in digliceridi kaprilne oz. oktanojske (50-90 %) in kaprinske oz. dekanajske kisline (10-50 %). Je brezbarvna ali rahlo rumena oljna tekočina ali poltrdna snov, netopna v vodi, topi pa se v oljih pri povišanih temperaturah. Je lipofilna snov z izraženimi emulgatorskimi lastnostmi in hidrofilnim-lipofilnim ravnotežjem (HLB) 5-6. Vgradimo ga lahko v različne peroralne in dermalne farmacevtske oblike, in sicer se uporablja kot vehikel, solubilizator ali emulgator/koemulgator ter za izboljšanje peroralne ali dermalne absorpcije. V farmaciji se pogosto uporablja kot sestavina na lipidih osnovanih dostavnih sistemov (42, 43).

- Ricinusovo olje, deviško (Lex, Slovenija)

Ricinusovo olje je sestavljeno iz trigliceridov različnih maščobnih kislin. Približna sestava maščobnih kislin je 87 % ricinolne kisline, 7 % oleinske kisline, 3 % linolne kisline, 2 % palmitinske kisline, 1 % stearinske kisline in sledovi dihidroksistearinske kisline.

Ricinusovo olje je bistro, skoraj brezbarvno ali blede rumeno viskozno olje z blagim vonjem in okusom. Meša se s kloroformom, dietil etrom, etanolom, brezvodno očetno kislino in metanolom, v vodi je netopno. Ricinusovo olje ima emolientno delovanje, uporablja pa se tudi kot oljni vehikel ali topilo. V farmaciji se največkrat uporablja v dermalnih farmacevtskih oblikah (predvsem v kremah in mazilih), lahko pa tudi v farmacevtskih oblikah za peroralno uporabo, farmacevtskih oblikah za oči in parenteralnih farmacevtskih oblikah (44).

### Emulgatorska zmes

- Kolliphor<sup>®</sup> EL (BASF Chem Trade GmbH, Nemčija)

Kolliphor<sup>®</sup> EL s kemijskim imenom polioksil 35 ricinusovo olje je etoksilirano ricinusovo olje z nenasičenimi alkilnimi verigami, katerega glavna sestavina je makrogolglicerol ricinolat. Znan je tudi pod lastniškim imenom Cremophor<sup>®</sup> EL. Je blede rumena, oljna tekočina, ki je bistra pri temperaturah nad 26 °C in ima rahel, toda značilen vonj. Topen je v mnogih oljih, maščobnih kislinah in alkoholih, organskih topilih in v vodi. Največkrat ima vlogo neionogenega emulgatorja ali solubilizatorja, lahko pa se uporablja tudi kot močljivec, s HLB vrednostjo 12-14. V farmaciji se pogosto uporablja za solubilizacijo hlapnih olj, lipofilnih vitaminov ali drugih lipofilnih snovi v peroralnih, dermalnih pa tudi parenteralnih farmacevtskih oblikah (44).

- Kolliphor<sup>®</sup> RH 40 (Sigma-Aldrich, Nemčija)

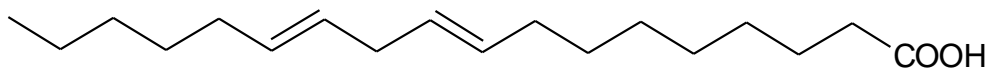
Kolliphor<sup>®</sup> RH 40 s kemijskim imenom polioksil 40 hidrogenirano ricinusovo olje je etoksilirano ricinusovo olje z nasičenimi alkilnimi verigami, katerega glavna sestavina je makrogolglicerol hidroksistearat. Znan je tudi pod lastniškim imenom Cremophor<sup>®</sup> RH 40. Pri temperaturi 20 °C se nahaja v obliki bele do rumenkaste, poltrdne paste, ki se utekočini pri 30 °C. Ima rahel, toda značilen vonj, v vodnih raztopinah je skoraj brez okusa. Topen je v mnogih oljih, maščobnih kislinah in alkoholih, organskih topilih in v vodi. Njegova HLB vrednost je 14-16. Uporablja se kot neionogen emulgator, solubilizator ali močljivec. V farmaciji se največkrat uporablja za solubilizacijo lipofilnih vitaminov, eteričnih olj in ostalih lipofilnih snovi, predvsem v peroralnih farmacevtskih oblikah, saj je skoraj brez okusa, lahko pa tudi v dermalnih ter parenteralnih farmacevtskih oblikah (44).

### 3.1.2 Ostali materiali

#### Sestavine emulzije linolne kisline (FTC metoda)

- Linolna kislina (Sigma-Aldrich, Nemčija)

Linolna kislina je nenasičena maščobna kislina z 18 ogljikovimi atomi in dvema dvojnima vezema (slika 5). Je brezbarvno ali rahlo rumeno obarvano olje, topno v etru in etanolu. Linolna kislina je občutljiva na zrak, svetlobo, vlago in toploto, zato jo je potrebno shranjevati na hladnem, v tesno zaprtem vsebniku pod inertno atmosfero (prepihana z argonom). Uporabili smo reagent tehnične kakovosti s 60-74 % linolne kisline. Glavna nečistota je oleinska kislina (18-34 %). Reagent delno kristalizira pri temperaturi shranjevanja 0-4 °C (44, 45).



**Slika 5:** Strukturna formula linolne kisline.

- Tween<sup>®</sup> 20 (Sigma-Aldrich, Nemčija)

Tween<sup>®</sup> 20 ali polisorbat 20 s kemijskim imenom polioksietilen 20 sorbitan monolavrat je neionogena PAS. Je bistra, rumeno do rumeno-zelena viskozna tekočina s HLB vrednostjo 16,7. Tween<sup>®</sup> 20 se pogosto uporablja kot emulgator za pripravo emulzij tipa O/V, solubilizator ali močljivec. Meša se z vodo, alkoholom, dioksanom in etil acetatom, v oljih pa je netopen (44, 46).

- 0,05 M fosfatni pufer (pH 7)

Za pripravo 1 L pufrne raztopine smo odmerili 250 mL 0,2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 145 mL 0,2 M NaOH, dopolnili s prečiščeno vodo do približno 900 mL in dobro premešali. Preverili smo pH raztopine in ga uravnali z dodatkom 0,2 M NaOH oz. 85 % fosforjeve(V) kisline ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , Merck KGaA, Nemčija) ter dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.

0,2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  smo pripravili tako, da smo 27,22 g kalijevega dihidrogenfosfata ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Merck KGaA, Nemčija) raztopili v prečiščeni vodi in dopolnili do 1000 mL, za pripravo 0,2 M NaOH pa smo 8,0 g natrijevega hidroksida (NaOH, Merck KGaA, Nemčija) raztopili v prečiščeni vodi in dopolnili do 1000 mL.

### Priprava reagentov FTC

- 3,95 M  $\text{NH}_4\text{SCN}$

6,0 g amonijevega tiocianata ( $\text{NH}_4\text{SCN}$ , Merck KGaA, Nemčija) smo raztopili v prečiščeni vodi in dopolnili do 20 mL.

- 1,2 M HCl

10,0 mL 37 % klorovodikove kisline (HCl, Panreac Quimica S.A.U., Španija) smo redčili s prečiščeno vodo do 100 mL.

- 20 mM  $\text{FeCl}_2$  v 1,2 M HCl

79,4 mg železovega(II) klorida tetrahidrata ( $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ , Merck KGaA, Nemčija) smo raztopili v 1,2 M HCl in dopolnili do 20 mL.

- 75 % etanol

390 mL 96 % etanola ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , Pharmachem, Slovenija) smo redčili s prečiščeno vodo do 500 mL.

### Ostali materiali

- DPPH oz. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (Sigma-Aldrich, ZDA)

DPPH je praškasta snov, zelene barve z molekulsko formulo  $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$  in molekulsko maso 394,32 g/mol. Topen je v organskih topilih (metanol, etanol), v vodi pa je netopen. Raztopine DPPH so vijolično obarvane (22, 47).

- Metanol za analizo ( $\text{CH}_3\text{OH}$ , Merck KGaA, Nemčija)
- Metanol za tekočinsko kromatografijo ( $\text{CH}_3\text{OH}$ , Merck KGaA, Nemčija)
- Bidestilirana voda (pridobljena s postopkom dvojne destilacije na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko Fakultete za farmacijo, Slovenija)
- Brezvodna očetna kislina ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , Merck KGaA, Nemčija)

## **3.2 NAPRAVE**

- Analitska tehtnica, Mettler Toledo AG245, Švica
- Analitska tehtnica, Mettler Toledo XS205, Švica
- HPLC sistem, Agilent 1100, ZDA
- Magnetno mešalo, Rotamix 550 MMH, Tehtnica, Slovenija
- pH meter, Seven Compact, Mettler Toledo, Švica
- Stresalnik Vibromix 403 EVT, Tehtnica, Slovenija

- Sušilnik, Tip SP-45, Kambič Laboratorijska oprema, Slovenija
- UV spektrofotometer, Hewlett Packard 8453, Nemčija
- Zetasizer Nano, Malvern Instruments, Velika britanija

### 3.3 METODE

#### 3.3.1 Priprava SMES in vgradnja resveratrola

Pri delu smo uporabili sedem SMES, ki imajo enake sestavine, vendar različno kvantitativno sestavo, in so bili razviti v okviru predhodnega raziskovalnega dela na Katedri za farmacevtsko tehnologijo. Sestava praznih SMES z deleži posameznih sestavin je predstavljena v preglednici II. Pripravili smo 10 g posameznega SMES. V erlenmajerico z obrusom smo natehtali sestavine SMES in mešali na magnetnem mešalu do nastanka homogene zmesi.

**Preglednica II:** Oznake posameznih SMES s sestavinami in količinsko sestavo SMES.

| Oznaka SMES | Kolliphor <sup>®</sup><br>RH 40 (%) | Kolliphor <sup>®</sup> EL<br>(%) | Capmul <sup>®</sup><br>MCM EP (%) | Ricinusovo olje<br>(%) |
|-------------|-------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| S10         | 30                                  | 30                               | 20                                | 20                     |
| S13         | 40                                  | 40                               | 10                                | 10                     |
| S14         | 35                                  | 35                               | 15                                | 15                     |
| S15         | 35                                  | 35                               | 30                                | /                      |
| S16         | 35                                  | 35                               | /                                 | 30                     |
| S17         | /                                   | 70                               | 15                                | 15                     |
| S18         | 70                                  | /                                | 15                                | 15                     |

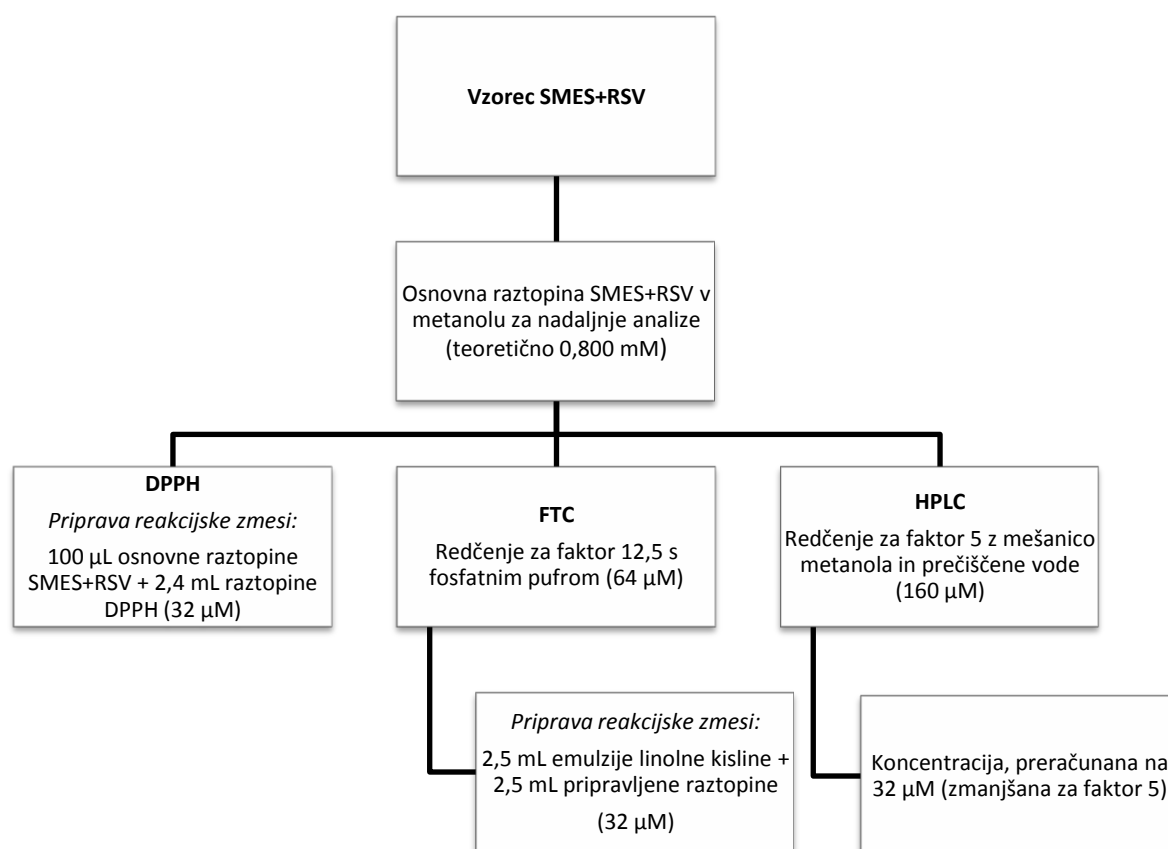
V SMES smo vgradili 10 % RSV (10 mg RSV/100 mg zmesi; SMES+RSV). V ustrezni stekleni vsebnik smo natehtali 800 mg RSV in dodali SMES do 8 g. Zmes smo zaščitili pred svetlobo in mešali na magnetnem mešalu čez noč oz. toliko časa, da se je RSV popolnoma raztopil.

#### 3.3.2 Spremljanje funkcionalne in kemijske stabilnosti resveratrola v SMES

Pripravljene vzorce SMES+RSV smo razdelili na dva dela ter jih shranjevali v zaprtih steklenih vsebnikih ali na sobni temperaturi (25 °C) ali na 37 °C, zaščitene pred svetlobo. V vnaprej določenih časovnih točkah (ob pripravi ter po 2, 5 in 9 tednih staranja) smo ovrednotili funkcionalno in kemijsko stabilnost RSV, vgrajenega v SMES. Funkcionalno stabilnost oz. AOU RSV smo vrednotili z DPPH in FTC metodo, kemijsko stabilnost RSV pa smo določali s HPLC metodo.

### 3.3.3 Priprava osnovne raztopine vzorcev SMES+RSV v metanolu za nadaljnje analize

Po določenem času staranja smo natehtali ustrezno količino posameznega SMES+RSV (~ 230 mg) ter redčili z metanolom do teoretične koncentracije RSV v raztopini 0,800 mM (upoštevaje natehto vzorca in delež RSV v SMES+RSV). Pripravljeno raztopino (osnovna raztopina SMES+RSV) smo uporabili pri vseh nadaljnjih analizah funkcionalne in kemijske stabilnosti RSV v SMES (slika 6).



**Slika 6:** Prikaz priprave vzorca SMES+RSV za nadaljnje analize z DPPH, FTC in HPLC metodo s teoretičnimi koncentracijami RSV pri vsaki stopnji postopka.

### 3.3.4 Določanje kemijske stabilnosti resveratrola s HPLC analizo

Kemijsko stabilnost RSV smo določili s HPLC analizo. Uporabili smo reverznofazno kolono YMC-Pack ODS-AM ( $4,6 \times 250 \text{ mm}^2$ ,  $5 \mu\text{m}$ ), 0,5 % očetno kislino v zmesi metanola in bidestilirane vode v volumskem razmerju 1:1 kot mobilno fazo s hitrostjo pretoka 1 mL/min, volumen injiciranja je znašal 20  $\mu\text{L}$ . Temperatura kolone je bila 25 °C, za detekcijo RSV pa smo uporabili UV detektor ( $\lambda_{\text{max}} = 303 \text{ nm}$ ).



Za HPLC analizo smo osnovno raztopino SMES+RSV (0,800 mM) redčili z mešanico metanola in prečiščene vode v volumskem razmerju 1:1 za faktor 5 do teoretične koncentracije RSV 160  $\mu\text{M}$  (slika 6). Dejansko koncentracijo RSV v vzorcu smo določili s pomočjo standardne raztopine RSV (*enačba 1*), ki smo jo pripravili pred vsako analizo: natančno smo natehtali približno 11,4 mg RSV ter redčili z mešanico metanola in prečiščene vode v volumskem razmerju 1:1 do ustrezne koncentracije ( $\sim 160 \mu\text{M}$ ).

$$c_{vz} = \frac{A_{vz} \times c_{st}}{A_{st}} \quad (\text{enačba 1})$$

$c_{vz}$  dejanska koncentracija RSV v vzorcu

$A_{vz}$  površina pod krivuljo odziva vzorca

$c_{st}$  koncentracija RSV v standardni raztopini

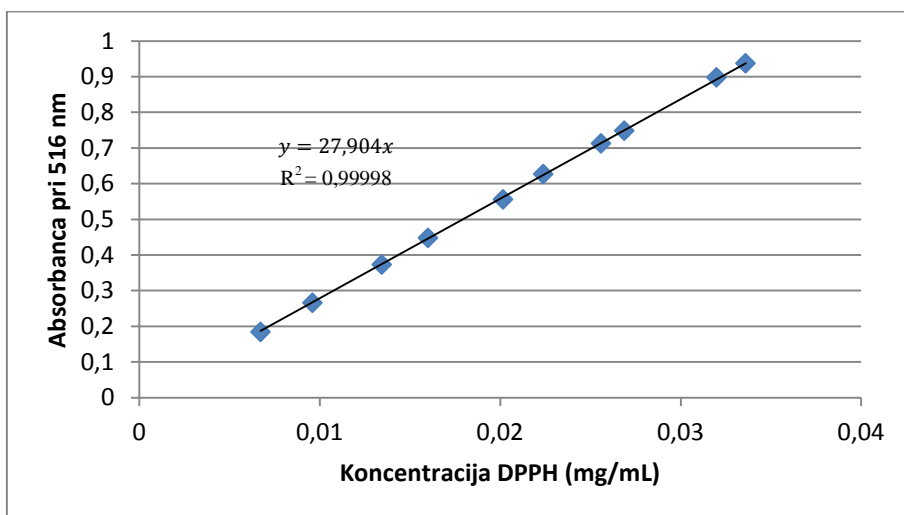
$A_{st}$  površina pod krivuljo odziva standardne raztopine

Zaradi lažje grafične predstavitve rezultatov oz. primerjave s funkcionalno stabilnostjo RSV smo rezultate podali kot povprečno dejansko koncentracijo RSV v vzorcu, zmanjšano za faktor 5 ( $\sim 32 \mu\text{M}$ ).

### 3.3.5 Analiza antioksidativne učinkovitosti resveratrola z DPPH metodo

#### Priprava umeritvene premice za določanje koncentracije DPPH

Za umeritveno premico smo pripravili raztopine DPPH v metanolu v koncentracijskem območju 0,005-0,035 mg/mL ter izmerili absorbanco pri 516 nm (slika 7).



**Slika 7:** Umeritvena premica za določanje koncentracije DPPH v raztopini iz absorbance pri 516 nm.

### Priprava vzorcev z resveratrolom

- Priprava raztopin RSV

Časovni potek reakcije med DPPH in RSV ter koncentracijsko odvisnost AOU RSV smo spremljali na sveže pripravljenih raztopinah RSV. Natančneje, pripravili smo metanolne raztopine RSV v koncentracijskem območju 0,25-1,00 mM, kar ustreza koncentracijskemu območju 10-40  $\mu\text{M}$  v pripravljenih reakcijskih zmesih z DPPH (redčenje za faktor 25: 2400  $\mu\text{L}$  raztopine DPPH + 100  $\mu\text{L}$  vzorca z RSV).

- Priprava vzorcev SMES+RSV

Za določanje AOU RSV, vgrajenega v SMES, smo pripravili osnovno raztopino SMES+RSV s teoretično koncentracijo RSV 0,800 mM (slika 6), kar ustreza koncentraciji 32  $\mu\text{M}$  v reakcijski zmesi z DPPH.

### Postopek DPPH metode

Osnova metode je redukcija DPPH ob dodatku AO in posledično razbarvanje vijolično obarvane raztopine DPPH, kar smo spremljali spektrofotometrično ( $\lambda_{\text{max}} = 516 \text{ nm}$ ). Postopek smo izvedli v zatemnjenem prostoru zaradi občutljivosti DPPH na svetlobo.

Pri delu smo uporabljali sveže pripravljeno raztopino DPPH v metanolu ( $\sim 52 \mu\text{M}$ ). V kiveto smo odpipetirali 2400  $\mu\text{L}$  raztopine DPPH in dodali 100  $\mu\text{L}$  metanola (kar ustreza volumnu raztopin testiranih vzorcev z RSV) in izmerili absorbanco raztopine DPPH ob času 0 oz. pred dodatkom RSV ( $A_0$ ). Na ta način smo upoštevali padec absorbance v raztopini DPPH zaradi redčenja ob dodatku vzorca. Koncentracijo DPPH ob času 0 smo določili s pomočjo umeritvene premice, in sicer je po redčitvi znašala  $\sim 50 \mu\text{M}$ .

Nato smo v kiveto odpipetirali 2400  $\mu\text{L}$  raztopine DPPH in 100  $\mu\text{L}$  testiranega vzorca z RSV. Kiveta je bila vedno zaprta, tako da smo preprečili izhlapevanje metanola. Ob določenih časovnih intervalih po dodatku vzorca v raztopino DPPH smo pomerili absorbanco ( $A_t$ ). Pri spremljanju časovnega poteka reakcije med DPPH in RSV smo določili, da ravnotežno stanje nastopi po 90 minutah, zato smo vse nadaljnje meritve izvedli ob tem času. AOU RSV smo izrazili kot delež preostalega DPPH ob času 90 minut, ki smo ga izračunali s pomočjo *enačbe 2*.

$$\text{Delež DPPH (\%)} = \frac{A_t}{A_0} \times 100 \quad (\text{enačba 2})$$

$A_0$  Absorbanca raztopine DPPH ob času 0 (2400  $\mu\text{L}$  DPPH + 100  $\mu\text{L}$  metanola)

$A_t$  Absorbanca raztopine DPPH po reakciji z RSV ob času t (2400  $\mu\text{L}$  DPPH + 100  $\mu\text{L}$  vzorca z RSV)

### Prikaz rezultatov

Koncentracijsko odvisnost AOU RSV smo določili na osnovi povprečne vrednosti 3 paralel. Vpliv variabilnosti v začetni koncentraciji DPPH smo zmanjšali tako, da smo namesto koncentracije RSV upoštevali molarno razmerje med RSV in DPPH v reakcijski zmesi. Prikazali smo graf odvisnosti  $\ln(\% \text{ DPPH v ravnotežnem stanju})$  v odvisnosti od molarne razmerja RSV/DPPH in z linearno regresijo izračunali enačbo premice ter  $R^2$ . Določili smo tudi parameter  $EC_{50}$ , ki pove, katera koncentracija RSV je potrebna za zmanjšanje začetne koncentracije DPPH za 50 %, in ga podali pri koncentraciji DPPH 50  $\mu\text{M}$ . Dejansko koncentracijo RSV v reakcijski zmesi pri vzorcih SMES+RSV smo določili iz premice  $\ln(\% \text{ DPPH v ravnotežnem stanju})$  v odvisnosti od molarne razmerja RSV/DPPH. Kot rezultat smo podali povprečno dejansko koncentracijo RSV v reakcijski zmesi.

### **3.3.6 Analiza antioksidativne učinkovitosti resveratrola s FTC metodo**

#### Priprava emulzije linolne kisline in določanje velikosti kapljic

V 100 mL erlenmajerico z obrusom smo natehtali 150 mg linolne kisline, 150 mg Tween-a<sup>®</sup> 20 in dodali 50 mL 0,05 M fosfatnega pufrja s pH 7. Emulzijo, zaščiteno pred svetlobo, smo stresali 40 min s hitrostjo 200 obratov/min.

Izbranim emulzijam smo določili velikost kapljic z metodo fotonske korelacijske spektroskopije pri temperaturi 25 °C (Zetasizer Nano).

#### Priprava vzorcev

- Priprava raztopin RSV

Časovni potek oksidacije linolne kisline ob prisotnosti RSV ter koncentracijsko odvisnost AOU RSV smo spremljali na sveže pripravljenih raztopinah RSV. Pripravili smo raztopine RSV različnih koncentracij, in sicer smo natančno natehtali ~ 10 mg RSV, redčili z metanolom do 20 mL ter raztopino nadalje redčili s fosfatnim pufrom. Z namenom izbire ustreznega koncentracijskega območja za nadaljnje poskuse smo pripravili raztopine s koncentracijami RSV 4-90  $\mu\text{M}$ , v nadaljevanju pa 40-90  $\mu\text{M}$  (v reakcijski zmesi z emulzijo linolne kisline so bile nižje za faktor 2: 2,5 mL emulzije + 2,5 mL vzorca).

- Priprava vzorcev SMES+RSV

Za analizo AOU RSV, vgrajenega v SMES, smo osnovno raztopino SMES+RSV (0,800 mM) dodatno redčili s fosfatnim pufrom do teoretične koncentracije RSV 64  $\mu\text{M}$  (faktor

12,5), kar ustreza koncentraciji 32  $\mu\text{M}$  v reakcijski zmesi z emulzijo linolne kisline (slika 6).

Zaradi velike variabilnosti določene AOU tako znotraj posameznega poskusa kot med različnimi poskusi smo hkrati primerjalno testirali še sveže pripravljeno raztopino RSV z isto koncentracijo RSV, kot je znašala teoretična koncentracija v vzorcih.

- Priprava vzorcev SMES

Ustrezno količino praznih SMES (~ 210 mg) smo redčili z metanolom tako, da je bila masna koncentracija SMES enaka kot v osnovni raztopini SMES+RSV (1,64 mg/mL) ter nadalje s fosfatnim pufrom (0,05 M, pH 7) za faktor 12,5.

#### Toplotno pospešena lipidna peroksidacija linolne kisline v emulziji (37 °C)

- Določanje časa najvišje vsebnosti LOOH linolne kisline pri 37 °C

Najprej smo določili časovni potek oksidacije linolne kisline brez prisotnosti AO z namenom določitve časa, pri katerem je količina LOOH linolne kisline, ki jih posredno določamo s FTC, največja. V ta namen smo 2,5 ml emulzije linolne kisline razredčili z 2,5 mL fosfatnega pufru (0,05 M, pH 7) (kontrolna zmes) ter kontrolno zmes inkubirali v sušilniku pri 37 °C (zaščiteno pred svetlobo). V različnih časovnih točkah do ~ 50 ur smo iz kontrolne zmesi odvezemali vzorce in določali vsebnost LOOH s FTC metodo. Čas inkubacije, pri katerem je vsebnost LOOH največja, smo določili grafično (38 ur).

- Določanje sposobnosti inhibicije LP linolne kisline v emulziji

Sposobnost vzorca za inhibicijo LP smo proučevali tako, da smo 2,5 mL emulzije linolne kisline in 2,5 mL posameznega vzorca odpipetirali v ustrezni stekleni vsebnik (reakcijska zmes). Pri vsakem poskusu smo pripravili tudi dve primerjalni kontrolni zmesi. Reakcijske in kontrolne zmesi smo inkubirali v sušilniku pri 37 °C 38 ur zaščiteno pred svetlobo. V vnaprej določenih časovnih točkah (pri spremljanju časovnega poteka oksidacije linolne kisline v prisotnosti RSV po 0, 14, 24 in 38 urah, pri določanju AOU RSV le še po 38 urah) smo odvezemali vzorce in določali vsebnost LOOH s FTC.

#### Posredno določanje količine nastalih hidroperoksidov linolne kisline s FTC

300  $\mu\text{L}$  kontrolne oz. reakcijske zmesi smo raztopili v 10,0 mL 75 % etanola (oz. v nadaljevanju 15,0 ml 75 % etanola, kar pa ni vplivalo na delež inhibicije LP, ki smo jo določali relativno glede na kontrolno zmes) ter dodali 300  $\mu\text{L}$  3,95 M  $\text{NH}_4\text{SCN}$  in 300  $\mu\text{L}$  20 mM  $\text{FeCl}_2$  v 1,14 M HCl. Ob prisotnosti LOOH linolne kisline se je  $\text{Fe}^{2+}$  oksidiral v  $\text{Fe}^{3+}$ , ki pa je tvoril rdeče obarvan kompleks s  $\text{SCN}^-$  ( $\lambda_{\text{max}} = 484 \text{ nm}$ ). Absorbanco raztopine

smo izmerili natanko 3 minute po dodatku FeCl<sub>2</sub>, saj je nastajanje kompleksa časovno odvisno. Slepno raztopino smo pripravili na enak način, le da smo 300 µL zmesi nadomestili s fosfatnim pufrom. AOU RSV smo izrazili kot delež inhibicije LP po 38 urah, ki smo ga izračunali po *enačbi 3*.

$$\text{Delež inhibicije LP (\%)} = \left(1 - \frac{A_{vz}}{A_k}\right) \times 100 \quad (\text{enačba 3})$$

$A_{vz}$  Absorbanca reakcijske zmesi (z vzorcem) ob času 38 ur

$A_k$  Absorbanca kontrolne zmesi ob času 38 ur

### Prikaz rezultatov

Odvisnost deleža inhibicije LP od koncentracije smo primerjali pri poskusih z vmesnim merjenjem (2 paraleli) in pri poskusih z merjenjem le po 38 urah (5 paralel). V obeh primerih smo s pomočjo polinomske regresije ocenili EC<sub>50</sub>, ki pove koncentracijo AO, pri kateri pride do 50 % inhibicije LP. FTC ni bila dovolj optimizirana, tako da iz deleža inhibicije LP nismo mogli določiti dejanske koncentracije RSV v reakcijski zmesi s SMES+RSV. Za slednje smo zato rezultat podali kot delež inhibicije LP ter ga primerjali s hkrati testiranimi sveže pripravljenimi raztopinami.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST RESVERATROLA

V okviru diplomskega dela smo spremljali AOU naravnega polifenola RSV, ki ga lahko opredelimo tudi kot fitoaleksin, saj se sintetizira v rastlinah kot odziv na stresne dejavnike (npr. infekcije s patogeni ali izpostavitve UV svetlobi) in tako ščiti rastline pred poškodbami (27, 28). V rastlinah je pogosto vezan na molekulo glukoze preko 3-O- $\beta$  glikozidne vezi (piceid), najdemo pa ga v več kot 70 rastlinskih vrstah. Eden najpomembnejših virov RSV je japonski dresnik, ki se uporablja v tradicionalni japonski in kitajski medicini. Pomembnejši viri RSV v prehrani so arašidi, pistacija, različne vrste jagodičevja, temna čokolada in grozdje (posledično tudi grozdni sok in vino). RSV je prisoten v semenih in kožici grozdnih jagod, ki jih pri pripravi rdečih vin odstranimo šele po delnem poteku fermentacije, zato je vsebnost RSV v rdečih vinih večja (26, 27, 33). Zmerno pitje rdečega vina so na osnovi epidemioloških raziskav povezali z zelo nizko pojavnostjo kardiovaskularnih bolezni v francoski populaciji kljub prehrani, bogati z nasičenimi maščobami (ti. »francoski paradoks«) (27, 28).

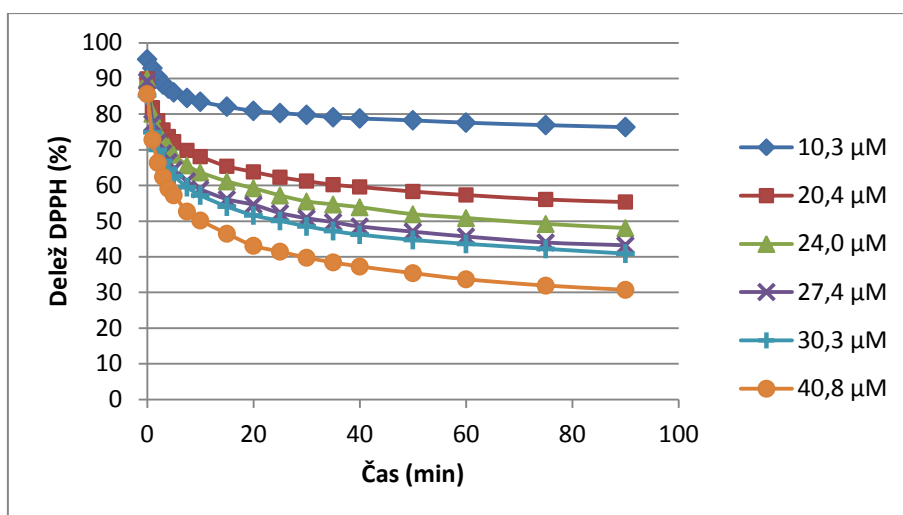
S spremljanjem AOU RSV, ki smo ga vgrajevali v SMES, smo želeli ovrednotiti njegovo funkcionalno stabilnost. Za določanje AOU smo uporabili dve različni *in vitro* metodi (DPPH in FTC metodo), saj lahko AOU določimo le z uporabo komplementarnih metod zaradi določenih omejitev posamezne *in vitro* metode. DPPH metoda vrednoti sposobnost redukcije stabilnega organskega DPPH radikala, FTC metoda pa sposobnost inhibicije s toploto pospešene LP v emulziji linolne kisline. Z namenom ugotavljanja tako ustreznosti omenjenih metod kot samega postopka za določanje AOU smo najprej določali AOU RSV na sveže pripravljenih raztopinah RSV. Prav tako smo želeli preveriti odvisnost AOU glede na koncentracijo RSV ter tako določiti optimalen postopek za ovrednotenje vzorcev SMES+RSV.

#### 4.1.1 Proučevanje antioksidativne učinkovitosti resveratrola z DPPH metodo

Z DPPH metodo smo proučevali AOU v metanolnih raztopinah RSV s koncentracijo v končni reakcijski zmesi v razponu med 10 in 40  $\mu\text{M}$ . Padec začetne koncentracije DPPH v reakcijski zmesi zaradi redukcije DPPH ob prisotnosti RSV smo spremljali spektrofotometrično ( $\lambda_{\text{max}} = 516 \text{ nm}$ ). Najprej smo spremljali časovni potek reakcije med DPPH in RSV v odvisnosti od koncentracije RSV ob približno enaki začetni koncentraciji DPPH v reakcijski zmesi ( $\sim 50 \mu\text{M}$ ) (slika 8). Reakcijo smo spremljali do ravnotežnega stanja, tj. 90 minut, ko so bile spremembe vrednosti absorbanc praktično zanemarljive. V primeru reakcijske zmesi s koncentracijo RSV  $\sim 30 \mu\text{M}$  smo namreč opravili še dodatno meritve po 260 minutah, in sicer se je absorbanca v povprečju zmanjšala le še  $\sim 2,7 \%$  na uro. Pri nadaljnjem delu smo zato predpostavili, da reakcija doseže ravnotežno stanje po 90 minutah, in smo vse meritve opravili ob tem času. Po literaturnih podatkih je čas, po katerem doseže reakcija med RSV in DPPH ravnotežno stanje, odvisen od koncentracije RSV. Različni raziskovalci navajajo različne čase, in sicer v območju med 41,5 in 90 minut (48) oz. med 20 in 75 minut (49). Torej tudi literaturni podatki potrjujejo ustreznost izbranega časa. Nadalje, iz slike 8 je razvidno, da se pričakovano z naraščajočo koncentracijo RSV ( $\sim 10\text{-}40 \mu\text{M}$ ) delež preostalega DPPH zmanjšuje ( $\sim 80\text{-}30 \%$  DPPH v ravnotežnem stanju), torej je obseg redukcije DPPH vedno večji.

Preverili smo tudi stabilnost raztopine DPPH znotraj dneva. Z isto raztopino RSV (koncentracija  $\sim 30 \mu\text{M}$ ) smo sprožili reakcijo takoj po pripravi raztopine DPPH oz. po 5 urah staranja. Delež DPPH v ravnotežnem stanju se je v obeh primerih razlikoval za manj kot 2 % (40,86 % vs. 39,16 %), s čimer smo potrdili ustrezno stabilnost DPPH raztopine tekom enega dneva.

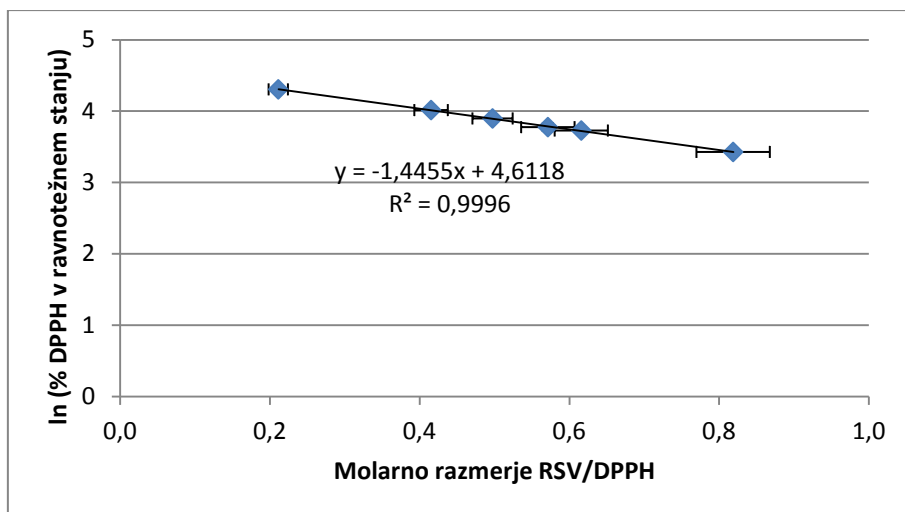
Prav tako smo želeli potrditi, da obsevanje reakcijske zmesi z UV svetlobo med izvedbo meritev ne vpliva na razpad DPPH. V ta namen smo pripravili dve reakcijski zmesi (koncentracija RSV  $\sim 27 \mu\text{M}$ ) in za prvo izvedli meritve v različnih časovnih intervalih (18 meritev v času do 90 minut), za drugo pa le v ravnotežnem stanju. Primerjali smo delež DPPH v ravnotežnem stanju, ki se je razlikoval za  $\sim 1,6 \%$  (43,21 % vs. 44,76 %), in tako potrdili, da obsevanje z UV svetlobo ne vpliva na stabilnost DPPH.



**Slika 8:** Časovni potek reakcije med RSV in DPPH oz. spreminjanje deleža preostalega DPPH v odvisnosti od časa po dodatku RSV v raztopino DPPH pri različnih koncentracijah RSV v reakcijski zmesi.

V nadaljevanju smo proučevali koncentracijsko odvisnost AOU RSV, ki smo jo podali kot delež preostalega DPPH v ravnotežnem stanju. V ta namen smo naredili dodatni paraleli v ravnotežnem stanju s približno istimi koncentracijami RSV kot pri spremljanju časovnega poteka reakcije med DPPH in RSV. Delež DPPH v ravnotežnem stanju je odvisen tudi od začetne koncentracije DPPH v reakcijski zmesi. Vplivu variabilnosti v koncentracijah pripravljenih raztopin DPPH smo se izognili z upoštevanjem molarnega razmerja RSV/DPPH v reakcijski zmesi namesto koncentracije RSV. Na sliki 9 je prikazana odvisnost  $\ln(\% \text{ DPPH v ravnotežnem stanju})$  od molarnega razmerja RSV/DPPH v reakcijski zmesi. Razvidna je linearna odvisnost z ustreznim  $R^2$  (0,9996), zato smo premico uporabili za določanje dejanske koncentracije RSV v reakcijskih zmesih pri nadaljnjih meritvah AOU RSV v SMES.





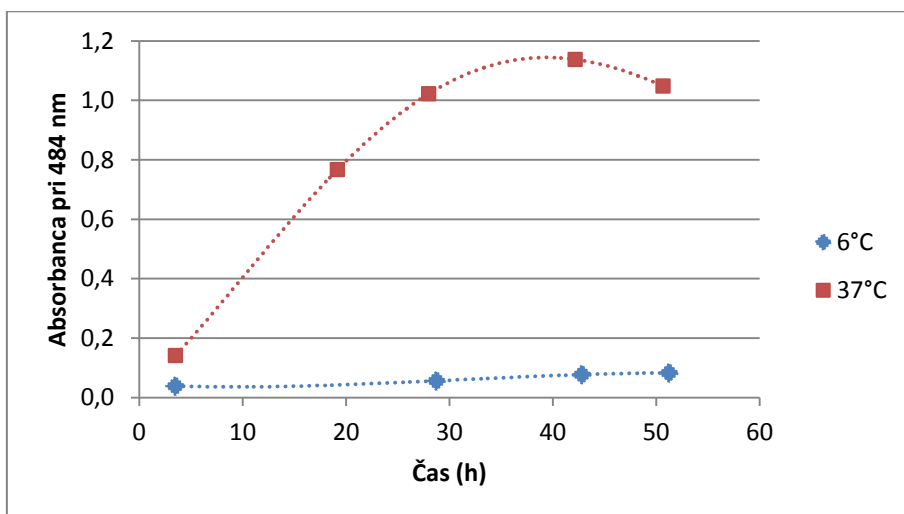
**Slika 9:** Prikaz linearnega modela  $\ln(\% \text{ DPPH v ravnotežnem stanju})$  v odvisnosti od molarnega razmerja RSV/DPPH. Rezultati so podani kot povprečje  $\pm$  SD ( $n=3$ ).

Iz enačbe premice (slika 9) smo izračunali parameter  $EC_{50}$ , ki ustreza molarnemu razmerju RSV/DPPH 0,484, kar znaša 24,2  $\mu\text{M}$  RSV pri ciljani začetni koncentraciji DPPH 50  $\mu\text{M}$ . AOU RSV so že predhodno določali z DPPH metodo, vendar so uporabljali različna topila, reakcijske čase, začetne koncentracije DPPH, pa tudi rezultate so podali na različne načine (50-55). Naše rezultate smo zato primerjali z literaturnimi podatki, kjer je AOU RSV izražena s parametrom  $EC_{50}$  ter pri podobnih eksperimentalnih pogojih, kot so bili naši, tj. v ravnotežnem stanju z metanolom kot topilom. Za lažjo primerjavo vrednosti parametra  $EC_{50}$  smo preračunali eksperimentalno določeno molarno razmerje RSV/DPPH (0,484) v ustrezne enote oz. na ustrezno uporabljeno začetno koncentracijo DPPH. Sanchez-Moreno s sodelavci je  $EC_{50}$  prav tako izrazil z upoštevanjem DPPH v enoti, in sicer je znašal  $337 \pm 12$  g RSV/kg DPPH (48), medtem ko naš  $EC_{50}$  v ustreznih enotah znaša 280 g RSV/kg DPPH. Ostali raziskovalci so  $EC_{50}$  izrazili v  $\mu\text{M}$  RSV, kljub temu da so rezultati zelo odvisni od začetne koncentracije DPPH. Villaño s sodelavci je določil  $EC_{50}$   $31,4 \pm 0,3$   $\mu\text{M}$  pri začetni koncentraciji DPPH  $\sim 63$   $\mu\text{M}$  (49) v primerjavi z  $EC_{50}$  30,5  $\mu\text{M}$  pri ustrezni koncentraciji DPPH, določenim v naši raziskavi. Stivala s sodelavci je določil  $EC_{50}$   $24,5 \pm 1,5$   $\mu\text{M}$  ( $\sim 60$   $\mu\text{M}$  DPPH) (56), ki pa je nekoliko nižji kot naš (29,0  $\mu\text{M}$ ). Zanimivo je, da se naši rezultati zelo dobro skladajo tudi z rezultati Iacopini-ja s sodelavci, ki je pri bistveno večji začetni koncentraciji DPPH ( $\sim 120$   $\mu\text{M}$ ) določil  $EC_{50}$   $57,8 \pm 0,1$   $\mu\text{M}$  (57), naš  $EC_{50}$  pri ustrezni koncentraciji pa je 58,1  $\mu\text{M}$ . Vidimo, da moramo biti pri interpretaciji rezultatov zelo kritični, saj je parameter  $EC_{50}$  odvisen tako od začetne koncentracije DPPH kot tudi drugih eksperimentalnih pogojev. Kljub temu je določen parameter  $EC_{50}$

primerljiv z rezultati drugih raziskovalcev, kar dodatno potrjuje ustreznost našega linearnega modela za določanje dejanske koncentracije RSV v reakcijskih zmesih s SMES+RSV.

#### 4.1.2 Proučevanje antioksidativne učinkovitosti resveratrola s FTC metodo

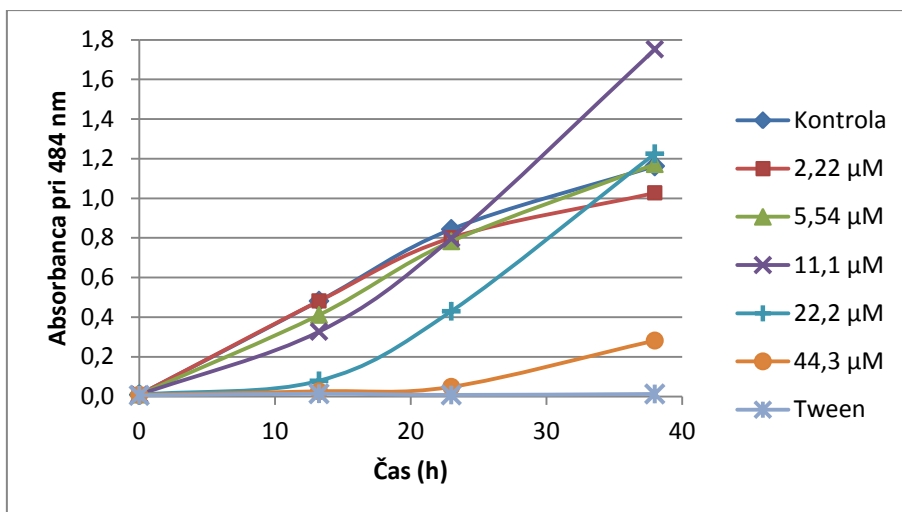
Tudi s FTC metodo smo AOU RSV prvotno določili v raztopini (metanolna raztopina, dodatno redčena s fosfatnim pufrom). Kot sistem za proučevanje sposobnosti RSV za inhibicijo LP smo izbrali emulzijo linolne kisline. Oksidacijo linolne kisline smo pospešili s povišano temperaturo (37 °C), s FTC metodo pa smo posredno določili vsebnost nastalih LOOH v sistemu z meritvami absorbance kompleksa med  $\text{Fe}^{3+}$  in  $\text{SCN}^-$  ( $\lambda_{\text{max}} = 484 \text{ nm}$ ). Najprej smo določili časovni potek oksidacije linolne kisline v emulziji brez prisotnosti AO. Pripravili smo kontrolno zmes in jo inkubirali pri 37 °C ter nato v različnih časovnih točkah določili vsebnost LOOH v emulziji. Z namenom ovrednotenja vpliva povišane temperature na oksidacijo linolne kisline smo primerjalno kontrolno zmes hranili v hladilniku (~ 6 °C). Slika 10 prikazuje vrednosti absorbanc za obe kontrolni zmesi v odvisnosti od časa inkubacije. Oksidacija linolne kisline poteka pri 37 °C bistveno hitreje kot pri 6 °C, saj so bile vrednosti absorbanc pri 37 °C tudi za faktor 10 višje kot pri 6 °C. Grafično smo določili čas inkubacije pri 37 °C, pri katerem je absorbanca in s tem vsebnost LOOH največja. Ob določenem času, tj. 38 ur, smo v nadaljevanju določali delež inhibicije LP po dodatku RSV.



Slika 10: Časovni potek oksidacije linolne kisline v emulziji ob inkubaciji pri različnih temperaturah.

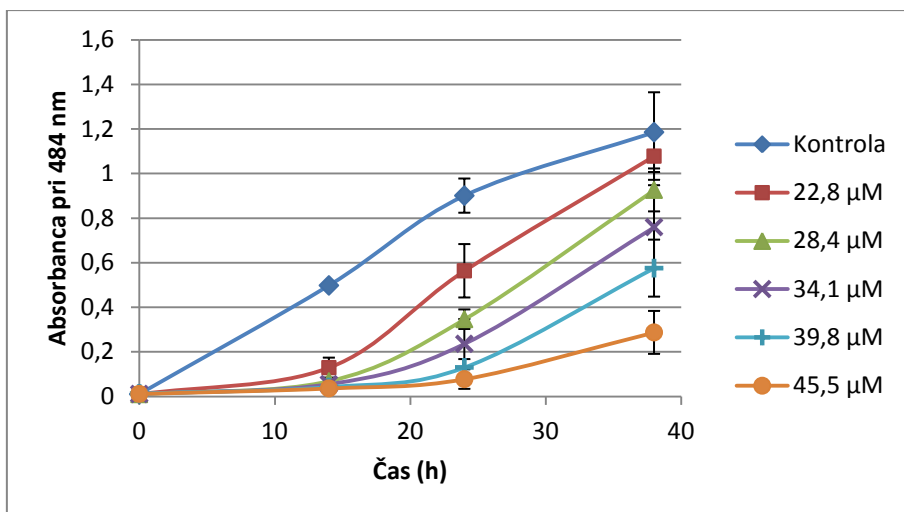
V nadaljevanju smo proučevali vpliv različnih koncentracij RSV na oksidacijo linolne kisline glede na kontrolno zmes. Najprej smo pripravili reakcijske zmesi s koncentracijami

RSV med 2 in 45  $\mu\text{M}$  z namenom izbire ustreznega koncentracijskega območja. Časovni potek oksidacije linolne kisline ob prisotnosti RSV smo merili v vnaprej izbranih časovnih točkah (0, 14, 24 in 38 ur). Slika 11 prikazuje izmerjene vrednosti absorbanc v odvisnosti od časa inkubacije s pripadajočimi vrednostmi za kontrolno zmes. Preizkusili smo tudi vpliv uporabljenega emulgatorja, in sicer smo istočasno inkubirali tudi micelarno raztopino Tween-a<sup>®</sup> 20 v fosfatnem pufru (brez linolne kisline) in določali vsebnost LOOH. Oksidacija Tween-a<sup>®</sup> 20 je glede na oksidacijo linolne kisline praktično zanemarljiva, s čimer smo potrdili, da je emulgator ustrezen za izvedbo poskusa. Iz slike 11 je razvidno, da so vrednosti absorbanc pri zelo nizkih koncentracijah RSV (2,22 in 5,54  $\mu\text{M}$ ) primerljive z vrednostmi absorbanc kontrolne zmesi v vseh časovnih točkah. Iz slednjega lahko sklepamo, da pri nizkih koncentracijah RSV ne vpliva znatno na potek oksidacije linolne kisline. Nasprotno pa smo pri koncentraciji 11,1  $\mu\text{M}$  RSV zaznali izrazito prooksidativno delovanje, saj je bila absorbanca po 38 urah za kar 50 % višja kot pri kontrolni zmesi. Po 14 urah so bile absorbance še nekoliko nižje kot pri kontroli (~ 30 %), po 24 urah pa praktično ni bilo razlik glede na kontrolno zmes. Pri koncentraciji RSV 22,2  $\mu\text{M}$  smo po 14 in 24 urah še opazili inhibicijo LP glede na kontrolno zmes (~ 85 in 50 %), medtem ko smo po 38 urah opazili rahlo prooksidativno delovanje (~ 5 % višja absorbanca glede na kontrolo). Koncentracija 44,3  $\mu\text{M}$  pa je že dovolj visoka, da je oksidacija linolne kisline tekom celotnega časa inkubacije v veliki meri zavarta (~ 95 % po 14 in 24 urah ter 75 % po 38 urah). Podobno koncentracijsko odvisno obnašanje v disperznem sistemu (liposomi v prisotnosti bakrovega acetata) so zasledili tudi pri kavni kislini. Pri nizkih koncentracijah je bila neučinkovita ali pa imela prooksidativni učinek, nad določeno kritično koncentracijo pa je prevladal antioksidativni učinek (58). Prooksidativni učinek so zaznali tudi pri nizkih koncentracijah nekaterih drugih fenolnih AO v emulziji linolne kisline v prisotnosti  $\text{Cu}^{2+}$ , pri nekaterih AO pa tudi brez njih (59). Mei in sodelavci so ugotovili, da obnašanje fenolnih AO v disperznih sistemih zavisi od ravnotežja med njihovimi pro- in antioksidativnimi učinki (60).

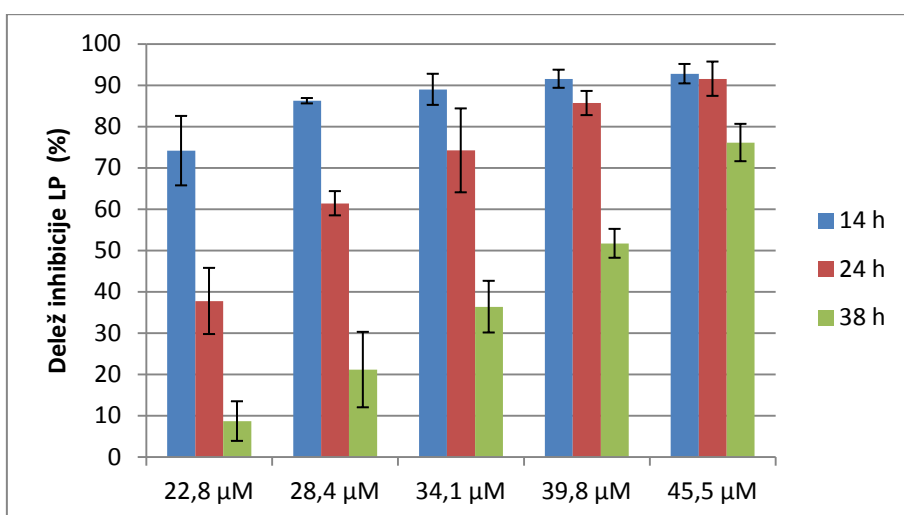


**Slika 11:** Časovni potek oksidacije linolne kisline v emulziji pri 37 °C ob prisotnosti RSV pri različnih koncentracijah.

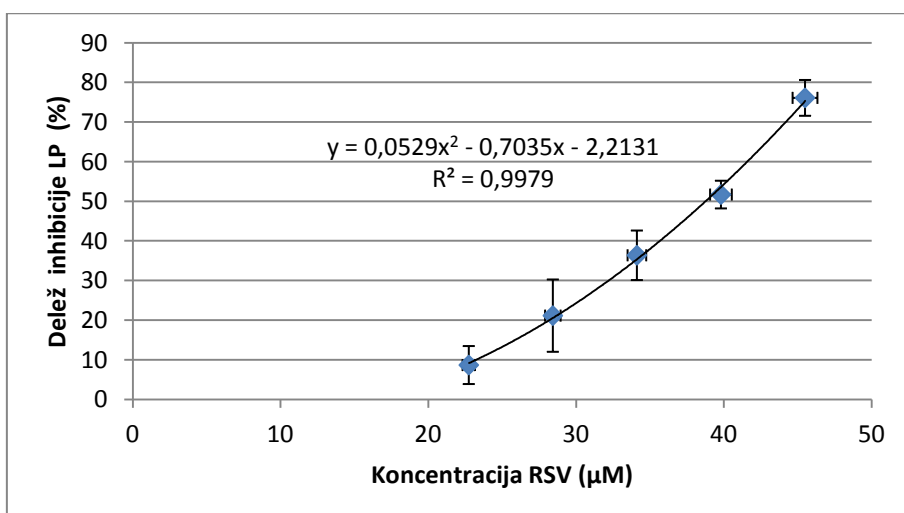
Na osnovi rezultatov smo za sledeče poskuse izbrali koncentracijsko območje, v katerem prevladajo antioksidativni učinki RSV (~ 20-45 μM). Časovni potek oksidacije linolne kisline smo spremljali pri petih različnih koncentracijah RSV v izbranem območju. Slika 12 prikazuje vrednosti absorbanca za posamezne koncentracije v odvisnosti od časa inkubacije. Pri vseh koncentracijah je bila oksidacija linolne kisline inhibirana glede na kontrolno zmes. Pri naraščajoči koncentraciji RSV so se vrednosti absorbanca oz. vsebnost LOOH nižale. Pri vsaki koncentraciji RSV smo določili delež inhibicije LP po 14, 24 in 38 urah (slika 13). Opazili smo, da je učinek RSV sčasoma manjši pri vseh testiranih koncentracijah oz. da se ob napredovanju oksidacije linolne kisline delež inhibicije LP glede na kontrolno zmes zmanjšuje. Delež inhibicije LP se je spreminjal od 74 do 9 % pri najnižji (22,8 μM) in od 93 do 76 % pri najvišji (45,5 μM) koncentraciji. Na osnovi rezultatov smo želeli določiti odnos med deležem inhibicije LP po 38 urah in koncentracijo RSV v reakcijski zmesi (slika 14). S pomočjo polinomske regresije smo na osnovi enačbe kvadratne funkcije ( $R^2 = 0,9979$ ) ocenili tudi  $EC_{50}$ , ki znaša 38,8 μM.



**Slika 12:** Časovni potek oksidacije linolne kisline v emulziji pri 37 °C ob prisotnosti RSV v različnih koncentracijah. Rezultati so podani kot povprečje ± SD (n=2).

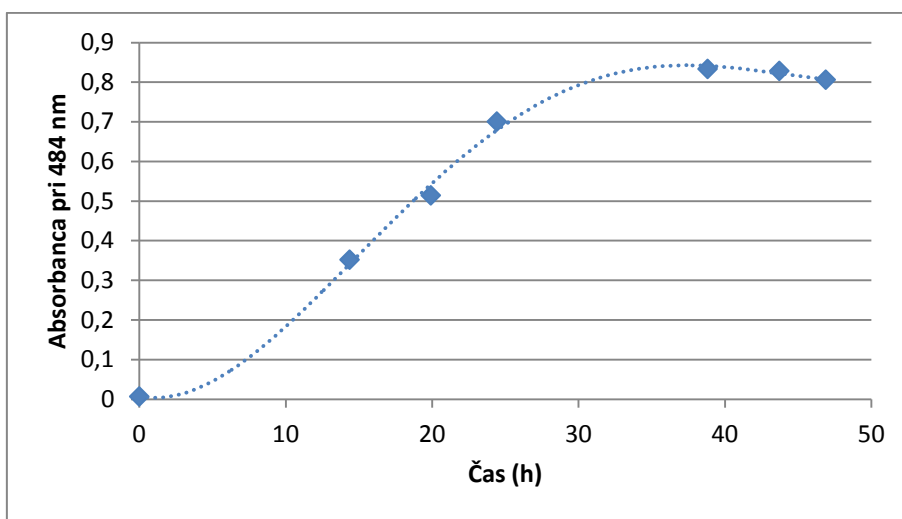


**Slika 13:** Primerjava deležev inhibicije LP glede na čas inkubacije pri 37 °C in koncentracijo RSV. Rezultati so podani kot povprečje ± SD (n=2).



**Slika 14:** Odvisnost deleža inhibicije LP po 38 urah v odvisnosti od koncentracije RSV. Rezultati so podani kot povprečje ± SD (n=2).

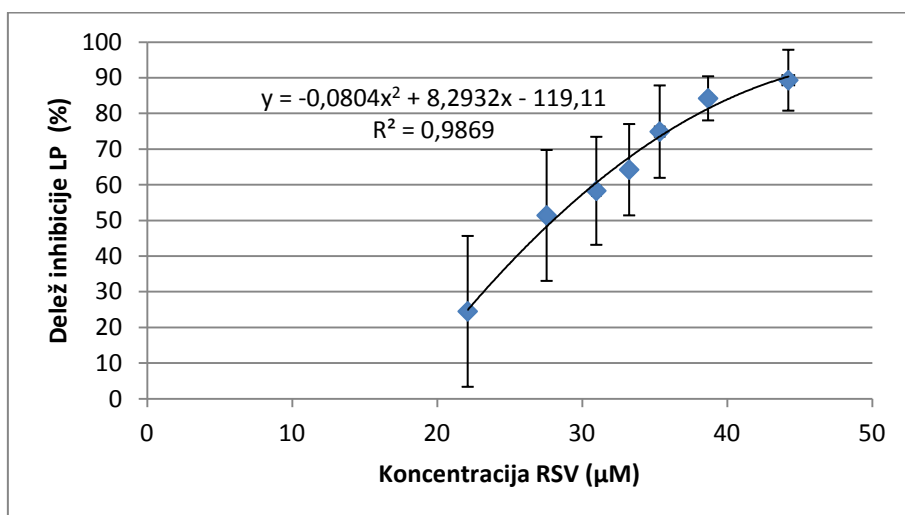
Dodatno smo preverili, če odpiranja vsebnika s kontrolno zmesjo v vmesnih časovnih točkah vpliva na čas, pri katerem je vsebnost LOOH največja, v primerjavi z AOU RSV določeno zgolj enkrat po 38 urah; v tem primeru pa je bil vsebnik med celotnim potekom inkubacije zaprt in tako ni bilo možnosti za dodaten vstop zraka oz. kisika iz okolja. Čas največje vsebnosti LOOH smo preverili tako, da smo v posamezni časovni točki odvzeli vzorec iz druge kontrolne zmesi (iz sicer iste izhodne emulzije linolne kisline) ter določili vsebnost LOOH s FTC. Kot je razvidno iz slike 15, tudi pri večkratnem odpiranju vsebnika čas znaša ~ 38 h.



**Slika 15:** Časovni potek oksidacije linolne kisline v emulziji pri 37 °C ob inkubaciji brez odpiranja vsebnika.

Nadalje smo odvisnost deleža inhibicije LP od koncentracije RSV v reakcijski zmesi določali po 38 urah. Iz slike 16 je razvidno, da se je v koncentracijskem območju med 22 in 45  $\mu\text{M}$  delež inhibicije LP povečeval od 25 do 90 %, kar ni v skladu z rezultati meritev z vmesnimi časovnimi točkami, kjer se je pri približno istih koncentracijah RSV delež inhibicije povečeval med 9 in 76 % (slika 14). Kljub velikemu standardnemu odklonu, ki kaže na sipanje rezultatov, se delež inhibicije LP po 38 urah očitno razlikuje, če vsebnika med inkubacijo ne odpiramo napram vmesnim meritvam, kar je razvidno iz različnih oblik krivulj (sliki 14 in 16). Iz krivulje na sliki 16 smo s pomočjo polinomske regresije ( $R^2 = 0,9869$ ) prav tako določili parameter  $EC_{50}$ , ki znaša 27,9  $\mu\text{M}$ , in se razlikuje glede na predhodno določen (38,8  $\mu\text{M}$ ).  $EC_{50}$  RSV so s FTC metodo že določali, vendar so rezultate prikazali zgolj grafično, tako da lahko podamo le številčno oceno (~ 0,45 mM) (61). Razlog za več kot desetkratno razliko med določenim in literaturnim parametrom  $EC_{50}$  je verjetno predvsem v sestavi reakcijske zmesi z emulzijo linolne kisline, ki je v našem primeru vsebovala bistveno manjšo količino linolne kisline (~ 0,15 % v primerjavi z 0,5

%). Rezultati kažejo na to, da je AOU RSV večja, če vsebnika med inkubacijo ne odpiramo (nižji  $EC_{50}$ ). Možna razlaga je, da so se v teh pogojih tekom LP izčrpale zaloge kisika v sistemu, kar je omejilo nastanek LOO'. To bi razložilo tudi veliko sipanje rezultatov, saj lahko prihaja do variabilnih rezultatov, če se porabi ves kisik med LP (25). Pri meritvah v večih časovnih točkah pa je vsakokrat v vsebnik vstopal svež zrak, posledično so se obnovile zaloge kisika, kar je pospešilo nastanek LOO' ter nadaljnjo oksidacijo linolne kisline, kar se kaže v manjši AOU RSV. Zaradi velikega standardnega odklona, kot je razvidno iz slike 16, ne moremo natančno določiti koncentracije RSV v reakcijski zmesi glede na delež inhibicije LP (podobno kot smo naredili pri DPPH metodi), zato smo pri določanju funkcionalne stabilnosti SMES+RSV rezultate izrazili kot delež inhibicije LP.



**Slika 16:** Odvisnost deleža inhibicije LP v odvisnosti od koncentracije RSV v reakcijski zmesi ob inkubaciji brez odpiranja vsebnika. Rezultati so podani kot povprečje  $\pm$  SD ( $n=5$ ).

Na potek LP v emulzijah tipa O/V vpliva veliko različnih dejavnikov, kot so sestava notranje oljne faze, koncentracija kisika, prisotnost AO, lastnosti mejne površine med oljno in vodno fazo (npr. naboj), lastnosti kapljic notranje faze (npr. njihova velikost in koncentracija) ter interakcije s sestavinami vodne faze (62). Razloge za variabilnost rezultatov FTC metode lahko iščemo tudi v izhodni emulziji linolne kisline. Eden izmed možnih vzrokov je že reagent linolna kislina, ki glede na specifikacijo proizvajalca vsebuje 60-74 % linolne kisline in 18-34 % oleinske kisline kot glavne nečistote. Linolna in oleinska kislina sta obe nenasičeni maščobni kislini z 18 ogljikovimi atomi, razlikujeta pa se v številu dvojnih vezi. Linolna kislina ima dve dvojni vezi na mestih 9 in 12, oleinska kislina pa ima le eno dvojno vez na mestu 9 (44). Stopnja nenasičenosti maščobne kisline

vpliva na njeno dovzetnost za oksidacijo (62). V zmesih linolne in oleinske kisline so dokazali, da se linolna kislina oksidira hitreje kot oleinska (63). Nasprotno so v vodnih disperzijah maščobnih kislin dokazali, da se večkrat nenasičene maščobne kisline oksidirajo počasneje (64, 65). Prav tako so dokazali, da ima oleinska kislina večji prooksidativni učinek na hkrati prisotne trigliceride v oljnih kapljicah emulzije kot linolna kislina (66). Iz tega sklepamo, da se v našem sistemu oleinska kislina, ki je prisotna kot nečistota, oksidira hitreje kot linolna kislina. Glede na heterogenost reagenta, ki je podvržen tudi delni kristalizaciji pri shranjevanju na hladnem, razmerje med linolno in oleinsko kislino v izhodnih emulzijah in iz njih pripravljenih reakcijskih zmesih najverjetneje ni konstantno, kar vpliva na hitrost LP in posledično AOU RSV. Znano je, da je linolna kislina občutljiva na več dejavnikov (zrak, svetloba, vlaga, toplota) (44), zato so možne tudi oksidativne spremembe reagenta skozi čas zaradi večkratnega odpiranja reagenta. Nuchi in sodelavci so izpostavili tudi problematičnost Tween-a<sup>®</sup> 20 kot emulgatorja, ki se lahko oksidira do LOOH, ti pa lahko pospešijo oksidacijo maščobnih kislin v micelih in O/V emulzijah (67).

#### Velikost kapljic v emulziji linolne kisline

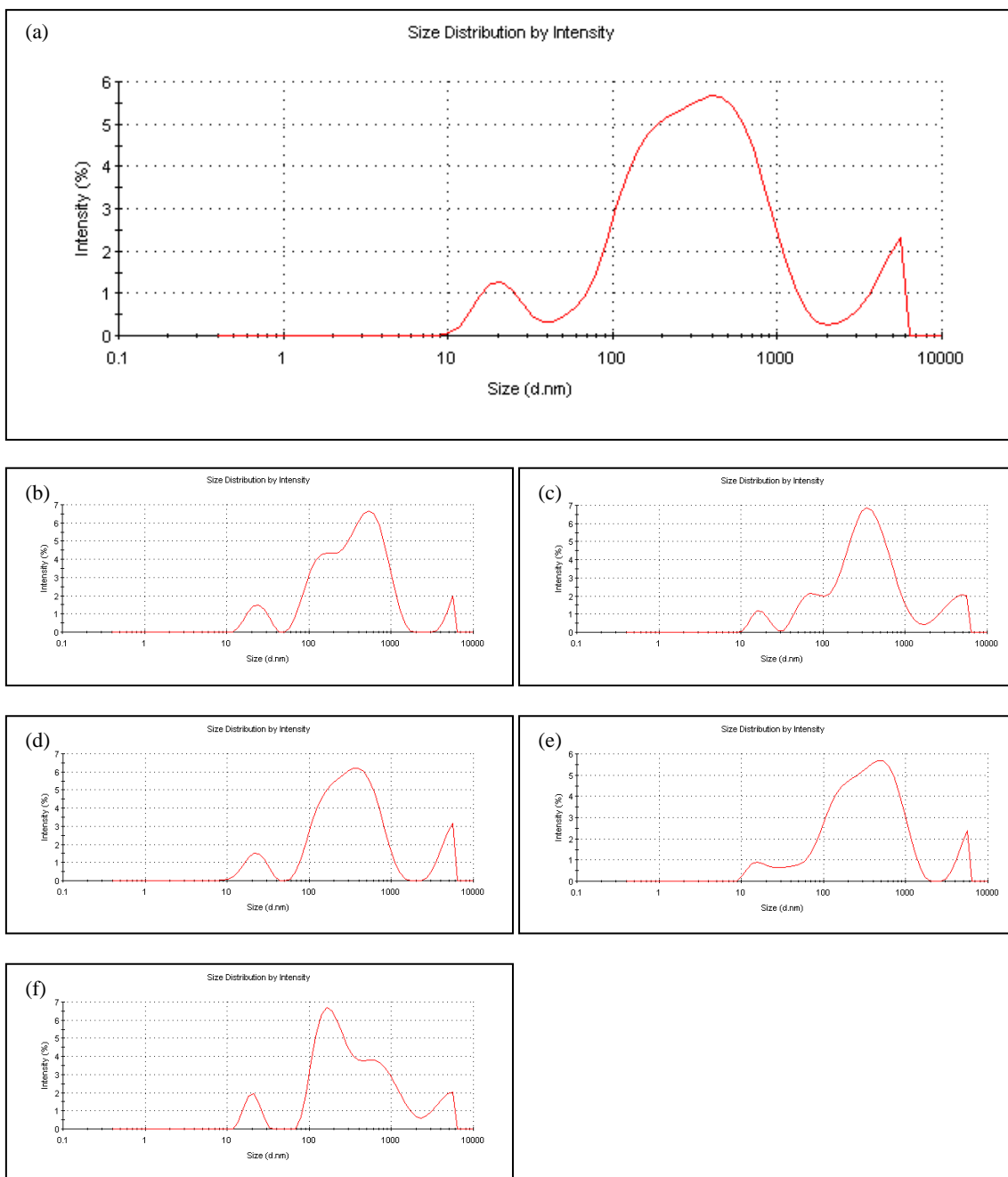
Možen vzrok za variabilnost rezultatov FTC metode bi lahko bilo tudi spreminjanje nekaterih lastnosti mejne površine med oljno in vodno fazo ter lastnosti kapljic notranje faze, saj so emulzije po definiciji termodinamsko nestabilni sistemi. To hipotezo smo želeli podkrepiti tudi eksperimentalno, zato smo izbranim emulzijam linolne kisline pomerili velikost kapljic notranje faze z metodo fotonske korelacijske spektroskopije pri 25 °C. Opazili smo, da se v vseh emulzijah pojavlja podobna porazdelitev velikosti kapljic, zato smo rezultate podali le za reprezentativno emulzijo linolne kisline. Velikost kapljic smo v isti emulziji pomerili petkrat in podali rezultate posameznih meritev in povprečni rezultat (preglednica III, slika 17). Iz preglednice III je razvidno, da je povprečna velikost kapljic na osnovi vseh petih meritev 196,9 nm in polidisperzni indeks (PDI) 0,853. PDI je merilo za širino porazdelitve velikosti kapljic. Če je vrednost PDI blizu 0 je porazdelitev velikosti kapljic homogena, z bližanjem vrednosti 1 pa je porazdelitev velikosti kapljic vedno bolj heterogena. Iz vrednosti PDI (0,853) lahko razberemo, da je emulzija linolne kisline zelo heterogen sistem, zato povprečna velikost kapljic ni reprezentativen parameter dejanske porazdelitve kapljic emulzije; slednjo bomo zato razložili s pomočjo preglednice III in slike 17. Pri vseh posameznih meritvah lahko vidimo, da se pri ~ 20 nm pojavlja vrh sicer dokaj nizko intenziteto (povprečno pri 21,65 nm in z intenziteto 6,8 %). Sklepali smo, da ta



vrh najverjetneje pripada micelom emulgatorja, saj molekule Tween-a<sup>®</sup> 20 pri koncentraciji nad kritično micelarno koncentracijo ( $3,5 \times 10^{-5}$  M) začnejo tvoriti micle (68). In sicer, ko smo pomerili velikost micelov raztopine Tween-a<sup>®</sup> 20 (z enako koncentracijo kot v emulziji), je povprečna velikost micelov znašala 43,76 nm s PDI 0,121. Pojavila sta se dva vrha, in sicer prvi pri 8,889 nm (97,9 %), ki glede na intenziteto pripada micelom Tween-a<sup>®</sup> 20, in drugi pri 260,6 nm, ki pripada nečistotam v fosfatnem pufru (2,1 %), kar smo dodatno potrdili z meritvami fosfatnega pufra. Povečanje velikosti micelov v emulziji linolne kisline glede na micelarno raztopino Tween-a<sup>®</sup> 20 lahko pripišemo vključevanju linolne kisline v micle emulgatorja. Proste maščobne kisline so amfifilne spojine s  $pK_a$  okrog 5 in lahko v vodnih raztopinah delno disociirajo, nastali anioni pa so delno topni v vodi in lahko tvorijo micle (68, 69). Prav tako je iz vseh posameznih meritev razviden vrh pri ~ 4000 nm (povprečno pri 4364 nm in z intenziteto 8,0 %). Prisotnost tega vrha je lahko posledica prisotnih prašnih delcev v emulziji ali preostalih kristalov iz reagenta linolne kisline, ki delno kristalizira pri shranjevanju na hladnem (0-4 °C). Emulzijo smo namreč pred meritvami hranili v hladilniku in se kljub temperiranju na 25 °C nastali kristali najverjetneje niso popolnoma stalili. Med približno 50 in 2000 nm pa se pri posameznih meritvah pojavljata eden ali dva vrhova, ki najverjetneje pripadata kapljicam emulzije. Glede na posamezne meritve lahko vidimo, da se v tem območju pojavljajo zelo različni vrhovi z različnimi intenzitetami. Ne glede na število prisotnih vrhov je skupna intenziteta vrhov v območju med 50 in 2000 nm ~ 85 %.

**Preglednica III:** Rezultati meritev velikosti kapljic v emulziji linolne kisline za reprezentativno emulzijo linolne kisline.

| Meritev          | Porazdelitev velikosti kapljic |                            |                             | Povprečna velikost kapljic | PDI          |
|------------------|--------------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------|
| 1                | 528,0 nm<br>(65,0 %)           | 133,3 nm<br>(24,7 %)       | 23,98 nm<br>(6,9 %)         | 204,0 nm                   | 0,845        |
| 2                | 416,9 nm<br>(70,9 %)           | 72,51 nm<br>(12,9%)        | 3856 nm<br>(11,6 %)         | 187,4 nm                   | 0,938        |
| 3                | 366,6 nm<br>(82,5 %)           | 4653 nm<br>(9,5 %)         | 22,35<br>(8,0 %)            | 201,4 nm                   | 0,842        |
| 4                | 407,3 nm<br>(88,8 %)           | 4861 nm<br>(5,8 %)         | 18,29 nm<br>(5,4 %)         | 196,7 nm                   | 0,835        |
| 5                | 224,0 nm<br>(55,9 %)           | 885,2 nm<br>(28,3 %)       | 4169 nm<br>(8,8 %)          | 195,3 nm                   | 0,807        |
| <b>Povprečje</b> | <b>404,6 nm<br/>(85,1 %)</b>   | <b>4364 nm<br/>(8,0 %)</b> | <b>21,65 nm<br/>(6,8 %)</b> | <b>196,9 nm</b>            | <b>0,853</b> |



**Slika 17:** (a) Povprečna porazdelitev velikosti kapljic v emulziji linolne kisline na osnovi 5 meritev in (b)-(f) posameznih 5 porazdelitev velikosti kapljic.

Emulzije tipa O/V so sestavljene iz kapljic notranje oljne faze, zunanje vodne faze in mejne površine med obema fazama. Mejna površina je sestavljena iz molekul emulgatorja, molekul oljne in vodne faze ter drugih molekul, ki jih emulgatorski film privlači zaradi svojih lastnosti. LP pospešujejo reakcije, ki se odvijajo na mejni površini in so posledica interakcij med LOOH iz kapljice, ki so pogosto površinsko aktivni in se zadržujejo na mejni površini, in snovmi, ki pospešujejo LP in so največkrat prisotne v vodni fazi (npr. ioni prehodnih kovin). Pri manjši velikosti kapljic je mejna površina med fazama večja,

torej bi pričakovali večjo hitrost LP (62). Slednje so v okviru raziskav potrdili, toda le za začetno fazo LP, kasneje pa velikost kapljic ni več vplivala na hitrost LP (70, 71), medtem ko so določene raziskave dale nasprotno rezultate, torej da je pri manjših kapljicah oksidativna stabilnost emulzije večja (72, 73). Prav tako pa so tudi dokazali, da velikost kapljic ne vpliva na hitrost LP (74-76). Glede na literaturne podatke je torej nemogoče zanesljivo sklepati na dejanski vpliv velikosti kapljic v emulzijah tipa O/V na hitrost LP zaradi nasprotujočih si rezultatov. Potrebno je poudariti, da so v omenjenih študijah proučevali vpliv velikosti kapljic le na hitrost oksidacije v različnih O/V emulzijah in ne na učinkovitost AO v izbranih emulzijah, česar pa v literaturi nismo zasledili. AOU v emulzijah tipa O/V je odvisna od kemijske narave AO in njegove lokacije v sistemu oz. porazdeljevanja med faze emulzije, ki je odvisno predvsem od njegove polarnosti (62). RSV je lipofilen AO z logP 3,42 (77), ki je pri pH 7 pretežno v neionizirani obliki, saj je njegov  $pK_{a1}$  8,8 (78). Posledično pričakujemo, da se RSV v emulzijah O/V najverjetneje porazdeljuje predvsem v oljne kapljice. V emulziji linolne kisline pa smo dokazali tudi prisotnost micelov emulgatorja, ki lahko solubilizirajo lipofilne molekule, kot je RSV in spremenijo njegovo porazdeljevanje med fazama (79). To bi lahko vplivalo tudi na njegovo učinkovitost pri zaviranju LP v oljnih kapljicah. Hkrati pa je lahko problematično tudi to, da smo lipofilni RSV k emulziji linolne kisline dodali v obliki vodno-alkoholne raztopine. Za lipofilne AO se namreč priporoča dodajanje v oljno fazo emulzije pred homogenizacijo (80). Ponginebbi s sodelavci je dokazal, da že miceli Tween-a<sup>®</sup> 20 v vodni fazi izkazujejo zaščitni učinek na oksidacijo linolne kisline v notranji fazi (68). Prav tako lahko miceli emulgatorja solubilizirajo LOOH in tako zmanjšajo njihovo količino v oljnih kapljicah in posledično nastajanje radikalov zaradi njihove razgradnje (81). Sicer zelo enostaven sistem, kot je emulzija linolne kisline, se dejansko izkaže kot zelo kompleksen, v katerem je težko kontrolirati vse dejavnike, ki lahko vplivajo na hitrost LP in njeno inhibicijo z AO.

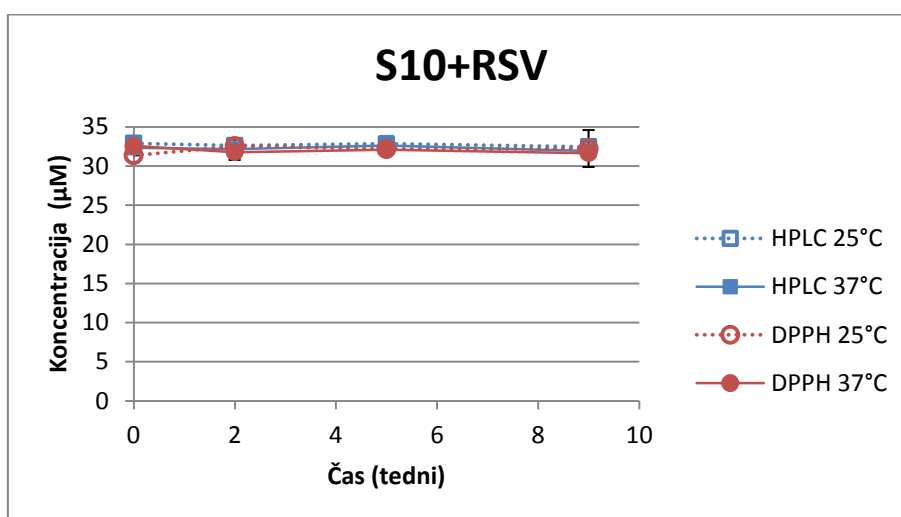
## 4.2 FUNKCIONALNA IN KEMIJSKA STABILNOST RESVERATROLA V SMES

Kemijska stabilnost učinkovine pomeni zmožnost ohranjanja dovolj velikih koncentracij za zagotavljanje njene učinkovitosti in varnosti. Pripravek z AO lahko izgubi AOU ali celo pridobi prooksidativni učinek brez znatnih sprememb v vsebnosti učinkovine, zato je potrebno hkratno vrednotenje funkcionalne stabilnosti. Ta zagotavlja ohranjanje učinkovitosti pripravka s specifično funkcijo oz. v primeru pripravka z AO ohranjanje njegove AOU (82). V okviru diplomskega dela smo ovrednotili kemijsko in funkcionalno stabilnost izbranih SMES z 10 % vgrajenega RSV pri sobni temperaturi (25 °C) in 37 °C tekom 9 tedenskega staranja. Kemijsko stabilnost RSV smo določali s HPLC analizo, funkcionalno stabilnost SMES+RSV pa z izbranimi metodama za določanje AOU, tj. z DPPH in FTC metodo. DPPH metodo je za spremljanje funkcionalne stabilnosti AO uporabilo že več raziskovalcev (82, 83), medtem ko uporabo FTC metode v te namene nismo zasledili v literaturi. Obe metodi za določanje AOU temeljita na spektrofotometričnem merjenju, zato smo najprej potrdili, da sestavine SMES ne absorbirajo v področju merjenja (516 in 484 nm). V nadaljevanju smo želeli izbrati način redčenja SMES+RSV oz. končno koncentracijo RSV v reakcijski zmesi z DPPH oz. linolno kislino, ki bi bila ustrezna za izvedbo tako DPPH kot FTC metode. Končno koncentracijo RSV smo izbrali na osnovi rezultatov določanja AOU RSV v raztopinah z obema metodama. Želeli smo, da je pri izbrani koncentraciji delež preostalega DPPH po reakciji z RSV nekoliko nižji kot 50 % in delež inhibicije LP nekoliko višji kot 50 %, saj smo pričakovali padec AOU tekom staranja (torej dvig deleža DPPH in padec deleža inhibicije LP). Izbrana končna koncentracija RSV je bila 32  $\mu\text{M}$ , pri kateri smo glede na rezultate proučevanja AOU RSV v raztopinah ocenili pričakovan delež DPPH v ravnotežnem stanju ( $\sim 40\%$  pri začetni koncentraciji DPPH 50  $\mu\text{M}$ ) in delež inhibicije LP ( $\sim 64\%$  pri merjenju po 38 urah). Pri teoretični koncentraciji RSV 32  $\mu\text{M}$  smo podali tudi rezultate HPLC analize. Rezultate FTC smo podali ločeno od rezultatov DPPH in HPLC analize zaradi nezadostne optimiziranosti metode.

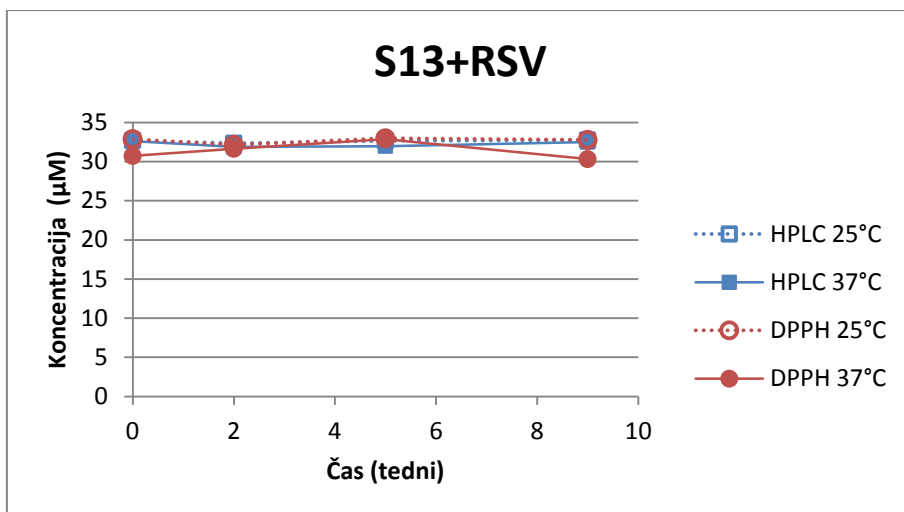
#### 4.2.1 Vrednotenje funkcionalne stabilnosti resveratrola v SMES z DPPH metodo v primerjavi s kemijsko stabilnostjo, določeno s HPLC

Tako z DPPH kot HPLC analizo smo določali dejansko koncentracijo RSV v končnih raztopinah SMES+RSV s teoretično koncentracijo RSV 32  $\mu\text{M}$  v vnaprej določenih časovnih točkah pri 25 °C in 37 °C (slike 18-24). Z DPPH metodo smo koncentracijo RSV določili iz vnaprej pripravljene umeritvene premice na raztopinah RSV (slika 9), s HPLC pa glede na odziv standardne raztopine RSV. Posamezen vzorec (SMES+RSV) smo ob izdelavi razdelili na dva dela za staranje na 25 °C oz. 37 °C in tako zagotovili isto začetno vsebnost RSV. Posledično smo pričakovali, da bomo ob času 0 določili enake dejanske koncentracije RSV z obema metodama. Slika 18 prikazuje določene dejanske koncentracije RSV v končni raztopini SMES+RSV v nosilnem sistemu S10 (S10+RSV). Ob času 0 smo s HPLC določili koncentraciji 32,9  $\mu\text{M}$  (25 °C) in 32,3  $\mu\text{M}$  (37 °C), z DPPH metodo pa 31,4  $\mu\text{M}$  (25 °C) in 32,6  $\mu\text{M}$  (37 °C). Iz rezultatov je razvidno, da se vse vrednosti gibljejo okrog teoretične vrednosti 32  $\mu\text{M}$  z manjšim odstopanjem. Iz slike 18 je razvidno, da se tudi po 2, 5 in 9 tednih staranja koncentracija RSV ni spremenila. Po 9 tednih staranja so bile s HPLC določene koncentracije RSV 32,5  $\mu\text{M}$  (25 °C) in 31,9  $\mu\text{M}$  (37 °C), z DPPH metodo pa 32,2  $\mu\text{M}$  (25 °C) in 31,6  $\mu\text{M}$  (37 °C). Vse določene koncentracije so pri vseh štirih časovnih točkah in obeh temperaturah od teoretične vrednosti odstopale za manj kot 3 %, kar pomeni, da se vsebnost RSV, vgrajenega v S10, tekom 9 tednov staranja praktično ni spremenila. Rezultati kažejo na veliko stabilnost RSV tako pri 25 °C kot 37 °C, saj razlik med obema temperaturama ni bilo opaziti. Glede na rezultate nobena od sestavin S10 (Kolliphor<sup>®</sup> RH 40, Kolliphor<sup>®</sup> EL, Capmul<sup>®</sup> MCM EP, ricinusovo olje) ne vpliva na kemijsko ali funkcionalno stabilnost RSV, zato je razumljivo, da smo zelo podobne rezultate dobili tudi za RSV, vgrajen v ostale SMES (nosilni sistemi S13, S14, S15, S16, S17, S18; preglednica III), ki so se razlikovali zgolj v kvantitativni sestavi (slike 19-24). Tudi pri ostalih SMES+RSV je večina določenih koncentracij odstopala od teoretične vrednosti 32  $\mu\text{M}$  za manj kot 3 %, le nekaj posameznih vrednosti je odstopalo do največ 5,3 %. Ugotovili smo, da se rezultati vrednotenja kemijske stabilnosti s HPLC zelo dobro skladajo z rezultati vrednotenja funkcionalne stabilnosti z DPPH metodo. S HPLC in DPPH analizo smo dobili zelo primerljive vrednosti dejanskih koncentracij, kar pomeni, da je DPPH metoda primerna tudi za določanje koncentracije RSV, kar je dokazal tudi Vicentini s sodelavci (82). Potrdili smo torej, da so vsi preučevani

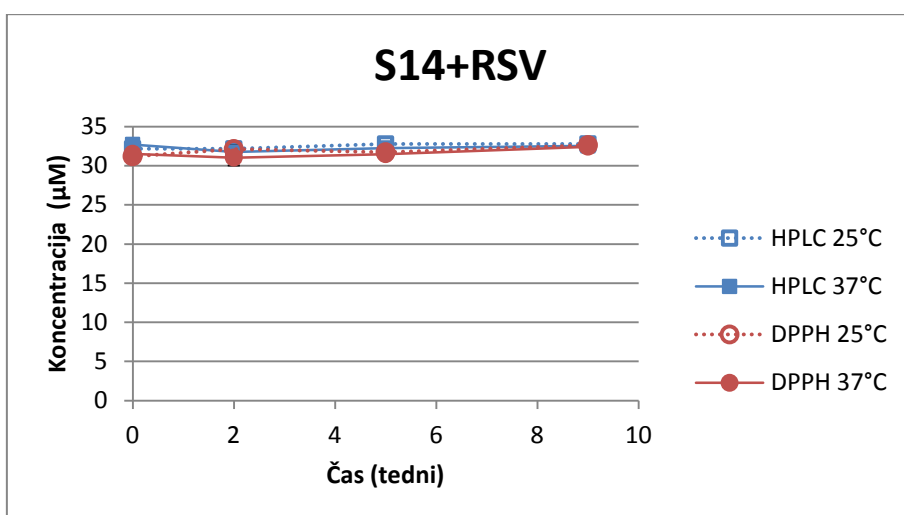
sistemi primerni za vgradnjo RSV, saj ne vplivajo niti na funkcionalno niti kemijsko stabilnost RSV. Prav tako nismo pri nobenem sistemu opazili vpliva povišane temperature (37 °C) glede na sobno temperaturo (25 °C), bi bilo pa potrebno v nadaljevanju izvesti stabilnostne študije tekom daljšega časovnega obdobja; v večini točk je bila namreč koncentracija RSV višja, čeprav zgolj minimalno, pri 25 °C. Poudariti je potrebno, da smo SMES+RSV shranjevali popolnoma zaščiteno pred svetlobo. V SMES smo vgrajevali trans- obliko RSV, saj cis- oblika zaradi svoje nestabilnosti v trdni obliki ni komercialno dostopna (84). Raztopljen trans-RSV pod vplivom sončne svetlobe ali pod vplivom UV obsevanja (254 in 366 nm) v veliki meri izomerizira v manj stabilno cis- obliko (84, 85). RSV, vgrajen v SMES, je v formulaciji že v raztopljenem stanju, zaradi česar bi bila stabilnost pri shranjevanju nezaščiteno pred svetlobo verjetno precej slabša, kar bi bilo potrebno potrditi tudi eksperimentalno. Rezultati raziskave, ki sta jo izvedla Trela in Waterhouse kažejo na to, da je pri ustrezni zaščiti pred svetlobo trans-RSV v raztopini stabilen tudi več mesecev (pH 1-7), razen v alkalnem mediju, kjer je stabilnost slabša (85). Predmet nekaterih raziskav v preteklih letih je bilo tudi izboljšanje stabilnosti RSV ob izpostavitvi svetlobi s pomočjo vgradnje v različne sisteme (porozne mikrosfere s ciano-funkcionalnimi skupinami, mikrokapsule na osnovi celic kvasovk, trdne nanodisperzije), ki ga do določene mere ščitijo pred njo (86-88). Nekatere raziskave sicer kažejo tudi, da je že sam trans-RSV v kristalinični obliki precej stabilen tudi pri obsevanju z UV ali fluorescenčno svetlobo (89).



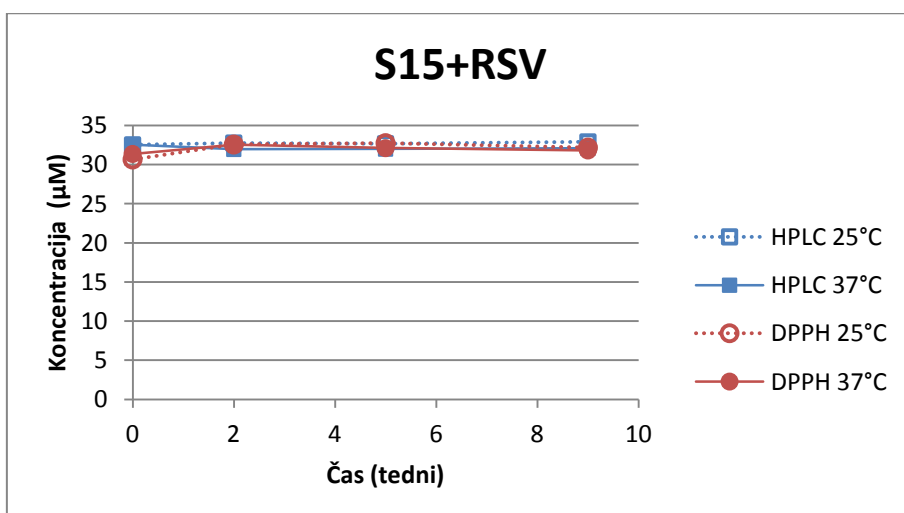
**Slika 18:** Dejanska koncentracija RSV v končni raztopini S10+RSV v odvisnosti od časa shranjevanja. Rezultati so podani kot povprečje  $\pm$  SD (n=2).



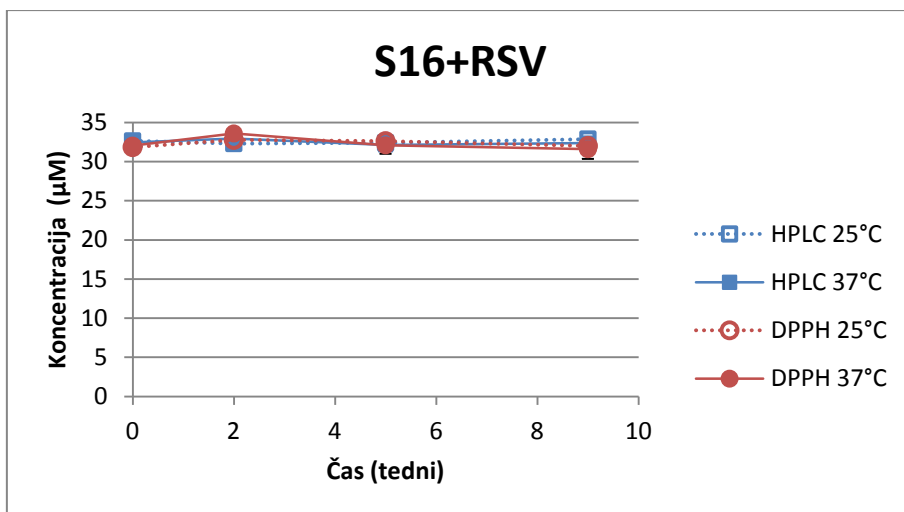
**Slika 19:** Dejanska koncentracija RSV v končni raztopini S13+RSV v odvisnosti od časa shranjevanja. Rezultati so podani kot povprečje  $\pm$  SD ( $n=2$ ).



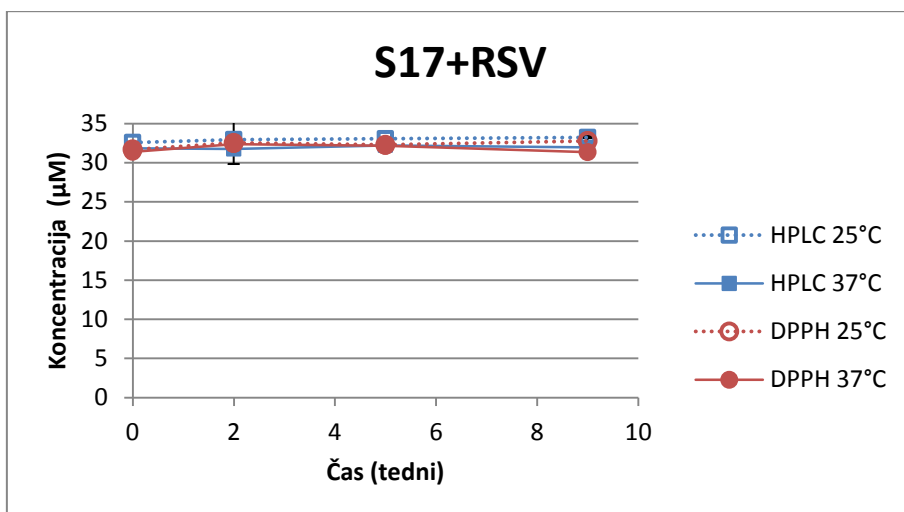
**Slika 20:** Dejanska koncentracija RSV v končni raztopini S14+RSV v odvisnosti od časa shranjevanja. Rezultati so podani kot povprečje  $\pm$  SD ( $n=2$ ).



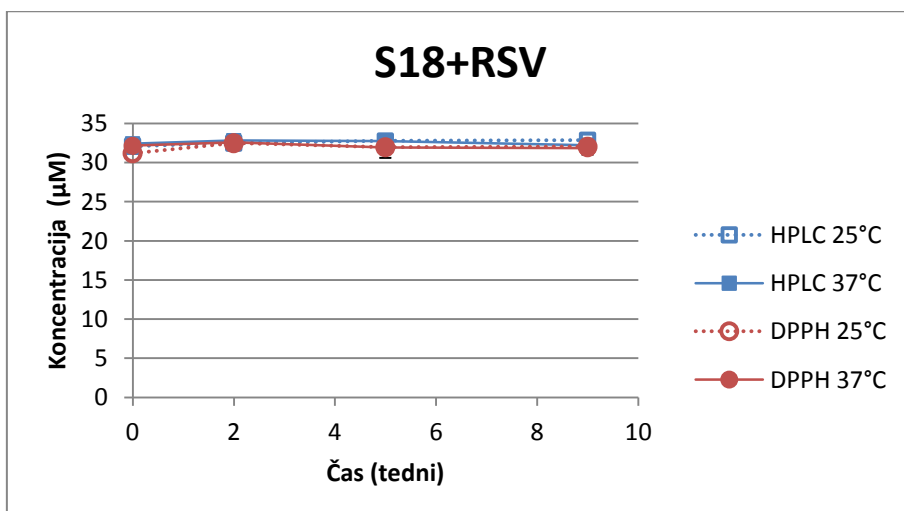
**Slika 21:** Dejanska koncentracija RSV v končni raztopini S15+RSV v odvisnosti od časa shranjevanja. Rezultati so podani kot povprečje  $\pm$  SD ( $n=2$ ).



**Slika 22:** Dejanska koncentracija RSV v končni raztopini S16+RSV v odvisnosti od časa shranjevanja. Rezultati so podani kot povprečje  $\pm$  SD ( $n=2$ ).



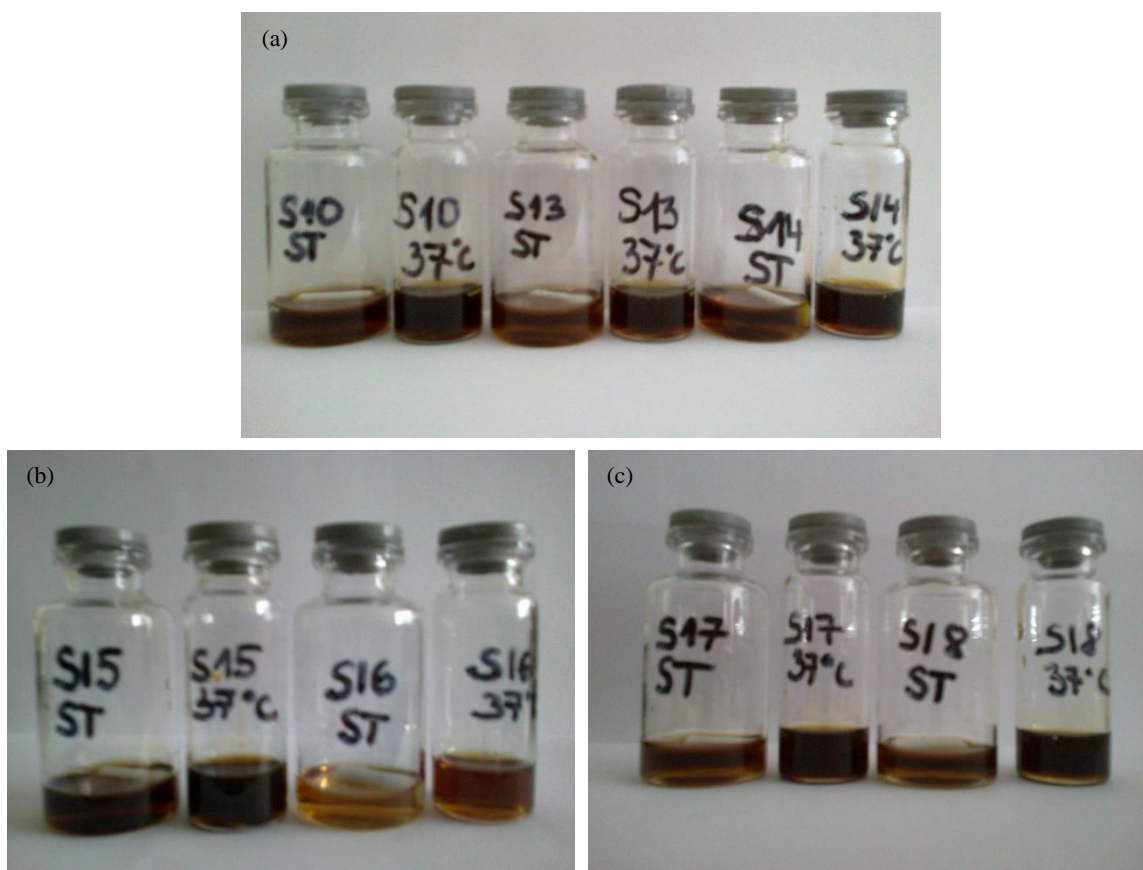
**Slika 23:** Dejanska koncentracija RSV v končni raztopini S17+RSV v odvisnosti od časa shranjevanja. Rezultati so podani kot povprečje  $\pm$  SD ( $n=2$ ).



**Slika 24:** Dejanska koncentracija RSV v končni raztopini S18+RSV v odvisnosti od časa shranjevanja. Rezultati so podani kot povprečje  $\pm$  SD ( $n=2$ ).



Po 9 tednih staranja pri 25 °C in 37 °C smo primerjali tudi organoleptične lastnosti, in sicer barvo in videz različnih SMES z vgrajenim RSV (slika 25). Načeloma so vsi sistemi zelo podobni, izjema je le S16, ki ne vsebuje Capmul-a<sup>®</sup> MCM EP in je nekoliko svetlejši. Pri vseh sistemih opazimo, da so po staranju na 37 °C nekoliko temnejši kot pri 25 °C. Eden izmed možnih vzrokov je večji obseg izomerizacije trans-RSV v cis-RSV pri 37 °C v primerjavi s 25 °C. Cis-RSV je rjavo obarvan (90) in posledično lahko prispeva k temnejšemu obarvanju SMES+RSV. Druga možnost pa je vpliv povišane temperature na sestavine SMES, za kar pa bi bilo potrebno spremljati tudi prazne SMES. Poudariti pa je potrebno, da že praškasta oblika trans-RSV vsebuje določen delež cis- oblike, zaradi česar so se sicer rumenkasto obarvani SMES že ob vgradnji RSV obarvali rjavo. Ne glede na morebitne organoleptične spremembe SMES+RSV sprememb v vsebnosti RSV in njegovi AOU nismo zaznali.



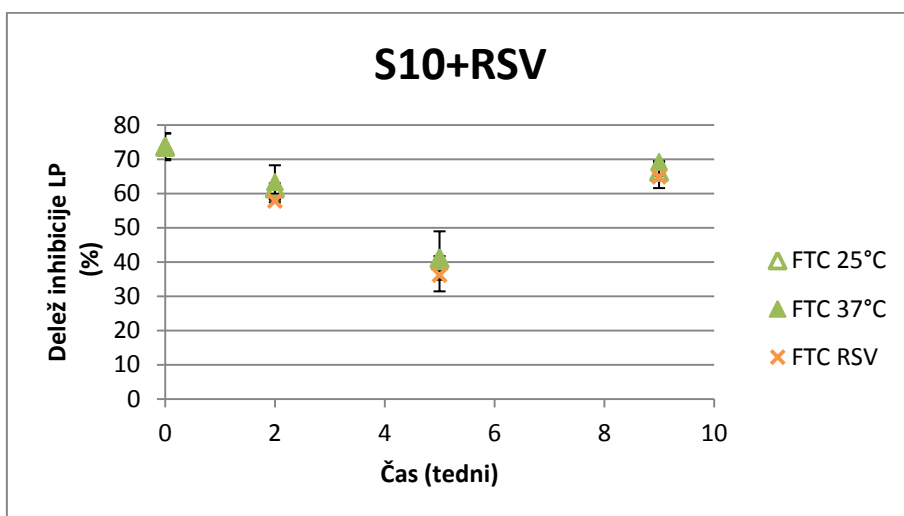
**Slika 25:** Različni SMES z vgrajenim RSV po 9 tednih staranja pri 25 °C (ST) in 37 °C: (a) S10, S13 in S14, (b) S15 in S16 in (c) S17 in S18.

#### 4.2.2 Vrednotenje funkcionalne stabilnosti resveratrola v SMES s FTC metodo

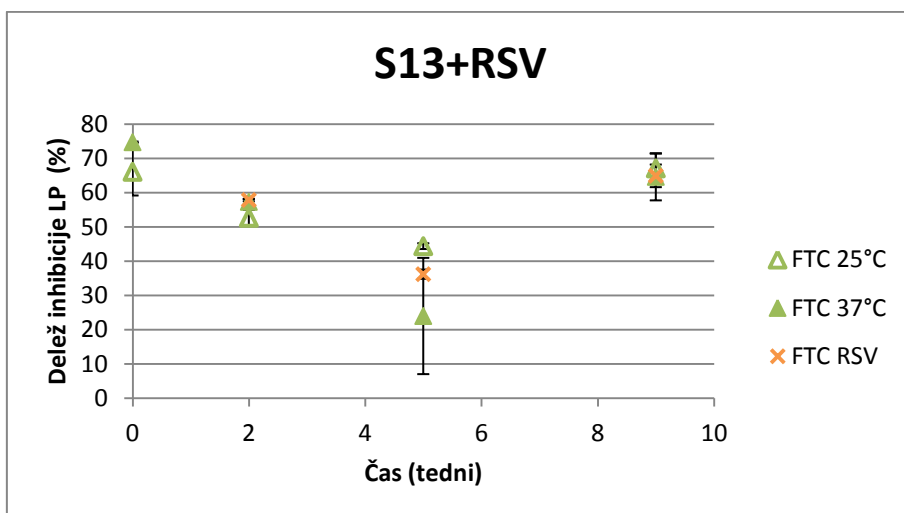
Funkcionalno stabilnost RSV, vgrajenega v SMES, smo vrednotili tudi s FTC metodo navkljub visoki variabilnosti preliminarnih rezultatov na raztopinah. S FTC metodo smo določali delež inhibicije LP pri teoretični koncentraciji RSV 32  $\mu\text{M}$  v vnaprej določenih časovnih točkah (ob pripravi ter po 2, 5 in 9 tednih) pri 25 °C in 37 °C (slike 26-32). S HPLC in DPPH analizo smo ugotovili, da so bile pri vseh SMES+RSV koncentracije tekom 9 tedenskega staranja praktično konstantne. Slika 26 prikazuje deleže inhibicije LP v odvisnosti od časa za reakcijsko zmes z S10+RSV. Ob pripravi oz. ob času 0 smo določili zelo podobna deleža inhibicije LP pri obeh temperaturah, in sicer 73,6 % (25 °C) ter 73,9 % (37 °C). Od drugega tedna naprej smo z isto emulzijo linolne kisline poleg posameznega SMES+RSV hkrati testirali še sveže pripravljeno raztopino RSV (32  $\mu\text{M}$ ). Po 2 tednih smo pri S10+RSV opazili rahel padec v deležu inhibicije LP (61,5 % pri 25 °C in 63,4 % pri 37 °C), nekoliko nižji rezultat pa smo dobili tudi pri hkrati testirani raztopini RSV (57,8 %). Po 5 tednih smo zaznali še dodaten padec v deležu inhibicije LP (41,0 % pri 25 °C in 40,2 % pri 37 °C), prav tako pri hkrati testirani raztopini RSV (36,2 %). Po 9 tednih pa smo ponovno določili podobne deleže inhibicije kot ob pripravi ter po 2 tednih (66,3 % pri 25 °C, 69,3 % pri 37 °C in 64,9 % pri raztopini). S hkratnim testiranjem raztopin RSV smo dokazali, da spreminjanje AOU RSV, vgrajenega v S10, ni posledica sprememb koncentracije ali učinkovitosti RSV v S10, saj je trend spreminjanja AOU RSV v raztopini zelo podoben. To dodatno potrjujejo rezultati HPLC in DPPH analize, kjer smo dokazali konstantno koncentracijo in AOU RSV. Podoben trend je opazen tudi pri vseh ostalih SMES+RSV (slike 27-32). Vendar pa lahko tudi upoštevaje rezultate FTC metode potrdimo, da se funkcionalna stabilnost RSV v vseh proučevanih SMES ohranja; določeni delež inhibicije LP je bil namreč vedno primerljiv s hkrati testirano svežo raztopino RSV, kljub razlikam v absolutni vrednosti.

Upoštevaje rezultate AOU RSV na raztopinah smo predvideli ~ 64 % delež inhibicije LP pri teoretični koncentraciji RSV 32  $\mu\text{M}$  po 38 urah. Rezultati po 0, 2 in 9 tednih (med 49 in 77 %) so v skladu s pričakovanji v okviru sicer zelo velikega standardnega odklona. Po 5 tednih pa smo določili precej nižjo AOU RSV, kar težko pojasnimo. Po 9 tednih smo zato poskus izvedli z drugo serijo Tween-a<sup>®</sup> 20 in ponovno dobili primerljive rezultate. Glede na to, da je bila vrednost absorbance kontrolne zmesi tudi po 5 tednih primerljiva z ostalimi, je najverjetneje prisotna nečistota v Tween-u<sup>®</sup> 20 vplivala na antioksidativno

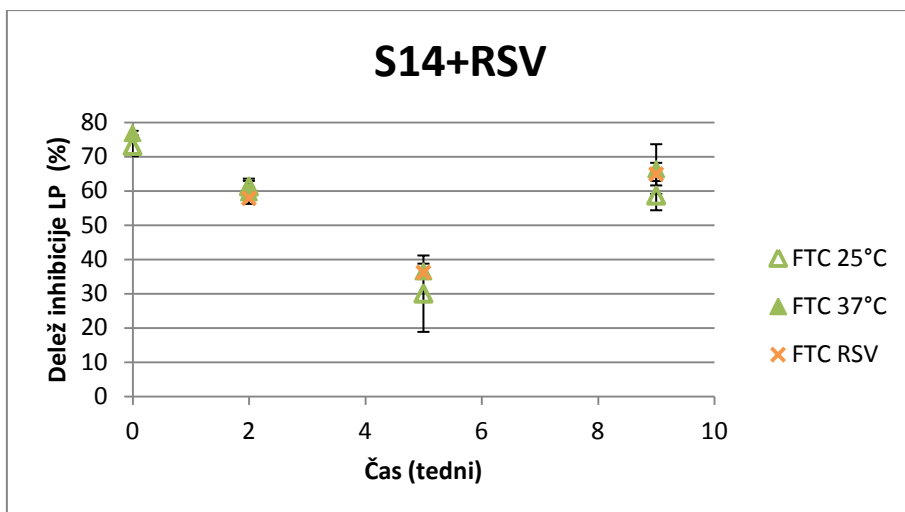
delovanje RSV. Rezultate smo kljub temu upoštevali pri grafičnem prikazu, saj smo s hkrati testirano raztopino RSV ovrgli možnost, da bi nanje vplivale spremembe SMES ali koncentracije RSV.



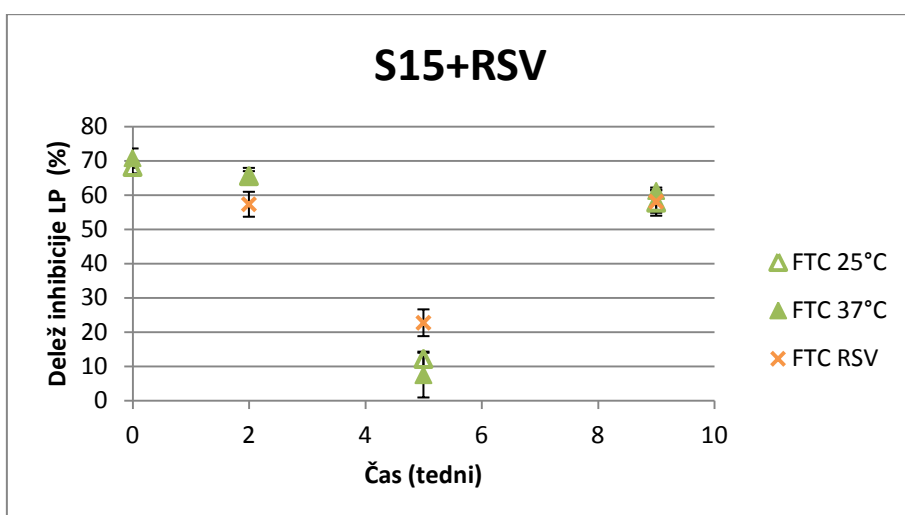
**Slika 26:** Delež inhibicije LP za reakcijsko zmes z S10+RSV in hkrati testirano raztopino RSV v odvisnosti od časa shranjevanja. Rezultati so podani kot povprečje  $\pm$  SD (n=2).



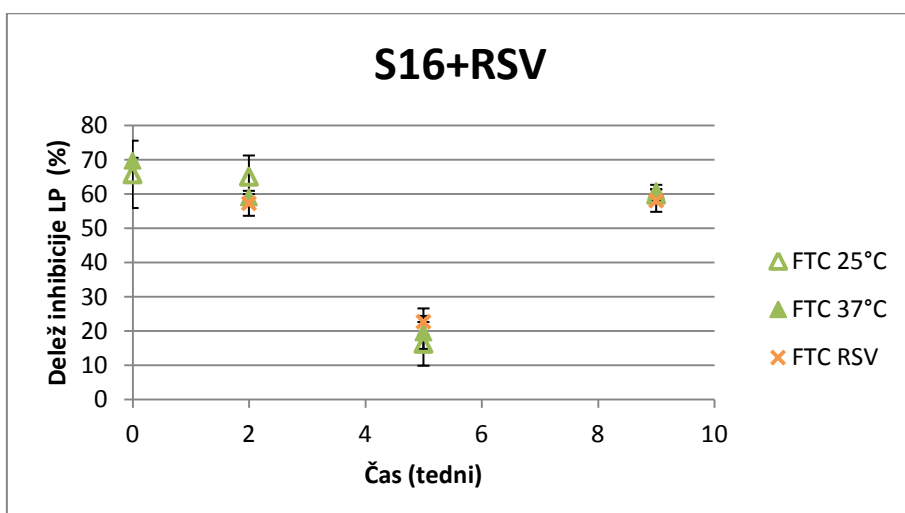
**Slika 27:** Delež inhibicije LP za reakcijsko zmes z S13+RSV in hkrati testirano raztopino RSV v odvisnosti od časa shranjevanja. Rezultati so podani kot povprečje  $\pm$  SD (n=2).



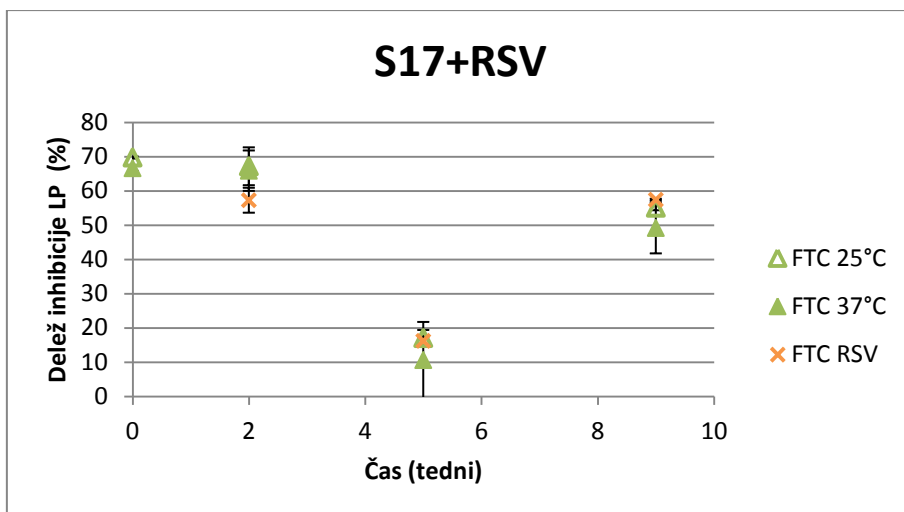
**Slika 28:** Delež inhibicije LP za reakcijsko zmes z S14+RSV in hkrati testirano raztopino RSV v odvisnosti od časa shranjevanja. Rezultati so podani kot povprečje  $\pm$  SD (n=2).



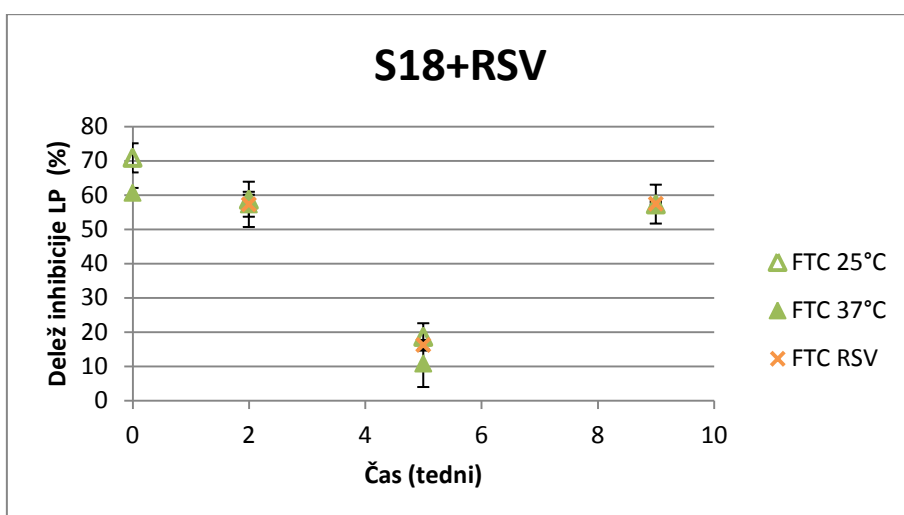
**Slika 29:** Delež inhibicije LP za reakcijsko zmes z S15+RSV in hkrati testirano raztopino RSV v odvisnosti od časa shranjevanja. Rezultati so podani kot povprečje  $\pm$  SD (n=2).



**Slika 30:** Delež inhibicije LP za reakcijsko zmes z S16+RSV in hkrati testirano raztopino RSV v odvisnosti od časa shranjevanja. Rezultati so podani kot povprečje  $\pm$  SD (n=2).

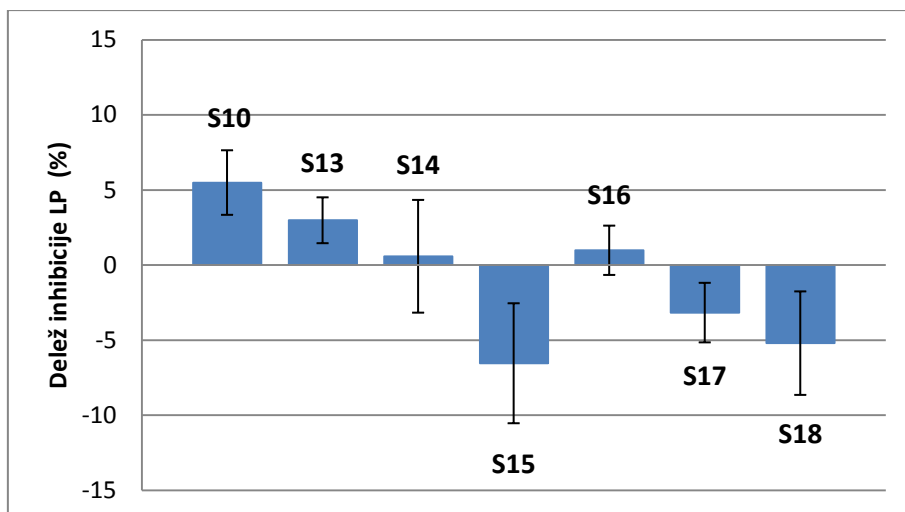


**Slika 31:** Delež inhibicije LP za reakcijsko zmes z S17+RSV in hkrati testirano raztopino RSV v odvisnosti od časa shranjevanja. Rezultati so podani kot povprečje  $\pm$  SD (n=2).



**Slika 32:** Delež inhibicije LP za reakcijsko zmes z S18+RSV in hkrati testirano raztopino RSV v odvisnosti od časa shranjevanja. Rezultati so podani kot povprečje  $\pm$  SD (n=2).

Ugotavljali smo tudi vpliv posameznih SMES kot nosilnih sistemov na obseg oksidacije linolne kisline v emulziji (slika 33). Prikazali smo deleže inhibicije LP za posamezne SMES brez vgrajenega RSV, ki so se gibali v območju med -6,5 in 5,5 %. Sistema S10 in S13 sta izkazovala rahel inhibitorni učinek, sistemi S15, S17 in S18 pa rahel prooksidativni učinek. Glede na to, da so vsi sistemi sestavljeni iz enakih sestavin in zaradi že dokazane velike variabilnosti v rezultatih ne moremo zaključiti, da kateri od nosilnih sistemov znatno vpliva na oksidacijo linolne kisline.



Slika 33: Vpliv SMES na delež inhibicije LP. Rezultati so podani kot povprečje  $\pm$  SD (n=2).

Ugotovili smo, da je na tej stopnji uporabnost FTC metode za določanje funkcionalne stabilnosti omejena. Velike spremembe v AOU starane formulacije z AO bi načeloma lahko potrdili ob primerjavi s hkrati testirano svežo raztopino istega AO. Manjše spremembe pa bi verjetno zakrila že v osnovi velika variabilnost v določeni AOU. Za večjo uporabnost metode bi bila potrebna nadaljnja optimizacija metode, in sicer predvsem izhodnega sistema (emulzija linolne kisline). V smislu sestave emulzije bi lahko metodo izboljšali z uporabo bolj čistega reagenta linolne kisline ali celo z zamenjavo modelnega lipida z drugim, ki ne tvori micelov v vodnih raztopinah. Uporabili bi lahko tudi emulgator večje čistote ali ga zamenjali z drugim, ki je manj problematičen glede tvorbe LOOH. Ne glede na izbrani lipid in emulgator bi bilo potrebno optimizirati razmerje med lipidom in emulgatorjem v emulziji, ki zagotavlja ustrezno stabilnost emulzije brez tvorbe presežka micelov, ki lahko vplivajo na potek LP. Optimizirati bi bilo potrebno tudi način priprave emulzije in njeno homogenizacijo za zagotovitev ozke porazdelitve velikosti kapljic, da izključimo morebiten vpliv variabilnosti v velikosti kapljic na LP. Prav tako bi morali izbrati tudi optimalen način dodajanja AO v emulzijo in način inkubacije z vidika dostopnosti kisika, da le-ta ne bi omejeval poteka LP. Namesto pospeševanja LP s toploto bi lahko reakcijo pospešili z azo iniciatorji pri nižji temperaturi, kar naj bi omogočalo bolj ponovljive rezultate.

## 5 SKLEP

V okviru diplomske naloge smo določali antioksidativno učinkovitost resveratrola z dvema *in vitro* metodama, in sicer DPPH in FTC metodo. Obe metodi smo uporabili za določanje funkcionalne stabilnosti resveratrola, vgrajenega v SMES z različnimi količinskimi sestavami, tekom 9 tedenskega staranja (pri 25 °C in 37 °C) ter jo primerjali s kemijsko stabilnostjo resveratrola, določeno s HPLC.

Ugotovili smo, da pri DPPH metodi obstaja dobra korelacija med antioksidativno učinkovitostjo resveratrola in molarnim razmerjem med resveratrolom in DPPH v reakcijski zmesi, zato je metoda primerna za določanje koncentracije resveratrola. Nasprotno je pri FTC določena antioksidativna učinkovitost zelo variirala, tako da nismo mogli določiti koncentracijske odvisnosti. Razloge za to smo iskali predvsem v termodinamski nestabilnosti emulzije linolne kisline kot izhodnem sistemu, kar smo podkrepili tudi z merjenjem velikosti kapljic v emulziji. Problematične so bile tudi nekatere lastnosti sestavin emulzije ter kakovost reagentov, ki smo jih uporabili za pripravo emulzije, prav tako tudi dostopnost kisika ob inkubaciji reakcijske zmesi.

Pri vrednotenju kemijske in funkcionalne stabilnosti resveratrola, vgrajenega v SMES, smo ugotovili, da po 9 tednih staranja zaščiten pred svetlobo tako pri 25 °C kot 37 °C ni bilo opaznega padca v koncentraciji ali antioksidativni učinkovitosti resveratrola glede na rezultate HPLC in DPPH analize. Tudi s FTC smo potrdili ohranjanje funkcionalne stabilnosti, saj je bila antioksidativna učinkovitost vedno primerljiva s hkrati testirano sveže pripravljeno raztopino resveratrola. Potrdili smo, da nobena izmed sestavin SMES (Kolliphor<sup>®</sup> RH 40, Kolliphor<sup>®</sup> EL, Capmul<sup>®</sup> MCM EP, ricinusovo olje) ne vpliva na kemijsko ali funkcionalno stabilnost resveratrola. Upošteva naše rezultate je z vidika stabilnosti vseh sedem proučevanih sistemov enako primernih za peroralno aplikacijo resveratrola, potrebno pa bi bilo izvesti dodatne stabilnostne študije tekom daljšega časovnega obdobja.

V nalogi smo potrdili primernost DPPH metode za določanje funkcionalne stabilnosti resveratrola. Ugotovili smo, da je tudi FTC metoda primerna za določanje večjih sprememb v SMES z vgrajenim resveratrolom pod pogojem, da rezultate primerjamo s hkrati testirano raztopino resveratrola. Za večjo uporabnost FTC metode pa bi bila potrebna nadaljnja optimizacija le-te.

## 6 VIRI IN LITERATURA

1. Manček B, Pečar S: Radikali in zaščita pred poškodbami z radikali v bioloških sistemih. *Farm vestn* 2001; 52: 133-144.
2. Nile SH, Khobragade CN, Park SW: Optimized and comparative antioxidant assays and its applications in herbal and synthetic drug analysis as an antioxidants. *Mini Rev Med Chem* 2012; 12 (10): 1007-1014.
3. Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JL: Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim Acta* 2008; 613 (1): 1-19.
4. Karadag A, Ozcelik B, Saner S: Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Anal Method* 2009; 2: 41-60.
5. Niki E: Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 2010; 49 (4): 503-515.
6. Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P: Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Prog Lipid Res* 2007; 46 (5): 244-282.
7. Huang D, Ou B, Prior RL: The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 2005; 53 (6): 1841-1856.
8. Roginsky V, Lissi EA: Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem* 2005; 92 (2): 235-254.
9. Prior RL, Wu X, Schaich K: Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 2005; 53 (10): 4290-4302.
10. Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K: Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 2002; 127 (1): 183-198.
11. Gülçin İ: Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol* 2012; 86 (3): 345-391.
12. Moon JK, Shibamoto T: Antioxidant assays for plant and food components. *J Agric Food Chem* 2009; 57 (5): 1655-1666.
13. Macdonald-Wicks LK, Wood LG, Garg ML: Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *J Sci Food Agric* 2006; 86 (13): 2046-2056.
14. Chanda S, Dave R: In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: an overview. *Afr J Microbiol Res* 2009; 3 (13): 981-996.
15. Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman M: Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm J* 2013; 21 (2): 143-152.
16. Frankel EN, Meyer AS: The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J Sci Food Agric* 2000; 80 (13): 1925-1941.
17. Badarinath AV, Mallikarjuna RAO K, Madhu Sudhana Chetty C, Ramkanth S, Rajan TVS, Gnanaprakash K: A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *Int J Pharm Tech Res* 2010; 2 (2): 1276-1285.



18. Aruoma OI: Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutat Res* 2003; 523-524: 9-20.
19. Hermans N, Cos P, Maes L, De Bruyne T, Vanden Berghe D, Vlietinck AJ, Pieters L: Challenges and pitfalls in antioxidant research. *Curr Med Chem* 2007; 14 (4): 417-430.
20. Lü JM, Lin PH, Yao Q, Chen C: Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med* 2010; 14 (4): 840-860.
21. Craft BD, Kerrihard AL, Amarowicz R, Pegg RB: Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. *Compr Rev Food Sci F* 2012; 11 (2): 148-173.
22. Molyneux P: The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol* 2004; 26 (2): 212-219.
23. Mihajlević B, Katušin-Ražem B, Ražem D: The reevaluation of the ferric thiocyanate assay for lipid hydroperoxides with special considerations of the mechanistic aspects of the response. *Free Radic Biol Med* 1996; 21 (1): 53-63.
24. Bartosz G: Non-enzymatic antioxidant capacity assays: Limitations of use in biomedicine. *Free Radic Res* 2010; 44 (7): 711-720.
25. Halliwell B: Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol* 1995; 49 (10): 1341-1348.
26. King RE, Bomser JA, Min DB: Bioactivity of resveratrol. *Compr Rev Food Sci F* 2006; 5 (3): 65-70.
27. Fernández-Mar MI, Mateos R, García-Parrilla MC, Puertas B, Cantos-Villar E: Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chem* 2012; 130 (4): 797-813.
28. Yu W, Fu YC, Wang W: Cellular and molecular effects of resveratrol in health and disease. *J Cell Biochem* 2012; 113 (3): 752-759.
29. Smoliga JM, Baur JA, Hausenblas HA: Resveratrol and health – A comprehensive review of human clinical trials. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55 (8): 1129-1141.
30. Resveratrol monograph. *Altern Med Rev* 2010; 15 (2): 152-158.
31. Amri A, Chaumeil JC, Sfar S, Charrueau C: Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? *J Control Release* 2012; 158 (2): 182-193.
32. Walle T: Bioavailability of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1215: 9-15.
33. Delmas D, Aires V, Limagne E, Dutartre P, Mazué F, Ghinringhelli F, Latruffe N: Transport, stability, and biological activity of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1215: 48-59.
34. Parmar B, Patel U, Bhimani B, Sanghavi K, Patel G, Daslaniya D: SMEDDS: A dominant dosage form which improve bioavailability. *Am J Pharm Tech Res* 2012; 2 (4): 54-72.
35. Zvonar A, Gašperlin M, Kristl J: Samo(mikro)emulgirajoči sistemi – alternativen pristop za izboljšanje biološke uporabnosti lipofilnih učinkovin. *Farm vestn* 2008; 59: 263-268.
36. Pouton CW, Porter CJ: Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: materials, methods and strategies. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60 (6): 625-637.

37. Kyatanwar AU, Jadhav KR, Kadam VJ: Self micro-emulsifying drug delivery system (SMEDDS): Review. *J Pharm Res* 2010; 3 (1): 75-83.
38. Neslihan Gursoy R, Benita S: Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomed Pharmacother* 2004; 58 (3): 173-182.
39. Bhargava P, Bhargava S, Daharwal SJ: Self emulsifying drug delivery system: An approach to improve the solubility of poorly water soluble drugs. *Adv Res Pharm Biol* 2011; 1 (1): 1-9.
40. Kohli K, Chopra S, Dhar D, Arora S, Khar RK: Self-emulsifying drug delivery systems: an approach to enhance oral bioavailability. *Drug Discov Today* 2010; 15 (21-22): 958-965.
41. Tang B, Cheng G, Gu JC, Xu CH: Development of solid self-emulsifying drug delivery systems: preparation techniques and dosage forms. *Drug Discov Today* 2008; 13 (13-14): 606-612.
42. Elektronski vir: [http://www.abiteccorp.com/wp-content/files\\_mf/1354912778CapmulMCMEPTDSI8.pdf](http://www.abiteccorp.com/wp-content/files_mf/1354912778CapmulMCMEPTDSI8.pdf) (Dostop: 27.05.2013).
43. Elektronski vir: <http://www.indcheminternational.com/products.htm> (Dostop: 27.05.2013).
44. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME: *Handbook of Pharmaceutical Excipients* 6<sup>th</sup> ed. Pharmaceutical Press and the American Pharmacists Association, London 2009: 126-127, 389-390, 542-549.
45. Elektronski vir: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/62240?lang=en&region=SI> (Dostop: 27.05.2013).
46. Elektronski vir: [http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma-Aldrich/Product\\_Information\\_Sheet/p1379pis.Par.0001.File.tmp/p1379pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma-Aldrich/Product_Information_Sheet/p1379pis.Par.0001.File.tmp/p1379pis.pdf) (Dostop: 27.05.2013)
47. Elektronski vir: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/d9132?lang=en&region=SI> (Dostop: 24.9.2013)
48. Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F: A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric* 1998; 76 (2): 270-276.
49. Villaño D, Fernández-Pachón MS, Moyá ML, Troncoso AM, García-Parrilla MC: Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* 2007; 71 (1): 230-235.
50. Wang M, Jin Y, Ho CT: Evaluation of resveratrol derivatives as potential antioxidants and identification of a reaction product of resveratrol and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *J Agric Food Chem* 1999; 47 (10): 3974-3977.
51. Khanduja KL, Bhardwaj A: Stable free radical scavenging and antiperoxidative properties of resveratrol compared in vitro with some other bioflavonoids. *Indian J Biochem Biophys* 2003; 40 (6): 416-422.
52. Lee HJ, Seo JW, Lee BH, Chung KH, Chi DY: Syntheses and radical scavenging activities of resveratrol derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 2004; 14 (2): 463-466.
53. Fabris S, Momo F, Ravagnan G, Stevanato R: Antioxidant properties of resveratrol and piceid on lipid peroxidation in micelles and monolamellar liposomes. *Biophys Chem* 2008; 135 (1-3): 76-83.

54. Murias M, Jäger W, Handler N, Erker T, Horvath Z, Szekeres T, Nohl H, Gille L: Antioxidant, prooxidant and cytotoxic activity of hydroxylated resveratrol analogues: structure-activity relationship. *Biochem Pharmacol* 2005; 69 (6): 903-912.
55. Soares DG, Andrezza AC, Salvador M: Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. *J Agric Food Chem* 2003; 51 (4): 1077-1080.
56. Stivala LA, Savio M, Carafoli F, Perucca P, Bianchi L, Maga G, Forti L, Pagnoni UM, Albini A, Prosperi E, Vannini V: Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. *J Biol Chem* 2001; 276 (25): 22586-22594.
57. Iacopini P, Baldi M, Storchi P, Sebastiani L: Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. *J Food Compos Anal* 2008; 21 (8): 589-598.
58. Nenadis N, Zafiropoulou I, Tsimido M: Commonly used food antioxidants: a comparative study in dispersed systems. *Food Chem* 2003; 82 (3): 403-407.
59. Fukumoto LR, Mazza G: Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 2000; 48 (8): 3597-3604.
60. Mei L, McClements DJ, Decker EA: Lipid oxidation in emulsions as affected by charge status of antioxidants and emulsion droplets. *J Agric Food Chem* 1999; 47 (6): 2267-2273.
61. Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura Calixto FD: Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Res Int* 1999; 32 (6): 407-412.
62. McClements DJ, Decker EA: Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *J Food Sci* 2000; 65 (8): 1270-1282.
63. Rosas Romero AJ, Morton ID: A kinetic study of the competitive oxidation of oleic acid-linoleic acid mixtures. *J Sci Food Agric* 1975; 26 (9): 1353-1356.
64. Bruna E, Petit E, Beljean-Leymarie M, Huynh S, Nouvelot A: Specific susceptibility of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid to peroxidation in aqueous solution. *Lipids* 1989; 24 (11): 970-975.
65. Miyashita K, Nara E, Ota T: Oxidative stability of polyunsaturated fatty acids in an aqueous solution. *Biosci Biotechnol Biochem* 1993; 57 (10): 1638-1640.
66. Waraho T, McClements DJ, Decker EA: Impact of free fatty acid concentration and structure on lipid oxidation in oil-in-water emulsions. *Food Chem* 2011; 129 (3): 854-859.
67. Nuchi CD, McClements DJ, Decker EA: Impact of tween 20 hydroperoxides and iron on the oxidation of methyl linoleate and salmon oil dispersions. *J Agric Food Chem* 2001; 49 (10): 4912-4916.
68. Ponginebbi L, Nawar WW, Chinachoti P: Oxidation of linoleic acid in emulsions: Effect of substrate, emulsifier, and sugar concentration. *J Am Oil Chem Soc* 1999; 76 (1): 131-138.

69. Huang SW, Hopia A, Schwarz K, Frankel EN, German JB: Antioxidant activity of  $\alpha$ -tocopherol and trolox in different lipid substrates: Bulk oils vs oil-in-water emulsions. *J Agric Food Chem* 1996; 44 (2): 444-452.
70. Lethuaut L, Métro F, Genot C: Effect of droplet size on lipid oxidation rates of oil-in-water emulsions stabilized by protein. *J Am Oil Chem Soc* 2002; 79 (5): 425-430.
71. Jacobsen C, Hartvigsen K, Lund P, Thomsen MK, Skibsted LH, Adler-Nissen J, Hølmer G, Meyer AS: Oxidation in fish oil-enriched mayonnaise: 3. Assessment of the influence of the emulsion structure on oxidation by discriminant partial least squares regression analysis. *Eur Food Res Technol* 2000; 211 (2): 86-98.
72. Nakaya K, Ushio H, Matsukawa S, Shimizu M, Ohshima T: Effects of droplet size on the oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Lipids* 2005; 40 (5): 501-507.
73. Atarés L, Marshall LJ, Akhtar M, Murray BS: Structure and oxidative stability of oil in water emulsions as affected by rutin and homogenization procedure. *Food Chem* 2012; 134 (3): 1418-1424.
74. Roozen JP, Frankel EN, Kinsella JE. Enzymic and autoxidation of lipids in low fat foods: model of linoleic acid in emulsified hexadecane. *Food Chem* 1994; 50 (1): 33-38.
75. Dimakou CP, Kiokias SN, Tsaprouni IV, Oreopoulou V: Effect of processing and storage parameters on the oxidative deterioration of oil-in-water emulsions. *Food Biophys* 2007; 2 (1): 38-45.
76. Osborn HT, Akoh CC: Effect of emulsifier type, droplet size, and oil concentration on lipid oxidation in structured lipid-based oil-in-water emulsions. *Food Chem* 2004; 84 (3): 451-456.
77. Smolarz HD, Kosikowska U, Baraniak B, Malm A, Persona A: Lipophilicity, antifungal and antioxidant properties of persilben. *Acta Pol Pharm* 2005; 62 (6): 457-460.
78. López-Nicolás JM, García-Carmona F: Aggregation state and pKa values of (E)-resveratrol as determined by fluorescence spectroscopy and UV-visible absorption. *J Agric Food Chem* 2008; 56 (17): 7600-7605.
79. Richards MP, Chaiyasit W, McClements DJ, Decker EA: Ability of surfactant micelles to alter the partitioning of phenolic antioxidants in oil-in-water emulsions. *J Agric Food Chem* 2002; 50 (5): 1254-1259.
80. Decker EA, Warner K, Richards MP, Shahidi F: Measuring antioxidant effectiveness in food. *J Agric Food Chem* 2005; 53 (10): 4303-4310.
81. Nuchi CD, Hernandez P, McClements DJ, Decker EA: Ability of lipid hydroperoxides to partition into surfactant micelles and alter lipid oxidation rates in emulsions. *J Agric Food Chem* 2002; 50 (19): 5445-5449.
82. Vicentini FT, Casagrande R, Verri WA Jr, Georgetti SR, Bentley MV, Fonseca MJ: Quercetin in lyotropic liquid crystalline formulations: physical, chemical and functional stability. *AAPS PharmSciTech* 2008; 9 (2): 591-596.
83. Almeida IF, Costa PC, Bahia MF: Evaluation of functional stability and batch-to-batch reproducibility of *Castanea sativa* leaf extract with antioxidant activity. *AAPS PharmSciTech* 2010; 11 (1): 120-125.

84. Camont L, Cottart CH, Rhayem Y, Nivet-Antoine V, Djelidi R, Collin F, Beaudeau JL, Bonnefont-Rousselot D: Simple spectrophotometric assessment of the trans-/cis-resveratrol ratio in aqueous solutions. *Anal Chim Acta* 2009; 634 (1): 121-128.
85. Trela BC, Waterhouse AL: Resveratrol: Isomeric molar absorptivities and stability. *J Agric Food Chem* 1996; 44 (5): 1253-1257.
86. Nam JB, Ryu JH, Kim JW, Chang IS, Suh KD: Stabilization of resveratrol immobilized in monodisperse cyano-functionalized porous polymeric microspheres. *Polymer* 2005; 46 (21): 8956-8963.
87. Shi G, Rao L, Yu H, Xiang H, Yang H, Ji R: Stabilization and encapsulation of photosensitive resveratrol within yeast cell. *Int J Pharm* 2008; 349 (1-2): 83-93.
88. Zhang XP, Le Y, Wang JX, Zhao H, Chen JF: Resveratrol nanodispersion with high stability and dissolution rate. *LWT- Food Sci Technol* 2013; 50 (2): 622-628.
89. Jensen JS, Wertz CF, O'Neill VA: Preformulation stability of trans-resveratrol and trans-resveratrol glucoside (piceid). *J Agric Food Chem* 2010; 58 (3): 1685-1690.
90. Sarker SD, Whiting P, Dinan L: Identification and ecdysteroid antagonist activity of three resveratrol trimers (suffruticosols A, B and C) from *Paeonia suffruticosa*. *Tetrahedron* 1999; 55 (2): 513-524.