

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

OLGA JERKOVIĆ

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

OLGA JERKOVIĆ

**VREDNOTENJE UČINKOVITOSTI NARAVNIH ANTIOKSIDANTOV**

**EFFECTIVENESS EVALUATION OF NATURAL ANTI-OXIDANTS**

UNIVERSITY STUDY PROGRAMME COSMETIC SCIENCE

Ljubljana, 2015

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

### *Zahvala*

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mirjani Gašperin za strokovno pomoč pri izdelavi diplomske naloge, asist. dr. Mirjam Gosenca in prof. dr. Samu Kreftu za pomoč in spodbudo pri delu, ter vsem zaposlenim na Katedri za farmacevtsko tehnologijo.

### *Izjava*

*Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice prof. dr. Mirjane Gašperlin in somentorice asist. dr. Mirjam Gosenca.*

Predsednik komisije: prof. dr. Samo Kreft

Članica komisije: doc.dr. Nataša Karas Kuželički, mag. farm.

Olga Jerković

Ljubljana, september 2015

## VSEBINA

<b>KAZALO SLIK</b> .....	II
<b>POVZETEK</b> .....	III
<b>ABSTRACT</b> .....	IV
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	V
<b>1 UVOD</b> .....	1
1.1 OKSIDATIVNI STRES IN NJEGOV VPLIV NA KOŽO.....	1
1.2 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI ANTIOKSIDANTOV.....	2
1.3. OPIS POSAMEZNIH ANTIOKSIDANTOV.....	4
1.3.1 POLIFENOLI.....	5
<b>2 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA</b> .....	11
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	12
<u>3.1 MATERIAL</u> .....	12
3.1.1 Belinal.....	12
3.1.2 Fenolne kisline.....	12
3.1.3 Reagenti.....	12
3.1.4 Aparature in oprema.....	12
<u>3.2 METODE</u> .....	13
3.2.1 DOLOČANJE NASIČENE TOPNOSTI BELINALA V PREČIŠČENI VODI.....	13
3.2.2 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI BELINALA IN FENOLNIH KISLIN Z DPPH METODO.....	14
<b>4 REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....	19
4.1 DOLOČANJE NASIČENE TOPNOSTI BELINALA.....	19
4.2 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI BELINALA IN FENOLNIH KISLIN Z DPPH METODO.....	20
4.2.1 KONCENTRACIJSKA ODVISNOST ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI BELINALA.....	21
<b>5 SKLEP</b> .....	28
<b>6 LITERATURA</b> .....	29

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Struktura galne kisline (25) .....	7
<b>Slika 2:</b> Struktura p-hidroksibenzojske kisline (25).....	8
<b>Slika 3:</b> Struktura vanilinske kisline (25) .....	8
<b>Slika 4:</b> Struktura kavne kisline (19) .....	8
<b>Slika 5:</b> Struktura ferulne kisline (25).....	9
<b>Slika 6:</b> Kemijska struktura o-kumarinske (a), m-kumarinske (b) in p-kumarinske kisline (c) (25).....	9
<b>Slika 7:</b> Reakcija med DPPH radikalom z antioksidantom (3).....	14
<b>Slika 8:</b> Sestava UV-VIS spektrofotometra (32) .....	16
<b>Slika 9:</b> Umeritvena premica Belinala za določanje nasičene topnosti Belinala v prečiščeni vodi pri valovni dolžini maksimalne absorpcije $\lambda=279$ nm z enačbo premice in pripadajočim $R^2$ .....	20
<b>Slika 10:</b> Umeritvena premica za določanje koncentracije DPPH v raztopini pri valovni dolžini maksimalne absorpcije $\lambda=517$ nm z enačbo in pripadajočim $R^2$ .....	21
<b>Slika 11:</b> Spremljanje deleža preostalega DPPH v odvisnosti od časa po dodatku različnih koncentracij Belinala v raztopino DPPH .....	22
<b>Slika 12:</b> Delež preostalega DPPH radikala v zmesi z različnimi antioksidanti s koncentracijo 0,85 mg/ml .....	23
<b>Slika 13:</b> Delež preostalega DPPH radikala v zmesi z različnimi antioksidanti s koncentracijo 0,034 mg/ml .....	25
<b>Slika 14:</b> Primerjava začetnih in končnih koncentracij DPPH v kombinaciji z antioksidanti v koncentraciji 0,85 mg/ml .....	26
<b>Slika 15:</b> Primerjava začetnih in končnih koncentracij DPPH v kombinaciji z antioksidanti v koncentraciji 0,034 mg/ml .....	27

## POVZETEK

Belinal je zmes polifenolov, natančneje flavonoidov, fenolnih kislin in lignanov, izoliranih iz lesa bele jelke. Polifenoli v izvlečku izkazujejo antioksidativno in protivnetno delovanje, delujejo varovalno na srčno žilni sistem ter zavirajo prebavne encime. Kot antioksidant je Belinal sposoben lovljenja hidroksilnih radikalov.

V okviru diplomske naloge smo se osredotočili na ugotavljanje antioksidativnega učinka Belinala in fenolnih kislin z metodo DPPH. Bistvo metode je, da DPPH radikal sprejme vodikov atom od antioksidanta in se pri tem reducira, njegova absorbanca v raztopini pa se zmanjša, kar spremljamo spektrofotometrično. Ugotovili smo, da se z naraščanjem koncentracije Belinala koncentracija DPPH zmanjšuje. Polifenoli v Belinalu namreč oddajo vodikove atome in reducirajo DPPH radikal. V enakih koncentracijah smo pripravili še raztopine drugih polifenolnih antioksidantov (galne kisline, kavne kisline, vanilinske kisline, ferulne kisline, p-hidroksibenzojske kisline, o-, m-, in p-kumarinske kisline) in primerjali učinkovitost vseh antioksidantov glede na zmanjševanje koncentracije DPPH radikala. Pri koncentraciji 0,85 mg/ml je bil najučinkovitejši antioksidant kavna kislina, kateri sledita galna in ferulna kislina. V primerjavi s slednjimi je Belinal izkazoval slabše antioksidativno delovanje, se je pa izkazal kot boljši antioksidant v primerjavi z vanilinsko kislino, o-, m-, p-kumarinsko kislino ter p-hidroksibenzojsko kislino. V ravnotežnem stanju je delež DPPH radikala v prisotnosti Belinala znašal 15,3 %. Pri kavni, galni in ferulni kislini je delež DPPH v ravnotežnem stanju znašal 3,5%, 5,1 % in 7,3 %. Ostali antioksidanti so povzročili majhen padec v deležu DPPH radikala, in sicer so bile vrednosti 89,2 % (vanilinska kislina) in 98,2 % (p-hidroksibenzojska kislina). Pri nižji testirani koncentraciji, tj. 0,034 mg/ml, je bila galna kislina najučinkovitejša (delež preostalega DPPH radikala je bil 36,3 %), sledita ji še kavna in ferulna kislina z vrednostmi 77,1 % in 83,9 %. Belinal se je izkazal kot učinkovitejši antioksidant od vanilinske, o-, m-, p-kumarinske kisline in p-hidroksibenzojske.

Na osnovi rezultatov diplomskega dela lahko zaključimo, da je Belinal učinkovit antioksidant, katerega učinek narašča s koncentracijo. Njegovo antioksidativno delovanje lahko primerjamo z najmočnejšimi fenolnimi kislinami, in je zaradi svojega delovanja primeren za vgradnjo v kozmetične izdelke proti staranju kože.

## ABSTRACT

Belinal is a mixture of polyphenols, specifically flavonoids, phenolic acids and lignans that are isolated from the wood of the fir tree. Polyphenols in the extract have antioxidative and anti-inflammatory effect, together with cardiovascular system protective role and digestive enzymes suppression. As an antioxidant, Belinal is able to quench hydroxyl radicals.

Within the thesis we have focused on identifying the antioxidant effect of Belinal and phenolic acids by the DPPH method. The essence of the method is that DPPH radical adopts a hydrogen atom of an antioxidant, and gets reduced. Its absorbance in the solution reduces. Then we can measure the change of absorbance using spectrophotometry. Concentration of DPPH was decreasing with increasing concentration of Belinal. Namely, polyphenols in Belinal act as donors of hydrogen atoms and therefore reduce DPPH radical. Solutions with identical concentrations were also prepared for other polyphenolic antioxidants (gallic acid, caffeic acid, vanillic acid, ferulic acid, p-hydroxybenzoic acid, o-, m-, and p-coumaric acid) and were used to compare the effectiveness of antioxidants in reducing the concentration of DPPH radical. At a concentration of 0,85 mg/ml the most effective antioxidant in reducing the concentration of DPPH radical in a mixture was caffeic acid, followed by further gallic and ferulic acid. Belinal has proved to be a better antioxidant than vanillic acid, o-, m-, p-coumaric acid and of p-hydroxybenzoic and worse than caffeic, gallic and ferulic acid. In balanced-state the proportion of DPPH radicals in the presence of Belinal was 15,3%. In the case of caffeic, gallic and ferulic acid, proportion of DPPH at balanced state were 3,5 %, 5,1 % and 7,3 %. Other antioxidants have caused a slight drop in the proportion of DPPH radical, i.e. to a value between 89,2 % (vanillic acid) and 98,2 % (p-hydroxybenzoic acid). At the lowest concentration tested, 0,034 mg/ml, the most effective in reducing DPPH radical was gallic acid with a share of the remaining DPPH radical 36,3 %. It is followed by caffeic and ferulic acid with values of 77,1 % and 83,9 %. Belinal has proved to be a more effective antioxidant than vanillic, o-, m-, p-coumaric and p-hydroxybenzoic acid. Based on the results of the thesis, it can be concluded that Belinal has good antioxidant effect, which increases with its concentration. Its antioxidant activity can be compared with the most powerful phenolic acids, and is suitable for the use in cosmetic anti-aging skin care products.

## **SEZNAM OKRAJŠAV**

**DNA** – deoksiribonukleinska kislina

**DPPH** – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazin

**ROS** – *reactive oxygen species* – reaktivne kisikove spojine

**UV** – ultravijolično (sevanje)



# 1 UVOD

## 1.1 OKSIDATIVNI STRES IN NJEGOV VPLIV NA KOŽO

Kisik je nujen za preživetje aerobnih organizmov, istočasno pa je odgovoren za nastanek t.i. oksidativnega stresa. Oksidativnemu stresu so izpostavljeni vsi aerobni organizmi, torej tudi človek, saj je neposredno povezan s prisotnostjo kisika v našem ozračju. Oksidativni stres je definiran kot porušeno ravnotežje med nastankom reaktivnih kisikovih spojin (ROS – “reactive oxygen species”) in zmožnostjo antioksidativnega obrambnega sistema, da te reaktivne spojine nevtralizira. ROS so snovi, ki nenehno nastajajo v našem organizmu in pri določenih pogojih lahko vodijo v nastanek radikalov. Radikali so atomi, ioni, molekule ali kompleksi, ki imajo v svoji strukturi vsaj en nesparjen elektron, zaradi česar so reaktivni in nestabilni. V skupino ROS uvrščamo superoksidni radikal, vodikov peroksid, hidroksilni radikal, singletni kisik idr. Te spojine povzročijo izbitje elektrona iz orbitale tarčne molekule, kar vodi v nastanek novega radikala. Novo nastali radikal nato vstopa v iste procese in prične se verižna reakcija, pri kateri nastajajo vedno novi radikali, ki povzročajo različne poškodbe celice. Lipidna peroksidacija je zelo pogost in pomemben mehanizem, povezan s poškodbami celic in tkiv. Vključuje nastanek hidroperoksidov (ROOH), ki so za razliko od radikalov bolj stabilni, vendar v celičnem okolju vseeno izkazujejo veliko oksidacijsko aktivnost. Najbolj znan hidroperoksid je vodikov peroksid, ki nastaja predvsem kot posledica encimskega odstranjevanja superoksidnega aniona. Lipidna peroksidacija namreč poteka po splošni poti radikalske verižne reakcije, ko naključni radikal reagira z nenasičeno maščobno kislino. Tak mehanizem povzroči poškodbe lipidnega dvosloja celične membrane, kar lahko povzroči spremembo njene propustnosti, motnje v delovanju membranskih encimov, motnje prenosa signalov preko transmembranskih receptorskih sistemov in nazadnje propad celične membrane (1, 2, 3, 4, 5).

Koža je kot zunanji telesni organ v neposrednem stiku z okoljem in je zato izpostavljena toksičnim fizikalnim in kemijskim dejavnikom, kateri vplivajo na njeno strukturo in funkcijo. Med zunanje oksidativne dejavnike štejemo ultravijolično (UV) sevanje, kemikalije, ksenobiotike, tobačni dim ipd. To so bodisi oksidanti bodisi posredni ali neposredni pospeševalci nastanka reaktivnih spojin. UV sevanje kot najpomembnejši predstavnik okoljskih dejavnikov lahko v koži poveča nastanek ROS. Oksidativni stres v celicah povzroči spremembo izražanja genov, poškodbe DNA, kar lahko rezultira v abnormalni celični

morfologiji, apoptozi in nekrozi celic ter staranju kože. Struktura kože je dokaj kompleksna, saj jo sestavljajo različne plasti s specifično sestavo, vlogami in delovanjem. Za posamezno plast kože pa so značilni tudi specifični obrambni mehanizmi za nadzor oksidativnega stresa. Eden izmed učinkovitih obrambnih mehanizmov kože je antioksidativna obramba, pri kateri encimi (peroksidaze, katalaze idr.) in druge antioksidantne snovi (glutation, sečna kislina, bilirubin idr.) neposredno reagirajo z ROS, s čimer preprečijo dostop le-teh do tarčnih molekul. Ne glede na učinkovitost antioksidativne obrambe, le-ta lahko postane pri obrambi pred oksidativnim stresom nezadostna in preobremenjena, ter lahko prihaja do okvar, zato obstajajo dodatni obrambni mehanizmi, ki vključujejo lipolitične encime, proteolitične sisteme in popravljalne sisteme DNA, ki popravljajo okvare, nastale zaradi oksidativnega stresa. Neučinkovito odstranjevanje reaktivnih zvrsti tako vodi v naraščanje količine ROS v koži in lahko vodi v prezgodnje staranje kože. Številne študije o fotostaranju kože, povzročenem z oksidativnim stresom, podajajo veliko informacij o znižanju zmogljivosti antioksidativne obrambe, kar vse skupaj vodi do kopičenja oksidativnih okvar in snovi, imunomodulacije (spremembe imunske odziva), melanogeneze (povečanega nastajanja melanina) in karcinogeneze (ustvarjanja rakavih celic). Antioksidanti reagirajo z radikali, ki nastanejo pri oksidativnem stresu, in imajo pomembno vlogo pri preprečevanju ali terapiji raznih obolenj kože kot tudi pri upočasnitvi procesa staranja. Dermalni nanos antioksidantov kot so vitamin C, vitamin E, koencim Q10 in polifenolne spojine nudi krepitev endogene antioksidantne obrambe kože ter ponovno vzpostavitev homeostaze in zaščito pred škodljivimi učinki radikalov ter oksidativnimi poškodbami kože (4, 6, 7).

## 1.2 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI ANTIOKSIDANTOV

Antioksidanti so snovi, ki znatno upočasnijo ali preprečijo oksidacijo pomembnih sestavin celice tako, da reagirajo z radikali in ustavijo verižne radikalske reakcije. V svoji strukturi imajo vsaj en reaktivni vodik, ki se enostavno odcepi in veže na radikal ter ga s tem stabilizira in prepreči njegovo nadaljnje delovanje (1, 3).

Antioksidante lahko razdelimo glede na strukturo in posledično fizikalno-kemijske lastnosti, izvor in mehanizem delovanja (1).

Po naravi jih ločimo na naravne in sintezne. Naravne antioksidante pridobimo iz naravnih virov, sintezne pa dobimo s kemijsko sintezo. V prvo skupino spadajo minerali (Se, Cu, Fe...),

vitamini (vitamin C, vitamin E ...) in spojine rastlinskega izvora (polifenoli in terpeni), v drugo pa butil hidroksi anizol, butil hidroksitoluen, etilendiamintetraocetna kislina idr. (8)

Glede na izvor delimo antioksidante v dve skupini – na endogene in eksogene. Endogene (superoksid dizmutaza, glutation reduktaza, katalaza idr.) je organizem sposoben sintetizirati sam. Večina izmed njih je encimskih antioksidantov. Ti katalitično odstranjujejo oksidante in tako zmanjšajo njihovo razpoložljivost. Med endogene neencimske antioksidante pa spadajo glutation, koencim Q, bilirubin idr. Ti reagirajo z radikali, jih nevtralizirajo, pri tem pa se sami pretvorijo v stabilne in zato manj škodljive radikale. Vsi endogeni antioksidanti skupaj sestavljajo antioksidativni obrambni sistem. S staranjem se količina in aktivnost endogenih antioksidantov zmanjšuje. Nivo in sestava endogenih antioksidantov se razlikuje med tkivi in tipi celic. Njihova količina se ob izpostavljenosti oksidantom (kot posledica obrambe) pogosto zviša, a se ta zaloga ob daljši izpostavljenosti oksidantom postopoma porabi (1, 8, 9).

Eksogenih antioksidantov (vitamina E, vitamina C,  $\beta$ -karotena idr.) naš organizem ni sposoben sintetizirati, zato jih moramo v telo vnašati s hrano ali z dermalnim nanosom. Delujejo tako, da zmanjšujejo tvorbo radikalov ter odstranjujejo že nastale ROS, imajo pa, tako kot endogeni, tudi sposobnost regeneracije (5, 6).

Po mehanizmu delovanja ločimo:

- a) *prave* antioksidante (vitamin E, vitamin C idr.), ki lovijo radikale in s tem zavirajo verižno reakcijo. Sami se oksidirajo v relativno stabilen in nereaktiven radikal, ki se obnavlja ali izloča iz organizma;
- b) *sinergiste* (vitamin C), ki imajo sami manjšo sposobnost antioksidativnega delovanja, a povečajo moč drugih antioksidantov (10);
- c) *kelatorje* (transferini, haptoglobini idr.), ki z večvalentnim kovinskim ionom (železovi, bakrovi ioni) – prooksidantom, tvorijo kompleks ligand-kovina, s čimer preprečijo njihovo interakcijo z vodikovim peroksidom ( $H_2O_2$ ) in superoksidnim radikalom ( $O_2^{\cdot-}$ )(1,11);
- d) *reducirajoče antioksidante*, ki se zlahka oksidirajo tako, da nase vežejo molekularni kisik, s čimer zaščitijo tarčno molekulo pred oksidacijo (11).

Glede na topnost antioksidante delimo na hidrofilne in hidrofobne. Hidrofilni antioksidanti delujejo v citosolu in krvni plazmi, medtem ko hidrofobni preprečujejo lipidno peroksidacijo v celičnih membranah (1).

Vsi antioksidanti v telesu skupaj tvorijo antioksidantni obrambni sistem, ki ga glede na delovanje delimo na primarni, sekundarni in terciarni. Primarni obrambni sistem preprečuje nastanek radikalov, sekundarni nevtralizira radikale, terciarni pa poskrbi za popravilo poškodb, ki so nastale zaradi delovanja radikalov. Antioksidanti torej najprej preprečijo nastajanje radikalov in oksidativnih poškodb, nato pa, če do nastanka in poškodb pride, s popravljivimi mehanizmi popravijo te poškodbe. Popravljalne mehanizme izvajajo encimski antioksidanti (npr. lipolitični encimi, proteolitični sistemi...), ki najprej prepoznajo oksidativno poškodbo, nato odstranijo oksidiran del molekule, sintetizirajo nov del in ga vežejo na poškodovano molekulo. S tem popravijo škodo, ki so jo povzročili radikali, hkrati pa zmanjšajo oksidativni stres in upočasnijo proces staranja. Obrambni sistem se nahaja tako znotraj kot zunaj celic (1, 5, 8).

### 1.3. OPIS POSAMEZNIH ANTIOKSIDANTOV

V nadaljevanju so podani opisi oz. značilnosti posameznih naravnih antioksidantov, njihova vloga in antioksidativno delovanje. V kozmetičnih izdelkih se sicer najpogosteje uporabljajo vitamin C, vitamin E, koencim Q10 in karotenoidi, vendar je glavni poudarek na polifenolih, ki smo jih proučevali v okviru diplomske naloge.

**Vitamin C** ali askorbinska kislina je vodotopen vitamin, ki se nahaja v zunajcelični tekočini. Neposredno reagira z radikali (superoksidom, hidroksilnim radikalom in ostalimi peroksidi) in prekine verižno reakcijo. Sam se pri tem oksidira do stabilnega askorbilnega radikala. Hkrati sodeluje pri obnavljanju vitamina E, sam pa se regenerira s pomočjo glutaciona (1,12,32).

**Vitamin E** je skupno ime za nabor osmih izomernih oblik tokoferolov in tokotrienolov lipofilne narave. Ob izpostavitvi UV žarkom uspešno lovi ROS in se sam pri tem oksidira v  $\alpha$ -tokoferoksilni radikal, ki za svojo regeneracijo porablja druge antioksidante (14, 15).

**Koencim Q10** je prav tako lipofilen endogen antioksidant, ki se nahaja v celičnih membranah. Izraz »koencim Q10« se nanaša na tri različne oblike molekule: reducirana oblika (ubikinol-10), oksidirana oblika (ubikinon-10) in intermediatna oblika (ubisemikinonski radikal). Med naštetimi oblikami izkazuje antioksidativne lastnosti le reducirana oblika – ubikinol. Koencim Q10 preprečuje razgradnjo kolagena zaradi vpliva UV žarkov (16).

**Karotenoidi** so lipofilni antioksidanti in predstavljajo skupino barvnih pigmentov, ki se nahajajo v rastlinskem tkivu. Ločimo ksantofile in karotene. Zaradi močne lipofilne narave se ksantofili v telesu nahajajo izključno znotraj celičnih membran, medtem ko se karoteni zaradi svoje polarnosti orientirajo s svojimi hidrofilnimi deli proti vodnem okolju. Karotenoidi so pomembni prekursorji vitamina A (retinola), ki vključuje retinal in retinojsko kislino – spojini, ki imata pomembni vlogi pri preprečevanju fotostaranja (6, 8, 9, 15, 17).

### 1.3.1 POLIFENOLI

Polifenoli so zelo široka skupina spojin naravnega izvora z značilno kemijsko strukturo, ki jo sestavlja aromatski obroč, na katerega je vezanih več hidroksilnih skupin. Te hidroksilne skupine so lahko proste ali pa tvorijo etre, estre ali glikozide (15).

Med polifenole uvrščamo približno 8000 naravnih spojin in so ena največjih in najbolj razširjenih spojin v rastlinah. Polifenoli so tako kot vitamini in minerali sekundarni metaboliti rastlin in le-te varujejo pred UV žarki ter patogeni. Polifenole so sposobni sintetizirati le rastline in mikroorganizmi, živali in ljudje pa jih moramo pridobiti s hrano (15).

Med polifenolne spojine uvrščamo preproste fenolne kisline, benzokinone, acetofenone, hidroksicimetne kisline, fenilacetilne kisline, fenilpropene, kromone, naftokinone, ksantone, flavonoide, antrakinone, lignane in neolignane, lignine, kumarine in izokumarine ter stilbene. Lahko jih razvrstimo glede na izvor, biološko delovanje in kemijsko strukturo. Mnogi rastlinski polifenoli so glikozidi z različnimi sladkornimi enotami in aciliranimi sladkorji na različnih položajih polifenolnega skeleta. Največjo antioksidativno učinkovitost izmed naštetih izkazujejo fenolne kisline in flavonoidi. Bogati viri polifenolov so sadje, zelenjava, stročnice in druge vrste hrane ter pijače kot so čaj, čokolada in vino (18).

Tri najbolj proučevane skupine fenolov so:

- flavonoidi,
- tanini (čreslovine) in
- fenolne kisline.

**Flavonoidi** so najboljše skupina fenolov v rastlinah. Rastlinam dajejo barvo: rumeno, oranžno ali rdečo. Flavonoidi izkazujejo antioksidativno delovanje, in sicer lovijo radikale (superoksid, hidroksilni radikal) in kelirajo kovinske ione (3, 19).

**Tanini** ali čreslovine so znane po svojem trpkem okusu in adstringentnem učinku. Delimo jih v dve skupini glede na strukturo in biogenetski izvor: hidrolizirajoči tanini (elagotanini, galotanini) in kondenzirani tanini (katehini, proantocianidini). Slednji imajo boljše antioksidativno delovanje. Tanini so in vitro lovilci radikalov in zaviralci nastanka superoksidnih anionov. V hrani se kondenzirani tanini nahajajo v sadju, rdečem vinu, čaju ter čokoladi (3, 19).

Med polifenolne spojine sodijo tudi fenolne kisline, ki jih zaradi pomembnosti v pričujoči nalogi opisujemo ločeno.

#### 1.3.1.1 FENOLNE KISLINE

Fenolne kisline so spojine iz skupine fenolov, ki imajo na aromatski obroč vezano vsaj eno karboksilno skupino. Delimo jih v dve skupini: derivate benzojske in derivate cimetine kisline. Skupini imata enako osnovno strukturo, ki se razlikuje le v številu in položaju hidroksilnih skupin na aromatskem obroču. Hidroksibenzojske kisline vključujejo galno kislino, vanilinsko kislino ter 3,4-dihidroksibenzojsko kislino, medtem ko med hidroksicimetine uvrščamo kavno kislino, ferulno kislino, kumarinsko kislino, sinapično kislino in klorogensko kislino. Polifenolne kisline se nahajajo v skoraj vsej rastlinski hrani, tako sadju kot zelenjavi ter so prisotne v vseh delih rastline, od korenin do semen (19).

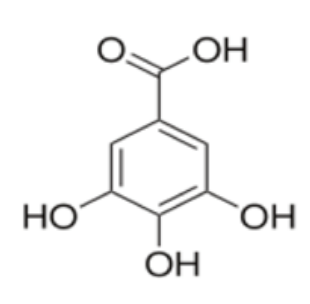
Cimetna kislina in njeni derivati poleg antioksidativnega delovanja izkazujejo še antibakterijsko, protivirusno, protivnetno in protitumorno delovanje. Razlog za dobro antioksidativno delovanje je hidroksilna skupina cimetine kisline in njenih derivatov, ki reagira z radikali in pri tem tvori resonančno stabilizirani fenoksilni radikal. Dodatno prisotnost propenojske stranske verige s svojo konjugirano dvojno vezjo povzroči stabilizacijo nastalega fenoksilnega radikala. Izmed vseh derivatov cimetine kisline kavna, ferulna in sinapinska kislina izkazujejo največjo antioksidativno učinkovitosti in so se v različnih študijah pokazale kot učinkovite v lovljenju ROS (hidroksilnega, superoksidnega, peroksilnega radikala in singletnega kisika). Število prostih hidroksilnih skupin na aromatskem obroču je sorazmerno z antioksidativnim delovanjem polifenolnih kislin (19, 20).

Raziskava je pokazala, da imajo hidroksicimetne kisline višjo antioksidativno učinkovitost od hidroksibenzojskih kislín, ker imajo na aromatski obroč vezano propenojsko stransko verigo, ki pripomore k resonančni stabilnosti molekule (19). Hidroksibenzojske kisline propenojske stranske skupine ne vsebujejo. Antioksidativno delovanje izkazujejo z doniranjem vodikovega iona hidroksilne stranske skupine obroča.

## HIDROKSIBENZOJSKE KISLINE

- **Galna kislina**

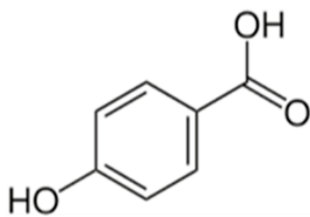
Galna ali 3,4,5-trihidroksibenzojska kislina (slika 1) vsebuje tri proste hidroksilne skupine, zaradi česar izkazuje dobre antioksidativne lastnosti. Topna je v alkoholu in vreli vodi. Nahaja se v zelenjavi in sadju ter v čaju in rdečem vinu. Ima močan antioksidativni učinek. Rezultati študij so pokazali, da že pri koncentraciji 4,2 mM povzroči padec deleža DPPH na 43,9%, učinek v zmanjšanju koncentracije DPPH radikala pa je primerljiv z vitaminom C ter nekoliko boljši od kavne kisline. V primerjavi z drugimi fenolnimi kislínami (ferulno, vanilinsko, kumarinsko) izkazuje največji učinek v reduciranju DPPH radikala (21, 22, 23, 24).



Slika 1: Struktura galne kisline (25)

- **p-hidroksibenzojska kislina**

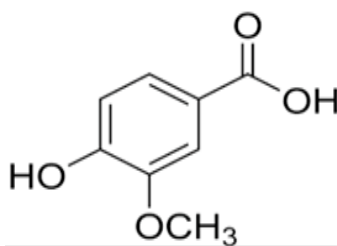
p-hidroksibenzojsko kislino ali 4-hidroksibenzojsko kislino (slika 2) najdemo v sadju in zelenjavi ter oreščkih, čaju in rdečem vinu. Dobro topna je v etanolu in n-butanolu, slabo pa v vodi. V primerjavi z drugimi fenolnimi kislínami ima šibkejši antioksidativni učinek (26).



Slika 2: Struktura p-hidroksibenzojske kisline (25)

- **Vanilinska kislina**

Vanilinska kislina ali 4-hidroksi-3-metoksibenzaldehid (slika 3) je oksidirana oblika vanilina. Topna je v acetonu, vročem benzenu in etru, slabše topna pa je v vodi. V okviru fenolnih kislin izkazuje boljši antioksidativni učinek od kumarinske kisline in slabši od ferulne, kavne in galne kisline (24).

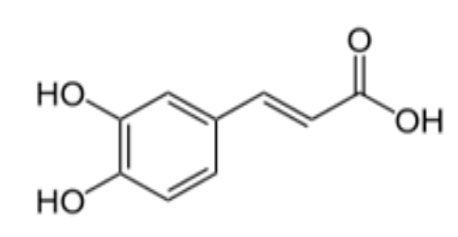


Slika 3: Struktura vanilinske kisline (25)

## HIDROKSICIMETNE KISLINE

- **Kavna kislina**

Drugo ime za kavno kislino je 3,4-dihidroksicimetna kislina (slika 4). Topna je v vroči vodi in alkoholu. Največ je najdemo v rastlinah in rdečem vinu (20). Kavna kislina ima močnejši antioksidativni učinek v primerjavi z  $\alpha$ -tokoferolom (27) ter ferulno in p-kumarinsko kislino (28).

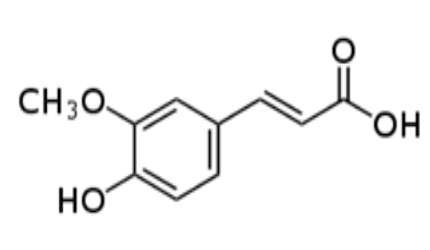


Slika 4: Struktura kavne kisline (19)



- **Ferulna kislina**

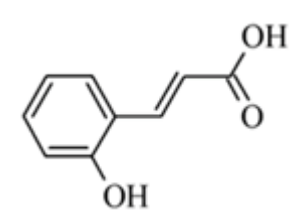
Ferulno kislino imenujemo tudi 4-hidroksi-3-metoksicimetna kislina (slika 5). Topna je v vodi, etanolu, acetonu, dietil etru in etil acetatu. V večjih količinah jo najdemo v žitaricah (riž, koruza, oves), nahaja pa se tudi v kavi, arašidih, jabolkih, pomarančah in ananasu. Ima močnejši antioksidativni učinek od kumarinske in vanilinske kisline in slabšega od galne in kavne kisline (24, 26).



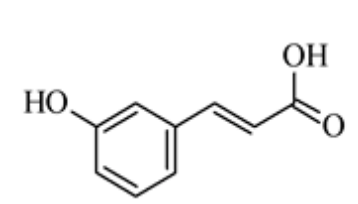
Slika 5: Struktura ferulne kisline (25)

- **Kumarinska kislina**

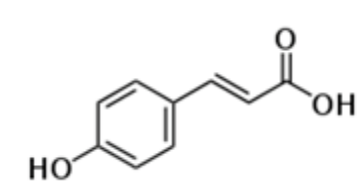
Poznamo tri izomere kumarinske kisline (slika 6), to so p-kumarinska (a), o-kumarinska (b) in m-kumarinska kislina (c), ki se med seboj razlikujejo po položaju hidroksilne skupine na fenilnem obroču (slika 6). Najbolj pogosto v naravi najdemo p-kumarinsko kislino. Kumarinska kislina se nahaja predvsem v žitih (oves, pšenica), koruzi ter v sadju in zelenjavi. Ima šibek antioksidativni učinek, šibkejši od vanilinske, ferulne, kavne in galne kisline (24); med fenolnimi kisljinami ima večji antioksidativni učinek le od p-hidroksibenzojske kisline (26).



(a)



(b)



(c)

Slika 6: Kemijska struktura o-kumarinske (a), m-kumarinske (b) in p-kumarinske kisline (c) (25)

### 1.3.1.2 Belinal

Belinal je zmes polifenolov, izoliranih iz lesa bele jelke. Izvleček so pridobili v podjetju Alpe Pharma. V sklopu raziskav so raziskovalci primerjali vsebnost, sestavo ter biološko učinkovitost fenolov, ki se nahajajo v različnih delih bele jelke, osredotočili pa so se predvsem na različne dele lesa – grče in jedrovino. Danes se v postopku ekstrakcije uporablja le demineralizirana voda, pri čemer nastane uprašen izvleček lesa bele jelke. Nastali produkt je zelo stabilen in je primeren za vgradnjo v kozmetične izdelke, tablete, kapsule ter hrano in pijačo (30).

Polifenoli, ki jih Belinal vsebuje, so flavonoidi, fenolne kisline in lignani. Flavonoidi, ki se nahajajo v izvlečku, so iz skupine procianidinov – katehin in epikatehin. Protokatehujnska, p-kumarinska ter galna kislina so nekatere v izvlečku prisotne fenolne kisline. Največji delež izvlečka pa zajemajo lignani (40%), med njimi je največ laricirecinola in njegovih derivatov, ki se drugače nahajajo tudi v semenih sezama ter v bezgu (30).

Analiza Belinala z visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC) je pokazala, da izvleček vsebuje vsaj 28 različnih polifenolov, med katerimi so določeni dobro raziskani, poznan pa je tudi njihov mehanizem delovanja ter vpliv na naše zdravje. Polifenoli v izvlečku izkazujejo antioksidativno in protivnetno delovanje, varovanje srčno žilnega sistema ter zaviralno delovanje na prebavne encime (30, 31).

Najpomembnejši učinek, ki ga izkazuje Belinal, je antioksidativni. Kot antioksidant vstopa v procese vzpostavitve oksidoredukcijskega ravnotežja v telesu. Belinalu so določili sposobnost lovljenja hidroksilnih radikalov, ki so zelo reaktivni in povzročajo največ poškodb pri oksidativnem stresu, saj povzročajo poškodbe DNA, membran in proteinov. Nadalje so proučevali, ali je sposoben zmanjšati količino hidroksilnega radikala *in vitro* in primerjali njegovo aktivnost s tremi standardnimi antioksidanti. Izkazalo se je, da je antioksidativna aktivnost Belinala nekoliko višja od aktivnosti resveratrola, dvakrat višja od vitamina E in skoraj štirikrat višja od učinkovitosti antioksidantov v zelenem čaju (31, 32).

## **2 NAMEN DIPLOMSKEGA DELA**

Namen diplomskega dela je vrednotenje antioksidativne učinkovitosti Belinala in različnih polifenolnih antioksidantov. Belinal je zmes čistih polifenolov izoliranih iz lesa bele jelke. Izvleček so pridobili v podjetju Alpe Pharma. V okviru diplomske naloge bomo najprej določili nasičeno topnost Belinala v prečiščeni vodi. Nato bomo spremljali antioksidativno učinkovitost raztopin Belinala z DPPH metodo. DPPH je radikal, ki sprejme vodikov atom od antioksidanta, pri čemer se reducira. Raztopina DPPH v metanolu pri tem izgublja intenzivno vijolično barvo, kar spremljamo spektrofotometrično z merjenjem absorbance. Nato bomo v enakih koncentracijah pripravili še raztopine drugih polifenolnih antioksidantov (galne kisline, kavne kisline, vanilinske kisline, ferulne kisline, p-hidroksibenzojske kisline, o-, m-, in p-kumarinske kisline) in primerjali njihovo učinkovitost za zmanjševanje DPPH radikala napram Belinalu.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Belinal

Kot vir Belinala smo uporabili izvleček lesa navadne jelke, ki so ga izolirali v podjetju Alpe Pharma.

##### 3.1.2 Fenolne kisline

- ferulna kislina Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)
- m-kumarinska kislina Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)
- galna kislina Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)
- vanilinska kislina Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)
- p-hidroksibenzojska kislina Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)
- o-kumarinska kislina Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)
- p-kumarinska kislina Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)
- 3,4-dihidroksicimetna kislina (kavna kislina) Merck Schuchardt OHG (Hohenbrunn, Nemčija)

##### 3.1.3 Reagenti

- DPPH radikal (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil): Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija); za določanje učinkovitosti antioksidantov
- metanol (CH<sub>3</sub>OH): Merck KGaA (Darmstadt, Nemčija); topilo pri pripravi raztopin antioksidantov.
- prečiščena voda Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani; za raztapljanje Belinala.

##### 3.1.4 Aparature in oprema

- merilne pipete Blaubrand (Wertheim, Nemčija)
- avtomatske pipete Sartorius Biohit (Helsinki, Finska)
- nastavki za pipete Sartorius Biohit (Helsinki, Finska)
- analizna tehtnica Mettler Toledo AG245, Mettler Toledo GmbH (Schwerzenbach, Švica)
- hladilnik +4 °C Gorenje (Velenje, Slovenija)

- UV/VIS spektrofotometer Hewlett Packard 8453, Agilent Technologies (Dunaj, Avstrija)
- kiveta, 10,00 mm, (Müllheim, Nemčija)
- filter Minisart 0.45  $\mu\text{m}$ , Sartorius (Goettingen, Nemčija)
- programska oprema Chem Station Software
- ultrazvočna kadička Sonis 2, Iskra pio d.o.o. (Šentjernej, Slovenija)
- ultracentrifuga WX Ultra Series, Thermo Fisher Scientific (Langensfeld, Nemčija)
- centrifuga Centric 322A, Tehnica (Železniki, Slovenija)
- centrifugirke (15 ml in 50 ml) Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri)
- magnetno mešalo IKA (Staufen, Nemčija)
- bučke Blaubrand (Wertheim, Nemčija)
- čaše Simax (Elk Grove Village, Illinois)
- erlenmajerice Simax (Elk Grove Village, Illinois)

## 3.2 METODE

### 3.2.1 DOLOČANJE NASIČENE TOPNOSTI BELINALA V PREČIŠČENI VODI

#### *3.2.1.1 Priprava standardnih raztopin Belinala in izdelava umeritvene premice*

V steklen čolniček smo točno natehtali približno 2,4 mg Belinala, ga prenesli v 100-ml bučko in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake. Z meritvami absorbance smo določili absorpcijsko krivuljo in odčitali valovno dolžino maksimalne absorpcije ( $\lambda_{\text{max}} = 279 \text{ nm}$ ). Nato smo pripravili razredčitve osnovne raztopine in dobili raztopine s koncentracijami med 0,0048 mg/ml in 0,0192 mg/ml. Po istem postopku smo naredili še redčitve osnovne raztopine Belinala za drugo natehto ( $m=3,7 \text{ mg}$ ; koncentracijski interval: 0,0074 – 0,0111 mg/ml). Vsem pripravljenim raztopinam smo izmerili absorbance in na podlagi le-teh določili enačbo umeritvene premice ( $R^2 = 0.99959$ ). Dodatno smo pripravili še dve osnovni raztopini s koncentracijama 0,048 in 0,068 mg/ml in tudi tema pomerili absorbanco.

#### *3.2.1.2 Določanje nasičene topnosti Belinala*

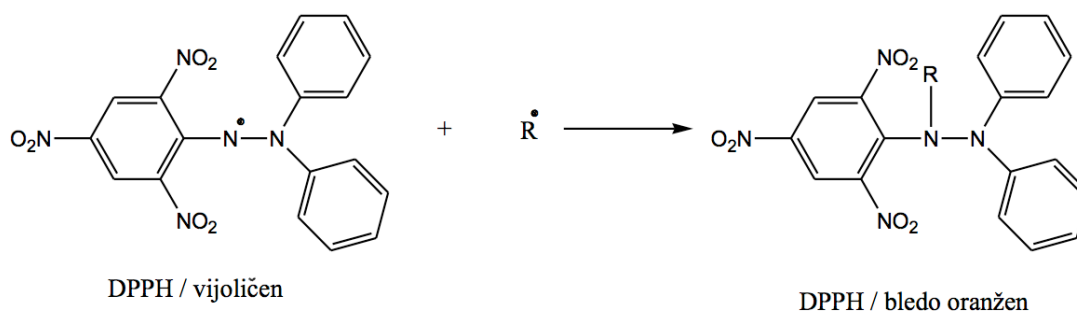
Nasičeno topnost Belinala v prečiščeni vodi smo določili tako, da smo v približno 50 ml prečiščene vode dodali prebitok (približno 43 mg) Belinala in pustili mešati 48h pri sobni temperaturi in nato mirovati vsaj 12 h, da je neraztopljen Belinal sedimentiral. Približno 30 ml

nasičene raztopine smo nato prelili v ustrezne centrifugirke in ultracentrifugirali 40 min pri 50000 obratih. Po končanem ultracentrifugiranju smo supernatant ustrezno redčili (1 ml supernatanta na 5 ml, 10 ml in 25 ml) ter pripravljenim raztopinam izmerili absorbanco. S pomočjo enačbe umeritvene premice Belinala smo nato določili koncentracije vsem trem raztopinam oz. upoštevaje faktor redčenja določili nasičeno topnost.

### 3.2.2 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI BELINALA IN FENOLNIH KISLIN Z DPPH METODO

#### 3.2.2.1 DPPH metoda

DPPH ali 2,2-difenil-1-pikrilhidrazin je stabilen radikal, ki ima prosti elektron delokaliziran po celotni molekuli, kar molekuli daje stabilnost in intenzivno vijolično barvo. Dodatek antioksidanta k metanolni raztopini DPPH radikala povzroči nastanek reducirane oblike DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazin) in razbarvanje raztopine oz. pojav rahlo rumenega odtenka raztopine zaradi prisotnosti pikrinske skupine. Reakcija je prikazana na sliki 7. Antioksidant deluje kot donor vodika, ki ga sprejme DPPH radikal. Iz molekule antioksidanta po reakciji z DPPH radikalom nastane nov radikal, ki ponovno reagira z novim DPPH radikalom in ga stabilizira. Spremembo barve iz vijolične v rumeno spremljamo spektrofotometrično z UV-VIS spektrofotometrom pri valovni dolžini 517 nm, pri kateri smo določili absorpcijski maksimum metanolne raztopine DPPH. Reakcija je prikazana na sliki 7. Stopnja razbarvanja oz. zmanjšanje intenzivnosti DPPH radikala je odvisna od učinkovitosti antioksidanta. Metoda je enostavna, poceni, hitra in ponovljiva.



Slika 7: Reakcija med DPPH radikalom z antioksidantom (3)

Z DPPH metodo smo določali antioksidativno učinkovitost Belinala, galne kisline, kavne kisline, ferulne kisline, o-, m-, p-kumarinske kisline, p-hidroksibenzojske kisline in vanilinske kisline. Koncentracijo vseh vzorcev smo določali spektrofotometrično.

### 3.2.2.2 UV-VIS spektrofotometrija

UV-VIS spektrofotometrija je metoda, ki temelji na merjenju absorpcije monokromatske svetlobe pri prehodu skozi raztopino vzorca. Mnoge spojine (večina organskih komponent, nekateri anorganski ioni ter kompleksi) namreč absorbirajo elektromagnetno valovanje v UV ali vidnem območju. UV območje obsega valovne dolžine med 180 in 380 nm, vidno območje pa od 380 do 780 nm. Absorpcijo UV-VIS svetlobe omogočajo t.i. kromofori. Spektrofotometer meri intenziteto žarka, ki prehaja skozi analiziran vzorec in le-to primerja z intenziteto vpadnega žarka. Intenziteto žarka, ki prehaja vzorec, imenujemo absorbanca in jo določamo pri valovni dolžini, pri kateri je razmerje med absorbanco in koncentracijo linearno, saj s tem zmanjšamo možnosti napak pri merjenju. Na podlagi meritev absorbance (A) ali transmittance (T) raztopine v kiveti lahko izvedemo analizo vzorca s spektrofotometrom.

Za absorpcijo svetlobe velja Beer-Lambertov zakon, ki opisuje odnos med absorbanco, dolžino svetlobne poti in koncentracijo raztopine kot je prikazano na spodnji enačbi (enačba 1). Natančneje, po Beer-Lambertovem zakonu je absorbanca (A) premosorazmerna koncentraciji preiskovane raztopine, in je odvisna tudi od dolžine optične poti in molarne absorptivnega koeficienta.

**Enačba 1:**  $A = -\log T = \log(I_0/I) = \epsilon * l * c$

A = absorbanca

T = transmittanca

$I_0$  = intenziteta vpadne svetlobe

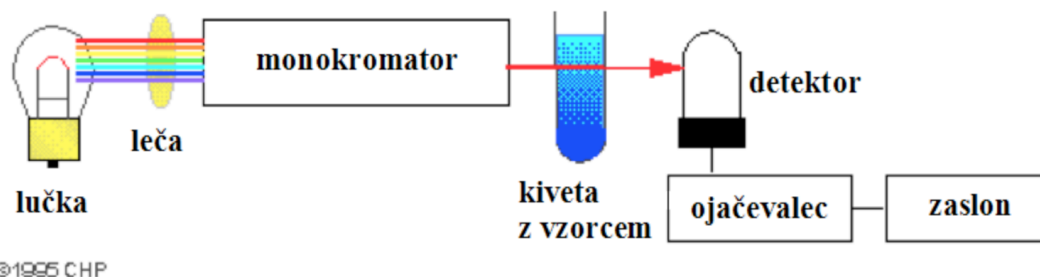
I = intenziteta izhodne svetlobe

$\epsilon$  = molarni absorptivni koeficient (L/mol\*cm)

l = dolžina optične poti (cm)

c = koncentracija merjenega analita v vzorcu (mol/L)

Spektrofotometer sestavljajo trije glavni deli – izvor svetlobe, ki je navadno žarnica, monokromator in detektor. Sestava UV-VIS spektrofotometra je prikazana na sliki 8.



Slika 8: Sestava UV-VIS spektrofotometra (32)

### 3.2.2.3 Priprava umeritvene premice za določanje koncentracije DPPH

Za pripravo umeritvene premice smo natančno natehtali dve različni natehti DPPH in ju redčili v metanolu. Tako smo pripravili dve osnovni raztopini DPPH s koncentracijama 74,6  $\mu\text{M}$  in 79,1  $\mu\text{M}$ , ki smo ju nadalje redčili in dobili osem raztopin s koncentracijami med 15,8  $\mu\text{M}$  in 67,1  $\mu\text{M}$ . Vsem desetim raztopinam smo nato spektrofotometrično izmerili absorbanco pri 517 nm in na podlagi rezultatov izračunali enačbo umeritvene premice ( $R^2=0.99975$ ).

### 3.2.2.4 Priprava osnovne raztopine DPPH za določanje antioksidativne učinkovitosti

Vsak dan smo pripravili svežo raztopino DPPH za določanje antioksidativne učinkovitosti antioksidantov. Osnovno raztopino DPPH smo pripravili tako, da smo natančno natehtali približno 11 mg DPPH in ga redčili s 25 ml metanola. Bučko z raztopino DPPH smo dali v ultrazvočno kadičko za 10 min in tako zagotovili, da se je DPPH popolnoma raztopil v metanolu. Zatem smo 3ml osnovne raztopine redčili na 50 ml. Dobljena koncentracija je bila v koncentracijskem območju (60  $\mu\text{M}$  in 80  $\mu\text{M}$ ), znotraj katerega DPPH po literaturnih podatkih izkazuje najboljše delovanje. To raztopino smo nato odmerili v kiveto (2400  $\mu\text{l}$ ) ter izmerili absorbanco pri 517 nm. S tem smo določili absorbanco začetne raztopine DPPH.

Ker na padec absorbance pri testiranju antioksidativne učinkovitosti ne vpliva samo razbarvanje zaradi redukcije DPPH radikala, temveč tudi redčenje raztopine DPPH z raztopino antioksidanta, smo izmerili absorbanco 2400  $\mu\text{l}$ -om raztopine DPPH po dodatku



100 µl metanola (isto razmerje volumnov kot pri testiranju antioksidantov). Enak postopek smo izvedli v treh paralelah in povprečje padca absorbance zaradi redčenja upoštevali pri vseh nadaljnjih meritvah.

Meritve smo izvajali v zatemnjenem prostoru, da bi preprečili razpad DPPH zaradi vpliva svetlobe, prav tako smo kivetu zaprli s pokrovčkom, da preprečimo izhlapevanje metanola.

#### *3.2.2.5 Priprava reakcijske zmesi DPPH in antioksidantov*

Z DPPH metodo smo proučevali antioksidativno sposobnost Belinala, galne kisline, kavne kisline, ferulne kisline, p-, o-, m-kumarinske kisline, p-hidroksibenzojske kisline in vanilinske kisline.

V ta namen smo pripravili vodno raztopino Belinala v različnih koncentracijah, in sicer 0.85 mg/ml, ki je nasičen raztopina Belinala, le-to pa smo nadalje redčili 1 ml na 5 ml, 10 ml in 25 ml. S tem smo dobili štiri vodne raztopine Belinala v različnih koncentracijah. 100 µl posamezne raztopine smo dodali k 2400 µl osnovne raztopine DPPH in spremljali padec koncentracije DPPH pri valovni dolžini 517 nm. Absorbanco smo merili na vsake pol minute do 5 min, na vsako minuto do 10 min in na vsakih 5 min do vključno 30 min, ko se koncentracija DPPH ni več znatno spreminjala oz. je reakcija med DPPH radikalom in antioksidantom dosegla ravnotežno stanje. Izvedli smo dve paraleli.

Na enak način smo testirali še preostale antioksidante (kavna kislina, galna kislina, ferulna kislina, p-, o-, m-kumarinska kislina, p-hidroksibenzojska kislina in vanilinska kislina). Najprej smo pripravili sveže raztopine antioksidantov. Te smo za razliko od Belinala raztopili v metanolu. Posamezen antioksidant smo raztopili v metanolu v dveh različnih koncentracijah (0,85 mg/ml, ki odgovarja koncentraciji nasičene raztopine Belinala, in 0,034 mg/ml, ki predstavlja redčitev 1ml nasičene raztopine na 25 ml) ter 100 µl raztopine antioksidanta v izbrani koncentraciji dodali k 2400 µl-om osnovne raztopine DPPH radikala v kiveti ter merili absorbanco v določenem časovnem obdobju.

S pomočjo enačbe 2 smo nato določili kolikšen je delež DPPH radikala v ravnotežnem stanju glede na absorbanco osnovne DPPH raztopine in absorbanco DPPH raztopine v določeni časovni točki. Tako smo posredno določili antioksidativni učinek Belinala in drugih antioksidantov:

**Enačba 2:** % DPPH radikala =  $A_t/A_0 \times 100$

$A_0$ : absorbanca raztopine DPPH ob času 0, brez dodanega antioksidanta;

$A_t$ : absorbanca zmesi DPPH in Belinala oz. ostalih antioksidantov v posamezni časovni točki.

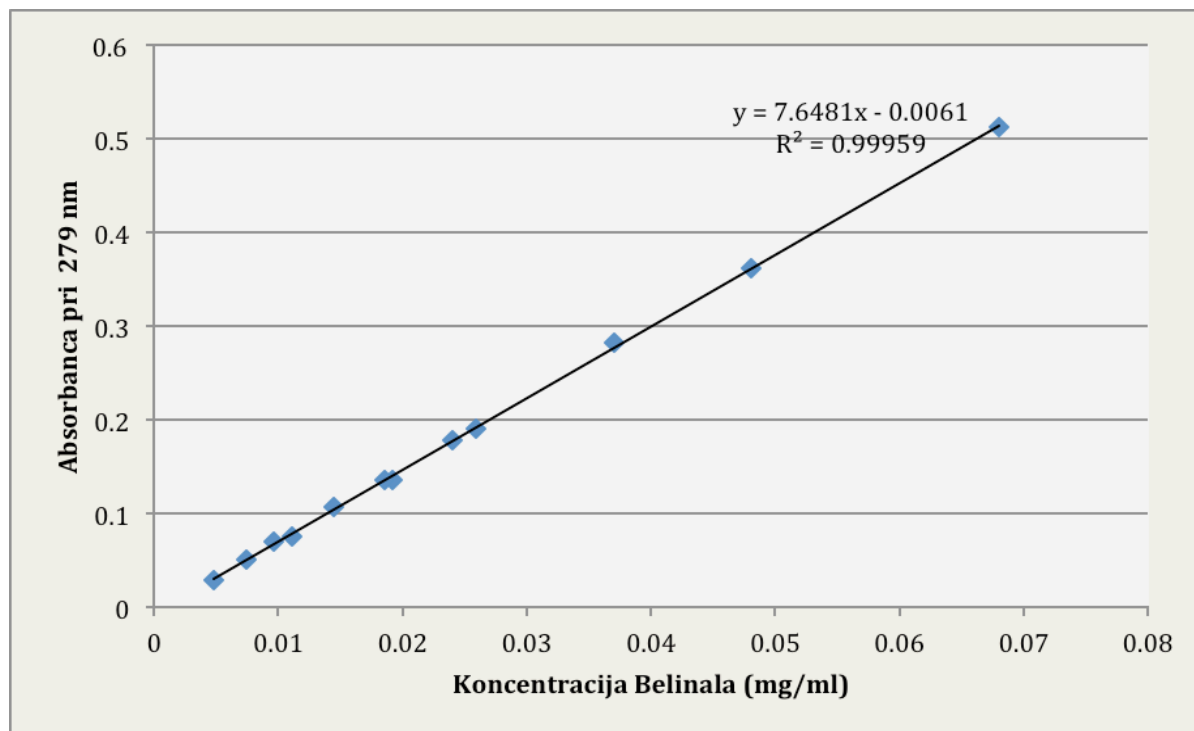
## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

V okviru diplomske naloge smo vrednotili antioksidativno učinkovitost Belinala, ki je zmes različnih polifenolov, izoliran iz lesa bele jelke. S pomočjo DPPH metode smo ovrednotili vpliv različnih koncentracij Belinala glede sposobnosti redukcije DPPH radikala. Nadalje smo antioksidativno učinkovitost Belinala primerjali z določenimi ostalimi polifenolnimi antioksidanti (galne kisline, kavne kisline, vanilinske kisline, ferulne kisline, p-hidroksibenzojske kisline, p-, o-, in m-kumarinske kisline) v odgovarjajočih koncentracijah.

### 4.1 DOLOČANJE NASIČENE TOPNOSTI BELINALA

Zaradi slabe topnosti Belinala v prečiščeni vodi smo najprej določili njegovo nasičeno topnost, torej največjo količino Belinala, ki se raztopi v prečiščeni vodi pri danih pogojih. Kot topilo smo testirali tudi metanol, vendar je bil v metanolu, kljub soniciranju v ultrazvočni kopeli, še težje topen, zato smo njegovo uporabo opustili. Za ugotavljanje antioksidativnega učinka z DPPH metodo mora namreč antioksidant biti raztopljen, pri nasičeni topnosti pa smo tudi predvidevali, da bomo dokazali največjo učinkovitost.

Za določitev nasičene topnosti Belinala smo najprej izdelali umeritveno premico Belinala v koncentracijskem območju 0,0048 mg/ml do 0,0192 mg/ml. Standardnim raztopinam smo izmerili absorbanco pri maksimalni valovni dolžini 279 nm in določili enačbo umeritvene premice:  $y = 7.6481x - 0.0061$  z  $R^2 = 0.99959$  (slika 9).

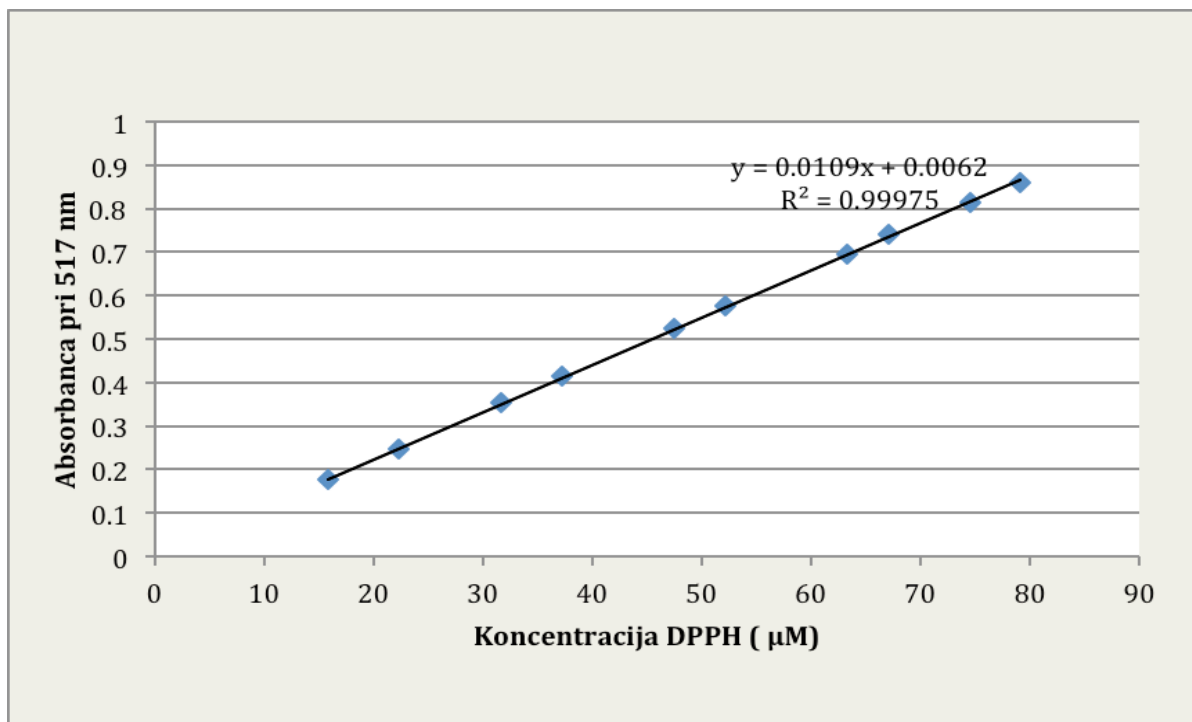


**Slika 9:** Umeritvena premica Belinala za določanje nasičene topnosti Belinala v prečiščeni vodi pri valovni dolžini maksimalne absorpcije  $\lambda=279$  nm z enačbo premice in pripadajočim  $R^2$

Nasičeno topnost Belinala v prečiščeni vodi pri sobni temperaturi smo določili v supernatantu po ultracentrifugiranju s pomočjo umeritvene premice in upoštevaje faktorjev redčenja. Ugotovili smo, da je Belinal v prečiščeni vodi zelo težko topen. 5-krat, 10-krat in 25-krat redčeni nasičeni raztopini smo izmerili absorbanco 1,333, 0,639 oziroma 0,257. Prva redčitev je bila prenizka, saj je absorbanca presegala zaželen interval (absorbanca mora znašati med 0,1 in 1,2, zato, da velja Beer-Lambertov zakon oz. da je absorbanca v vzorcu še vedno linearno odvisna od koncentracije). Zato smo upoštevali samo zadnji dve redčitvi. Koncentracija nasičene raztopine Belinala, ki smo jo določili pri sobni temperaturi (20 °C), znaša 0,856 mg/ml.

#### 4.2 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI BELINALA IN FENOLNIH KISLIN Z DPPH METODO

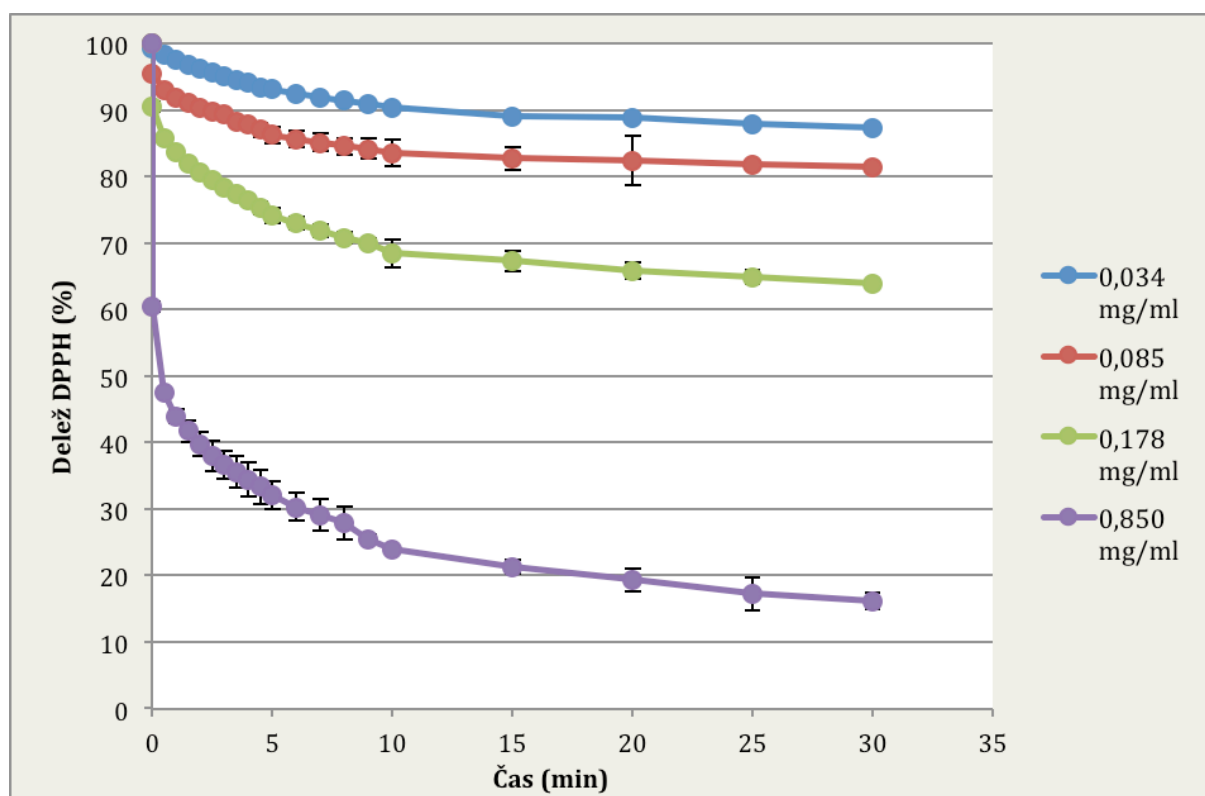
Za določanje sposobnosti antioksidantov za redukcijo DPPH radikala smo najprej izdelali standardne raztopine DPPH v metanolu v koncentracijskem območju 15,828 – 79,140  $\mu$ M. Vsem standardnim raztopinam smo nato pomerili absorbanco pri valovni dolžini 517 nm in dobili enačbo umeritvene premice:  $y = 0.0109x + 0.0062$  z  $R^2 = 0.99975$  (slika 10).



**Slika 10:** Umeritvena premica za določanje koncentracije DPPH v raztopini pri valovni dolžini maksimalne absorpcije  $\lambda=517$  nm z enačbo in pripadajočim  $R^2$

#### 4.2.1 KONCENTRACIJSKA ODVISNOST ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI BELINALA

Z DPPH metodo smo testirali antioksidativne lastnosti Belinala oz. njegovih raztopin v prečiščeni vodi v koncentracijskem v razponu 0,034 - 0,85 mg/ml. Padec koncentracije DPPH radikala v pripravljenih reakcijskih zmesih zaradi redukcije DPPH radikala smo spremljali spektrofotometrično pri valovni dolžini 517 nm. Spremljali smo časovni potek reakcije med DPPH in Belinalom v odvisnosti od koncentracije Belinala; začetne koncentracije DPPH radikala v metanolu so bile približno enake. Reakcijo smo zmeraj spremljali do ravnotežnega stanja, ki se je vzpostavilo po približno 30 minutah – po 30 min so bile namreč spremembe v vrednostih absorbanc praktično zanemarljive (slika 11).



**Slika 11:** Spremljanje deleža preostalega DPPH v odvisnosti od časa po dodatku različnih koncentracij Belinala v raztopino DPPH

Iz slike 11 je razvidno, da se delež DPPH radikala v odvisnosti od časa in koncentracije Belinala zmanjšuje in da je naklon krivulj odvisen od koncentracije vzorca. Večja kot je koncentracija Belinala, bolj strm je naklon krivulje in hitreje poteče reakcija Belinala z DPPH. Večja hitrost reakcije spojine z DPPH pa nam pove, da ima spojina boljše antioksidativno delovanje. Pričakovano zaznamo največji padec koncentracije DPPH pri najvišji koncentraciji Belinala, t.j. 0,85 mg/ml, najmanjšega pa v kombinaciji z najnižjo koncentracijo Belinala, t.j. 0,034 mg/ml. Bolj postopen padec absorbance DPPH radikala zaznamo pri koncentracijah Belinala 0,085 mg/ml in 0,178 mg/ml. Delež preostalega DPPH radikala v zmesi je v kombinaciji z najnižjo koncentracijo Belinala pri 30 minutah 87,4 %, pri najvišji koncentraciji Belinala pa zgolj 20,9 %.

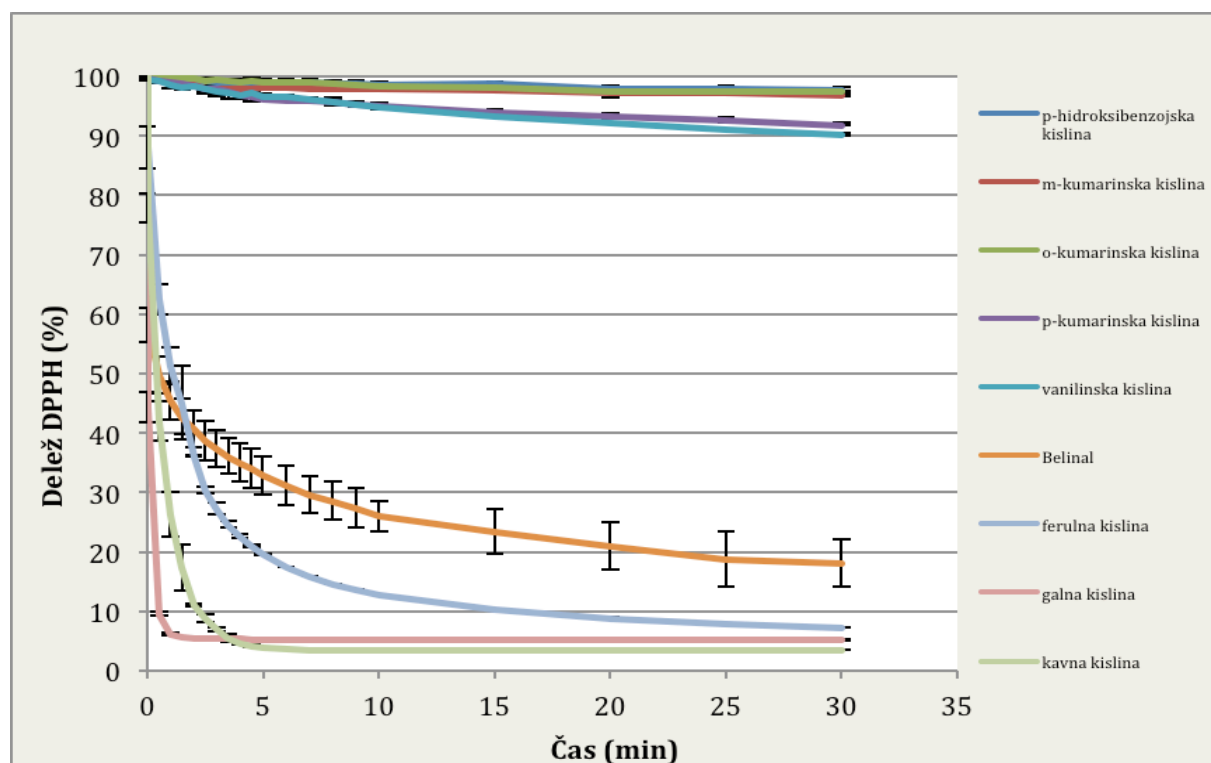
Večji padec koncentracije DPPH radikala pri višjih koncentracijah Belinala smo pričakovali, saj večja koncentracija Belinala pomeni večje število vodikovih ionov in posledično več reduciranih DPPH radikalov. Polifenoli, ki jih Belinal vsebuje, oddajo vodikove atome in reducirajo DPPH. Pri nižjih koncentracijah (0,085 mg/ml in 0,034 mg/ml) polifenoli v

Belinalu niso tako učinkoviti, saj je na razpolago manj vodikovih ionov, ki bi sicer prišli v stik z DPPH radikalom in ga reducirali.

#### 4.2.2 UČINKOVITOST ANTIOKSIDANTOV V KOMBINACIJI Z DPPH RADIKALOM

V nadaljevanju smo vrednotili 9 različnih polifenolnih antioksidantov in njihovo antioksidativno učinkovitost primerjali med sabo ter predvsem glede na Belinal. Koncentracije testiranih raztopin so odgovarjale nasičeni topnosti Belinala v prečiščeni vodi, torej 0,85 mg/ml, ter najnižji testirani koncentraciji Belinala, tj. 0,034 mg/ml. Padeč absorbance DPPH radikala oz. delež preostalega DPPH radikala v reakcijski zmesi smo spremljali do dosega ravnotežnega stanja (30 min) in rezultate prikazali kot % DPPH radikala v odvisnosti od časa.

Delež DPPH se je z dodanimi antioksidanti s koncentracijo 0,85 mg/ml spreminjal različno hitro. Na spodnjem grafu je prikazan % preostalega DPPH radikala v zmesi v odvisnosti od časa (slika 12).



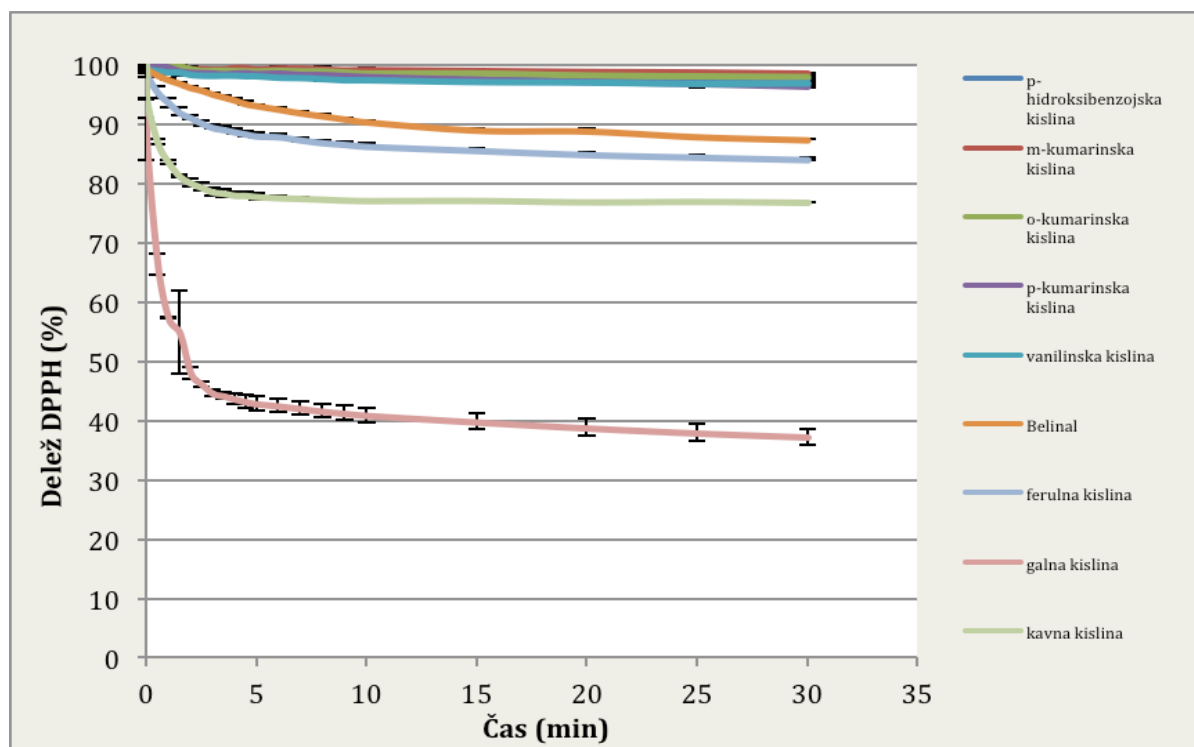
Slika 12: Delež preostalega DPPH radikala v zmesi z različnimi antioksidanti s koncentracijo 0,85 mg/ml

Pri koncentraciji 0,85 mg/ml se je kot najučinkovitejši antioksidant izkazala kavna kislina, sledita pa ji še galna in ferulna. Krivulja kinetike redukcije DPPH z galno kislino je bila

izredno strma in je dosegla plato že po približno 1 minuti. Tudi krivulja kinetike redukcije DPPH s kavno kislino je bila zelo strma in dosegla plato po približno 3 minutah. Krivulja ferulne kisline je bila manj strma od krivulj kavne in galne kisline in je kasneje dosegla plato, in sicer po približno 20 minutah. V primerjavi s temi tremi fenolnimi kisljinami ima Belinal slabše antioksidativno delovanje, saj je povzročil manj strm padec koncentracije DPPH v zmesi, medtem ko se je izkazal kot boljši antioksidant od vanilinske kisline, o-, m-, p-kumarinske kisline ter od p-hidroksibenzojske. V ravnotežnem stanju je delež DPPH radikala v prisotnosti Belinala znašal 15,3 %. Pri kavni, galni in ferulni kislini je delež DPPH v ravnotežnem stanju znašal zgolj 3,5 %, 5,1 % in 7,3 %. Tako majhen delež preostalega DPPH je lahko posledica absorpcije svetlobe zreagiranega DPPH pri 517 nm. Ostali antioksidanti so povzročili majhen oz. zanemarljiv padec v deležu DPPH radikala, in sicer na vrednosti med 89,2 % (vanilinska) oz. 98,2 % (p-hidroksibenzojska kislina) (slika 13). Trditve, da imajo hidroksicimetne kisline domnevno višjo antioksidativno učinkovitost od hidroksibenzojskih kisljin, ker imajo na aromatski obroč vezano propenojsko ( $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ ) skupino, ki pripomore k resonančni stabilnosti molekule, nismo mogli potrditi (19). Galna kislina (hidroksibenzojska kislina) se je pri koncentraciji 0,85 mg/ml izkazala kot podobno učinkovit antioksidant kavna kislina (hidroksicimetna kislina). Galna kislina vsebuje tri proste hidroksilne skupine, zaradi česar izkazuje dobre antioksidativne lastnosti (21).

Delež DPPH se je z dodanimi antioksidanti s koncentracijo 0,034 mg/ml spreminjal različno hitro. Na spodnjem grafu je prikazan % preostalega DPPH radikala v zmesi v odvisnosti od časa (slika 13).



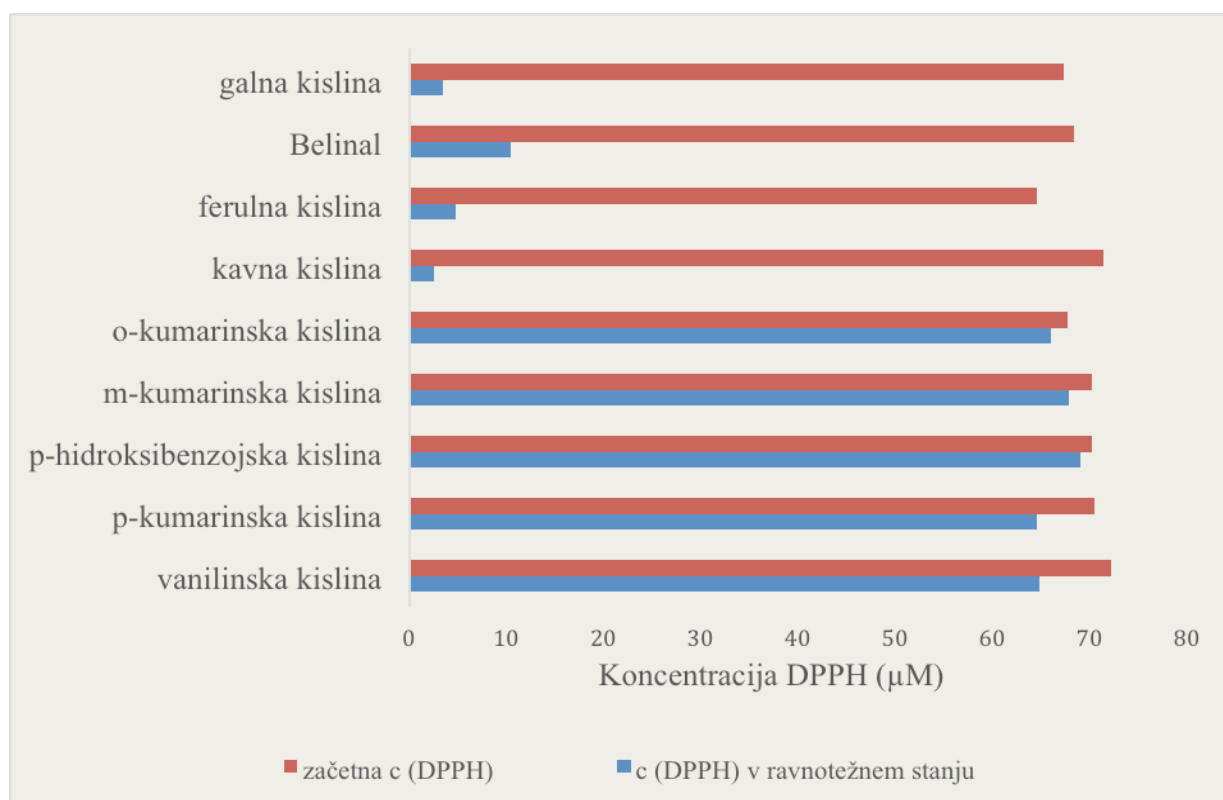


Slika 13: Delež preostalega DPPH radikala v zmesi z različnimi antioksidanti s koncentracijo 0,034 mg/ml

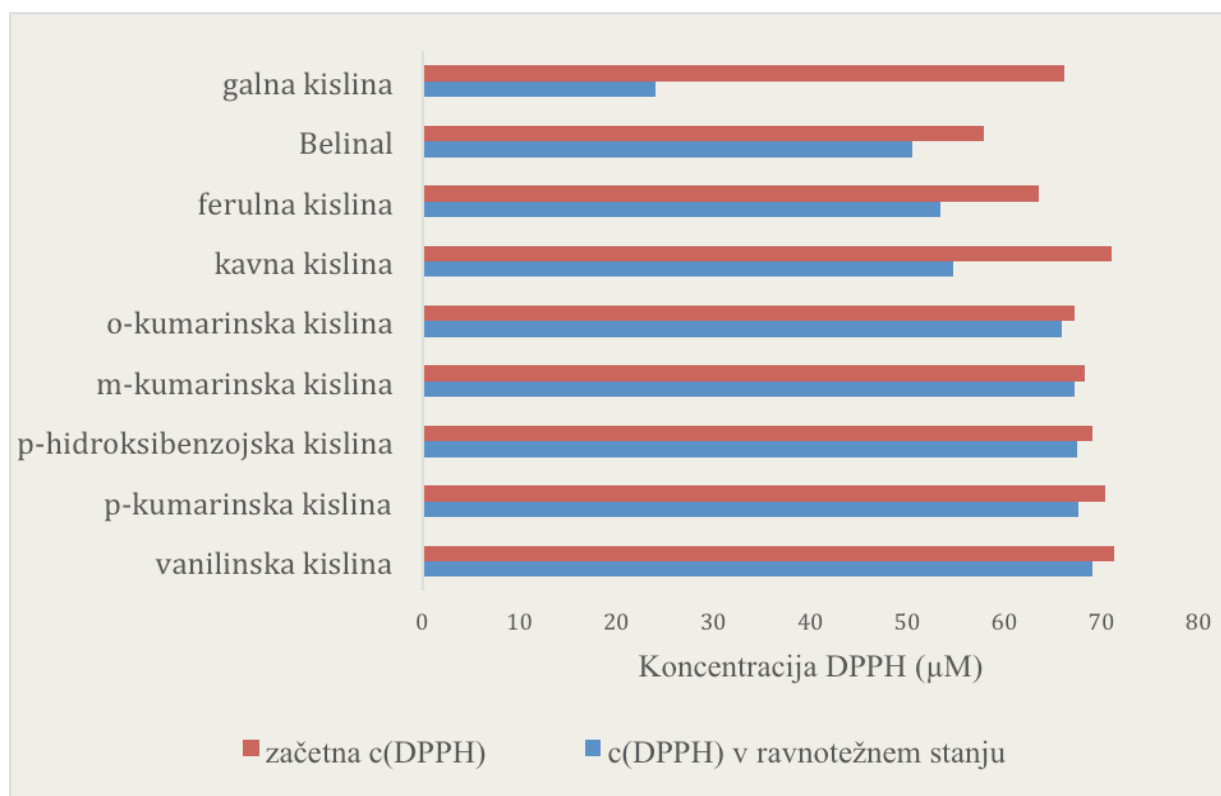
Pri koncentraciji 0,034 mg/ml se je kot najbolj učinkovit antioksidant za redukcijo DPPH radikala izkazala galna kislina z deležem preostalega DPPH radikala 36,3 %. Plato je dosegla že po približno 4 minutah. Sledita ji še kavna in ferulna kislina z vrednostima 77,1 % in 83,9 %. Belinal se je izkazal kot učinkovitejši antioksidant od o-, m-, p-kumarinske kisline in p-hidroksibenzojske kisline. Pri koncentraciji 0,034 mg/ml se je galna kislina pokazala kot močnejši antioksidant od kavne kisline, čeprav je hidroksibenzojska kislina. To se ujema z izsledki raziskav, ki so primerjale učinke kavne in galne kisline (26, 27). Tudi naša ugotovitev, da je kavna kislina močnejši antioksidant od p-kumarinske kisline je v skladu z literaturo (28). Glede na učinkovitost v zmanjševanju koncentracije DPPH je zaporedje testiranih fenolnih kislin sledeče (od najučinkovitejšega proti najmanj učinkovitem): galna kislina > kavna kislina > ferulna kislina > vanilinska kislina > p-kumarinska kislina > o-kumarinska kislina > m-kumarinska kislina > p-hidroksibenzojska kislina. Takšno zaporedje se ujema z literaturnimi podatki o antioksidativnem delovanju fenolnih kislin z DPPH metodo (26).

Na spodnjih grafih so prikazane začetne koncentracije DPPH radikala v zmesi (v času 0) ter koncentracijo DPPH radikala v zmesi v ravnotežnem stanju (po približno 30 min) za vsak antioksidant posebej. Najprej smo primerjali razliko v koncentraciji DPPH radikala v zmesi za

antioksidante s koncentracijo 0,85 mg/ml (slika 14), nato pa še za antioksidante v koncentraciji 0,034 mg/ml (slika 15). Rezultati so prikazani na slikah 14 in 15. Kljub razlikam v začetnih koncentracijah DPPH je mogoče iz slik razbrati naslednje ugotovitve: (i) pri višji koncentraciji se antioksidativni učinek galne, kavne, ferulne kisline in Belinala izrazito poveča, (ii) galna, kavna, ferulna kislina in Belinal imajo močnejše antioksidativno delovanje kot o-, m-, p-kumarinska, p-hidroksibenzojska ali vanilinska kislina, (iii) Belinal ima v višji koncentraciji izrazito večji antioksidativni učinek.



**Slika 14:** Primerjava začetnih in končnih koncentracij DPPH v kombinaciji z antioksidanti v koncentraciji 0,85 mg/ml



**Slika 15:** Primerjava začetnih in končnih koncentracij DPPH v kombinaciji z antioksidanti v koncentraciji 0,034 mg/ml

## 5 SKLEP

V diplomski nalogi smo najprej določili nasičeno topnost Belinala v prečiščeni vodi pri sobni temperaturi, ki je znašala 0,85 mg/ml. Ker je torej v prečiščeni vodi zelo težko topen, je bilo smiselno, da smo njegovo antioksidativno učinkovitost določili tudi v nasičeni raztopini. To smo naprej ustrezno redčili in tako določili učinkovitost različnih koncentracij Belinala glede na redukcijo DPPH radikala. V odgovarjajočih mejnih koncentracijah (najnižji in najvišji) smo pripravili še raztopine drugih polifenolnih antioksidantov (galne kisline, kavne kisline, vanilinske kisline, ferulne kisline, p-hidroksibenzojske kisline, o-, m-, in p-kumarinske kisline) in primerjali antioksidativno učinkovitost omenjenih antioksidantov glede na Belinal. Pri koncentraciji 0,85 mg/ml se je kot najučinkovitejši antioksidant potrdila kavna kislina, sledita pa ji še galna in ferulna kislina. Belinal se je izkazal kot boljši antioksidant od vanilinske kisline, m-, o-, p-kumarinske kisline ter od p-hidroksibenzojske in slabši od kavne, galne in ferulne kisline. Pri koncentraciji 0,034 mg/ml so bile najučinkovitejše v zmanjševanju koncentracije DPPH radikala galna, kavna in ferulna kislina. Belinal se je izkazal kot učinkovitejši antioksidant od vanilinske, o-, m-, p-kumarinske kisline in p-hidroksibenzojske. Na osnovi rezultatov diplomskega dela lahko zaključimo, da je Belinal učinkovit antioksidant, katerega učinek narašča s koncentracijo. Njegovo antioksidativno delovanje lahko primerjamo z najmočnejšimi fenolnimi kisljinami, in je zaradi svojega delovanja primeren za vgradnjo v kozmetične izdelke proti staranju kože.

## 6 LITERATURA

1. Osredkar J: Oksidativni stres. Zdrav Vestn 2012; 81: 393-406.
2. Palmer DM, Silverman-Kitchin J: Oxidative Damage, Skin Aging, Antioxidants and a Novel Antioxidant Rating System. Journal of Drugs in Dermatology 2010; 9(1): 11-15.
3. Krakar D: Optimizacija metod za ugotavljanje antioksidativne aktivnosti izvlečka lubja navadne jelke (*Abies alba* Mill.). Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011.
4. Stojiljković D, Pavlović D, Arsić I: Oxidative Stress, Skin Aging and Antioxidant Therapy. Scientific Journal of the Faculty of Medicine in Niš 2014; 31(4): 207-217.
5. Graf J: Antioxidants and Skin Care: The Essentials. Plastic & Reconstructive Surgery® 2010; 125(1): 378-383.
6. Oresajo C, Pillai S, Yatskayer M, Puccetti G, McDaniel DH: Antioxidants and Skin Aging: A Review. Cosmetic Dermatology® 2009; 22(11): 563-570.
7. Bickers DR, Arthar M: Oxidative Stress in the Pathogenesis of Skin Disease. Journal of Investigative Dermatology 2006; 126: 2565-2575.
8. Pouillot A, Polla LL, Tacchini P, Neequaye A, Polla A, Polla B: Formulating, Packaging, and Marketing of Natural Cosmetic Products, John Wiley & Sons, Inc., 2011: 239-257.
9. Halliwell B, Gutteridge J: Free radicals in biology and medicine, Oxford University Press, 4th, 2007: 79-186.
10. Analysis of some Antioxidants used in Cosmetics by Chromatographic Methods.  
Pridobljeno decembra 2014 s spletne strani:  
[http://doctorat.ubbcluj.ro/sustinerea\\_publica/rezumat/2011/chimie/JUNCAN\\_ANCA\\_MARIA\\_EN.pdf](http://doctorat.ubbcluj.ro/sustinerea_publica/rezumat/2011/chimie/JUNCAN_ANCA_MARIA_EN.pdf)
11. Swarbrick J: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Third Edition, CRC Press, 2006: 415-449.
12. Rozman B, Gašperlin M, Kristl J: Preventivno delovanje naravnih antioksidantov na nastanek kožnega raka pod vplivom ultravijoličnih žarkov. Med Razgl 2006: 45: 141-153.

13. Hamid AA, Aiyelaagbe OO, Usman LA, Ameen OM, Lawal A: Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. *African Journal of Pure and Applied Chemistry* 2010; 4(8): 142-151.
14. Poljsak B, Glavan U, Dahmane R: Skin Cancer, Free Radicals and Antioxidants. *International Journal of Cancer Research and Prevention* 2011; 4(3): 193-217.
15. Shapiro SS, Saliou C: Role of Vitamins in Skin Care. *Nutrition Journal* 2001; 17: 839-844.
16. Pinemail J, Dafraigne JO: Coenzyme Q10 or Ubiquinone: a Peculiar Antioxidant. Pridobljeno avgusta 2015 s spletne strani:  
<http://www.probiox.com/uk/html/documents/coQ10uk.PDF>
17. Fiedor J, Kvetoslava B: Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease. *Nutrients* 2014; 6(2): 466-488.
18. Tsao R: Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2010; 2(12): 1231-1246.
19. Abramović I: Določevanje stabilnosti nekaterih polifenolnih antioksidantov. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Pedagoška fakulteta, Biotehniška fakulteta, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Naravoslovnotehniška fakulteta, Ljubljana, 2013.
20. Matej Sova: Biološki učinki derivatov cimetne kisline, *Farm vestn* 2012; 63:178-184.
21. Berlatanič L: Vpliv topila na določeno antioksidativno aktivnost vin in modelnih antioksidantov. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta, Ljubljana, 2011.
22. Yena GC, Duh PD, Tsai HL: Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chemistry* 2012; 79 (3): 307-313.
23. Volf I, Ignat I, Neamțu M, Popa VI: Thermal stability, antioxidant activity, and photo-oxidation of natural polyphenols. *Chemical Papers* 2014; 68 (1): 121-129.
24. W. Brand-Williams, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology* 1995; 28 (1): 25-30.
25. Strukture fenolnih kislin. Povzeto julija 2015 s spletne strani:  
<http://www.commonswikimedia.org>

26. Karamać M, Kosińska A, Pegg RB: Comparison of radical – scavenging activities for selected phenolic acids. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2005; 14 (2): 165-170.
27. Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). Povzeto avgusta 2015 s spletne strani:  
[https://www.researchgate.net/publication/7523981\\_Antioxidant\\_activity\\_of\\_caffeic\\_acid\\_%283\\_4-dihydroxycinnamic\\_acid%29](https://www.researchgate.net/publication/7523981_Antioxidant_activity_of_caffeic_acid_%283_4-dihydroxycinnamic_acid%29).
28. Kikuzaki H1, Hisamoto M, Hirose K, Akiyama K, Taniguchi H. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *J Agric Food Chem* 2002; 50 (7): 2161-8.
29. Belinal® – les bele jelke iz globine pragozda. Pridobljeno maja 2015 s spletne strani:  
<http://si.belinal.com/belinal-izvlecek/belinal-izvlecek.html>
30. Štrukelj B, Kreft S: Study report on the in vitro antioxidative activity of Belinal: hydroxyl radical scavenging activity. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2014.
31. Benković T, Štrukelj B, Kreft S: Study report on the phytochemical investigation of Belinal. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za Farmacijo, Ljubljana 2014.
32. Sestava spektrofotometra. Gradivo s predavanj iz predmeta Kozmetični izdelki I, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011.