

Mladi za napredek Maribora

31. srečanje

**PRIMERJAVA ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA PREHRANSKIH
DOPOLNIL, ČAJEV IN SVEŽIH RASTLIN AMERIŠKEGA SLAMNIKA (*Echinacea
purpurea*) IN INGVERJA (*Zingiber officinalis*)**

INTERDISCIPLINARNO RAZISKOVALNO PODROČJE:

Kemija, kemijska tehnologija; biologija

Raziskovalna naloga

05q | K P Ò Ù Á P U Ü X C E / Á T Ò P Q

T ^ } q | K T U R Ô Ç Á S Ò Û Õ Ò V Ê Z Ö Ò P S C Á S Ò W Ô

¥ [| a K Ö Q P C Z C Á T C E Ü Ó U Ü

2014, Maribor

Mladi za napredek Maribora

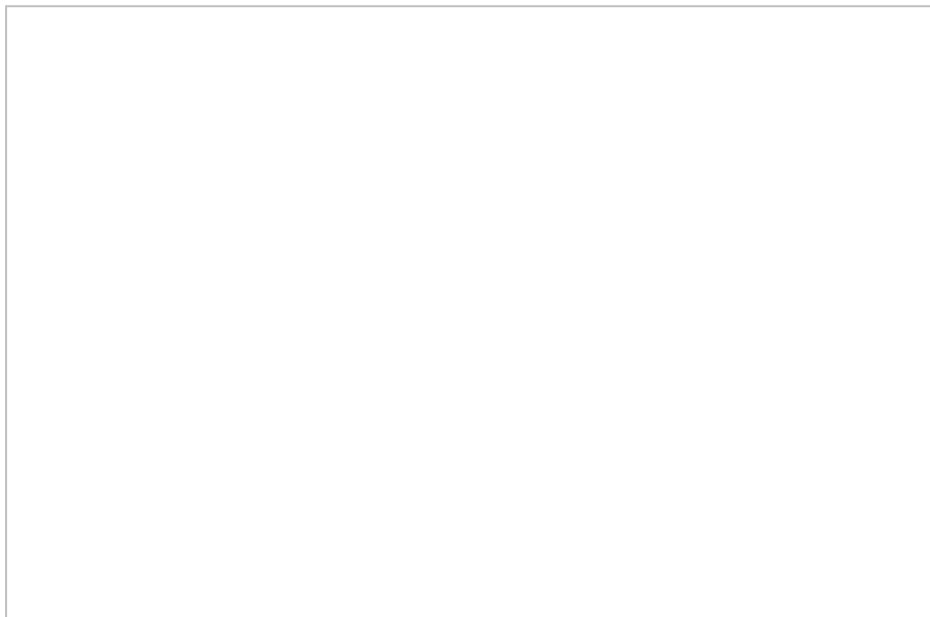
31. srečanje

**PRIMERJAVA ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA PREHRANSKIH
DOPOLNIL, ČAJEV IN SVEŽIH RASTLIN AMERIŠKEGA SLAMNIKA (*Echinacea
purpurea*) IN INGVERJA (*Zingiber officinalis*)**

INTERDISCIPLINARNO RAZISKOVALNO PODROČJE:

Kemija, kemijska tehnologija; biologija

Raziskovalna naloga



PROSTOR ZA NALEPKO

2014, Maribor

KAZALO

1	POVZETEK	6
2	ZAHVALA.....	7
3	UVOD	8
3.1	Raziskovalno vprašanje	9
3.2	Hipoteze.....	9
3.3	Spremenljivke.....	10
4	PREGLED LITERATURE	11
4.1	Kisikov paradoks, reaktivne kisikove spojine in celične poškodbe	11
4.2	Antioksidanti	12
4.2.1	Delitev antioksidantov.....	12
4.3	Testi antioksidativnosti.....	19
4.3.1	Določanje vsebnosti totalnih fenolov s Folin-Ciocalteujevim reagentom	21
4.3.2	Določanje antioksidativnega delovanja na radikale 1,1-difenil-2-dipikrilhidrazila 21	
5	EKSPERIMENTALNO DELO.....	23
5.1	Postopek konvencionalne ekstrakcije	23
5.1.1	Materiali	23
5.1.2	Potek ekstrakcije	24
5.1.3	Izračun izkoristka ekstrakcije v odstotkih	25
5.1.4	Izračun napak	25
5.2	Določanje vsebnosti totalnih fenolov s Folin-Ciocalteujevim reagentom.....	26
5.2.1	Materiali	26
5.2.2	Postopek	26
5.2.3	Izračun koncentracije GA v standardnih raztopinah za pripravo umeritvene krivulje 27	
5.2.4	Izračun vsebnosti totalnih fenolov v ekstraktih.....	27
5.3	Določanje antioksidativnega delovanja na radikale 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila	28
5.3.1	Materiali	28
5.3.2	Postopek	29
5.3.3	Izračun antioksidativnega delovanja ekstraktov	30
6	REZULTATI IN DISKUSIJA	31

6.1	Postopek konvencionalne ekstrakcije	31
6.2	Določanje vsebnosti totalnih fenolov s Folin-Ciocalteuevim reagentom.....	33
6.3	Določanje antioksidativnega delovanja na radikale 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila	38
7	ZAKLJUČKI.....	40
7.1	Ovrednotenje rezultatov in metod	41
7.2	Možne izboljšave v eksperimentu	42
8	VIRI.....	43
9	PRILOGE	47
9.1	Priloga I: <i>in vivo</i> študije, ki raziskujejo vlogo prehrane (sadje, zelenjava, prehranska dopolnila) na zdravje ljudi (Bouayed in Bohn (2010), stran 232).....	47
9.2	Priloga II: Odvisnost inhibicije prostih radikalov od vsebnosti totalnih fenolov.....	48

KAZALO SLIK

Slika 1:	Razgradnja hema (Mancuso in sodelavci, 2007)	14
Slika 2:	Formacija fenoksi radikala pri reakciji z ROS, resonance (BASF, 2013).....	16
Slika 3:	Koristni učinki optimalnih koncentracij in škodljivi učinki visokih doziranja antioksidantov na celične metabolizme (Bouayed in Bohn, 2010).....	18
Slika 4:	Struktura DPPH pred in po reakciji z antioksidantom (Nervi, 1996).....	22
Slika 5:	Rotacijski uparjalnik	24
Slika 6:	Aparatura za ekstrakcijo.....	25
Slika 7:	Merjenje absorbanc raztopin ekstraktov	27
Slika 8:	Priprava vzorcev z raztopinami ekstraktov	29

KAZALO TABEL

Tabela 1:	Primerjava med učinkovinami škrlatnega ameriškega slamnika (<i>Echinacea purpurea</i>) in ingverja (<i>Zingiber officinalis</i>)	15
Tabela 2:	Rezultati konvencionalne ekstrakcije.....	31
Tabela 3:	Umeritvena krivulja: koncentracije raztopin GA in njihove absorbance	33
Tabela 4:	Rezultati določanja vsebnosti totalnih fenolov	34
Tabela 5:	Rezultati inhibicije radikala DPPH	38

Tabela 6: *in vivo* študije, ki raziskujejo vlogo prehrane (sadje, zelenjava, prehranska dopolnila) na zdravje ljudi..... 47

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Umeritvena krivulja z galno kislino..... 33
Graf 2: Vsebnost totalnih fenolov izražena v mg GA na g ekstrakta..... 34
Graf 3: Vsebnost totalnih fenolov izražena kot mg GA na g materiala 35
Graf 4: Inhibicija DPPH radikalov posameznega ekstrakta, podana v odstotkih 38
Graf 5: Odvisnost inhibicije prostih radikalov od vsebnosti totalnih fenolov 48

KRATICE

BHA = butylated hydroxyanisole	GSHPx = glutathione peroxidase
BHT = butylated hydroxytoluene	GSSG = oxidized glutathione
BVR = biliverdin reductase	HAT = hydrogen atom transfer
DPPH = 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil	NADPH = nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
DPPH ₂ = diphenylpicrylhydrazine	ROS = reactive oxygen species
EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid	SOD = superoxide dismutase
ET = electron transfer	TPC = total phenols content
FCR = Folin-Ciocalteu reagent	
GSH = reduced glutathione	

1 POVZETEK

V raziskovalni nalogi smo preučevali antioksidativno delovanje šestih ekstraktov pridobljenih s konvencionalno ekstrakcijo različnih vzorcev rastlin, in jih med seboj primerjali. Ti so vključevali naslednje: prehranski dopolnili škrlatnega ameriškega slamnika (*Echinacea purpurea*) in ingverja (*Zingiber officinalis*), čaja obeh rastlin, kupljenega v trgovini, in sveže rastline. Zanimalo nas je, kateri ekstrakt bo imel največjo vsebnost totalnih fenolov, določenih *in vitro* z redoks reakcijo s Folin-Ciocalteu reagentom in največjo zmožnost inhibicije prostih radikalov 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila, in bi tako lahko najbolj učinkovito ščitil naše telo s svojim antioksidativnim delovanjem. Pri obeh testih antioksidativnega delovanja je takšne lastnosti kazal ekstrakt čaja ameriškega slamnika, in sicer z vsebnostjo totalnih fenolov izraženo kot miligram galne kisline na gram ekstrakta, 41,277 mg GA/g ekstrakta, kot tudi izraženo z miligram galne kisline na gram materiala, 10,480 mg GA/g materiala, pri testu antioksidativnega delovanja na radikale 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila, pa s 40,19% inhibicijo. S tem smo potrdili hipotezo, da bo eden od čajev kazal največje zmožnosti antioksidativnega delovanja in delno tudi hipotezo, v kateri smo predvideli bolj učinkovito delovanje ekstraktov ameriškega slamnika. Med testom določanja vsebnosti totalnih fenolov in testom inhibicije prostih radikalov smo s statistično analizo našli premo sorazmerno odvisnost. Prišli smo tudi do ugotovitve, da čeprav sta imela ekstrakta prehranskih dopolnil enega izmed višjih izkoristkov ekstrakcije (51,08% - ameriški slamnik in 18,46% - ingver), sta se izkazala kot precej skromna lovilca prostih radikalov 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila (6,99% inhibicije – ameriški slamnik in 21,29% inhibicije ingver). S tem smo potrdili naša pričakovanja o slabši učinkovitosti prehranskih dopolnil, kar smo pripisali dejstvu, da zgornja priporočena vrednost dnevnega vnosa antioksidantov še ni standardizirana in je zato boljše, da se v izoliranih ekstraktih, kot so kapsule, pojavlja manjša mera antioksidativnega delovanja, kot je v čajih ali svežih rastlinah. Druga možna razlaga je tudi, da kapsule vsebujejo razne dodatke, ki so v vodi topni, vendar nimajo sinergističnih učinkov.

2 ZAHVALA

V največji meri se zahvaljujem svoji mentorici, ki mi je omogočila laboratorijsko delo, me pri tem ustrezno usmerjala in mi pomagala z nabavo kemikalij in vzorcev, vendar v skladu s pravili razpisa Mladi za napredek Maribora, ostaja anonimna. Zahvaljujem se ji tudi za pomoč pri iskanju literature, potrpežljivo pregledovanje rezultatov raziskave in nasvete pri pisanju samega poročila.

Za pomoč pri izvedbi eksperimentov, nasvete in usmerjanje v laboratoriju sem zelo hvaležna mlademu raziskovalcu, ki prav tako ostaja anonimen.

Svoji šolski mentorici se zahvaljujem za skrbno pregledovanje ustreznosti in pravilnosti raziskovalne naloge kot celote.

3 UVOD

Ljudje se dandanes zavedajo velikega pomena zdravja, vendar jih zaradi pomanjkanja časa vedno več posega po prehranskih dopolnilih, ki obljublajo odpravo številnih zdravstvenih problemov. V zadnjem času so si svojo komercialno pot utrli predvsem naravni izvlečki iz rastlin, bogati z antioksidanti, kot sta tudi prehranski dopolnili z ekstrakti ameriškega slamnika in ingverja. Antioksidanti so kemijske spojine, ki tako v laboratorijskih poskusih, kot tudi v naravnih sistemih lovijo proste radikale. Slednji sicer lahko sprožajo verižne reakcije, ki privedejo do sprememb molekul in njihove posledične disfunkcije, vključno z lipidi, nukleinskimi kislinami, proteini in encimi v živih organizmih. Posledice reakcij prostih radikalov so lahko hitrejše staranje, pojav rakavih obolenj, bolezni srca in ožilja in poslabšanje delovanja možganov ter imunskega sistema.

Bruneton (1999) povzema, da farmakološka aktivnost pripravljenih proizvodov ameriškega slamnika (kaspule, tinkture in infuzije), testirana *in vivo* vključuje imunostimulatorne učinke, kot so preprečevanje in zdravljenje prehlada, vnetja grla in ostalih vnetij zgornjih dihal. Tsai in sodelavci (2012) pripisujejo takšna, zdravju koristna opazovanja, bioaktivnim snovem, pridobljenim iz rastlin, ki v so ameriškem slamniku naslednje: polisaharidi, alkilni amidi, fenolne spojine, med katere sodijo derivati kavne kisline, predvsem pa opozarjajo na pomembnost prisotnosti cikorne kisline, ki naj bi bila marker, ki določa medicinsko kvaliteto proizvodov iz ameriškega slamnika zaradi svoje sposobnosti lovljenja prostih radikalov.

Tudi ingverjev gomolj je znan po tem, da vsebuje zdravju koristne spojine. El-Ghorab in sodelavci (2010) so predlagali uporabo le-tega za ublažitev slabosti, artritisa, revmatoloških stanj, bolečin v mišicah, migren, zmanjšanje holesterola, in drugo. Bruneton (1999) pravi, da se kemijskim komponentam ingverja, tako imenovanim gingerolom in zingiberenom, pripisuje pozitivna učinkovitost v *in vivo* eksperimentih s podganami, medtem ko študije na ljudeh prikazujejo kontradiktorne rezultate in med seboj niso primerljive, saj ne navajajo standardiziranih ingverjevih produktov.

Nas je tako zanimala prav primerjava med posameznimi produkti obeh rastlin, in če so res prehranska dopolnila z naravnimi izvlečki toliko boljša, kot trdijo farmacevtske korporacije. Odločili smo se raziskati, ali je vredno porabiti nekaj minut, da se skuha čaj in se ga v miru popije, namesto da človek na hitro poje eno kapsulo kar na poti v službo. V ta namen smo preučili šest ekstraktov iz različnih vzorcev obeh rastlin. Ti vključujejo naslednje: prehransko dopolnilo, čaj in svežo rastlino ameriškega slamnika, ter enake vzorce ingverjevega gomolja.

3.1 Raziskovalno vprašanje

Kateri ekstrakt, pridobljen s konvencionalno ekstrakcijo, izmed vseh testiranih, bo imel največjo vsebnost totalnih fenolov, določenih *in vitro* z redoks reakcijo s Folin-Ciocalteu reagentom in kateri bo imel največjo zmožnost inhibicije prostih radikalov 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila, in bi tako potencialno najbolj učinkovito ščitil naše telo zaradi svojega antioksidativnega delovanja?

3.2 Hipoteze

Ničelna hipoteza: ekstrakti rastlin ne vsebujejo antioksidantov in ne sodelujejo v redoks reakcijo s Folin-Ciocalteujevim reagentom (FCR) ter nimajo zmožnosti inhibicije 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalov.

1. Hipoteza: Tsai in sodelavci (2012) poročajo o vsebnosti totalnih fenolov v cvetovih *Echinaceae purpuree* (škrlatnega ameriškega slamnika), ki so bili predhodno posušeni z liofilizacijo (zamrzovalnim sušenjem), ter o zmožnosti inhibicije DPPH prostih radikalov zaradi prisotnosti derivatov kavne kisline v ekstraktih. El-Ghorab in sodelavci (2010) poročajo o vsebnosti totalnih fenolov, določenih s FCR, v ekstraktih iz svežih in sušenih gomoljev *Zingiber officinalis* (ingverja) in njihove sposobnosti inhibicije DPPH radikalov. Na osnovi tega predpostavljamo, da antioksidanti v ekstraktih izbranih vzorcev rastlin lovijo reaktivne kemijske spojine in tako sodelujejo v redoks reakciji s FCR, kot tudi inhibiciji DPPH radikalov.
2. Hipoteza: Bruneton (1999) povzema, da kemijska sestava obeh rastlin sestoji iz mnogih fenolnih spojin, in hkrati Neuss (2007) opisuje fenolno skupino kot odstranjevalca prostih radikalov. Iz tega razloga sklepamo, da imajo fenolne skupine v ekstraktih rastlin antioksidativno kapaciteto, in predvidevamo premo sorazmerje med rezultati testa za vsebnost totalnih fenolov (TPC) in testa za inhibicijo DPPH radikalov.
3. Hipoteza: Postopek priprave čajev je podoben prvemu delu konvencionalne ekstrakcije, s katero se pridobijo ekstrakti (Škerget in sodelavci, 2012). Tako torej predpostavljamo, da bo eden od ekstraktov čajev pokazal največjo antioksidativno delovanje.
4. Hipoteza: Po analizi literarnih podatkov, ki podajajo kemijsko sestavo obeh rastlin, je bilo pri ameriškem slamniku ugotovljenih več antioksidativno delujočih spojin, kot pri

ingverju. Tako pričakujemo, da bodo ekstrakti ameriškega slamnika pokazali večjo antioksidativno aktivnost v testih.

3.3 Spremenljivke

Neodvisne:

Za konvencionalno ekstrakcijo, določanje vsebnosti totalnih fenolov in eksperiment na DPPH radikalih, je neodvisna spremenljivka določen vzorec rastline, ki je bil preučevan, in tudi naslednje:

- Konvencionalna ekstrakcija: topnost kemijskih sestavin vzorcev v deionizirani vodi (pri kontroliranih pogojih, opisanih spodaj),
- TPC: kvantitativna in kvalitativna vsebnost fenolnih spojin v ekstraktu,
- DPPH test: sposobnost ekstrakta, da lovi DPPH radikale.

Odvisne:

- Konvencionalna ekstrakcija: masa ekstrakta, oz. izkoristek ekstrakcije,
- TPC: absorbanca ekstrakta po reakciji s Folin-Ciocalteuevim reagentom, merjena spektrofotometrično,
- DPPH test: absorbanca ekstrakta po reakciji z DPPH radikali, merjena spektrofotometrično.

Kontrolne:

- Konvencionalna ekstrakcija: temperatura vodne kopeli (80°C), hitrost mešanja magnetnega mešala (300 vrtljajev na minuto), čas ekstrakcije (2 h), deionizirana voda uporabljena kot topilo, stalen tlak ekstrakcije, razmerje material/topilo (1/10 g mL⁻¹); v nekontroliranih razmerah imajo sicer tile faktorji lahko vpliv na učinkovitost ekstrakcije (Tsai in sodelavci, 2012).
- TPC: previdna priprava potrebnih raztopin, masa zatehtanih vzorcev, uporaba čiste laboratorijske opreme in aparatov, tako da obstaja zgolj minimalna verjetnost prisotnosti reagentov, ki bi lahko povzročili redoks reakcijo.
- DPPH test: previdna priprava potrebnih raztopin, masa zatehtanih vzorcev, uporaba čiste laboratorijske opreme in aparatov, enake majhne temne stekleničke za vsako raztopino ekstrakta, postavljene za 15 min v isti temni prostor s sobno temperaturo; s tem se izognemo tudi večjim slučajnim napakam.

4 PREGLED LITERATURE

4.1 Kisikov paradoks, reaktivne kisikove spojine in celične poškodbe

Tako imenovan »kisikov paradoks« nakazuje na to, da je kisik sicer nujno potreben za obstoj aerobnih organizmov, vendar sodeluje tudi pri reakcijah, ki povzročajo poškodbe samih organizmov. Te reakcije vključujejo kisik v obliki reaktivnih kisikovih spojin (ROS), in lahko povzročijo spremembo celičnih struktur, kot so lipidi, membrane, proteini, nukleinske kisline, kar privede do njihove nesposobnosti opravljanja prvotne funkcije (Davies, 1995). V zdravem organizmu se aktivirajo obrambni mehanizmi, ki vzdržujejo ROS na nivoju, potrebnem za procese, v katerih so nepogrešljivi, kot so celična komunikacija, izražanje genov in transport ionov, vendar v primeru slabega delovanja obrambnih mehanizmov ali njihove preobremenjenosti pride do porušenega ravnotežja med oksidanti in antioksidanti (»oksidativni stres«). To pa privede do hitrejšega staranja ali možnega nastanka hudih obolenj (rak, kardiovaskularne in nevrodegenerativne bolezni) (Bergamini in sodelavci, 2004). Za ohranjanje redoks homeostaze, je potrebno v telo vnesti tudi antioksidante v obliki hrane in v zadnjem času se opravlja veliko raziskav na temo antioksidantov pridobljenih iz rastlin (Davies, 1995).

Reaktivne kisikove spojine zaobjemajo reaktivne molekule in proste radikale, ki običajno nastanejo iz molekularnega kisika v elektronski prenašalni verigi pri celičnem dihanju ali pri reakcijah z ioni prehodnih kovin (Held, 2012). Po teoriji molekulskih orbital je kisik v svojem osnovnem stanju molekula z dvema nesparjenima elektronoma v razvezni orbitali; tako imenovan triplet kisik. V pogojih oksidativnega stresa je podvržen takšni redukciji, da eden od elektronov napreduje v vzbujeno stanje, kar povzroči nastanek singlet oblike kisika, superoksidnega radikala, $O_2^{\cdot-}$. Nadaljnje ROS, ki se akumulirajo kot rezultat delovanja $O_2^{\cdot-}$, vključujejo vodikov peroksid (H_2O_2), hidroperoksidni radikal (HO_2^{\cdot}), hidroksilni radikal (HO^{\cdot}), in druge. Pogosto se zanje uporablja tudi izraz »kisikovi prosti radikali«, saj večina teh (vendar ne H_2O_2) vsebuje en nesparjen elektron v svoji zunanji lupini. Takšen pojav dela atome in molekule močno reaktivne zaradi njihove nagnjenosti k oddajanju ali sprejemanju elektronov (Yoshida in sodelavci, 2004). Radikali se v našem telesu proizvajajo tudi zaradi zunanjih vplivov, po navadi zaradi slabe prehrane, alkohola, onesnaženega zraka, kajenja ali nevarnega dela sončnega sevanja (Mandal, 2013). V tem primeru postanejo antioksidanti, ki jih proizvaja naše telo kot obrambni mehanizem proti odvečni količini ROS, preobremenjeni, in čezmerni prosti radikali iniciirajo verižne reakcije s kemijskimi komponentami celic.

Membrane so v veliki meri sestavljene iz fosfolipidov in lipidna peroksidacija je verižna reakcija, v kateri pride do razgradnje lipidov. Tarčne spojine so polinenasičene maščobne kisline zaradi njihovih dvojnih vezi. Hipotetični mehanizem, ki obsega stopnje radikalne substitucije (iniciacijo, propagacijo in terminacijo), predstavljajo enačbe 1-5 (Repetto in sodelavci, 2012).



Iniciacija se sproži, ko kisikov radikal ($R\bullet$) pritegne vodikov atom od maščobne kisline (R_1H), pri tem pa nastane radikal maščobne kisline ($R_1\bullet$) (enačba 1). Iniciacija se lahko sproži tudi kot s kovinskim ionom (železovim) katalizirana homolitična cepitev vezi med vodikom ob dvojni vezi in preostalo verigo maščobne kisline (Gutteridge, 1995). Novo nastali radikal nato reagira z atmosferskim kisikom, kar privede do nastanka lipidnega peroksil radikala ($R_1OO\bullet$) (enačba 2). Reakcija se nadaljuje na podoben način – kisikovi radikali, maščobno kislini radikali ali lipidni peroksil radikali reagirajo z lipidnimi molekulami in pri tem proizvajajo vedno več prostih radikalov, kot tudi hiperoksidnih molekul ($ROOH$) (enačba 3). Hiperoksidne molekule so relativno nestabilne in se zato razgradijo na še dodatne proste radikale (enačba 4). Do terminacije pride le redko tako, da trčita dva radikala, kot je predstavljeno v enačbi 5; pogosteje se ta zgodi ob posredovanju antioksidantov (Repetto in sodelavci, 2012).

4.2 Antioksidanti

Po Gutteridgu (1995), je antioksidant snov, ki, ko je prisotna v nizkih koncentracijah v primerjavi s substratom, ki je zmožen oksidacije (npr. lipidi, DNA, proteini), znatno zavira oziroma zakasni oksidacijo substrata (npr. reakcijo z ROS).

4.2.1 Delitev antioksidantov

Antioksidante lahko kategoriziramo z upoštevanjem različnih kriterijev delitev. V tej raziskovalni nalogi upoštevamo dva, in sicer: izvor antioksidantov, ki se pojavijo v našem telesu, kjer se delijo na endogene in eksogene (Percival, 1998), in klasifikacija antioksidantov

z upoštevanjem reakcijskega mehanizma, v katerega so vpleteni. Glede na slednji kriterij, ločimo 3 tipe: kelatorji kovinskih ionov, prekinjevalci verižnih reakcij in donatorji elektronov (Neuss, 2007).

4.2.1.1 Endogeni antioksidanti

Endogeni antioksidanti se sintetizirajo znotraj naših celic; so prirojeni in temeljni obrambni mehanizem proti odvečni koncentraciji ROS v našem telesu (Rizzo in sodelavci, 2010). Nekaj glavnih je opisanih v nadaljevanju.

4.2.1.1.1 Superoksidna dismutaza

Superoksidna dismutaza (SOD) je učinkovit znotrajcelični encimski antioksidant, ki pospeši razpad superoksida v neradikalni vodikov peroksid in kisik z dosti večjo hitrostjo, kot poteka nekatalizirana reakcija (Flora, 2009).



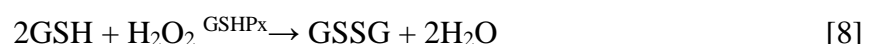
4.2.1.1.2 Katalaza

Produkt razpada superoksida je vodikov peroksid, ki se odstrani z nadaljnjima encimskima antioksidantoma, katalazo in glutationom. Katalazo je možno zaslediti v celičnem organelu, imenovanem peroksisom, in ko se koncentracija H_2O_2 dvigne nad optimum, ga katalaza pretvori v vodo in kisik.



4.2.1.1.3 Glutation

Glutation (GSH) je vodotopni tripeptid in je, v svoji reducirani obliki, večinoma prisoten znotraj celic (Rizzo in sodelavci, 2010). Odgovoren je za antioksidativno obrambo rdečih krvnih celic, in sicer na tak način, da s prisotnostjo glutation peroksidaze (GSHPx – glutationski encim, ki vsebuje selen) reducira oksidante (npr. H_2O_2) (enačba 8) (Gutteridge, 1995). V tem procesu pride do nastanka oksidirane oblike glutationa (GSSG), ki se lahko pretvori nazaj v GSH s pomočjo GSH reduktaze in nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) (Rizzo, 2012).



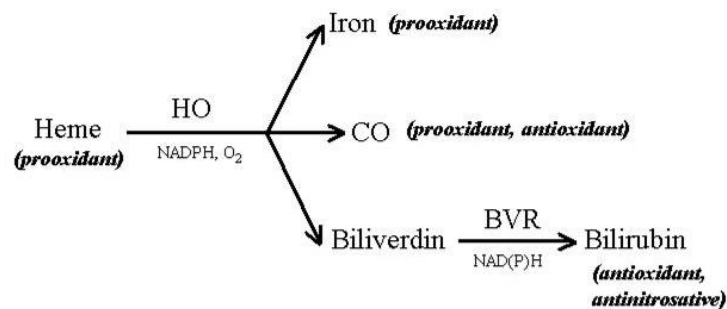
4.2.1.1.4 Alfa-lipoična kislina

Alfa-lipoična kislina je žveplo-vsebujoča molekula s sposobnostjo keliranja kovinskih ionov (Flora, 2009). Skupaj s svojo reducirano obliko, dihidrolipoično kislino, lovita in

onemogočata delovanje prostih radikalov, tako v lipidnem kot tudi v vodnem mediju (Percival, 1998).

4.2.1.1.5 Bilirubin

Ko se kemijska spojina hem, bolj znan kot del molekule hemoglobina, razgradi, pride do nastanka biliverdina, nato pa s pomočjo biliverdin reduktaze (BVR), do končnega produkta bilirubina (Slika 1). Bilirubin je rumeni pigment žolča, katerega sposobnost lovljenja prostih radikalov v eksperimentih *in vitro* je bila pripisana predvsem učinkovitemu redoks pretvarjanju med bilirubinom in biliverdinom (Rizzo, 2010).



Slika 1: Razgradnja hema (Mancuso in sodelavci, 2007)

4.2.1.2 Eksogeni antioksidanti

Za ohranjanje redoks homeostaze pa so poleg endogenih antioksidantov nepogrešljivi tudi ti, ki jih zaužijemo s hrano in vsrkamo s prebavo, zato jih imenujemo tudi »prehranski antioksidanti« (ang.: »dietary antioxidants«). Med te spadajo vitamin C (askorbinska kislina), vitamin E (α -tokoferol), karotenoidi (likopen, β -karoten, lutein), elementi v sledovih (cink, selen), in polifenoli (flavonoidi, flavoni, fenolne kisline) (Percival, 1998).

4.2.1.2.1 Aktivne spojine ameriškega slamnika (*Echinacea purpurea*) in ingverja (*Zingiber officinalis*)

Med zgoraj naštetimi eksogenimi antioksidanti, so bile v ameriškem slamniku odkrite fenolne spojine, kot so cikorna kislina, kavna kislina in njeni derivati, medtem ko je ingverjev gomolj bogat s farmakološko aktivnimi spojinami, ki so zelo specifične; to so terpeni in gingeroli s svojimi derivati.

Primerjava med učinkovinami obeh rastlin je prikazana v Tabeli 1, njihove lastnosti pa so pojasnjene v nadaljevanju.

Proučeni so bili naslednji viri:

- *Echinacea purpurea*: (Bone, 1997), (Bruneton, 1999)
- *Zingiber officinalis*: (Bruneton, 1999), (Pandya, 2012), (Shumake, 2012)

Tabela 1: Primerjava med učinkovinami škrlatnega ameriškega slamnika (*Echinacea purpurea*) in ingverja (*Zingiber officinalis*)

	<i>Echinacea Purpurea</i>	<i>Zingiber officinalis</i>
Farmakološko aktivne kemijske spojine	<ul style="list-style-type: none"> - Fenolne spojine, derivati kavne kisline: kavna kislina, cikorna kislina, klorogenska kislina, dikafeoilkvinska kislina, monokafeoil in feruol tartarne kisline - Nenasičene alifatske spojine: alifatski amidi, isobutilamidi polieninskih kislin (npr. isobutilamid undeka-(2E,4Z)-dien-8,10-diinoat) in polienskih kislin (npr. isobutilamin dodeka-(2E,4E,8Z,10E)-tetraenoat) - Polisaharidi: fukogalaktoksi-glukani, arabinogalaktani, glukuronoarabinosilan (prisoten v koreninah) 	<ul style="list-style-type: none"> - Komponente esencialnega olja: (-)-zingiberen, (+)-ar-kurkumen, (-)-β-seskvifelandren, <i>E,E</i>-β-farnezen, β-bisabolen (pojavljajo se ob monoterpenskih aldehydih and glikozidih) - Spojine, ki povzročajo oster vonj: 1-(3'-methoksi-4'-hidroksifenil)-5-hidroksialkan-3-oni, oz. bolj znani kot [3-6]-, [8]-, [10]-, in [12]-gingeroli (dehidrirani produkti: šogaoli) - Diterpeni labdanskega tipa - ciklični diarilheptanoidi (izolirani so bili iz kitajskega ingverja) - nedavne študije (Pandya, 2012 in Shumake, 2012) opisujejo tudi prisotnost askorbinske kisline, beta-karotena, kapsaicina, limonena (ki se najverjetneje pojavljajo glede na geografsko poreklo)

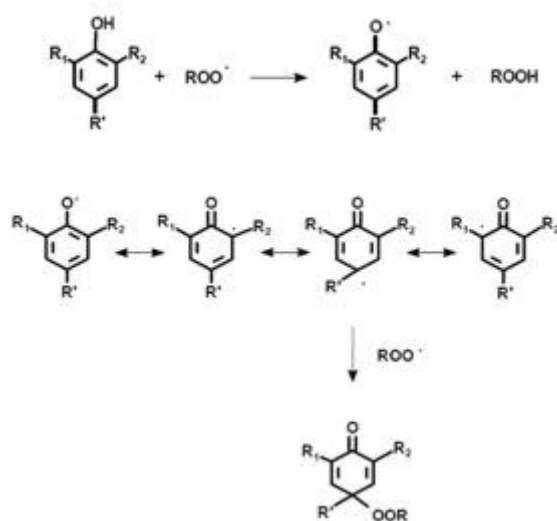
4.2.1.2.1.1 Fenoli in terpeni

Fenoli zaobjemajo široko skupino kemijskih spojin, katerih glavna značilnost je (vsaj en) aromatski obroč, na katerega je direktno vezana hidroksilna skupina, in lahko obstoji sam ali pa je vezan še na kakšno funkcionalno skupino (npr. eter, ester ali glikozid). Edini živi organizmi, ki so sposobni biološko sintetizirati aromatske obroče¹, so rastline in

¹ Nekaj je izjem, kot recimo sinteza estrogena.

mikroorganizmi. Živali, ki morajo zadovoljevati svojo potrebo po teh specifičnih kemijskih spojinah, so torej od njih odvisne in pridobijo te spojine s prehrano ali s simbiozo (Bruneton, 1999).

Antioksidativne lastnosti fenolov izvirajo iz energijsko nezahtevne oksidacije fenolatnega aniona, ki se pretvori v fenoksi radikal (Slika 2), ta pa je izjemno reaktiven, pa tudi stabiliziran z resonanco. Iz tega razloga imajo fenoli kislinske lastnosti, so topni v bazičnih raztopinah (karbonatnih) in v polarnih organskih topilih (Bruneton, 1999).



Slika 2: Formacija fenoksi radikala pri reakciji z ROS, resonance (BASEF, 2013)

Glede na dve aromatski sintezni poti (šikimska in acetatna) ločimo različne vrste rastlinskih fenolnih spojin. Te predstavljajo v rastlinah sekundarne metabolite, kar pomeni »dodatne«, takšne, ki služijo za obrambno funkcijo. Fenolne kisline, prisotne v ameriškem slamniku, in gingeroli v ingverju, spadajo pod šikimsko sintezno pot, s to razliko, da so fenolne kisline klasificirane kot derivati 1-fenilpropana, medtem ko gingeroli spadajo pod arilalkanone, ki so derivati podaljšane verige 1-fenilpropana (Bruneton, 1999).

4.2.1.2.1.1 Fenolne kisline

Fenolne kisline so organske spojine, ki vsebujejo vsaj en fenolni obroč in vsaj eno karboksilno skupino. Po Brunetonu (1999) je ta izraz rezerviran zgolj za fenolne kisline, ki so pridobljene iz benzojske (C₆-C₁) in cimetne (C₆-C₃) kisline. Nas zanimajo predvsem derivati cimetne kisline, med katere se uvršča estre alifatnih alkoholov (feruloiltartarna kislina), estre kina kisline (klorogenska kislina) in kavno kislino ter njene derivate.

4.2.1.2.1.1.2 Arilalkanoni: gingeroli in njihovi derivati

Podaljšanje fenilpropana z adicijo dveh enot ogljika je pogost pojav pri rastlinah, kar privede med drugim tudi do nastanka flavonoidov, C₁₅ kemijskih spojin, v katerih sta dva benzenova obroča povezana z verigo iz treh ogljikov. Proces podaljšanja je lahko tudi sintezna pot arilalkanonov, vendar ni nujni pogoj. Med arilalkanone se uvršča spojine, ki sestojijo iz ene ali dveh molekul fenilpropanojske kisline, največkrat je to ferulna kislina. 1-(3'-metoksi-4'-hidroksifenil)-5-hidroksialkan-3-oni so znani kot [3-6]-, [8]-, [10]-, in [12]-gingeroli, in ti imajo stransko verigo z 7-10, 12, 14 or 16 ogljikovimi atomi, po vrsti si sledeč. Ti povzročajo oster vonj in okus ingverja, ki pa je bistveno bolj izrazit, ko je rastlina sušena, in sicer zaradi formacije šogaolov, dehidriranih produktov gingerolov (Bruneton, 1999).

4.2.1.2.1.1.3 Terpeni

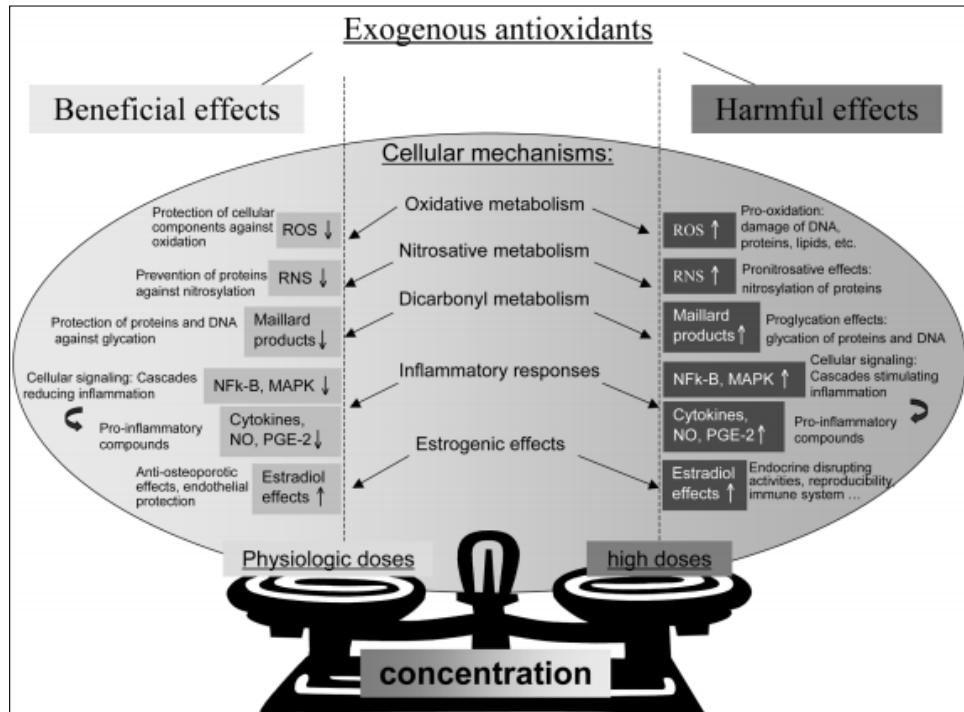
Čeprav mnogi terpeni vsebujejo fenolno funkcionalno skupino, je aromatizacija šele sekundarni proces, zato v osnovi niso obravnavani kot fenoli (Bruneton, 1999). Okarakterizira jih funkcionalna skupina izopren, oziroma v skladu z IUPAC nomenklaturjo, 2-metil-1,2-butadien (C₅H₈). Mnogo teh enot se lahko povezuje »glava-rep« in s tem tvorijo linearne verige ali obročje. Tako se lahko oblikujejo monoterpeni (dve enoti izoprena), seskviterpeni, (tri enote izoprena), diterpeni (štiri enote izoprena), sesterterpeni (pet enot izoprena), triterpeni (šest enot izoprena), seskvarterpeni (sedem enot izoprena), tetraterpeni (osem enot izoprena: likopen in β-karoten) in politerpeni (več enot izoprena) (Wikipedia, 2014). Seskviterpenske ogljikovodike so najbolj zastopane komponente ingverjevega esencialnega olja ((-)-zingiberen, (+)-ar-kurkumen, (-)-β-seskvuifelandren, *E,E*-β-farnezen, β-bisabolen),

4.2.1.2.1.2 Lipidom sorodne spojine: Alkinski derivati – polialkini

Polialkini so biosintezno sorodni maščobnim kislinam, saj se sintetizirajo iz linolenske kisline, ki preko serij desaturacij privede do C₁₈ dolge verige s tremi trojnimi vezmi. Prav vsebovanje multiplih trojnih vezi je zanje značilno, lahko pa so linearni ali se pojavljajo v obročih. Mednje spada npr. Isobutilamin undeka-(2*E*,4*Z*)-dien-8,10-diinoat, ki je prisoten v škrlatnem ameriškem slamniku.

Vseeno pa je potrebno biti z dozami eksogenih antioksidantov previden, saj imajo visoke koncentracije izoliranih spojin ravno nasproten učinek od pričakovanega – poleg tega, da zreagirajo z nujnimi količinami ROS, ki so potrebni za delovanje celic, se začnejo obnašati kot prooksidanti. Takšne ugotovitve so bile podprte s strani številnih študij, *in vitro* kot tudi *in*

vivo (Priloga I). Primerjava med koristnimi in škodljivimi učinki antioksidantov v odvisnosti od njihove koncentracije je prikazana na Sliki 3 (Bouayed in Bohn, 2010).



Slika 3: Koristni učinki optimalnih koncentracij in škodljivi učinki visokih doziranj antioksidantov na celične metabolizme (Bouayed in Bohn, 2010)

V pregledni študiji Bouayed in Bohna (2010), je omenjeno, da je zdravilni učinek rastlinske hrane najverjetneje rezultat sinergističnega delovanja koristnih kemijskih spojin (fenolnih kislin, flavonoidov, karotenoidov), hranil in vlaknin, ki jih rastlina vsebuje, kot pa zgolj rezultat delovanja ene sama molekule antioksidanta. Takšna opažanja so bila podprta s študijami, v katerih izolirani vitamini v obliki prehranskih dopolnil niso pokazali nobenega koristnega učinka, medtem ko so sintetični antioksidanti izzvali vprašljiv, celo toksičen učinek ob kronični izpostavitvi. V diskusiji znova poudarjajo pomen koncentracije antioksidantov, v kakršnikoli obliki so že zaužiti. Sadje je torej »bogato« z antioksidanti, če so ti v zaznavnih koncentracijah, vendar preveč koncentriran pripravek ni več zdrav, na žalost pa ni postavljenih zgornjih meja količin vnosa za prehranske antioksidante, da bi se lahko pravilno ravnali po teh priporočilih (Bouayed in Bohn, 2010).

4.2.1.3 Mehanizem keliranja kovinskih ionov

Kelatorji kovin delujejo tako, da tvorijo komplekse (kelirajo) s kovinskimi ioni v raztopini, da le-ti niso več sposobni katalizirati oksidacij oziroma iniciirati radikalske verižne reakcije. Takšni antioksidanti se torej obnašajo kot ligandi in najučinkovitejši imajo več kot šest neveznih elektronskih parov, s katerimi lahko tvorijo veliko koordinatnih vezi s kovinskimi ioni. Primeri teh vključujejo EDTA, BHT in BHA (Neuss, 2007).

4.2.1.4 Mehanizem prenosa vodikovega atoma

Prekinjevalci verižnih reakcij delujejo tako, da zmotijo iniciacijo ali propagacijo radikalske verižne reakcije z lovljenjem radikalov (enačba 9). Nastali antioksidativni radikal je relativno stabilen zato ne proizvaja nadaljnjih prostih radikalov, temveč raje reagira s kakšnim drugim že obstoječim prostim radikalom, s katerim tvori obstojno spojino (enačba 10). Značilnosti takšnih antioksidantov so posedovanje fenolne ali terciarne butilne skupine in stabilnost, ki je posledica resonance, sposobnost tvorbe vodikovih vezi in konjugirane strukture. Mehanizem se imenuje prenos vodikovega atoma (HAT – hydrogen atom transfer) in primeri antioksidantov, ki delujejo po tem mehanizmu so flavonoidi in vitamin E (Huang in sodelavci, 2005).



4.2.1.5 Mehanizem prenosa elektrona

Tretji mehanizem, ki se imenuje prenos elektrona (ET – electron transfer), deluje tako, da elektronski donor odda elektron oksidantu ali radikal (M•), sam pa postane kationski radikal (AH•⁺) (enačba 11). Takšen mehanizem je podprt, ko antioksidanti potrebujejo le nizko energijo za oddajanje elektronov in ko je nastali oksidiran antioksidant stabilen. Mednje spadajo karotenoidi in askorbinska kislina (Huang in sodelavci, 2005).



4.3 Testi antioksidativnosti

Na osnovi delitve antioksidantov glede na to, po katerem mehanizmu se ravna, razločimo tudi med različnimi načini eksperimentalnih pristopov k določanju antioksidativne aktivnosti. Pri razdelitvi na *in vivo* (poskusi na živih organizmih, živalih) in *in vitro* (poskusi v »epruvetah«), se bomo osredotočili na *in vitro* teste za določanje antioksidativne kapacitete.

Huang in sodelavci (2005) so kategorizirali *in vitro* teste na sledeč način:

Testi na podlagi prenosa vodikovega atoma, ki merijo zmožnost antioksidanta, da odda vodikov atom²:

- Oxygen radical absorbance capacity
- Total radical trapping antioxidant parameter
- Crocin bleaching assay
- Inhibicija oksidacije lipoproteina nizke gostote (Inhibition of low-density lipoprotein oxidation)
- Inhibited oxygen uptake
- Inhibicija oksidacije linolenske kisline (Inhibition of linoleic acid oxidation)

Testi, ki temeljijo na reakcijah prenosa elektrona in merijo stopnjo spremembe barve zaradi reduciranega oksidanta:

- Trolox equivalent antioxidant capacity
- Ferric ion reducing antioxidant parameter
- Copper (II) reduction capacity
- Vsebnost totalnih fenolov s Folin-Ciocalteuevim reagentom (Total phenols content assay by Folin-Ciocalteu reagent)
- Določanje antioksidativnega delovanja na radikale 1,1-difenil-2-dipikrilhidrazila (DPPH scavenging capacity)

In ostali *in vitro* testi za določanje antioksidativne kapacitete:

- Total oxidant scavenging capacity
- Inhibicija Briggs-Rauscherjeve oscilirajoče reakcije (Inhibition of Briggs-Rauscher oscillation reaction)
- Kemiluminiscenca
- Elektrokemiluminescenca

Kot smo že lahko ugotovili, vsebujeta ameriški slamniki in ingver fenolne spojine, zato je smiselno izvesti test za vsebnost totalnih fenolov. To je tudi cenovno dostopen analizni postopek, ki je že precej standardiziran in se, z modifikacijami, rutinsko uporablja v

² Zaradi pomanjkanja besednjaka v slovenščini na to tematiko so nekatera imena za teste puščena v izvorni obliki.

laboratorijih (Huang in sodelavci, 2005). DPPH test, prav tako splošno uporabljan, služi kot dodatna potrditev antioksidativnega delovanja ekstraktov.

4.3.1 Določanje vsebnosti totalnih fenolov s Folin-Ciocalteujevim reagentom

Folin-Ciocaltejev reagent (FCR) se je spočetka uporabljal kot indikator proteina tirozina (vsebuje fenolno skupino), in šele leta kasneje sta ga Singleton in Rossi (1965) uporabila za analizo totalnih fenolov v vinu. Od takrat dalje se uporablja pri proučevanju fenolnih spojin, sam test pa je temu tudi primerno poimenovan – test za vsebnost totalnih fenolov (TPC – total phenols content) (Huang in sodelavci, 2005).

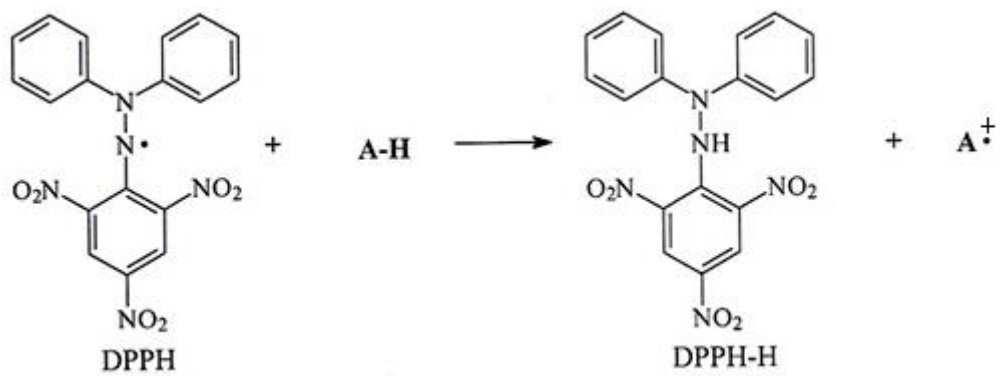
V FCR se nahajajo kisline, kot so $H_3PW_{12}O_{40}$ in $H_3PMo_{12}O_{40}$, ki reagirajo s fenolnimi spojinami v bazičnem okolju, kar se uravnava s prisotnostjo raztopine natrijevega karbonata (Na_2CO_3 (aq)). Bazične razmere so namreč nujne za disociacijo fenolnega protona, kar vodi v nastanek fenolatnega iona. Ta nato lahko reducira FCR in tako nastanejo kemijske spojine modre barve (najverjetneje $(PMoW_{11}O_{40})^{-4}$). Predvideva se, da se znotraj tega kompleksa najlažje reducira molibden (Mo(VI)) in da naj bi tako potekel prenos elektrona prav med Mo(VI) in reducenti (fenolatnimi ioni), s čimer se potrjuje mehanizem prenosa elektrona (enačba 12) (Huang in sodelavci, 2005).



TPC se nato določi s spektrofotometričnim merjenjem absorbance nastalega modrega kompleksa pri valovni dolžini 760 nm. Pridobljeni podatki za vzorec se nato primerjajo z umeritveno krivuljo, ki je največkrat narejena z galno kislino.

4.3.2 Določanje antioksidativnega delovanja na radikale 1,1-difenil-2-dipikrilhidrazila

DPPH je eden izmed stabilnejših in komercialno najdostopnejših organskih dušikovih radikalov. Barva metanolne raztopine DPPH je vijolična in ima absorpcijski maksimum pri 515 nm. Ko antioksidanti reagirajo z DPPH radikali (po mehanizmu prenosa elektrona), nastaja produkt difenildipikrilhidrazin, $DPPH_2$. To lahko opazimo kot spremembo barve raztopine, ki variira od vijolične do svetlo rumene, odvisno od tega, koliko DPPH je zreagiralo. Absorbanca se meri spektrofotometrično pri 515 nm (Škerget, 2012 in Huang in sodelavci, 2005).



Slika 4: Struktura DPPH pred in po reakciji z antioksidantom (Nervi, 1996)

5 EKSPERIMENTALNO DELO

Preden smo se lotili analize antioksidativnega delovanja vzorcev obeh rastlin, smo morali pridobiti ekstrakte le teh. To je bilo storjeno s konvencionalno ekstrakcijo, ki je postopek ločevanja spojin iz tekočin ali trdnih zmesi in temelji na različni topnosti komponent zmesi v topilu. Postopek je sledil metodi, opisani v literaturi (Škerget in sodelavci, 2012), s to razliko, da je bilo kot topilo uporabljena voda, saj je ta glavno topilo v človeškem telesu (Lehninger, 1979).

Ekstrakti so bili shranjeni v zamrzovalniku in kasneje analizirani na vsebnost totalnih fenolov (TPC) ter antioksidativno aktivnost z DPPH testom. Metoda TPC je bila povzeta po literaturi (Škerget in sodelavci, 2012) in je temeljila na modifikaciji metode Singletona in Rossija (1956). Test DPPH je sledil postopku, opisanem v literaturi (Škerget in sodelavci (2012), ki je povzetek metode Miliauskas (2004)).

5.1 Postopek konvencionalne ekstrakcije

5.1.1 Materiali

Ekstrakte smo pripravili iz sledečih vzorcev:

- *Echinacea purpurea* prehransko dopolnilo – kapsule (proizvajalec: Evropska Unija za NutriLAB)
- Prehransko dopolnilo (kapsule) iz ingverjevega gomolja (proizvajalec: BIOVITA, Belgija)
- Čaji *Echinaceae purpurea herba* in *Zingiberis radix* (proizvajalec: Flora d.o.o., Rogatec, Slovenija) *Echinacea* je bila gojena v Evropski Uniji, ingver na Kitajskem.
- *Echinacea purpurea* sveža rastlina, gojena v Sloveniji
- Svež ingverjev gomolj, gojen na Kitajskem

Reagenti:

- Mili-Q ultra čista voda

Laboratorijska oprema:

- merilne bučke: 10 mL, 100 mL
- bučke z okroglim dnom 250 mL, 500 mL
- Mettler Toledo analitska tehtnica 1 ($\pm 0,00001$ g) in analitska tehtnica 2 ($\pm 0,0001$ g)

- Merilni valj 100 mL ($\pm 0,5$ mL)
- Ultrazvočna kopel
- Centrifuga
- Aparatura za ekstrakcijo: magnetno mešalo z grelcem (300 vrtljajev na minuto), magnetni mešalček, vodna kopel (80°C), povratni hladilnik
- Priprava za vakuumsko filtracijo: filter papir, porcelanast Buchnerjev lij, Buchnerjeva bučka, vakuumsko črpalka
- Rotacijski vakuumski uparjalnik
- eksikator
- žlička, spatula

5.1.2 Potek ekstrakcije

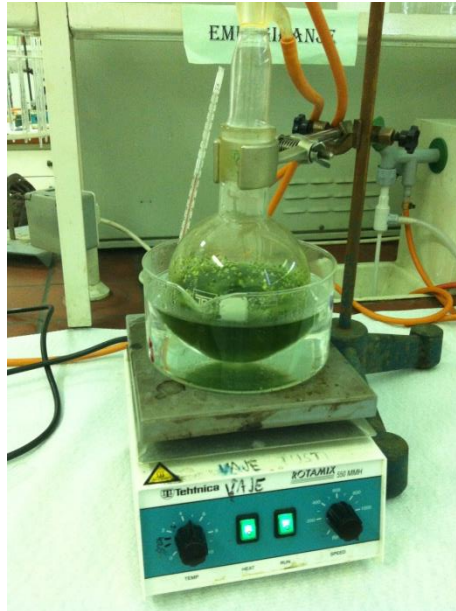
Prehranski dopolnili sta bili ekstrahirani po sledečem postopku: masa treh kapsul vsakega prehranskega dopolnila je bila zatehtana v 100 mL merilno bučko na analitski tehtnici. Do meniska smo nato dodali Mili-Q vodo, pomešali, dali v ultrazvočno kopel pri sobni temperaturi za 5 min, nato pa še v centrifugo, da se je neraztopljen material sesedel. Zatem smo raztopino prefiltrirali, in jo iz Buchnerjeve bučke prelili v bučko z okroglim dnom, katere maso smo že prej izmerili, to pa namestili na rotacijski uparjalnik (Slika 5). Ko se je topilo uparilo, smo bučko s suhim ekstraktom postavili še v eksikator, da je odhlapela še preostala vlaga, nato pa ponovno izmerili maso, s katero smo lahko določili izkoristek ekstrakcije. Suhi ekstrakt smo pobrali iz bučke in ga shranili za nadaljnje analize.



Slika 5: Rotacijski uparjalnik

Ekstrakte čajev in rastlin smo pripravili na podoben način. 5 g vsakega čaja smo zatehtali v bučko z okroglim dnom in dolili 200 mL vode. Svežo rastlino ameriškega slamnika smo odrezali pri koreninah in zmleli, enako smo napravili tudi s svežim ingverjevim gomoljem. Mase obeh smo zatehtali v bučke z okroglim dnom in dolili vodo v razmerju $1/10 \text{ g mL}^{-1}$ (material/topilo). Zmesi smo nato postavili na magnetno mešalo z grelcem, namestili povratni

hladilnik in tako pripravljene pustili 2 uri pri konstantni temperaturi 80°C (Slika 6). Zatem smo zmesi prefiltrirali, topilo iz raztopin uparili, stehtali in določili izkoristek ekstrakcije vsakega vzorca materiala.



Slika 6: Aparatura za ekstrakcijo

5.1.3 Izračun izkoristka ekstrakcije v odstotkih

$$\eta_{ekstrakcije} = \frac{m_{ekstrakt}}{m_{material}} * 100 \quad [13]$$

Kjer je:

$\eta_{ekstrakcija}$ – izkoristek ekstrakcije (%)

$m_{material}$ - masa zatehtanega materiala (g)

$m_{ekstrakt}$ – masa ekstrakta (g), izračunana kot razlika mas bučke z ekstraktom ($m_{bučka+ekstrakt}$) in prazne bučke z okroglim dnom pred ekstrakcijo ($m_{bučka}$):

$$m_{ekstrakt} = m_{bučka+ekstrakt} - m_{bučka} \quad [14]$$

5.1.4 Izračun napak

$$\Delta_{analitska\ tehnica\ 1} = \frac{napaka\ analitske\ tehnice\ 1}{m_{material}} * 100 (\%) \quad [15]$$

$$\Delta_{analitska\ tehnica\ 2} = \frac{napaka\ analitske\ tehnice\ 2}{m_{ekstrakt}} * 100 (\%) \quad [16]$$

5.2 Določanje vsebnosti totalnih fenolov s Folin-Ciocalteujevim reagentom

5.2.1 Materiali

Kemikalije:

- Folin-Ciocalteujev reagent (FCR)
- natrijev (V) karbonat (Na_2CO_3)
- galna kislina (GA) (98% čistost)

Laboratorijska oprema:

- merilne bučke: 10 mL ($\pm 0,01$ mL)
- stekleničke: 10 mL
- avtomatska pipeta ($5\text{ mL} \pm 0.001\text{ mL}$) in mikropipeta ($100\mu\text{L} \pm 0,8\mu\text{L}$)
- Spatula
- Mettler Toledo analitska tehnica ($\pm 0,00001\text{ g}$)
- UV-Vis spektrofotometer (Varian Spectrophotometer Cary 50 3.00)
- Vodna kopel 50°C

Reagenti:

- FCR raztopina: FCR razredčen z Mili-Q vodo v razmerju 1:10 (4 mL FCR + 36 mL MiliQ = $40\text{ mL} \pm 0,156\text{ mL}$)
- Na_2CO_3 raztopina koncentracije 75 g L^{-1} : 7,5 g Na_2CO_3 zatehtanega v 100 mL merilni bučki, dolita Mili-Q voda do oznake ($100\text{ mL} \pm 0,1013\text{ mL}$)
- osnovna GA raztopina koncentracije $0,392\text{ mg mL}^{-1}$: 11,48 mg $\pm 0,01\text{ mg}$ 98% GA razredčena z $28,7\text{ mL} \pm 0,08\text{ mL}$ Mili-Q vodo

5.2.2 Postopek

5.2.2.1 Umeritvena krivulja z galno kislino

V pet 10 mL merilnih bučk smo odpipetirali sledeče volumne osnovne GA raztopine: 0 mL, 0,25 mL, 0,5 mL, 1,0 mL in 1,5 mL; te smo razredčili z Mili-Q vodo do meniska in dobro premešali. V stekleničke smo s pomočjo mikropipete pripravili reagente: 0,5 mL GA raztopine, 2,5 mL FCR raztopine in 2 mL raztopine Na_2CO_3 . Te smo pretresli in jih dali v

vodno kopel pri 50°C za 5 min. Raztopine smo ohladili in izmerili absorbanco vsake pri 760 nm šestkrat. Ko smo izračunali povprečno vrednost za vsako absorbanco, smo narisali graf absorbance (Abs) v odvisnosti od koncentracije GA v merilnih bučkah (γ_{GAC}).

5.2.2.2 Določanje vsebnosti totalnih fenolov v ekstraktih

V šest 10 mL merilnih bučk smo zatehtali 10 mg vsakega ekstrakta in dolili Mili-Q vodo do oznake. V šest stekleničk smo nato pripravili reakcijsko zmes, za katero nismo smeli porabiti več kot 2 min, in sicer: 0,5 mL raztopine ekstrakta, 2,5 mL FCR in 2 mL raztopine Na_2CO_3 . Te smo namestili v vodno kopel pri 50°C za 5 min. Kontrolni vzorec smo pripravili tako, da smo v stekleničko namesto raztopine ekstrakta odpipetirali Mili-Q vodo. Le-tega smo uporabili za umerjanje spektrofotometra. Ko so se raztopine ohladile, smo izmerili njihove absorbanco pri 760 nm (Slika 7).



Slika 7: Merjenje absorbanc raztopin ekstraktov

5.2.3 Izračun koncentracije GA v standardnih raztopinah za pripravo umeritvene krivulje

Za potrebe risanja grafa umeritvene krivulje z galno kislino, smo izračunali koncentracijo galne kisline v posamezni bučki:

$$\gamma_{GAC} = \text{koncentracija osnovne GA raztopine } (0,392 \text{ mg mL}^{-1}) * \text{volumen osnovne GA raztopine v 10 mL bučki } (0\text{mL}, 0,25\text{mL}, 0,5\text{mL}, 1\text{mL}, 1,5\text{mL})/10 \text{ mL} \quad [18]$$

5.2.4 Izračun vsebnosti totalnih fenolov v ekstraktih

TPC v ekstraktih je bil izračunan na podlagi umeritvene krivulje z GA po Enačbi 19:

$$Abs = a * \gamma_{GA} + b \quad \rightarrow \quad \gamma_{GA} = \frac{Abs-b}{a} \quad [19]$$

Kjer je:

Abs – absorbanca raztopine ekstrakta, merjena pri 760 nm

b – odsek premice umeritvene krivulje GA na osi absorbance

a – naklon premice umeritvene krivulje GA (mL mg⁻¹)

γ_{GA} - GA koncentracija v raztopini ekstrakta (mg mL⁻¹)

Rezultate vsebnosti totalnih fenolov smo izrazili v mg GA na g ekstrakta ($w_{GA \text{ ekstrakt}}$) in mg GA na g materiala ($w_{GA \text{ material}}$) po spodnjih enačbah:

$$w_{GA \text{ ekstrakt}} = \frac{\gamma_{GA}}{\gamma_{ekstrakt}} * 1000 \quad [20]$$

$$w_{GA \text{ material}} = w_{GA \text{ ekstrakt}} * \frac{\eta_{ekstrakcije}}{100} \quad [21]$$

Kjer je:

$\gamma_{ekstrakt}$ – koncentracija ekstrakta v raztopini vzorca (mg mL⁻¹), izračunanega iz mase ekstrakta, ki smo ga zatehtali za analizo ($m_{ekstraktA}$, (mg)):

$$\gamma_{ekstrakt} = \frac{m_{ekstraktA}}{V_{raztopina}} \quad [22]$$

Kjer je:

$V_{raztopina} = 10 \text{ mL}$

5.3 Določanje antioksidativnega delovanja na radikale 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila

5.3.1 Materiali

Kemikalije:

- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH)
- Metanol

Laboratorijska oprema:

- Merilne bučke: 100 ml ($\pm 0,08$ mL)
- Mettler Toledo analitska tehtnica ($\pm 0,00001$ g)
- Spatula
- 6 x 10 mL merilne bučke ($\pm 0,01$ mL)
- 8 x 10 mL temne stekleničke
- UV-Vis spektrofotometer
- avtomatska pipeta ($5\text{ mL} \pm 0,001\text{ mL}$) in mikropipeta ($100\mu\text{L} \pm 0,8\mu\text{L}$)

Reagenti:

- Raztopina DPPH v metanolu ($6 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹): 2,36 mg DPPH smo zatehtali v 100 mL merilno bučko in dolili metanol do meniska ter dobro premešali.

5.3.2 Postopek

30 mg vsakega ekstrakta smo zatehtali v 10 mL merilno bučko, do oznake dodali Mili-Q vodo in dobro premešali. V temne stekleničke smo pripravili reakcijsko zmes; v šest stekleničk smo dali 3 mL metanolne raztopine DPPH in 77 μL raztopine ekstrakta iz merilnih bučk (Slika 8) in te postavili v temen prostor s sobno temperaturo za 15 minut, preden smo izmerili njihovo absorbanco. Medtem časom smo v eno izmed preostalih temnih stekleničk odpipetirali samo metanol za umerjanje spektrofotometra, v drugo pa pripravili referenčno raztopino s 3 mL metanolne raztopine DPPH in 77 μL Mili-Q vode, katere absorbanco smo izmerili takoj. Za večjo natančnost smo absorbanco vsakega ekstrakta izmerili šest krat in vzeli povprečno vrednost.



Slika 8: Priprava vzorcev z raztopinami ekstraktov

5.3.3 Izračun antioksidativnega delovanja ekstraktov

Antioksidativna aktivnost vzorcev je bila izražena kot odstotek inhibicije (%) glede na referenčno raztopino:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_r^0 - A_s^{15}}{A_r^0} * 100 \quad [23]$$

Kjer je:

A_r^0 - Absorbanca referenčne raztopine v času 0 min

A_s^{15} - Absorbanca raztopine vzorca po času 15 min

6 REZULTATI IN DISKUSIJA

6.1 Postopek konvencionalne ekstrakcije

Tabela 2 prikazuje neobdelane podatke, ki smo jih zbrali tekom ekstrakcije z namenom izračuna izkoristka ekstrakcije za vsak vzorec materiala. Največji izkoristek ekstrakcije je pokazal vzorec kapsul ameriškega slamnika, $51,08\% \pm 0,04\%$, kar lahko nakazuje na to, da prehransko dopolnilo vsebuje največjo količino vodotopnih snovi, deloma pa tudi, da ne poseduje vode oziroma velike količine vlage, ki bi povzročila dodatno težo materiala. Slednje namreč zadeva sveže rastline ameriškega slamnika in ingverja, katerih mase za ekstrakcijo so bile $21,02221\text{ g} \pm 1,05 \cdot 10^{-5}\text{ g}$ in $37,12400\text{ g} \pm 1,11 \cdot 10^{-5}\text{ g}$, masa ekstrakta po ekstrakciji pa je bila le $1,2973\text{ g} \pm 2,00 \cdot 10^{-4}\text{ g}$ in $1,1519\text{ g} \pm 2,00 \cdot 10^{-4}\text{ g}$, kar se je poznalo tudi pri izračunu izkoristkov ekstrakcij, ki so bile najnižje ($6,17\% \pm 0,02\%$ in $3,10\% \pm 0,02\%$).

Tabela 2: Rezultati konvencionalne ekstrakcije

ekstrakt rezultati	ameriški slamnik kapsule	ameriški slamnik čaj	ameriški slamnik svež	ingver kapsule	ingver čaj	ingver svež
m_{material} (g) \pm napaka 1	0,98859 \pm $9,98 \cdot 10^{-6}$	5,00720 $\pm 1,00 \cdot 10^{-5}$	21,02221 $\pm 1,05 \cdot 10^{-5}$	0,56718 \pm $9,98 \cdot 10^{-6}$	5,18802 \pm $9,86 \cdot 10^{-6}$	37,12400 \pm $1,11 \cdot 10^{-5}$
$m_{\text{bučka}}$ (g) $\pm 0,0001\text{ g}$	121,8494	172,7720	166,9169	118,5512	169,3636	260,6490
$m_{\text{bučka+ekstrakt}}$ (g) $\pm 0,0001\text{ g}$	122,3544	174,0450	168,2142	118,6559	170,1732	261,8009
m_{ekstrakt} (g) \pm napaka 2	0,505 \pm $2,00 \cdot 10^{-4}$	1,273 $\pm 2,00 \cdot 10^{-4}$	1,2973 $\pm 2,00 \cdot 10^{-4}$	0,1047 \pm $2,00 \cdot 10^{-4}$	0,8096 \pm $2,00 \cdot 10^{-4}$	1,1519 \pm $2,00 \cdot 10^{-4}$
$\eta_{\text{ekstrakcije}}$ (%) \pm skupna napaka	51,08 $\pm 0,04$	25,42 $\pm 0,02$	6,17 $\pm 0,02$	18,46 $\pm 0,19$	15,61 $\pm 0,02$	3,10 $\pm 0,02$

Glede na raziskavo Tsai in sodelavci (2012), lahko na izkoristek ekstrakcije vplivajo različni dejavniki, kar so preučevali tako, da so pri 25°C spremljali učinek koncentracije etanola v topilu, nato pa tudi učinek različnih temperatur ekstrakcije s 50% etanolom v vodni raztopini na izkoristek ekstrakcije liofiliziranih cvetov ameriškega slamnika. Ugotovili so, da se je največji izkoristek ekstrakcije pokazal pri uporabi čiste vode kot topila (brez etanola) ($39,8\% \pm 1,3\%$) in ko je bila temperatura ekstrakcije 95°C ($39,8\% \pm 0,3\%$). V naši raziskavi smo uporabili kot topilo ultra čisto vodo in ekstrakcije izvajali pri 80°C , vendar pa nismo vzeli v

obzir tehnik sušenja vzorcev, saj smo želeli testirati materiale, takšne kot jih dobimo v lekarni, trgovini ali na tržnici. To je lahko tudi eden izmed vzrokov za nižji izkoristek ekstrakcije suhega čaja ameriškega slamnika v primerjavi z rezultati, ki so jih dobili Tsai in sodelavci (2012), in sicer $25,42\% \pm 0,02\%$.

Kubra in Rao (2012) sta po drugi strani usmerila pozornost na učinek mikrovalovnega sušenja ingverja na izkoristek ekstrakcije, vsebnost totalnih fenolov in antioksidativne aktivnosti ekstraktov. Držala sta se postopka ekstrakcije s 50% etanolom pri sobni temperaturi. Ugotovila sta, da so z naraščanjem mikrovalovne električne moči, naraščali tudi izkoristek ekstrakcije, vsebnost totalnih fenolov in antioksidativna aktivnost ekstraktov. Takšna opažanja sta pripisovala razlagi, da z intenzivno toploto pride do pretrganja celičnih sten rastline, kar povzroči lažjo dostopnost do aktivnih komponent.

Pomembno pa je tudi razlikovati med ekstrakcijo hlapnih in nehlapnih spojin, kar so preučevali El-Ghorab in sodelavci (2010). Tako ameriški slamnik kot ingver vsebujeta esencialno (hlapno) olje in lahko med procesom ekstrakcije nehlapnih komponent pride do izgube znatnih količin antioksidativno aktivnih spojin. Zatorej so El-Ghorab in sodelavci (2010) uporabljali dva ločena procesa ekstrakcije – hidrodestilacijo za hlapne spojine in klasično ekstrakcijo z različnimi koncentracijami heksana in metanola za nehlapne komponente ingverja.

V raziskavah se postopki ekstrakcij lahko izredno razlikujejo. Mesomo in sodelavci (2012) poročajo o uporabi superkričnega ogljikovega dioksida in komprimiranega propana kot topil za ekstrakcijo, kar zagovarjata, rekoč da se s klasično ekstrakcijo, ki uporablja visoke temperature, zmanjša vsebnost totalnih fenolov kot tudi antioksidativna aktivnost ekstrakta, s čimer sta razložila svoje rezultate.

Tako napredne tehnike ekstrakcije, ki se uporabljajo za pridobivanje ekstraktov in esencialnih olj z največjim profitom (čim manj porabljenega časa in stroškov, vendar z visoko kvaliteto), pa nas v okviru teh raziskav niso zanimale, saj smo se vprašali, kakšen učinek ima material, ko ga pojemo. V ta namen, četudi nismo uporabljali *in vivo* testov, smo se skušali bolj realni situaciji približati vsaj z uporabo topila vode in vključitvijo vroče vodne kopeli pri ekstrakciji čajev in svežih rastlin, ki potrebujejo toplotno obdelavo preden jih zaužijemo.

6.2 Določanje vsebnosti totalnih fenolov s Folin-Ciocalteujevim reagentom

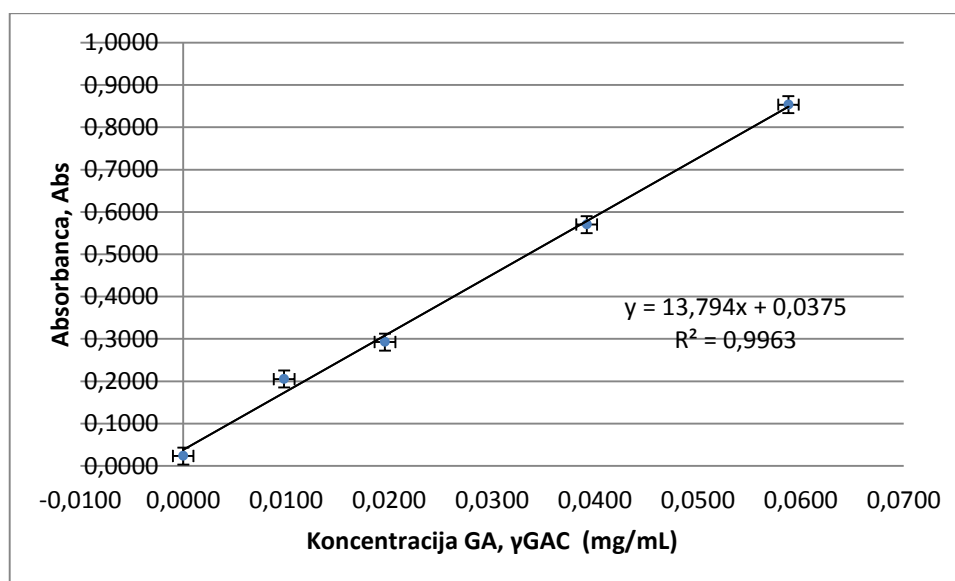
Tabela 3 prikazuje absorbance standardnih raztopin galne kisline po reakciji s FCR, ki so bile uporabljene za določitev umeritvene krivulje.

Tabela 3: Umeritvena krivulja: koncentracije raztopin GA in njihove absorbance

koncentracija GA v standardnih raztopinah, γ_{GAC} (mg mL^{-1}) \pm napaka	Absorbanca, <i>Abs</i> \pm napaka
0	0,023 \pm 0,0005
0,0098 \pm 0,00009	0,205 \pm 0,0013
0,0196 \pm 0,00013	0,293 \pm 0,0013
0,0392 \pm 0,00022	0,570 \pm 0,0024
0,0588 \pm 0,00032	0,854 \pm 0,0015

Umeritvena krivulja s premico z najboljšim potekom in vrednost R^2 sta predstavljena na Grafu 1.

Graf 1: Umeritvena krivulja z galno kislino

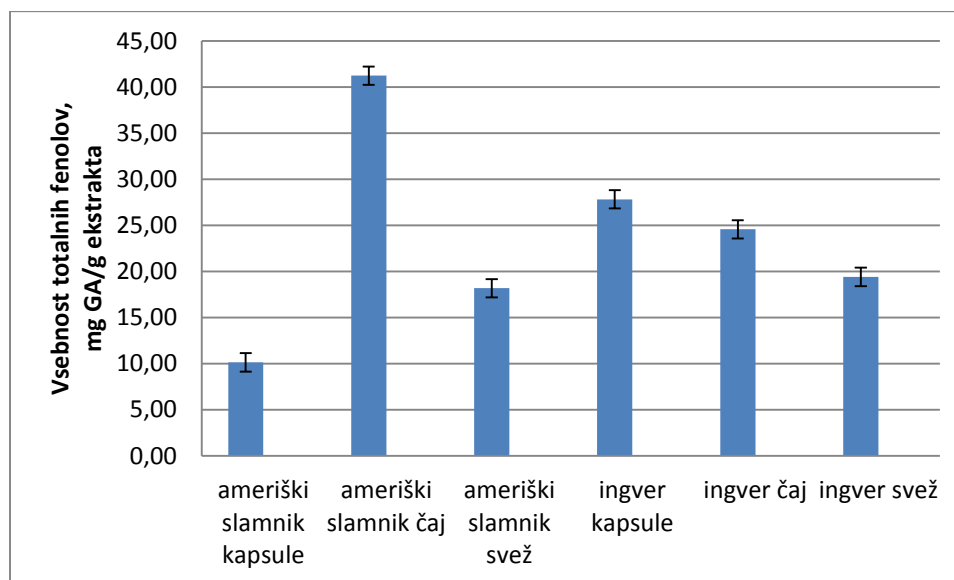


S pomočjo kalibracijske krivulje smo na podlagi absorbanc vzorcev, ki smo jih določili s spektrofotometrom, nato izračunali koncentracije teh vzorcev. Po reakciji ekstraktov s FCR in določitvi absorbanc smo izračunali njihove vsebnosti totalnih fenolov in jih izrazili kot miligram galne kisline na gram ekstrakta oziroma kot miligram galne kisline na gram materiala. rezultati so prikazani v Tabeli 4.

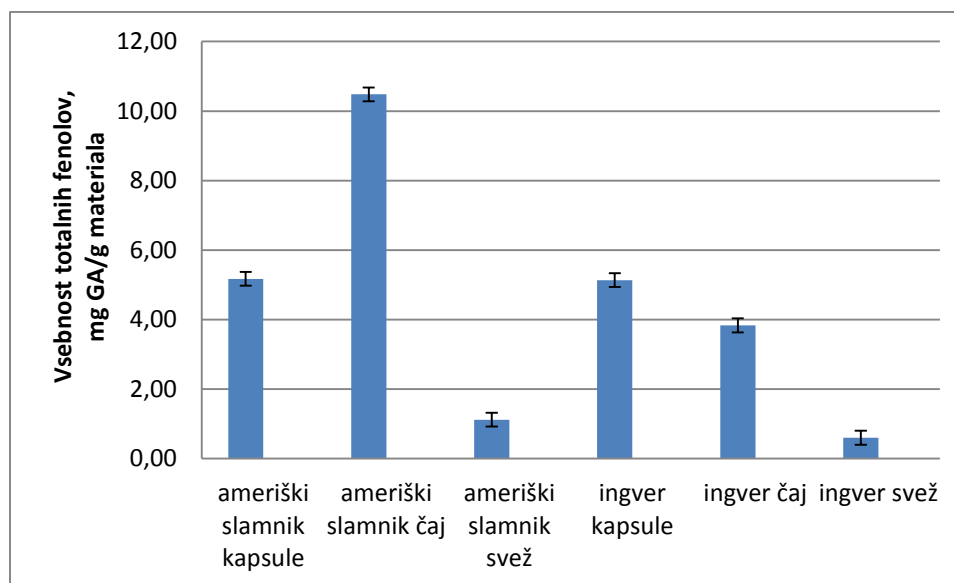
Tabela 4: Rezultati določanja vsebnosti totalnih fenolov

ekstrakt rezultati	ameriški slamnik kapsule	ameriški slamnik čaj	ameriški slamnik svež	ingver kapsule	ingver čaj	ingver svež
$m_{ekstrakta}$ (mg)	9,97	11,25	10,00	11,28	16,53	9,52
$\gamma_{ekstrakt}$ (mg mL ⁻¹)	0,997	1,125	1,000	1,128	1,653	0,952
Absorbanca, <i>Abs</i>	0,1768	0,6772	0,2881	0,4703	0,5976	0,2922
γ_{GA} (mg mL ⁻¹)	0,0101	0,0464	0,0182	0,0314	0,0406	0,0185
W_{GA} ekstrakt (mg GA/ g ekstrakta) ± 0,1	10,130	41,227	18,170	27,819	24,561	19,391
W_{GA} material (mg GA/ g material) ± 0,1	5,174	10,480	1,121	5,135	3,834	0,601

Graf 2: Vsebnost totalnih fenolov izražena v mg GA na g ekstrakta



Graf 3: Vsebnost totalnih fenolov izražena kot mg GA na g materiala



Primerjava med TPC, predstavljena na grafih 2 in 3, pokaže, da je bila največja vsebnost totalnih fenolov določena v vzorcu čaja ameriškega slamnika, $41,227 \pm 0,1$ mg GA/g ekstrakta in $10,480 \pm 0,1$ mg GA/g materiala. Medtem pa drugi ekstrakti ne sledijo istemu modelu, kar je najbolj očitno pri primerjavi TPC v ekstraktih kapsul ameriškega slamnika. Na Grafu 2 lahko vidimo, da so le-te pokazale najmanjšo vsebnost totalnih fenolov izmed vseh testiranih ekstraktov ($10,130 \pm 0,1$ mg GA/g ekstrakta), po drugi strani pa na Grafu 3 zasedajo drugo mesto, čeprav s polovico manjšo TPC (mg GA/g materiala), kot je bila izmerjena pri čaju ameriškega slamnika, in skoraj enako vsebnostjo mg GA/g materiala, kot jo ima ekstrakt ingverjevih kapsul.

Takšna opažanja, kjer se vsebnost totalnih fenolov izražena kot *mg GA/g ekstrakta* razlikuje od vrednosti, ki je izražena kot *mg GA/g materiala*, lahko pojasnimo na sledeč način: kadar izražamo TPC kot *mg GA/g materiala*, upoštevamo tudi izkoristek ekstrakcije, kot narekuje enačba 21, ta pa je bil največji prav pri kapsulah in čajih (Tabela 2), najverjetneje zaradi dejstva, da ti vzorci niso vsebovali veliko ali sploh kaj vode, in so posledično pokazali tudi visoko vsebnost totalnih fenolov. Razen tega je treba upoštevati tudi to, da lahko kapsule poleg ekstrakta vsebujejo tudi pomožne komponente, ki so prav tako lahko topne v vodi in prispevajo k večjemu izkoristku ekstrakta in, posledično, zavajajoči vrednosti TPC, izraženi kot *mg GA/g materiala*. Potemtakem je bolj zanesljivo izraziti TPC v *mg GA/g ekstrakta*, poleg tega – mnoge druge študije raje uporabljajo tak zapis ali pa posebej poudarijo, da je bil material posušen (kar se pojavlja pri Ghasemzadeh in sodelavci, 2011).

Kubra in Rao (2012) sta izrazila vsebnost totalnih fenolov mikrovalovno sušenega ingverja kot mg galne kisline na g ekstrakta, poleg tega pa ugotovila, da večja, kot je bila intenziteta električne moči, večja je bila vsebnost totalnih fenolov (59 – 80 mg GA/g ekstrakta). El-Ghorab in sodelavci (2010) so izrazili TPC heksanovih in metanolnih ekstraktov svežega in posušenega ingverja kot mg GA/g posušenega ekstrakta, hkrati pa opazili, da je sveža rastlina pokazala večjo vsebnost totalnih fenolov (heksanovi in metanolni ekstrakti posušenega ingverja: 67,5 in 71,1 mg GA/g posušenega ekstrakta, primerjano s heksanovim in metanolnim ekstraktom svežega ingverja: 87,5 in 95,2 mg GA/g posušenega ekstrakta). Predpostavljajo, da naj bi sušenje zmanjšalo vsebnost totalnih fenolov, njihove metode sušenja predstavljajo dvodnevno sušenje ingverja v senci. Nasprotno pa naši rezultati ne podpirajo takšnega argumenta, saj je bila TPC svežih vzorcev ena izmed najnižjih (svež ameriški slamnik: $18,17 \pm 0,1$ mg GA/g ekstrakta; in svež ingver: $19,391 \pm 0,1$ mg GA/g ekstrakta). So pa zato v skladu z dognanji raziskave Kubra in Rao (2012), ki trdi, da izrazita toplota omogoča prodor fenolov iz celic rastlin, saj se uničijo celične stene. Na tak način bi se torej dalo razložiti naše rezultate.

Razlogi za neskladnosti v vsebnosti totalnih fenolov v vzorcih ameriškega slamnika in ingverja med našo raziskavo in prej omenjenimi študijami, v veliki meri ležijo v variaciji samih metod (različni postopki sušenja, različna topila in kemikalije – Tsai in sodelavci (2012) so pri preučevanju TPC ameriškega slamnika za umeritveno krivuljo uporabili klorogensko kislino), vendar se lahko nanašajo tudi na geografsko poreklo rastlin. Kje in pod kakšnimi pogoji je bila rastlina gojena, je pomembno z vidika, da se antioksidativni obrambni sistem učinkoviteje razvije v ostrih podnebnih in okolijskih razmerah (Bruneton, 1999). To pomeni, da bodo rastline, ki rastejo v gozdu, razvile večjo količino antioksidantov, kot pa takšne, ki so rasle znotraj cvetličnih lončkov, po možnosti v topli gredi.

Če primerjamo, kako so v posameznih študijah prišli do rastlin, lahko ugotovimo, da jih je večina pridobila od posrednika (izstopa Ghasemzadeh in sodelavci (2010), ki so gojili lastni ingver v lončkih v topli gredi). Tsai in sodelavci (2012) so pravkar pobran ameriški slamnik nabavili od organizacije »Echili Biotechnology Company in Taichung, Taiwan«, način gojenja torej ni znan. Kubra in Rao (2012) sta kupila sveže, zrele ingverjeve gomolje na Devaraja tržnici, Mysore, El-Ghorab in sodelavci (2010) pa z lokalne tržnice v Faisalabadu, Pakistan. Ameriški slamnik, ki smo ga proučevali v tej študiji, je bil prav tako kupljen na lokalni tržnici v Mariboru in, kot rečeno, gojen na domačem vrtu. Ingverjev gomolj je bil kupljen v lokalni trgovini, vendar dobavljen s Kitajske.

Zgoraj naštetih dejavnikov, ki vplivajo na TPC vzorcev (npr. metode sušenja, ekstrakcije, uporabljena topila in kemikalije, geografsko poreklo rastline), imajo vpliv tudi na antioksidativno delovanje ekstraktov, merjeno z DPPH metodo.

6.3 Določanje antioksidativnega delovanja na radikale 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila

Enačba 24 predstavlja absorbanco referenčne raztopine, ki je bila spektrofotometrično izmerjena takoj, ko smo referenčno raztopino pripravili iz 3 mL metanolne raztopine DPPH in 77 μ L metanola.

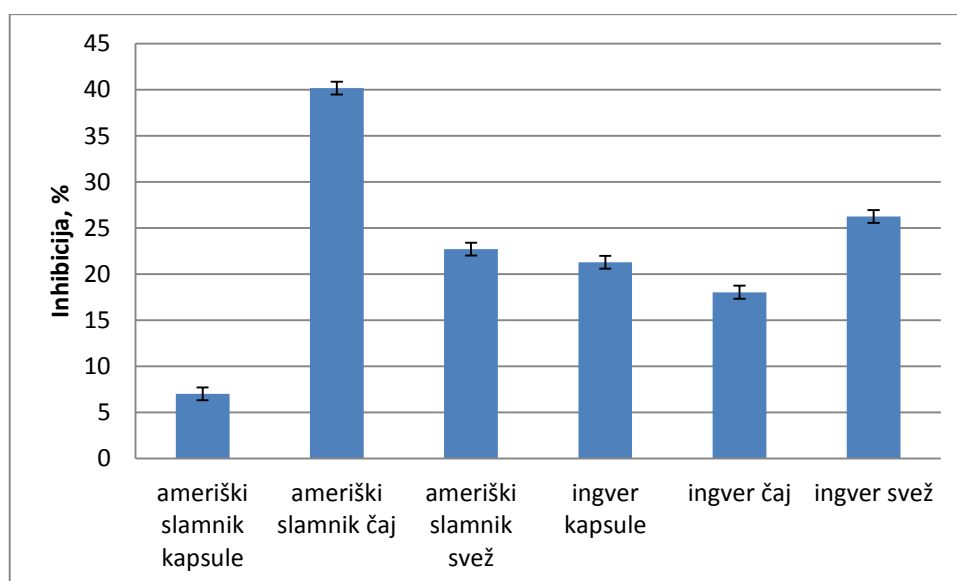
$$A_r^0 = 0,8122 \pm 0,0013 \quad [24]$$

Absorbance ekstraktov, ki so bile izmerjene po 15 minutah priprave reakcijskih zmesi v stekleničkah, so prikazane v Tabeli 5, kjer so podane tudi inhibicije DPPH posameznega ekstrakta, ki so nato grafično predstavljene na Grafu 4.

Tabela 5: Rezultati inhibicije radikala DPPH

ekstrakt rezultati	ameriški slamnik kapsule	ameriški slamnik čaj	ameriški slamnik svež	ingver kapsule	ingver čaj	ingver svež
A_s^{15} \pm napaka	0,7554 \pm 0,0020	0,4858 \pm 0,0005	0,6278 \pm 0,0026	0,5993 \pm 0,0008	0,6658 \pm 0,0006	0,5991 \pm 0,0029
Inhibicija (%) \pm napaka	6,99 \pm 0,04	40,19 \pm 0,17	22,70 \pm 0,17	21,29 \pm 0,10	18,03 \pm 0,07	26,24 \pm 0,21

Graf 4: Inhibicija DPPH radikalov posameznega ekstrakta, podana v odstotkih



Najvišjo zmožnost lovljenja in onesposabljanja radikalov DPPH je pokazal vzorec čaja ameriškega slamnika, $40,19\% \pm 0,17\%$ inhibicije. Temu je sledil svež ingver s $26,24\% \pm 0,21\%$ inhibicije, za njim pa v padajočem vrstnem redu: ekstrakt svežega ameriškega slamnika > kapsule ingverja > ingverjev čaj > kapsule ameriškega slamnika.

Ker smo uporabljali modificirano metodo DPPH testa, so naši rezultati primerljivi z rezultati drugih študij le v omejenem obsegu. Na primer, Tsai in sodelavci (2012) so opazili 90,82% inhibicijo ekstraktov liofiliziranega ameriškega slamnika (v primerjavi z našim vzorcem čaja ameriškega slamnika: 40,19%). Postopek se je od našega razlikoval na sledeč način: 4 mL metanolnega ekstrakta (v primerjavi z našim $77\mu\text{L}$ v vodnem topilu) s koncentracijo $30\ \mu\text{g mL}^{-1}$ (naša $3\ \text{mg mL}^{-1}$) je bilo dodano 1 mL metanolne raztopine DPPH s koncentracijo $2 \cdot 10^{-4}\ \text{M}$ (v primerjavi z našo 3 mL in $6 \cdot 10^{-5}\ \text{M}$), nato pa so pustili tako pripravljene reakcijske zmesi stati 30 min v temnem prostoru s sobno temperaturo (naš čas: 15 min). Kot že omenjeno v diskusiji rezultatov TPC poskusa (Poglavje 6.2), obstajajo številni drugi dejavniki, ki vplivajo na izid poskusa antioksidativne dejavnosti.

Ghasemzadeh in sodelavci (2011), ki so sledili podobnemu postopku kot Tsai in sodelavci (2012), so ugotovili, da je bilo 2,5 mL raztopine (v metanolu, acetonu ali kloroformu) ekstrakta sušenega ingverja s koncentracijo $50\ \mu\text{g mL}^{-1}$, sposobno inhibirati 1 mL $3 \cdot 10^{-4}\ \text{M}$ metanolne raztopine DPPH z 51,48%, 49,22% in 47,47% inhibicijo. Na osnovi tega so zaključili, da so ekstrakti, pridobljeni z bolj polarnimi topili (metanol) bolj učinkoviti lovilci prostih radikalov kot manj polarna topila (aceton in kloroform), kar nakazuje na raznoliko polarnost antioksidantov oziroma aktivnih spojin v ingverju. Kakorkoli, četudi smo v naši raziskavi uporabljali izredno polarno topilo (voda), so bile inhibicije ingverjevih ekstraktov relativno nizke (ingverjev čaj: 18,03%; ingverjeve kapsule: 21,29%; svež ingver: 26,24%), kar bi se kvečjemu dalo pojasniti z upoštevanjem mnogih drugih faktorjev – že omenjenih, ali še neodkritih (kot je npr. starost rastline ob pridobitvi).

7 ZAKLJUČKI

Ker so vsi preučevani vzorci pokazali učinek na oba testa antioksidativnega delovanja, določanje TPC in sposobnost inhibicije DPPH radikalov, ničelna hipoteza ovržena, prva hipoteza pa potrjena.

Test določanja TPC s Folin-Ciocalteuevim reagentom je pokazal največjo vsebnost totalnih fenolov v ekstraktu čaja ameriškega slamnika (41,227 mg GA/g ekstrakta in 10,48 mg GA/g materiala), pa tudi največjo zmožnost inhibicije DPPH radikalov (40,19%). To nas vodi v potrditev tretje in delno četrte hipoteze, se pravi, da bo eden od vzorcev čaja pokazal največjo antioksidativno delovanje in da bomo pri ekstraktih ameriškega slamnika izmerili višje antioksidativne lastnosti. Četrta hipoteza ne more biti popolnoma potrjena, saj niso vsi vzorci ameriškega slamnika pokazali večje vsebnosti totalnih fenolov in zmožnosti inhibicije radikalov DPPH kot ingverjevi ekstrakti.

V drugi hipotezi smo predvideli premo sorazmerje med rezultati testa za vsebnost totalnih fenolov (TPC) in testa za inhibicijo DPPH radikalov. S statistično primerjavo rezultatov (Priloga II), smo ugotovili, da v primeru ameriškega slamnika inhibicija prostih radikalov skoraj linearno narašča z vsebnostjo totalnih fenolov v območju od 10 do 41 mg GA/g ekstrakta, in sicer od 7 do 40%. V primeru ingverja so vsebnosti totalnih fenolov v ekstraktih različnih vzorcev zelo podobne (med 19 in 28 mg GA/g ekstrakta), zato je tudi odstotek inhibicije prostih radikalov teh vzorcev v ozkem območju (med 18 in 26%). Vidimo tudi, da rezultati za ingver, kljub temu, da gre za drug material, ki vsebuje druge komponente kot ameriški slamnik, ležijo zelo blizu linearnega trenda, ki ga opazimo za slamnik. Na osnovi teh opazanj lahko torej potrdimo drugo hipotezo. Nekoliko višja inhibicija ekstraktov iz svežega ingverja (v primerjavi s kapsulami in čajem) je najverjetneje posledica tega, da sveži ingver vsebuje tudi hlapne komponente, ki niso fenolne spojine, imajo pa antioksidativni učinek ali pa sinergistično delujejo z ostalimi komponentami v ekstraktu ingverja in na ta način zvišajo antioksidativno aktivnost ekstrakta.

Ob vrnitvi na raziskovalno vprašanje, ki je spraševalo, kateri ekstrakt, pridobljen s konvencionalno ekstrakcijo, od vseh testiranih, bo imel največjo vsebnost totalnih fenolov, določenih *in vitro* z redoks reakcijo s Folin-Ciocalteu reagentom in največjo zmožnost inhibicije prostih radikalov 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila, in bo tako potencialno najbolj učinkovito ščitil naše telo s svojim antioksidativnim delovanjem, si lahko torej na podlagi analize rezultatov odgovorimo, da ima takšne lastnosti ekstrakt čaja ameriškega slamnika.

Vendar lahko to trdimo le, če pretehtamo številne slabosti in omejitve pristopa k raziskovalnemu problemu. Ker je bila pri tem uporabljena laboratorijska oprema z veliko natančnostjo, raztopine in reagente pa smo pripravljali s precejšnjo točnostjo, se ne bomo toliko osredotočili na same sistematične in slučajne napake, saj so skoraj zanemarljive. Ovrednotiti pa moramo omejitvev posploševanja v laboratoriju pridobljenih rezultatov na realno življenjsko situacijo.

7.1 Ovrednotenje rezultatov in metod

Celotna raziskava temelji zgolj na *in vitro* antioksidativnih poskusih, ki z biološkimi sistemi nimajo kaj dosti skupnega. Nekateri antioksidanti so lahko v epruveh odlični lovilci prostih radikalov, vendar so lahko popolnoma nestabilni ali celo nevarni v živih celicah, kjer pa moramo upoštevati še njihovo koncentracijo. Z veliko gotovostjo torej ne moremo posplošiti, da je čaj ameriškega slamnika zares najboljši pri obrambi telesa pred oksidativnim stresom in z njim povezanimi boleznimi, smo pa zato ugotovili, da so kapsule z izoliranimi izvlečki rastlin v vodnem mediju manj učinkovite, kar je skorajda proti pričakovanjem. Rezultati so pravzaprav presenetljivi, saj kljub temu, da sta se prehranski dopolnili ameriškega slamnika in ingverja izkazali z visokima izkoristkoma ekstrakcije in vsebnostjo totalnih fenolov, ko je bila ta izražena kot g GA/g materiala (5,174 in 5,135, po vrsti), so bili njuni ekstrakti precej slabi lovilci prostih radikalov (6,99% in 21,29% inhibicije DPPH). Takšna opažanja bi lahko razložili z upoštevanjem kompromisa proizvajalcev prehranskih dopolnil, ki želijo omejiti antioksidativno delovanje samih kapsul, saj te vsebujejo izolirane ekstrakte, in bi sicer lahko predstavljale potencialno nevarnost za predoziranje. Na obeh škatlicah prehranskih dopolnil je tako pisalo, da se priporočenega dnevnega vnosa (ameriški slamnik – 2-4 kapsule, ingver – 1 kapsula) ne sme prekoračiti in da prehransko dopolnilo ni nadomestilo za uravnoteženo in raznovrstno prehrano. Druga od možnih razlag, ki pojasnjuje nizke vrednosti inhibicije DPPH radikalov ekstraktov kapsul, je ta, da dopolnila vsebujejo razne dodatke poleg samega ekstrakta, ki je lahko prečiščen, tako pa sinergističnih učinkov ni več. Potemtakem je teh nekaj minut več, ki so potrebne za pripravo čaja ali obroka iz sveže rastline, ki vsebujejo naravno prisotne sinergistične komponente, skoraj nezatnih v primerjavi s pozitivnim učinkom na zdravje (čeprav je bilo v Indiji izredno pogosto pitje zelenega čaja (več kot en liter dnevno) povezano z rakom na požiralniku, vendar so takšna opažanja morda posledica pitja vročega čaja in ne zaradi prevelikega odmerka antioksidantov v njem (Bouayed in Bohn, 2010)).

Tudi testi antioksidativnosti imajo slabosti sami po sebi. Nekatere šibkosti TPC testa vključujejo netočno poznavanje kemijske sestave Folin-Ciocalteujevega reagenta in s tem tudi standardiziranosti Mo(VI)/Mo(V) redoks potenciala (Huang in sodelavci, 2005). Prav tako sami nismo določili kemijskih spojin v obeh rastlinah, kar je še dodatno omejilo našo predstavo o tem, kaj je sploh reagiralo. Ker pa so vsi ekstrakti pokazali neko stopnjo spremembe barve kemijske zmesi, ki je indikator potekle kemijske reakcije med fenolnimi spojinami in FCR, je mogoče zaključiti, da so v vzorcih ameriškega slamnika in ingverja le prisotne vodo topne fenolne spojine. Čeprav je nujno izvajati eksperiment v bazičnih pogojih, lahko že preprosti fenoli (kot je C_6H_5OH) reagirajo s FCR, četudi niso učinkoviti lovilci prostih radikalov. In ker je sam TPC test opravljen zgolj v vodnem okolju, je tako neuporaben za test lipofilnih antioksidantov (Huang in sodelavci, 2005), ki pa jih načeloma v naših ekstraktih tako ni bilo, saj jih z vodo nismo ekstrahirali.

Po drugi strani lahko DPPH sicer testira lipofilne antioksidante v večji meri kot TPC test, vendar ne vključuje prenosa vodikovega atoma, ki se zgodi med antioksidanti in prostimi radikali v lipidni peroksidaciji. DPPH tudi ne reagira s peroksilnim radikalom, kar nakazuje na to, da bi mnogi antioksidanti, ki bi sicer hitro zavrl delovanje peroksil radikala, lahko bili celo inertni do DPPH (Huang in sodelavci, 2005).

7.2 Možne izboljšave v eksperimentu

Da bi dobili boljšo predstavo o učinku ekstraktov na naše telo, bi se morali osredotočiti, poleg ustvarjanja pogojev bolj podobnih človeškemu prebavnemu sistemu (npr. kontrolirana vrednost $pH = 2$, kot je v želodcu), tudi na poskuse na bioloških sistemih. Tako bi se že *in vitro* testi, kot so test mutagenosti in toksičnosti, nekoliko približali bolj utemeljenemu zaključku, seveda pa šele *in vivo* testi in klinične študije pokažejo pravo sliko. Ostaja pa temeljito testiranje antioksidantov najprej v laboratoriju obvezen korak, preden se ta pojavi znotraj živih organizmov. Potrebno bi bilo določiti zgornjo mejo priporočenega dnevnega vnosa.

V našem eksperimentu bi se razumevanje dogajanja znotraj merilnih bučk in stekleničk osvetlilo navsezadnje šele ob poznavanju kemijske sestave vseh vzorcev. Na primer, s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) bi tako lahko ugotovili točno določene spojine, ki so vplivale na rezultate poskusov določanja vsebnosti totalnih fenolov in antioksidativnega delovanja na DPPH radikale.

8 VIRI

- BASF, The chemical company. (Nazadnje obnovljeno: December, 2013) Light Stabilizers. (Dostopno na: http://www.dispersions-pigments.basf.com/portal/basf/ien/dt.jsp?setCursor=1_556325, dosegljivo 22. 1. 2014)
- Benzie, F. F. I. (2003) Evolution of dietary antioxidants. *Comparative biochemistry and physiology part A: Molecular & integrative physiology*. 136, 113-126.
- Bergamini CM., Gambetti, S., Dondi, A., Cervellati, C. (2004) Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Current pharmaceutical design*. 10(14), 1611- 26.
- Bone, K. (1997) Echinacea: What makes it work? *Alternative medicine review, Thorne research*. 2(2), 87-93.
- Bouayed, J.; Bohn, T. (2010) Exogenous antioxidants – Double-edged swords in cellular redox state. Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 3(4), 228-237.
- Bruneton, J. (1999) *Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants*; 2nd ed.; Lavoisier Publishing: Paris, France.
- Davies, KJ. (1995) Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp*. 61, 1-31.
- Demetzos, C.; Dimas, K. S. (2001) Labdane-type diterpenes : chemistry and biological activity. *Studies in Natural Products Chemistry*. Volume 25, Part F, pages 235 – 292.
- El-Ghorab, A. H.; Nauman, M.; Anjum, F. M.; Hussain, S.; Nadeem M. (2010) A comparative study on chemical composition and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale*) and cumin (*Cuminum cyminum*). *J. Agric. Food Chem.* 58, 8231-8237.
- Flora, S. JS. (2009) Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2(4), 191-206.
- Ghasemzadeh, A.; Jaafar H. Z. E.; Rahmat A. (2011) Effects of solvent type on phenolics and flavonoids content and antioxidant activities in two varieties of young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extracts. *Journal of medicinal plants research*. 5(7), 1147-1154.

- Gutteridge, J. M. C. (1995) Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *Clinical chemistry*. 41(12), 1819-1828
- Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1841-1856.
- Held, P. (2012) An introduction to Reactive Oxygen Species – Measurement of ROS in cells. *Biotek: Tech Resources – Application guides*. Vermont, USA.
- Kubra, I. R.; Rao, L. J. M. (2012) Microwave drying of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and its effects on polyphenolic content and antioxidant activity. *International journal of food science and technology*. 47, 2311-2317.
- Lehninger, A. L. (1979) *Biochemistry*; 2nd ed.; Worth Publishers, Inc.: United States of America.
- Mancuso, C.; Scapagnini, G.; Curro, D.; Stella, A. M. G.; De Marco, C. ; Butterfield, D. A. ; Calabrese, V. (2007) Mitochondrial dysfunction, free radical generation and cellular stress response in neurodegenerative disorders. *Frontiers in Bioscience*. 12, 1107-1123. (Dostopno na: <http://www.bioscience.org/2007/v12/af/2130/fulltext.php?bframe=figures.htm>, dosegljivo 22. 1. 2014)
- Mandal, A. (Nazadnje obnovljeno: 2013). News medical: What are antioxidants? (Dostopno na: <http://www.news-medical.net/health/What-are-Antioxidants.aspx>, dosegljivo 18.1. 2014)
- Mesomo, C. M.; Scheer, A. de P.; Perez, E. ; Ndiaye, P. M. ; Corazza, M. L. (2012) Ginger (*Zingiber Officinale* R.) extracts obtained using supercritical CO₂ and compressed propane: Kinetics and antioxidant activity evaluation. *The journal of supercritical fluids*. 71, 102-109.
- Miliauskas, G.; Venskutonis, P. R.; van Beek, T. A. (2004) Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*. 85(2), 231-237.
- Miller, S. C. (2005) Echinacea: a Miracle Herb against Aging and Cancer? Evidence In vivo in Mice. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2(3), 309-314.
- Nervi, C. (Nazadnje obnovljeno: 1996) Proprietf antiossidanti dei polifenoli. *Department of Chemistry I. F. M.* (Dostopno na: http://lem.ch.unito.it/didattica/infochimica/2007_Polifenoli_Vino/antiox.html, dosegljivo 25. 1. 2014)

- Neuss, G. (2007) *Chemistry Course Companion*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Pandya, C. (2012) *Evaluation of concomitant treatment of ginger and glibenclamide in alloxan induced diabetic wistar rats*. Dissertation submitted to KLE University, in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of Pharmacy in Pharmacology, Belgaum, Karnataka, India.
- Percival, M. (Pregledano: 1998) Antioxidants. *Clinical nutrition insights*. Advanced Nutrition Publications. (Dostopno na: <http://acudoc.com/Antioxidants.PDF>, dosegljivo 19. 1. 2014)
- Repetto, M.; Semprine J.; Boveris A. (2012) Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination, Lipid Peroxidation, Dr. Angel Catala (Ed.). (Dostopno na: <http://www.intechopen.com/books/lipid-peroxidation/lipid-peroxidation-chemical-mechanism-biological-implications-and-analytical-determination>, dosegljivo 18. 1. 2013)
- Rhee, S. G. (2006) H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science*. 312, 1882-1883.
- Rizzo, A. M.; Berselli, P.; Zava, S.; Montorfano, G.; Negroni, M.; Corsetto, P.; Berra, B. (2010) Endogenous Antioxidants and Radical Scavengers. *Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors*. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media. (Dostopno na: https://www.landesbioscience.com/pdf/05Giardi_Berra.pdf, dosegljivo 19. 1. 2014)
- Shumake, L. (Nazadnje obnovljeno: 2012). Riverhillwellness: Ginger constituents. (<http://www.riverhillwellness.com/ginger.htm>, dosegljivo 18. 1. 2014)
- Singleton, V. L.; Rossi, J. A. Jr. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16(3), 144-158.
- Škerget, M.; Makovšek, K.; Perko, T. (2012) Osnove tehnologije živilskih izdelkov; navodila za vaje; FKKT Maribor: Maribor.
- Tsai, Y. et al. (2012) Caffeic acid derivatives, total phenols, antioxidant and antimutagenic activities of *Echinacea purpurea* flower extracts. *Food Science and Technology*. 46, 169-176.
- Wikipedia, the free encyclopedia. (Nazadnje obnovljeno: 11. Januar 2014) Terpene. (available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/ Terpene>, dosegljivo 22. 1. 2014)

- Williams, R. J.; Spencer, J. P. E.; Rice-Evans, C. (2004) Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? *Free radical biology and medicine*. 36, 838-849.
- Yoshida, W. B.; de Campos, E. B. P. (2004) The role of free radicals in pathophysiology and reperfusion in skin flaps: experimental models and treatment strategies. *Journal Vascular Brasileiro*. 3(4), 357-366.

9 PRILOGE

9.1 Priloga I: *in vivo* študije, ki raziskujejo vlogo prehrane (sadje, zelenjava, prehranska dopolnila) na zdravje ljudi (Bouayed in Bohn (2010), stran 232)

Tabela 6: *in vivo* študije, ki raziskujejo vlogo prehrane (sadje, zelenjava, prehranska dopolnila) na zdravje ljudi

Table 2. Compilation of data from epidemiological (retrospective and prospective) investigations and human intervention trials highlighting the role of the diet (fruits and vegetable, supplements) on human diseases or biomarkers of health

Epidemiological and dietary intervention studies employing plant foods	References	Supplementation	References
Retrospective epidemiological data:			
<ul style="list-style-type: none"> apple,^{78,98,99} onion^{86,99} and white grapefruit⁷⁸ possessing preventive properties against developing coronary diseases⁹⁹ and lung cancer^{78,98} as measured by cancer incidence^{78,98} and CYP1A1⁷⁸ reduced risk of lung cancer with higher dietary intake of β-carotene plant-based diet may prevent against several types of cancer including breast, prostate and colon cancers, based on comparisons between traditional Eastern diets (e.g., Korea) rich in plant foods versus Western diets (e.g., U.S, high intake of calories and fats and limited intake of plant foods). Changes in Korean dietary habits due to "Westernization" of diet have increased incidence of cancer 	<p>Knekt et al.^{98,99} & Le Marchand⁷⁸</p> <p>Reviewed by Peto et al.¹³⁶</p> <p>Reviewed by Lee et al.²⁷</p>	<p>Human intervention trials with supplements:</p> <ul style="list-style-type: none"> no negative effects with respect to β-carotene supplementation (50 mg every other day) for 12 yrs in healthy subjects negative impact of supplementation by a combined treatment with vitamin A (retinyl palmitate) at 25,000 IU and β-carotene (30 mg) for 4 yrs on incidence of human lung cancer and cardiovascular diseases (CARET* study) negative impact of supplementation of β-carotene (20 mg/d) for 5–8 yrs on incidence of lung cancer (ATBC study)* vitamin E (50 mg/d) and β-carotene (20 mg/d) supplements for 6 yrs (median) failed to show beneficial effects on total stroke incidence or mortality in male smokers participating in the ATBC study ("Finish smoking study"). Increased risk of fatal subarachnoid hemorrhage and intracerebral hemorrhage by vitamin E and beta-carotene supplements, respectively vitamin E (100 mg twice/d) and vitamin C (250 mg twice/d) supplements during two months failed to reduce oxidative DNA damage in smokers supplementation with vitamin C at 500 mg/kg over 6 weeks increased oxidative lymphocyte DNA damage of 30 healthy volunteers positive effects of long term supplementation of various minerals (Zn, Se), and β-carotene (15 mg), vitamin E (30 mg) on incidence on cancer in general (Linxian trial) 	<p>Reviewed by Goralczyk,¹³⁸</p> <p>#Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial¹¹¹</p> <p>*The Alpha-Tocopherol Beta Carotene Cancer Prevention Study Group¹¹⁰</p> <p>Leppälä et al.¹⁵⁹</p> <p>Prieme et al.¹¹⁷</p> <p>Podmore et al.¹¹⁸</p> <p>Blot et al.¹¹⁴</p>
Prospective cohort epidemiological trials:			
<ul style="list-style-type: none"> protective effects of fruits and vegetables against coronary heart disease when consumed >4 servings/d for >8 years Meta-analysis of eight independent cohort prospective studies: Consumption of >5 servings/d of fruits and vegetables caused a stronger reduction in strokes (ischaemic and haemorrhagic stroke) compared to 3–5 servings, the latter consumption reducing stroke incidence significantly compared to <3 servings/d 	<p>Joshiपुरa et al.¹⁰⁴</p> <p>He et al.¹⁰⁵</p>		
Human dietary intervention trials:			
<ul style="list-style-type: none"> decreased levels of oxidative DNA damage in healthy human volunteers consuming fruits and vegetables Adoption of traditional Mediterranean diets (moderate energy intake, limited animal fat and diversity and high intake of plant-based foods such as olive oil, cereals, legumes, nuts and vegetables), reduced several CVD risk factors in subjects at risk (primary prevention) and/or cardiovascular events/mortality in patients following a first cardiac event (secondary prevention) 	<p>Reviewed by Halliwell⁶⁵</p> <p>Reviewed by Lairon¹³⁷</p>		

9.2 Priloga II: Odvisnost inhibicije prostih radikalov od vsebnosti totalnih fenolov

Graf 5: Odvisnost inhibicije prostih radikalov od vsebnosti totalnih fenolov

