

»Mladi za napredek Maribora 2020«

37. srečanje

ANTIOKSIDACIJSKA UČINKOVITOST EKSTRAKTOV RAZLIČNIH  
GENOTIPOV MURV (*Morus alba* L., *Morus nigra* L., *Morus rubra* L.)

Raziskovalno področje: Interdisciplinarno področje (zdravstvo, kemija, kemijska tehnologija)

Raziskovalna naloga

Avtor: URŠKA ŠUMAK

Mentor: ENEKO JOSE MADORRAN ESTEIRO, KATJA HOLNTHANER ZOREC,

PETRA KOTNIK

Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR

Število točk: 154/ 170

Maribor, 2020

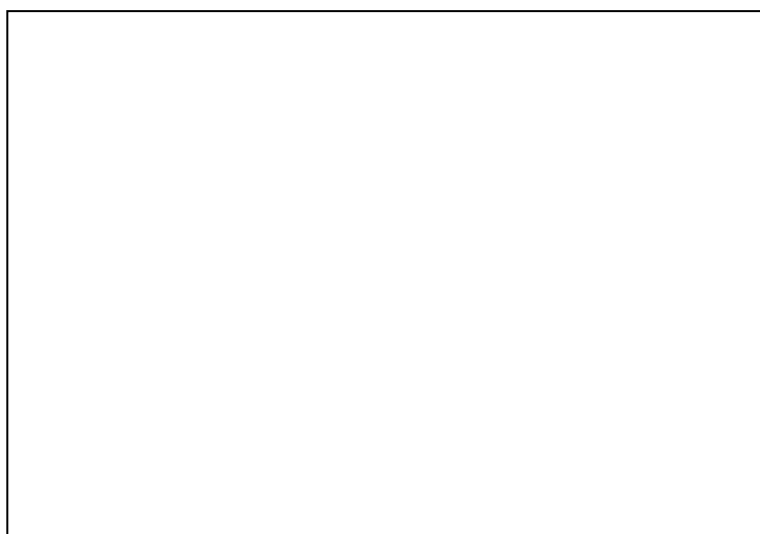
»Mladi za napredek Maribora 2020«

37. srečanje

ANTIOKSIDACIJSKA UČINKOVITOST EKSTRAKTOV RAZLIČNIH  
GENOTIPOV MURV (*Morus alba* L., *Morus nigra* L., *Morus rubra* L.)

Raziskovalno področje: Interdisciplinarno področje (zdravstvo, kemija, kemijska tehnologija)

Raziskovalna naloga



Maribor,

# KAZALO

## Kazalo vsebine

---

KAZALO .....	3
Kazalo slik.....	4
Kazalo tabel in grafikonov .....	5
POVZETEK .....	6
ZAHVALA.....	7
1 UVOD.....	8
1.1 NAMEN DELA .....	8
1.2 RAZISKOVALNO VPRAŠANJE .....	9
1.3 HIPOTEZE .....	9
2 TEORETIČNI DEL .....	10
2.1 Bela murva.....	10
2.2 Črna murva .....	11
2.3 Rdeča murva.....	11
2.4 Aktivne komponente .....	11
2.5 METODE DELA.....	13
2.5.1 Ekstrakcija s Soxhletovim aparatom .....	13
2.5.2 Ultrazvočna kopel.....	13
2.5.3 DPPH.....	14
2.5.4 Določevanje vsebnosti skupnih fenolov .....	14
2.5.5 Tekočinska kromatografija z masno spektrometrijo (LC/MS) .....	14
2.5.6 Antioksidanti in njihovo delovanje proti ROS .....	15
2.5.7 DCFH-da in vitro .....	16

2	EKSPERIMENTALNI DEL .....	16
3.1	Ekstrakcije s Soxhletovim aparatom.....	16
3.2	Ekstrakcija s pomočjo ultrazvočne kopeli.....	17
3.3	Tekočinska kromatografija z masno spektrometrijo (LC/MS).....	18
3.4	Določanje vsebnosti skupnih fenolov v ekstraktih .....	19
3.5	Antioksidacijska učinkovitost.....	20
3.6	Gojenje celic MCF-7 .....	22
3.7	Merjenje znotrajceličnega antioksidativnega potenciala.....	22
4	REZULTATI .....	23
5	RAZPRAVA .....	34
5.1	Izkoristki ekstraktov.....	34
5.2	Antioksidacijska učinkovitost.....	35
5.3	DCFH test.....	36
6	ZAKLJUČEK.....	38
6.1	Potrditev/zavrnitev hipotez.....	38
6.2	Odgovor na raziskovalno vprašanje.....	39
6.3	Nadaljnje raziskave .....	40
7	DRUŽBENA ODGOVORNOST .....	40
8	VIRI IN LITERATURA.....	41
9	PRILOGE.....	43

## Kazalo slik

Slika 1: Shema Soxhletovega aparata (dostopno na:

<https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffigure%2FSoxhlet-extraction-apparatus-set-up->

33_fig2_326734330&psig=AOvVaw1awWC2xbdwh9d8pHd6fPht&ust=1581352724022000&source=images&cd=vfe). .....	13
Slika 2: Strukturna formula klorogenske kisline (dostopno na: <a href="https://www.google.com/search?q=chlorogenic+acid&amp;source=lnms&amp;tbm=isch&amp;sa=X&amp;ved=2ahUKEwiam6vh9cTnAhXBk4sKHWSrBIsQ_AUoAXoECBMQAw&amp;biw=1584&amp;bih=772#imgrc=M1eb2CKa6BVjAM">https://www.google.com/search?q=chlorogenic+acid&amp;source=lnms&amp;tbm=isch&amp;sa=X&amp;ved=2ahUKEwiam6vh9cTnAhXBk4sKHWSrBIsQ_AUoAXoECBMQAw&amp;biw=1584&amp;bih=772#imgrc=M1eb2CKa6BVjAM</a> ) .....	12
Slika 3: Metoda DCFH (lastni vir) .....	16
Slika 4: Ekstrakcija s Sxhletovim aparatom (lastni vir) .....	17
Slika 6: Test fenolnih spojin (lastni vir) .....	20
Slika 7: DPPH analiza (lastni vir) .....	21

---

## Kazalo tabel in grafikonov

Grafikon 1: Vsebnost aktivnih komponent v posameznem vzorcu [mg/mL].....	28
Grafikon 2: Povprečna vrednost odstotka inhibicije pri različnih koncentracijah vzorca.....	29
Grafikon 3: Povprečna vrednost odstotka inhibicije BHT pri posameznih koncentracijah [%]	30
Grafikon 4: Fluorescenca vzorcev pri posameznih razredčinah [AU] (1. ponovitev).....	33
Grafikon 5: Fluorescenca vzorcev pi posameznih koncentracijah [AU] (2. ponovitev) .....	34
Grafikon 6: Izkoristek ekstrakta posameznega vzorca [%].....	35
Tabela 1: Poimenovanje vzorcev.....	23
Tabela 2: Vhodne mase vzorcev za ekstrakcijo [mg] in izkoristki ekstraktov [%] .....	25
Tabela 4: Vsebnost aktivnih komponent v posameznih ekstraktih [%] .....	26
Tabela 5: Povprečna vrednost odstotka inhibicije pri različnih koncentracijah vzorca [mg/ml] .....	28
Tabela 6: Vsebnost skupnih fenolov v posameznih vzorcih [mg GA/100 g ekstrakta] .....	30
Tabela 7: Fluorescenca vzorcev pri posameznih razredčinah [AU] (1. ponovitev) .....	31
Tabela 8: Fluorescenca vzorcev pri posameznih koncentracijah [AU] (2. ponovitev) .....	33

## POVZETEK

---

V raziskovalni nalogi smo preučevali antioksidativne lastnosti ekstraktov listov bele, rdeče in črne murve (*Morus alba* L., *Morus nigra* L., *Morus rubra* L.). Liofiliziran material smo ekstrahirali s Soxhletovim aparatom ali z ultrazvočno ekstrakcijo. Ekstraktom smo določili vsebnost aktivnih komponent (klorogenske kisline, rutina in hesperidina) s spektrofotometričnimi metodami in z uporabo tekočinske kromatografije z masno spektrometrijo. Dobljenim ekstraktom smo z metodo DPPH določali antioksidativne lastnosti. V literaturi se navaja tudi znotrajcelična antioksidativnost ekstraktov, ki smo jo glede na dobljene rezultate, z meritvijo antioksidativnega potenciala znotraj celice, lahko tudi stestirali.

# ZAHVALA

---

Rada bi se zahvalila predvsem svojima mentorjema, za vso pomoč in potrpljenje tekom nastanka naloge. Prav tako se zahvaljujem Medicinski fakulteti Maribor, da mi je omogočila uporabo svojih laboratorijev in uresničitvev zadane ideje, zahvaljujem pa se tudi šolski koordinatorici, za spodbudo pri raziskovalnem delu in opominjanju na bližajoče se roke. Prav tako bi se rada posebej zahvalila Fakulteti za kmetijstvo in biosistemske vede, da so nam dali vzorce, ki so raziskavo sploh omogočili.

# 1 UVOD

---

V nalogi smo preučevali antioksidacijske lastnosti etanolnih ekstraktov listov bele, črne in rdeče murve (*Morus alba* L., *Morus nigra* L., *Morus rubra* L.). Ena izmed že v Kitajski medicini prepoznanih rastlin, ki vsebuje bioaktivne učinkovine, je murva. Vsebuje komponente kot so polifenolne spojine, vlakna, probiotike in prebiotike, aktivne proteine in peptide, polinenasičene maščobne kisline, minerale in vitamine. Fenolske spojine vključno z flavonoidi so skupina spojin z najvišjo vsebnostjo naravnih antioksidantov (Grajek, Wawro in Pieprzyk-Kokocha, 2013).

Antioksidacijske lastnosti izvlečkov listov murve sta raziskovala Arabshahi-Delouee in Urooj<sup>1</sup> z različnimi eksperimentalnimi metodami, med drugim tudi z metodo odstranjevanja prostih radikalov z DPPH. V Koreji so antioksidacijske aktivnosti etanolnih izvlečkov petih gojišč murve določali z metodo DPPH. Za ekstrakte je bilo ugotovljeno, da so močna sredstva za odstranjevanje hidroksilnih radikalov in superoksidnih anionov (Arfan s sod., 2012).

## 1.1 NAMEN DELA

V nalogi smo preučevali antioksidativne lastnosti etanolnih ekstraktov listov bele, črne in rdeče murve (*Morus alba* L., *Morus nigra* L., *Morus rubra* L.). Z različnimi ekstrakcijskimi metodami smo ekstrahirali liofiliziran material murve. Prva ekstrakcija je bila ekstrakcija s Soxhletovim aparatom. Druga metoda pa izolacija aktivnih snovi z uporabo ultrazvočne kopeli. Dobljene ekstrakte smo raztopili v metanolu in izvedli analizo z metodo tekočinske kromatografije z masno spektrometrijo. Aktivnim spojinam smo določali antioksidacijsko učinkovitost (AOU) s stabilnim prostim radikalom 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH).

---

<sup>1</sup> Arabshahi-Delouee S., Urooj A. Antioxidant properties of various solvent of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. Food Chem. Dostopno na:

[https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?journal=Food+Chem&title=Antioxidant+properties+of+various+solvent+of+mulberry+\(Morus+indica+L.\)+leaves&author=S.+Arabshahi-Delouee&author=A.+Urooj&volume=102&publication\\_year=2007&pages=1233-1240&](https://scholar.google.com/scholar_lookup?journal=Food+Chem&title=Antioxidant+properties+of+various+solvent+of+mulberry+(Morus+indica+L.)+leaves&author=S.+Arabshahi-Delouee&author=A.+Urooj&volume=102&publication_year=2007&pages=1233-1240&)



## 1.2 RAZISKOVALNO VPRAŠANJE

Pred začetkom raziskovanja smo si zastavili vprašanje »Kakšne so antioksidativne lastnosti ekstraktov listov različnih genotipov murve?«, na katerega smo skozi nalogo skušali odgovoriti.

## 1.3 HIPOTEZE

Pri delu smo si postavili naslednje hipoteze:

1. Ekstrakti, ekstrahirani s Soxhletovim aparatom, bodo imeli večji izkoristek kot tisti, ekstrahirani s pomočjo ultrazvočne kopeli.

Temperatura vrelišča metanola je 64 °C, voda pa pri 100 °C. Iz tega predpostavimo, da po pri ekstrakciji po Soxhletu poteklo več ciklov, posledično pa bo izkoristek višji, kot pri ekstraktih, ekstrahiranih s pomočjo ultrazvočne kopeli.

2. Ekstrakti, ekstrahirani s 50 % metanolom, bodo imeli višjo znotrajcelično antioksidacijsko učinkovitost, kot tisti, ekstrahirani z metanolom.

Pri ekstrakciji z uporabo ultrazvočne kopeli se temperatura vrelišča zanemari, saj vse ekstrakcije potekajo pri isti temperaturi. Predpostavljamo, da bo antioksidacijska učinkovitost višja, saj se bodo pri uporabi 50 % metanola ekstrahirale tako polarne kot nepolarne komponente.

3. Vsebnost skupnih fenolov bo pozitivno vplivala na izmerjeno znotrajcelično antioksidacijsko učinkovitost.

Glede na literaturo (Grajek, Wawro in Pieprzyk-Kokocha, 2013) predvidevamo, da antioksidacijska učinkovitost izvira pretežno iz vsebnosti fenolnih spojin, med katere spadajo tudi rutin, hesperidin in klorogenska kislina.

4. Vpliv vsebnosti skupnih fenolov na znotrajcelično antioksidacijsko učinkovitost bo večji, kot vpliv DPPH.

Ekstrakti, uporabljeni na celicah, so v različnih koncentracijah raztopljeni v vodi, v njej pa so fenolne spojine dobro topne. Hkrati glede na prejšnjo hipotezo predpostavljamo višjo antioksidacijsko učinkovitost ekstraktov z visoko vsebnostjo fenolnih spojin.

## 2 TEORETIČNI DEL

---

### 2.1 Bela murva

»Bela murva (*Morus alba* L.) je listopadno do 18 metrov visoko drevo. Deblo je kratko in grčavo, skorja je rdečkastorjava in vzdolžno razpokana. Poganjki bele murve so sprva dlakavi in pozneje goli, rumenosivi. Listi bele murve so dvojni, enostavni ali dlanasto krpsti. Pojav, da se na isti rastlini listi razlikujejo po obliki in velikosti, imenujemo heterofilija. Tendenca k tvorjenju krpstih listov je odvisna od genotipa in starosti listov in poganjkov. Listi so pri beli murvi na zgornji strani svetlo zeleni in bleščeči, na spodnji strani so samo ob žilah dlakavi, kar je ključno pri prepoznavanju te vrste (Brus, 2004).

Bela murva vsebuje beljakovine, ogljikove hidrate, kalcij, železo, askorbinsko kislino,  $\beta$ -karoten, tiamin, folno kislino, vitamin D in različne fenolne spojine. Fenoli (flavonoidi, fenolne kisline, antocianini, stilbeni, tanini, lignani, lignini) so pomembni tako pri rasti in razvoju rastlin, kot tudi pri obrambi pred okužbami in poškodbami. Spojine so pogosto prisotne v rastlinskih tkivih in so močni antioksidanti. (Urbanek Krajnc s sod. 2014)

Fenolne spojine kot antioksidanti rastlino ščitijo na različne načine; neposredno reagirajo s prostimi radikali, jih odstranjujejo iz celic, razgrajujejo na manj reaktivne snovi, nadzorujejo aktivnost mnogih encimov.

Glavne fenolne spojine v listih murv so različne kisline: klorogena, galna, vanilinska, kavna, kumarna, p-hidroksibenzojna, in še nekatere druge kisline. Najbolj pogosta fenolna kislina v beli murvi je klorogena (povz. po Veberič, 2010). Bela murva vsebuje oksiresveratrol in 5,7-dihidroksikumarin 7-metil eter, ki ima antioksidativni potencial (Oh s sod., 2002). Podobno kot pri beli, tudi črna murva vsebuje primerljive snovi, s tem da si bili v črni najdeni tudi karotenoidi (Radojkovič s sod. 2012, Zafar s sod., 2013).

Ekstrakti iz listov imajo nevroprotektivni, imunomodulatorni, antihiperglikemični, protivirusni in protirakavi učinek. Hkrati deluje kot antipiretik proti povišani telesni temperaturi (Zafar s sod., 2013) (Šumak, 2019).«matr

## 2.2 Črna murva

Črna murva je na videz podobna beli murvi, le da ima močnejše in bolj hrapavo deblo in veje. Zraste od 10 do 15 metrov visoko, krošnja pa je gosta. Listi so na mladih vejah veliki 23 cm, na starih vejah pa so dolgi od 10 do 20 cm in široki od 6 do 10 cm. Na veje so nameščeni na nekoliko krajših pecljih kot listi bele murve, žleb pa je pri njih le nakazan. Na bazi so listi izrazito srčasti. Sicer se delijo na 3 do 5 krp, lahko pa so tudi nedeljeni. Zgornja plast listne ploskve je temno zelena, spodnja pa je dlakava.

Cvetovi so enospolni. Iz oplojenih cvetov se razvijejo soplodja, dolga od 2 do 3 cm. Zreli plodovi so temno vijolične, skoraj črne barve, po čemer je drevo dobilo svoje ime (Črna murva, s.a.).

## 2.3 Rdeča murva

Rdeča murva (*Morus rubra* L.) je listopadno drevo, ki je naravno prisotno v osrednjem in vzhodnem delu Severne Amerike. Zraste okoli 15 metrov visoko, kratko deblo pa doseže premer 40 cm. Lubje je lahko gladko ali pa razbrazdano, temno rjave barve. Veje oblikujejo kroglasto krošnjo. Listi so nameščeni premenjalno in dosežejo do 15 cm dolžine. Enako kot pri črni in beli murvi, so tudi listi rdeče murve lahko tako enostavni široko jajčasti, kot tudi 2-3 krpati. Zgornja površina lista je hrapava, spodnja pa prekrita s svilnatimi dlačicami. Dobro je odporna na temperature pod lediščem, sušo, onesnaženje in prilagojena na manj kakovostno podlago. Cvetovi so neopazni, rumenozeleni do rdečkasto zeleni, plodovi pa rdeči do temno vijolični in merijo 2-3 cm v dolžino (Rdeča murva, 2019).

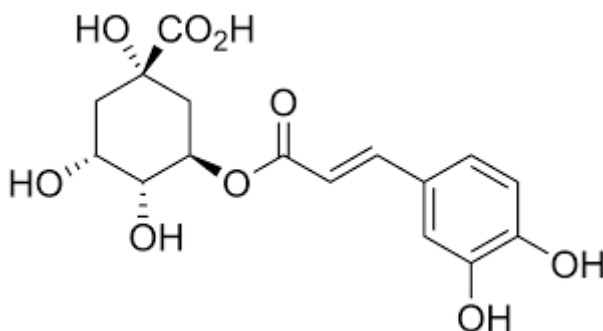
## 2.4 Aktivne komponente

Rastline imajo veliko sposobnost izgradnje velikega števila različnih spojin, številne izmed njih imajo tudi protimikrobni učinek. Med najpomembnejšimi so fenolne spojine, na primer enostavni fenoli, fenolne kisline, kinoni, flavonoidi, tanini (Cowan, 1999). Medicinske rastline so ogromni viri novih zdravil in lahko konstituira alternativo tistim zdravilom, ki jih uporabljamo ponavadi (Al-Mariri in Saf, 2014). Rastline imajo skoraj neomejeno sposobnost

sinteze aromatičnih snovi. Z izjemo aromatskih kislin je večina sekundarnih metabolitov, od katerih je bilo izoliranih vsaj 12.000, kar je ocenjeno na manj kot 10% skupnega števila metabolitov. Večina teh sekundarnih metabolitov je fenolov ali njihovih derivatov. V mnogih primerih te snovi služijo kot obrambni mehanizem rastlin pred škodljivimi organizmi, kot so patogeni in škodljivci. Nekateri, kot so terpenoidi, dajejo rastlinam svoje vonjave; drugi (kinoni in tanini) so odgovorni za rastlinski pigment. Flavoni so fenolne strukture, ki vsebujejo eno karbonilno skupino. Z dodatkom 3-hidroksilne skupine nastane flavonol. Flavonoidi so tudi hidroksilirane fenolne snovi, vendar se pojavijo kot C6-C3 enota, povezana z aromatskim obročem. Znano je, da jih rastline sintetizirajo kot odziv na mikrobno okužbo, zato ne bi smelo biti presenetljivo, da so in vitro ugotovili, da so učinkovita protimikrobna sredstva proti širokemu nizu mikroorganizmov. Njihova aktivnost je verjetno posledica njihove sposobnosti, da tvorijo komplekse z zunajceličnimi in topnimi proteini ter, da tvorijo kompleks z bakterijskimi celičnimi stenami. Več lipofilnih flavonoidov lahko ovira tudi mikrobne membrane (Murphy in Cowan, 1999).

V murvi so flavonoidi najpomembnejše aktivne sestavine, ki prispevajo k farmakološki učinkovitost listov. Rutin, izokvarcitrin in astragalin so trije glavni flavonoidi, ki so prisotni v listih murve. Pokazali so različne biološke učinke, kot so hipoglikemični, hipolipidemični in antioksidativni učinki (He et al., 2013).

Črna murva (*Morus nigra*), ima v primerjavi z drugimi vrstami iz rodu *Morus* največjo vsebnost fenolnih spojin. Budiman et al. (2017) prav tako navajajo, da ima črna murva antioksidativne lastnosti.



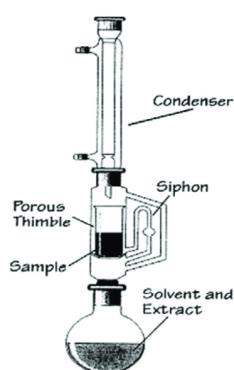
Slika 1: Strukturna formula klorogenske kisline (dostopno na:

[https://www.google.com/search?q=chlorogenic+acid&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=2ahUKEwiam6vh9cTnAhXBk4sKHWSrBIsQ\\_AUoAXoECBMQAw&biw=1584&bih=772#imgrc=M1eb2CKa6BVjAM](https://www.google.com/search?q=chlorogenic+acid&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=2ahUKEwiam6vh9cTnAhXBk4sKHWSrBIsQ_AUoAXoECBMQAw&biw=1584&bih=772#imgrc=M1eb2CKa6BVjAM))

## 2.5 METODE DELA

### 2.5.1 Ekstrakcija s Soxhletovim aparatom

Prva metoda, ki smo jo izvedli, je bila ekstrakcija s Soxhletovim aparatom. Ta metoda se v veliki meri uporablja prav za ekstrakcijo bioaktivnih spojin iz naravnih materialov. Soxhlet naprava je sestavljena iz kondenzatorja, ekstraktorja, v katerem je tulec za ekstrakcijski material, sifona in destilacijske bučke z grelnikom. Načelo te metode je, da segrevamo topilo v destilacijski bučki, pri čemer se pare v kondenzatorju utekočinijo in kapljajo na trden ekstrakcijski material v tulcu. Pri tem nastaja raztopina topila in spojin, ki jih želimo ekstrahirati. Ko raztopina napolni ekstraktor do višine sifona, steče v destilacijsko bučko in postopek ekstrakcije se ponovi. V bučki tako ostajajo komponente, topne v izbranem topilu (ekstrakt), v tulcu pa netopne snovi ekstrakcijskega materiala (rafinat).



Slika 2: Shema Soxhletovega aparata (dostopno na:

[https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffigure%2Ffigure%2FSoxhlet-extraction-apparatus-set-up-33\\_fig2\\_326734330&psig=AOvVaw1awWC2xbdwh9d8pHd6fPht&ust=1581352724022000&source=images&cd=vfe](https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffigure%2Ffigure%2FSoxhlet-extraction-apparatus-set-up-33_fig2_326734330&psig=AOvVaw1awWC2xbdwh9d8pHd6fPht&ust=1581352724022000&source=images&cd=vfe)).

### 2.5.2 Ultrazvočna kopel

Druga metoda, ki smo jo uporabili, je bila ekstrakcija s pomočjo ultrazvočne kopeli, ki je znatno hitrejša od ekstrakcije s Soxhletovim aparatom.

Ultrazvočna ekstrakcija je metoda ekstrakcije, s katero lahko izboljšamo kvaliteto vzorca, tj. odstranimo nezaželene komponente, in povečamo izkoristek, namreč topilo ali mešanico topil lahko optimiziramo tako, da zagotovimo največji možni izkoristek. Hkrati lahko vzporedno poteka več ekstrakcij in postopek ne zahteva posebne laboratorijske opreme (Ridgway et al, 2007).

### 2.5.3 DPPH

Najpreprostejša metoda za vrednotenje antioksidativnega potenciala je radikalska metoda z 1,1-difenil-2-pikrilhidrazilom (DPPH). Prosti radikali, ki nastajajo pri procesu oksidacije v organizmu, v telesu povzročajo različne degenerativne motnje, kot so mutageneza, kancerogenost, kardiovaskularne bolezni in staranje. Antioksidanti se borijo proti tem prostim radikalom in uravnavajo ravnovesje med oksidanti in antioksidanti ter s tem vplivajo na zdravje.

DPPH je stabilen prosti radikal močne vijoličaste barve. Antioksidativne spojine v raztopini pretvorijo radikal DPPH v stabilno DPPH molekulo tako, da oddajo en elektron ali vodikov atom. Pri tem pride do spremembe barve iz vijolične do blede rumene, kar nam omogoča, da antioksidativno aktivnost določimo spektrofotometrično. Rezultati se največkrat izražajo kot koncentracija antioksidanta, ki povzroča 50 % zaviranje DPPH (Gračnar, 2018).

### 2.5.4 Določevanje vsebnosti skupnih fenolov

Za določanje skupnih fenolov smo uporabili Folin-Cioacaltea (FC) metodo. To je kolorimetrična metoda, ki temelji na reakciji prenosa elektronov med FC reagentom in fenolnimi komponentami. Gre za reakcijo oksidacije med fenolnimi spojinami in kislina  $H_3PMO_{12}O_{40}$  in  $H_3PW_{12}O_{40}$ , pri čemer nastane kompleks, ki se glede na vsebnost fenolnih spojin obarva modro in ga je kogoče določiti z UV/VIS spektrofotometrom. Za referenčni faktor je bila uporabljena galna kislina, zato se vsebnost skupnih fenolov podaja v miligramih galne kisline na gram vzorca (Gračnar, 2018).

### 2.5.5 Tekočinska kromatografija z masno spektrometrijo (LC/MS)<sup>2</sup>

Kromatografija je separacijski postopek, ki deluje na osnovi porazdelitve komponent v mešanici med mobilno in stacionarno fazo. Mobilna faza – tekočina, plin ali superkritični fluid

---

<sup>2</sup> Povzeto po Gračnar, 2018

potuje skozi stacionarno fazo, ta je lahko trdna snov ali tekočina. Porazdelitev komponent je odvisna od adsorpcije, ionskih interakcij, difuzije in topnosti komponent, ki jih želimo ločiti. Glede na tip mobilne in stacionarne faze, se metoda kromatografije lahko razdeli na 3 skupine: plinska kromatografija, tekočinska kromatografija in kromatografija s superkritičnimi fluidi.

Parametri, s katerimi opisujemo ločevanje komponent na kromatografski koloni so: retencijski čas in volumen, število teoretskih podov in selektivnost.

V raziskovalni nalogi smo vzorce analizirali s tekočinsko kromatografijo z masno spektrometrijo (LC-MS/MS). Po ločitvi na tekočinski kromatografiji, se molekule ionizirajo in prehajajo skozi niz magnetov. Ta molekule se dodatno ločijo glede na razmerje med maso in njihovo napetostjo v masnem detektorju.

## 2.5.6 Antioksidanti in njihovo delovanje proti ROS

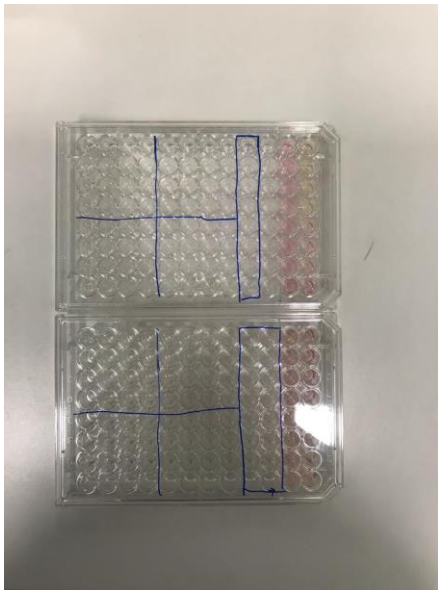
Antioksidanti so snovi, ki lahko preprečijo ali upočasnijo poškodbe celic, ki jih povzročajo prosti radikali, nestabilne molekule, ki jih telo ustvari kot reakcijo na pritiske iz okolja in druge. Viri antioksidantov so lahko naravni ali umetni. Nekatera živila na rastlinski osnovi naj bi bila bogata z antioksidanti. Tudi telo proizvaja nekatere antioksidante, to so endogeni antioksidanti. Antioksidanti, ki prihajajo iz okolja, pa se imenujejo eksogeni antioksidanti.

Prosti radikali so odpadne snovi, ki jih proizvajajo celice, ko telo predela hrano. Če telo ne more učinkovito predelati in odstraniti prostih radikalov, lahko pride do oksidativnega stresa. To lahko škoduje celicam in telesnemu delovanju. Znani so tudi kot reaktivne kisikove vrste (ROS). Dejavniki, ki povečajo proizvodnjo prostih radikalov v telesu, so lahko notranji, na primer vnetja, ali zunanji, na primer onesnaženje, izpostavljenost UV in cigaretni dim. Oksidativni stres je povezan z boleznimi srca, rakom, artritisom, možgansko kapjo, boleznimi dihal, imunski pomanjkanjem, Parkinsonovo boleznijo in drugimi vnetji.

Antioksidanti naj bi pomagali nevtralizirati proste radikale v našem telesu, kar naj bi izboljšalo splošno zdravje (Antioxidants, s.a.).

### 2.5.7 DCFH-da in vitro

Diklorofluorescein (DCF) je organsko barvilo družine fluoresceinov. Uporablja se pri testu celičnega antioksidativnega delovanja. Diklorofluorescin (DCFH) je sonda, ki je ujeta znotraj celic in se zlahka oksidira v fluorescenčni diklorofluorescein (DCF) (Dichlorofluorescein, s.a.).



Slika 3: Metoda DCFH (lastni vir)

## 2 EKSPERIMENTALNI DEL

---

Liofiliziran rastlinski material, uporabljen pri vseh ekstrakcijah, smo pridobili iz Fakultete za kmetijstvo in biosistemske vede.

### 3.1 Ekstrakcije s Soxhletovim aparatom

Zaradi velikega števila vzorcev, a majhne količine le-teh, smo s Soxhletovim aparatom ekstrahirali 7 vzorcev (V5, V6, V7, V8, V9, V14, in V16).

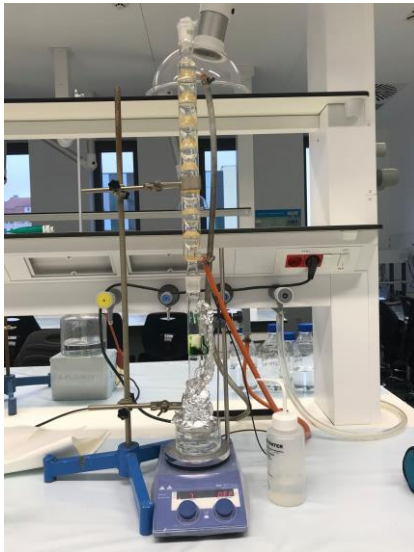
Za ekstrakcije smo uporabili 1 gram liofiliziranega rastlinskega materiala, ki smo mu dodali 50 ml metanola. Aparaturo smo prekrili z aluminijasto folijo, da bi minimizirali toplotne izgube. Ekstrakcijsko topilo smo v bučki segrevali s pomočjo grelne plošče do 80°C ( $\pm 1$  °C). Kondenzat, ki se je nabiral v zgornjem delu aparature, je kapljal na trdno zmes v tulcu, pri čemer je



nastajala raztopina. Ko je raztopina nastavek napolnila do vrha, je po principu natege stekla nazaj v bučko, kjer so se nabirale ekstrahirane spojine, postopek pa se je ponovil.

Ob ekstraktu se v bučki nabere tudi topilo, ki smo ga odstranili s pomočjo rotavaporja.

Po odstranitvi topila, smo ekstrakte postrgali iz sten bučk, jih zatehtali v steklene posodice in jih shranili v hladilniku ter tako preprečili potencialno razgradnjo ekstrahiranih aktivnih komponent.



Slika 4: Ekstrakcija s Soxhletovim aparatom (lastni vir)

## 3.2 Ekstrakcija s pomočjo ultrazvočne kopeli

V primeru ekstrakcije s pomočjo ultrazvočne kopeli smo v centrifugirko zatehtali 0,5 grama materiala in dodali 25 mililitrov metanola za izvedbo prve ekstrakcije, v primeru druge pa smo pripravili raztopino vode in metanola v razmerju 1:1. V primeru tretje ekstrakcije (za njo smo uporabili samo dva vzorca, in sicer V24 in V25) pa smo materialu dodali 25 mililitrov destilirane (Milli – Q) vode. Ekstrakcije so potekale 2 uri.

Po končani ekstrakciji, smo vzorce prefiltrirali s pomočjo mikrofiltrirnih in vakuuma, v primeru ekstrakcije z vodo, da smo ločili raztopino topila z ekstrahiranimi snovmi in trdni rastlinski material. Nato smo odparili topilo s pomočjo rotavaporja.

Po končani ekstrakciji, smo ekstrakte shranili v hladilniku, da preprečimo potencialno razgradnjo ekstrahiranih komponent.

### 3.3 Tekočinska kromatografija z masno spektrometrijo (LC/MS)

Izbrali smo 3 fenolne spojine, in sicer rutin, hesperidin in klorogensko kislino. Na podlagi standardov smo določili njihovo prisotnost in vsebnost določili z masno spektrometrijo LC/MS.

Da bi lahko kvantificirali posamezne fenolne spojine v vzorcih, je za vsakega bilo potrebno pripraviti umeritveno krivuljo. V 10 mL bučko smo zatehtali 2 mg standarda in bučko napolnili do oznake z metanolom.

V 10 mL bučko smo zatehtali 50 mg ekstrakta in do oznake dolili metanol. Raztopine smo prefiltrirali v vialo. Analize so potekale na tekočinskem kromatografu Agilent 1200 z masnim spektrometrom Agilent 6460 JetStream s trojnim kvadrupolom. Separacija komponent je bila izvedena na kromatografski koloni Agilent Poroshell C18 (dimenzij 150 x 4,6 mm z delci 2,7  $\mu\text{m}$ ) s pomočjo mobilne faze voda in acetonitril z dodano mravljično kislino v deležu 0,1 vol. %. Pretok mobilne faze je bil 0,4 mL/min.

Masne koncentracije smo glede na zatehto ekstrakta in maso materiala izračunali s pomočjo sledečih enačb:

$$\omega(komp.) = \frac{c(komp.)}{\gamma(ekst.) \times 10}$$

$$\omega(komp.) = \frac{\omega(komp.) \times \eta}{100}$$

kjer je:

$\omega(komp.)$  vsebnost fenolne komponente v ekstraktu [mg(komp.)/100 g(ekst.)]

$c(komp.)$  koncentracija fenolne komponente [mg(komp.)/100 g(mat.)]

$\gamma(ekst.)$  masna koncentracija ekstrakta v raztopini vzorca [mg/mL]

$\eta$  izkoristek ekstrakta [%]

### 3.4 Določanje vsebnosti skupnih fenolov v ekstraktih

Najprej smo si morali pripraviti raztopine reagentov. Raztopino FC smo pripravili tako, da smo ga razredčili z destilirano v razmerju 1:10. nato smo pripravili še raztopino natrijevega (V) karbonata, in sicer tako, da smo v 50 ml merilno bučko zatehtali 3,75 g  $Na_2CO_3$  in do oznake razredčili z destilirano vodo. Pripravljeni raztopini reagentov smo za nekaj časa dali na ultrazvočno kopel, da se je vse dobro premešalo in raztopilo.

Za kvantifikacijo skupnih fenolov se uporablja galna kislina, zato smo morali pripraviti umeritveno krivuljo. V 10 ml bučko smo zatehtali 4 g galne kisline in do oznake razredčili z metanolom. Iz osnovne raztopine (0,4 mg GA/ml) smo pripravili 5 razredčin s koncentracijami 5 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,1mg/ml in 0,01mg/ml. 10  $\mu$ l vsake raztopine smo odpipetirali na mikrotitrsko ploščo, dodali 150  $\mu$ l FC reagenta in 120  $\mu$ l  $Na_2CO_3$  ter termostatirali 5 minut pri 50 °C. Kot kontrolni vzorec smo namesto galne kisline odpipetirali metanol, ki smo mu v enakem razmerju dodali FC reagent in  $Na_2CO_3$ .

Raztopine smo ohladili in jim s spektrofotometrom izmerili absorbanco pri 760nm. Na osnovi izmerjenih absorbanc smo lahko izrisali graf odvisnosti absorbance od masne koncentracije galne kisline.

Vzorci smo pripravili tako, da smo v steklene bučke zatehtali 50 miligramov materiala in jih do oznake razredčili z metanolom. Za nekaj časa smo ekstrakte dali na ultrazvočno kopel, da so se v celoti raztopili. Nato smo 10  $\mu$ l vzorca odpipetirali na mikrotitrsko ploščo, dodali 150  $\mu$ l FC reagenta in 120  $\mu$ l  $Na_2CO_3$  ter termostatirali 5 minut pri 50 °C. Raztopine smo nato ohladili in izmerili absorbance pri valovni dolžini 760 nm. Vsebnost skupnih fenolov smo izračunali s pomočjo umeritvene krivulje po naslednji enačbi:

$$\gamma = \frac{Abs - b}{a}$$

kjer je:

$\gamma$ GA      masna koncentracija galne kisline [mg/mL]

Abs      izmerjena absorbanca pri valovni dolžini 760 nm

b      odsek premice umeritvene krivulje na ordinati

$a$  naklon premice umeritvene krivulje

Vsebnost skupnih fenolov se izraža v mg GA na 100 g ekstrakta, po naslednji enačbi:

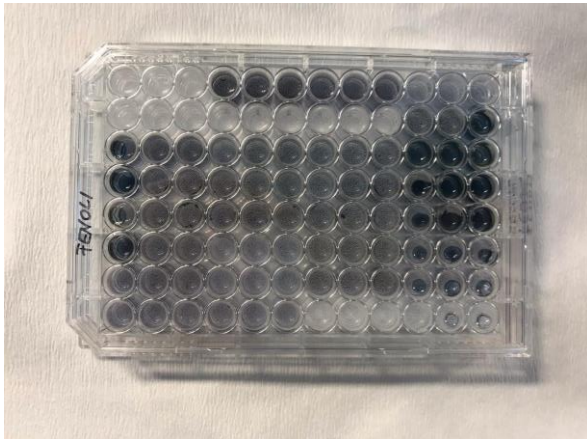
$$\omega_{GA(ekst.)} = \frac{\gamma_{GA}}{\gamma_{ekst.}} \times 10^5$$

kjer je:

$\omega_{GA(ekst.)}$  vsebnost totalnih fenolov v ekstraktu [mgGA/100 g ekstrakta]

$\gamma_{GA}$  koncentracija GA v raztopini [mg/mL]

$\gamma_{ekst.}$  masna koncentracija ekstrakta v raztopini vzorca [mg/mL]



Slika 5: Test fenolnih spojin (lastni vir)

### 3.5 Antioksidacijska učinkovitost

Antioksidacijsko učinkovitost smo določali z uporabo prostega radikala DPPH.

Najprej smo si pripravili raztopino DPPH tako, da smo v 50 ml merilno bučko zatehtali 1,96 g DPPH in z metanolom razredčili do oznake. Raztopino smo dali na ultrazvočno kopel in s tem zagotovili, da se bo DPPH v celoti raztopil.

Nato je bilo potrebno pripraviti ekstrakte. Želeli smo določiti masno koncentracijo ekstrakta, ki bo povzročila 50 % inhibicijo, zato smo iz osnovne raztopine ekstrakta pripravili naslednje masne koncentracije: 5 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,1mg/ml in 0,01mg/ml; za referenčni vzorec smo uporabljali metanol. 10 µl vsakega ekstrakta smo odpipetirali na mikrotitrsko ploščo in dodali 200 µl raztopine DPPH. Mikrotitrsko ploščo smo na sobni temperaturi pustili v temi 15 minut. Vzorcem smo nato izmerili absorbance pri valovni dolžini 517 nm.

Antioksidacijska učinkovitost vzorcev se računa po naslednji enačbi:

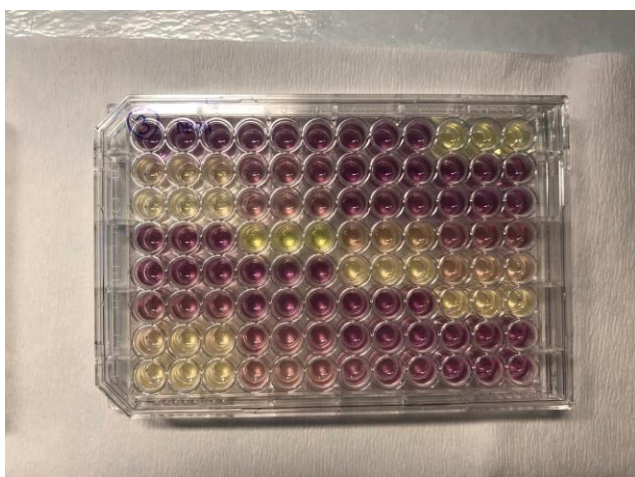
$$\% \text{ inhibicije} = \frac{(A^{\circ} - A')}{A^{\circ}} \times 100$$

kjer je:

$A^{\circ}$  absorbanca referenčne raztopine

$A'$  absorbanca ekstraktov po 15 minutah

Po enačbi smo izračunali antioksidacijsko učinkovitost vseh razredčin ekstraktov in iz dobljenih rezultatov izrisali diagram odvisnosti inhibicije DPPH od masne koncentracije raztopine (predstavljeno v prilogah).



Slika 6: DPPH analiza (lastni vir)

### 3.6 Gojenje celic MCF-7

Za gojenje celic MCF-7 smo uporabljali rdečefenolni medij (DMEM/F-12 medij), ki ne vsebuje beljakovin, lipidov ali rastnih faktorjev, zato ga dopolnjujemo z 10% FBS (fetalnim govejim serumom). Celice, zamrznjene pri  $-81^{\circ}\text{C}$  odmrzemo v vodni kopeli pri  $37^{\circ}\text{C}$ . Medtem ko se celična kultura, medij ter rastni faktor segrevajo do optimalne temperature, pripravimo delovno površino laminarija, tako da jo obrišemo z etanolom in jo tako razkužimo. V centrifugirko odpipetiramo 9ml celičnega medija in 1ml celične kulture, ter ju premešamo s pomočjo pipete. Zmes nato centrifugiramo 5min pri 330 g. Po centrifugiranju celični kulturi menjamo medij, tako da izlijemo starega in dodamo 10 ml novega ( 9ml medija in 1ml 10% FBS), zmes pa prestavimo v posodico za gojenje celičnih kultur. Celično kulturo inkubiramo v inkubatorju pri  $37^{\circ}\text{C}$  v atmosferi s 5%  $\text{CO}_2$ .

Tekom gojenja celično kulturo obnavljamo z menjavanjem medija po opisanem postopku.

Po dveh tednih gojenja celične kulture je čas, da celice odlepimo iz dna posode s pomočjo encima tripsina. Podobno kot prej celični medij, rastni faktor in tripsin segrevamo v vodni kopeli do  $37^{\circ}\text{C}$ . Iz stekleničke s celično kulturo odlijemo medij, celice pa ostanejo na dnu posode. V posodico dodamo 2ml tripsina in inkubiramo 5 minut pri temperaturi  $37^{\circ}\text{C}$  v atmosferi s 5%  $\text{CO}_2$ . Vsebino stekleničke prenesemo v centrifugirko in centrifugiramo 5 minut pri 330 g. V centrifugirko dodamo 3ml rdečefenolnega medija (DMEM/ F-12), premešamo z vortexom in tekočino odlijemo. Kar ostane v centrifugirki ponovno centrifugiramo. Nato celični kulturi dodamo 9ml medija in 1ml 10% FBS, zmes premešamo s pomočjo pipete, prestavimo v posodico za gojenje celičnih kultur in inkubiramo pri  $37^{\circ}\text{C}$  v atmosferi s 5%  $\text{CO}_2$ .

### 3.7 Merjenje znotrajceličnega antioksidativnega potenciala

Preden lahko začnemo na celice nanašati ekstrakte, jih je potrebno tripsinizirati (po prej opisanem postopku). Tripsinizirani celični kulturi smo dodali 10,8 ml medija (DMEM/ F-12) in 1,2 ml FBS ter jih s pomočjo multikanalske pipete prenesli na 2 mikrotitrski plošči tako, da smo v vsak vodnjaček prenesli 100  $\mu\text{l}$  celične kulture.

Nato je potrebno odstraniti star medij, to storimo s pomočjo multikanalske pipete, ter dodati 100 µl novega (WILL) medija. Ekstrakte V6, V9, V17 in V24 smo na celice nanašali v 4 različnih razredčinah, in sicer 1:2, 1:4, 1:8 in 1:16, za kontrolo pa smo uporabili vodo. Mikrotitrne plošče inkubiramo pri 37 °C približno uro in pol. iz mikrotitrnih plošč se nato odstranijo star medij in ekstrakti, vsak posamezni vodnjaček pa speremo s pufrom PBS. Pripravimo zmes celičnega medija (WILL) in reagenta DCF, tako da 20 ml medija dodamo 100 µl reagenta. V vsak vodnjaček nato dodamo po 100 µl zmesi ter inkubiramo približno eno uro.

Po inkubaciji s pomočjo fluorometrije izmerimo antioksidativni potencial znotraj celične kulture. Pred meritvenim procesom nastavimo ustrezne vrednosti, in sicer ekscitacija poteka pri 504 nm, emisija pa pri 523 nm.

## 4 REZULTATI

V nadaljevanju bomo uporabljali sledeč način poimenovanja.

Tabela 1: Poimenovanje vzorcev

Oznaka vzorca	Pogoji obdelave	Uporabljeno topilo	Ime vzorca
V1	Ekstrakcija z uporabo ultrazvočne kopeli	Metanol	2/1 <i>M. alba x rubra</i>
V2	Ekstrakcija z uporabo ultrazvočne kopeli	Metanol	3/1 <i>Seedles Big Ten</i>
V3	Ekstrakcija z uporabo ultrazvočne kopeli	Metanol	83 Florio
V4	Ekstrakcija z uporabo ultrazvočne kopeli	Metanol	M.nigra 1/1
V5	Ekstrakcija po Soxhletu	Metanol	233 NG 218
V6	Ekstrakcija po Soxhletu	Metanol	2/1 <i>M. alba x rubra</i>
V7	Ekstrakcija po Soxhletu	Metanol	83 Florio
V8	Ekstrakcija po Soxhletu	Metanol	M. nigra 1/1

V9	Ekstrakcija po Soxhletu	Metanol	3/1 Seedles Big Ten
V10	Ekstrakcija z uporabo ultrazvočne kopeli	Metanol	24 Kokuso
V11	Ekstrakcija z uporabo ultrazvočne kopeli	Metanol	136 P/251
V12	Ekstrakcija z uporabo ultrazvočne kopeli	Metanol	169 BK 8
V13	Ekstrakcija z uporabo ultrazvočne kopeli	Metanol	233 NG 218
V14	Ekstrakcija po Soxhletu	Metanol	169 BK 8
V15	Ekstrakcija z uporabo ultrazvočne kopeli	Metanol	M. nigra 1/1
V16	Ekstrakcija po Soxhletu	Metanol	24 Kokuso
V17	Ekstrakcija z uporabo ultrazvočne kopeli	50 % metanol	3/1 Seedles Big Ten
V18	Ekstrakcija z uporabo ultrazvočne kopeli	50 % metanol	233 NG 218
V19	Ekstrakcija z uporabo ultrazvočne kopeli	50 % metanol	169 BK 8
V20	Ekstrakcija z uporabo ultrazvočne kopeli	50 % metanol	136 P/251
V21	Ekstrakcija z uporabo ultrazvočne kopeli	50 % metanol	24 Kokuso
V22	Ekstrakcija z uporabo ultrazvočne kopeli	50 % metanol	83 Florio
V23	Ekstrakcija z uporabo ultrazvočne kopeli	50 % metanol	2/1 <i>M. alba x rubra</i>
V24	Ekstrakcija z uporabo ultrazvočne kopeli	Voda	24 Kokuso



V25	Ekstrakcija z uporabo ultrazvočne kopeli	Voda	83 Florio	
-----	--	------	-----------	--

Sledeča tabela prikazuje vhodne mase vzorcev za ekstrakcije in izkoristke posameznih ekstraktov.

Izkoristki ekstracij so bili izračunani po naslednji enačbi:

$$\% \text{ izkoristek} = \frac{\text{masa ekstrakta (g)}}{\text{masa obdelanega materiala (g)}} \times 100$$

Iz preglednic je razvidno, da so izkoristki ekstracij po Soxhletu višji od izkoristka ekstraktov, ekstrahiranih z ultrazvočno kopelijo.

Tabela 2: Vhodne mase vzorcev za ekstrakcijo [mg] in izkoristki ekstraktov [%]

Vzorec	Masa vhodnega materiala za ekstrakcijo [mg]	Izkoristek ekstrakta [%]
V1	51,01	26,0
V2	49,44	22,8
V3	50,57	20,8
V4	50,09	21,6
V5	1000	
V6	1000	53,6
V7	1000	11,9
V8	1003	21,5
V9	1000	11,6
V10	52,15	23,6
V11	51,7	25,0
V12	50,99	26,0

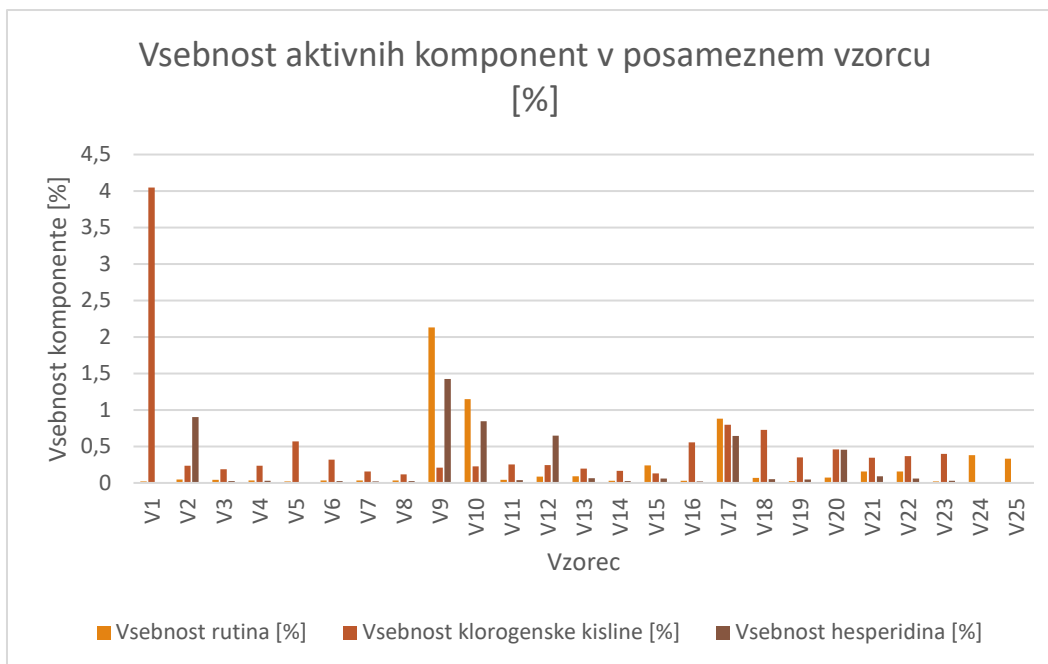
V13	49,08	17,2
V14	1000	25,7
V15	51,09	23,9
V16	1000	25,4
V17	50,49	21,0
V18	50,23	20,4
V19	51,57	18,6
V20	48,39	17,9
V21	49,71	24,1
V22	52,06	17,9
V23	46,21	20,5
V24	15,92	
V25	50,31	

Vsebnosti rutina, hesperidina in klorogenske kisline so predstavljene v naslednji preglednici.

Tabela 3: Vsebnost aktivnih komponent v posameznih ekstraktih [%]

<b>Vzorec</b>	<b>Vsebnost rutina [%]</b>	<b>Vsebnost klorogenske kisline [%]</b>	<b>Vsebnost hesperidina [%]</b>
V1	0,0211	4,0485	0,0138
V2	0,0486	0,2359	0,9036
V3	0,0419	0,1891	0,0248
V4	0,0361	0,2351	0,0294
V5	0,021	0,5706	0,0143
V6	0,0325	0,3176	0,0246
V7	0,0319	0,1554	0,023
V8	0,0361	0,1178	0,0235

V9	2,1310	0,2086	1,4254
V10	1,1484	0,2266	0,8447
V11	0,0444	0,2527	0,0381
V12	0,0882	0,2433	0,6498
V13	0,0915	0,1972	0,0643
V14	0,0298	0,1644	0,0267
V15	0,2393	0,1295	0,0609
V16	0,0317	0,5543	0,023
V17	0,8802	0,7995	0,6427
V18	0,0691	0,7266	0,0512
V19	0,0247	0,3501	0,0462
V20	0,0727	0,4580	0,4542
V21	0,1589	0,3464	0,0891
V22	0,1578	0,3694	0,0597
V23	0,0217	0,3961	0,0288
V24	0,3786	0,0002	0,0000
V25	0,3337	0,0018	0,0000



Grafikon 1: Vsebnost aktivnih komponent v posameznem vzorcu [mg/mL]

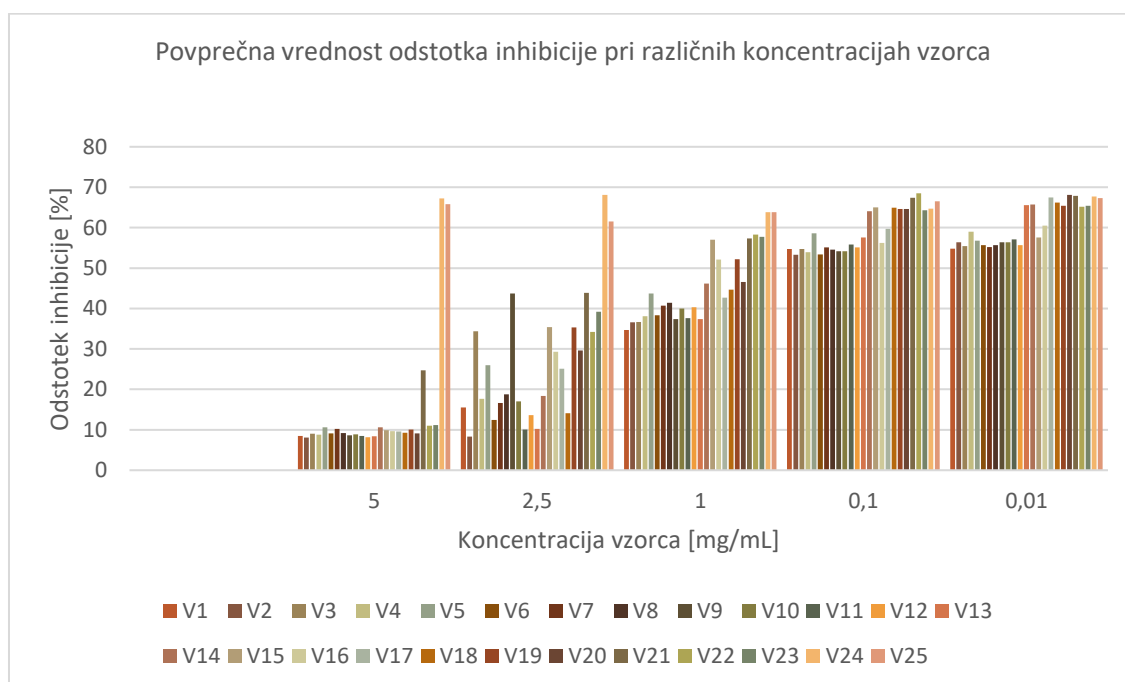
V preglednicah, zbranih v prilogi, so prikazani podatki sprememb absorbanca DPPH po dodatku 10 µl ekstraktov pri različnih koncentracijah za vsak posamezni vzorec. Odstotek inhibicije je bil izračunan po enačbi, prikazani v razdelku 3.4.

Tabela 4: Povprečna vrednost odstotka inhibicije pri različnih koncentracijah vzorca [mg/ml]

Vzorec	Povprečna vrednost odstotka inhibicije pri različnih koncentracijah vzorca [mg/mL]				
	5	2,5	1	0,1	0,01
V1	8,5	15,53	34,7	54,7	54,8
V2	8,1	8,3	36,6	53,3	56,4
V3	9,0	34,4	36,7	54,7	55,4
V4	8,8	17,7	38,1	53,9	59,0
V5	10,6	26,0	43,7	58,6	56,8
V6	9,1	12,4	38,3	53,4	55,7
V7	10,2	16,6	40,7	55,1	55,2
V8	9,2	18,8	41,4	54,6	55,7
V9	8,6	43,7	37,4	54,2	56,4
V10	8,9	17	40	54,2	56,4
V11	8,5	10,1	37,6	55,8	57,1
V12	8,2	13,6	40,3	55,1	55,7
V13	8,4	10,2	37,4	57,6	65,6

V14	10,6	18,4	46,2	64,1	65,7
V15	9,9	35,4	57	65	57,6
V16	9,7	29,3	52,1	56,2	60,5
V17	9,6	25,1	42,7	59,7	67,5
V18	9,3	14,1	44,7	64,9	66,2
V19	10,1	35,3	52,2	64,6	65,4
V20	9,1	29,6	46,6	64,6	68,1
V21	24,7	43,9	57,3	67,4	67,9
V22	11,0	34,2	58,3	68,5	65,2
V23	11,2	39,2	57,7	64,3	65,4
V24	67,2	68,1	63,8	64,7	67,7
V25	65,8	61,5	63,8	66,5	67,3

Naslednji graf prikazuje povprečno vrednosti odstotka inhibicije pri različnih koncentracija ekstrakta.

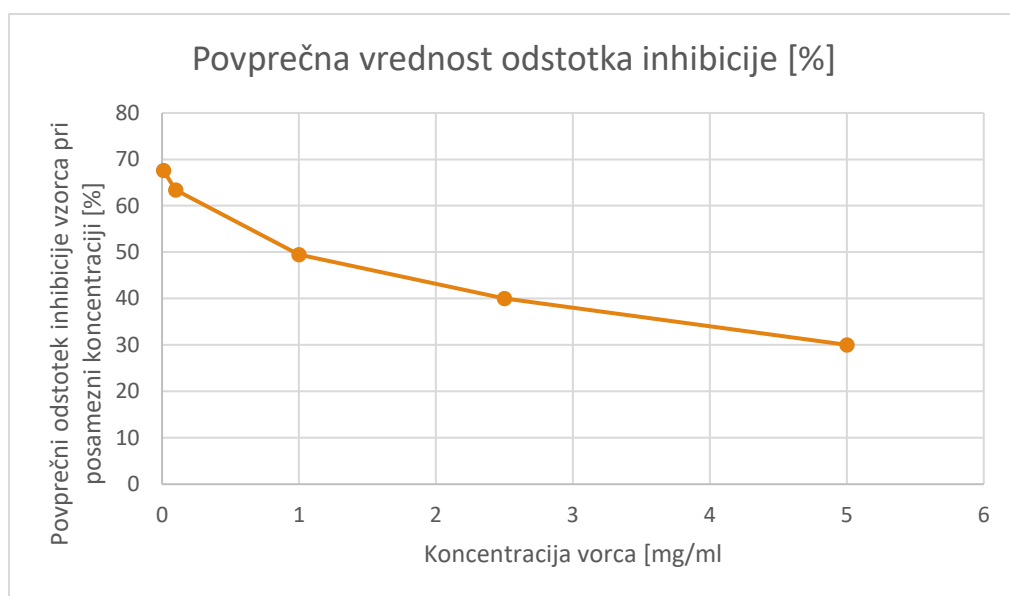


Grafikon 2: Povprečna vrednost odstotka inhibicije pri različnih koncentracijah vzorca

Iz grafa je razvidno, da so ekstrakti 50 % inhibicijo večinoma dosegali pri koncentraciji 1 mg/ml. Inhibicijo, višjo od 50 % pa sta pri vseh koncentracijah izkazovala vzorca V24 in V25.

Poudariti je treba, da smo z DPPH metodo določili antioksidacijsko učinkovitost metanolnih vzorcev. Ko smo ekstrakte nanašali na celice, smo uporabili vodne ekstrakte, saj bi metanolni ekstrakti celice uničili. Zaradi različne polarnosti topil predvidevamo, da so se ekstrahirale različne komponente, zato smo pri 2 vzorcih (V24 in V25) kot topilo uporabili vodo.

Antioksidacijsko učinkovitost smo primerjali z vrednostmi, ki jih je pri istih koncentracijah dal BHT. Rezultati so prikazani na spodnjem grafikonu. Opazimo, da ekstrakti vzorcev z najvišjim odstotkom inhibicije vrednosti presegajo v koncentracijah 5 mg/mL, 2,5 mg/mL in 1 mg/mL.



Grafikon 3: Povprečna vrednost odstotka inhibicije BHT pri posameznih koncentracijah [%]

V tabeli 6 je prikazana vsebnost celokupnih fenolov, izračunanih po enačbi iz razdelka 3.4

Tabela 5: Vsebnost skupnih fenolov v posameznih vzorcih [mg GA/100 g ekstrakta]

Vzorec	Vsebnost skupnih fenolov [mg GA/100 g ekstrakta]
1	71158,3
2	94655,9
3	66789,4
4	64760

5	70852,7
6	89844,4
7	77076,9
8	71699,6
9	93803,9
10	71685,8
11	93011,6
12	85725,5
13	99020,4
14	128622
15	48313,7
16	82204,1
17	63492,1
18	85259
19	55175,1
20	97933,9
21	52409,6
22	71500
23	65520
24	20520
25	26240

Sledeča razpredelnica prikazuje izmerjeno fluorescenco vzorcev V6, V9, V17 in V24 pri različnih razredčinah (1:2, 1:4, 1:8 in 1:16) prve ponovitve.

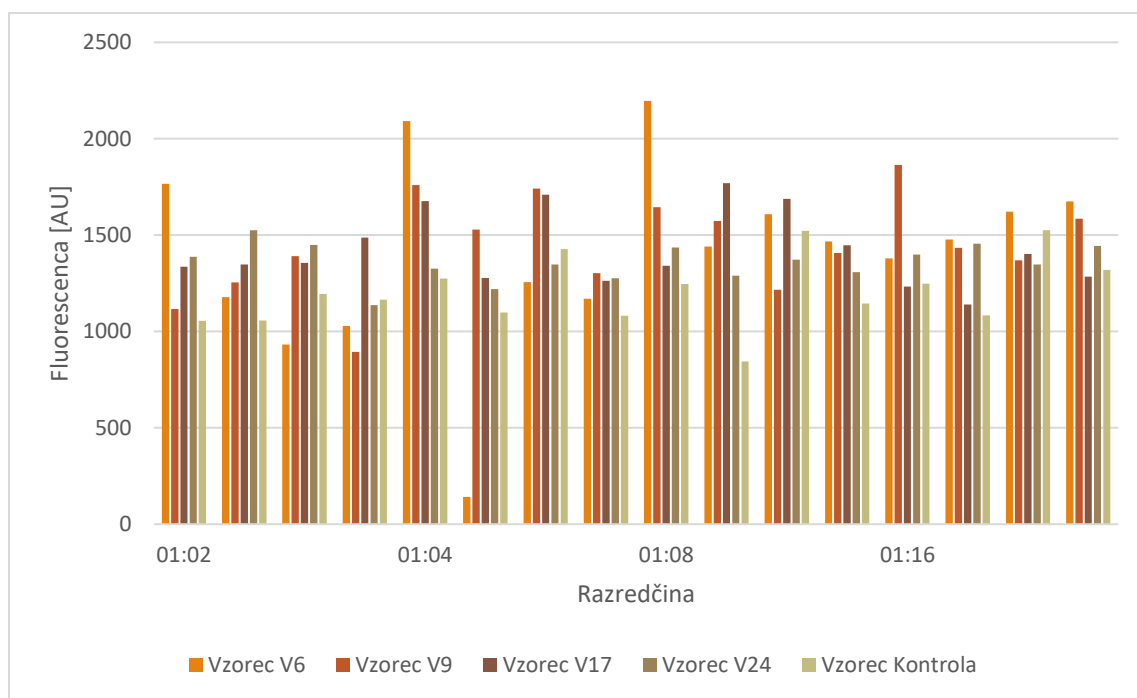
**Tabela 6: Fluorescenca vzorcev pri posameznih razredčinah [AU] (1. ponovitev)**

	<b>Fluorescenca [AU]</b>			
--	------------------------------	--	--	--

	<b>Vzorec</b>				
<b>Razredčina</b>	V6	V9	V17	V24	Kontrola
1:2	1765,26	1117,11	1335,96	1387,03	1055,55
	1178,47	1254,27	1347,81	1524,96	1056,23
	931,788	1390,91	1356,2	1448,22	1194,44
	1029	894,342	1486,48	1136,09	1165,43
1:4	2092,11	1759,38	1676,99	1325,21	1273,55
	141,82	1528,17	1277,89	1219,21	1098,14
	1255,93	1740,97	1709,62	1346,86	1427,26
	1170,22	1302,56	1262,7	1275,89	1081,72
1:8	2196,03	1644,37	1339,99	1435,55	1245,99
	1440,2	1573,83	1768,59	1289,21	843,643
	1608,77	1217,06	1687,62	1372,96	1521,73
	1466,85	1406,79	1447,47	1307,9	1145,03
1:16	1379,78	1863,82	1233,4	1398,55	1247,2
	1476,38	1433,6	1139,09	1456,09	1082,85
	1621,22	1368,94	1402,24	1347,61	1525,47
	1675,3	1584,17	1284,83	1443,18	1318,65

Iz spodnjega grafa je razvidno, da najvišjo fluorescenco in s tem znotrajcelično antioksidativno učinkovitost izkazuje vzorec V6, pri razredčini 1:4.





Grafikon 4: Fluorescenca vzorcev pri posameznih razredčinah [AU] (1. ponovitev)

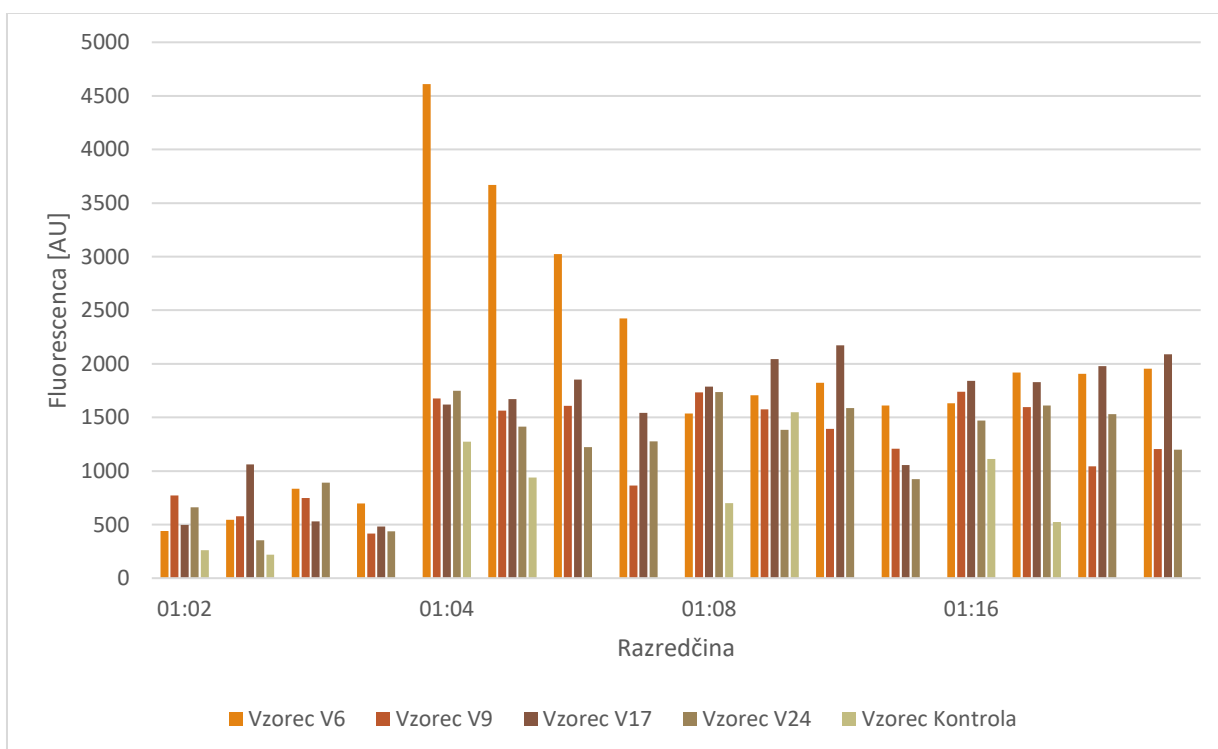
Tabela prikazuje drugo ponovitev merjenja fluorescence.

Tabela 7: Fluorescenca vzorcev pri posameznih koncentracijah [AU] (2. ponovitev)

	Fluorescenca [AU]				
	Vzorec				
Razredčina	V6	V9	V17	V24	Kontrola
1:2	439,132	771,462	496,341	660,418	260,328
	544,964	576,127	1062,41	353,239	219,168
	833,034	748,903	528,528	891,911	/
	697,913	415,307	482,867	435,685	/
1:4	4609,65	1676,02	1620,94	1749,36	1274,42
	3668,87	1562,88	1670,11	1414,11	938,218
	3022,57	1609,29	1854,42	1223,21	/
	2424,55	865,308	1543,82	1276,12	/
1:8	1535,06	1732,58	1786,47	1735,25	699,238
	1707,61	1574,77	2043,37	1383,56	1547,43

	1822,59	1393,33	2171,58	1588,44	
	1610,67	1208,84	1056,33	924,751	
1:16	1632,08	1738,09	1842,44	1469,42	1112,09
	1919,23	1595,89	1829,84	1611,67	523,959
	1908,09	1042,51	1977,23	1529,65	
	1955,87	1205,22	2090,13	1198,72	

Ponovno lahko razberemo, da najvišjo fluorescenco da vzorec V6 pri razredčini 1:4.



Grafikon 5: Fluorescenca vzorcev pi posameznih koncentracijah [AU] (2. ponovitev)

## 5 RAZPRAVA

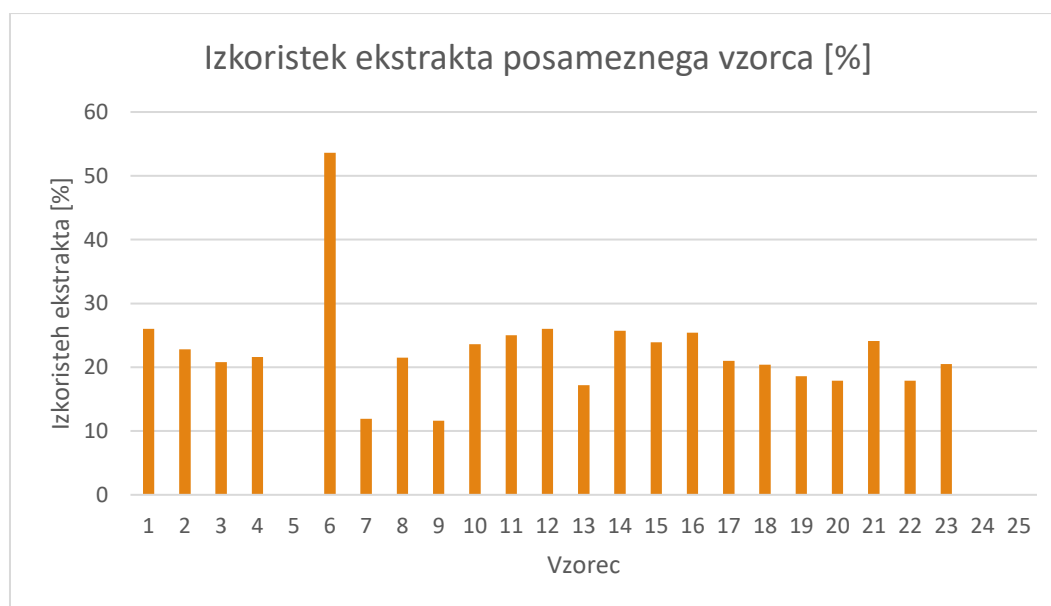
### 5.1 Izkoristki ekstraktov

Rastlinski material, obdelan z ekstrakcijo po Soxhletu, obsega 7 vzorcev (V5, V6, V7, V8, V9, V14 in V16), kot topilo smo uporabili metanol. Iz grafa 6 lahko razberemo, da so vrednosti

izkoristka ekstraktov, pridobljenih po Soxhletu, v povprečju višje od tistih, ekstrahiranih s pomočjo ultrazvočne kopeli. Najvišji izkoristek je dal vzorec V6, in sicer 53,6 %.

V primeru ekstrakcije s pomočjo ultrazvočne kopeli smo kot topilo uporabili metanol, 50 % metanol, oziroma vodo. Ekstrakcije so potekale 2 uri. Vrednosti izkoristkov, ekstrahiranih s pomočjo ultrazvočne kopeli s topilom metanol, so se gibale okoli 20 %, najmanjši izkoristek je dal vzorec V13 (17,2 %) , največji pa vzorec V16 (26 %) v primeru ekstrakcije. V primeru ekstrakcij s pomočjo ultrazvočne kopeli in topilom 50 % metanol, je najvišji izkoristek bil zabeležen pri vzorcu V21 (24,1 %), najnižji pa pri vzorcu V20 in V22, ki sta dala enak izkoristek (17,9 %).

Zaključimo lahko, da so preiskovane ekstrahirane aktivne komponente po polarnosti bližje metanolu, kot 50 % metanolu, saj so izkoristki tako v primeru ekstrakcije po Soxhletu in s pomočjo ultrazvočne kopeli bili večji.



Grafikon 6: Izkoristek ekstrakta posameznega vzorca [%]

## 5.2 Antioksidacijska učinkovitost

AOU smo določali s prostim radikalom DPPH, ki s pomočjo antioksidacijskih spojin reducira do DPPH<sub>2</sub>. Ob prisotnosti reducentov, torej antioksidantov, absorbanca vzorcev s časom pada. Iz grafov, ki prikazujejo odstotek inhibicije posameznega vzorca (prikazani v prilogah) pri različnih koncentracijah, lahko opazimo trend zmanjševanja odstotka inhibicije z višanjem

koncentracije ekstrakta, tako smo največji odstotek inhibicije večinoma opazili pri koncentraciji 0,01 mg/ml. Zdaleč najvišjo AOU sta pri koncentraciji 5 mg/ml izkazovala vzorca V24 in V25, in sicer 67,2 % in 65,8 %. Vzorec V24 in V25 sta oba bila ekstrahirana s pomočjo ultrazvočne kopeli, kot topilo pa smo uporabili vodo.

Po nadaljnji analizi pa ugotovimo, da pri t.i. najučinkovitejših vzorcih (torej V24 in V25) pride do spremembe trenda. AOU z višanjem koncentracije sprva pada, v primeru V24 in potem ponovno naraste pri koncentraciji 1 mg/ml, pri koncentraciji 2,5 mg/ml pa začne ponovno padati, medtem ko v primeru vzorca V25 lahko opazimo, da AOU ponovno začne naraščati pri koncentraciji 2,5 mg/ml.

Podoben trend lahko zasledimo tudi pri vzorcema V9 in V14, pri katerih AOU naraste pri koncentraciji 2,5 mg/ml, nato pa ponovno pade. Oba vzorca sta bila ekstrahirana po Soxhletu, za topilo pa je bil uporabljen metanol.

Najslabše delovanje pri koncentraciji 5 mg/ml je izkazoval vzorec V2, prav tako pri koncentraciji 2,5 mg/ml in 0,1 mg/ml. Vzorec V2 je bil ekstrahiran z uporabo ultrazvočne kopeli, za topilo smo uporabili metanol. Najnižjo AOU pri koncentracijah 1 mg/ml in 0,01 mg/ml pa je izkazoval vzorec V1. Vzorec V1 je bil ekstrahiran s pomočjo ultrazvočne kopeli, za topilo je bil uporabljen metanol. Vzorec V1 predstavlja primer križanca med belo in rdečo murvo.

### 5. 3 DCFH test

Iz rezultatov testa DCFH-da je razvidno, da imajo skoraj vsi izbrani vzorci (V6, V9 in V17) antioksidativni potencial. Najvišji antioksidativni potencial so vzorci izkazovali pri razredčinah 1:2 in 1:4. Iz tega lahko sklepamo, da je pri razredčinah 1:8 in 1:16 vzorec pretirano razredčen, oziroma se njegova sestava bliža sestavi kontrole, torej mediju samemu in celične rasti zato ne zatira v tolikšni meri.

Največje zaviranje je pri obeh ponovitvah testa izkazal vzorec V6, s pripombo, da so bili rezultati druge ponovitve znatno višji, njihova povprečna vrednost pa presega najvišjo izmerjeno vrednost prve ponovitve. Vzorec V6 je bil pridobljen z ekstrakcijo po Soxhletu, za topilo pa je bil uporabljen metanol. Vzorec V6 vsebuje sorazmeroma nizko koncentracijo aktivnih komponent. Po vsebnosti rutina, hesperidina in klorogenske kisline presega le vzorec V24, vsi ostali vzorci pa, kljub višji vsebnosti aktivnih komponent, niso izkazovali tako visoke fluorescence.. Največjo inhibicijo je po analizi DPPH izkazoval pri 0,01M raztopini. Prav tako ima vzorec po analizi LC-MS relativno visoko vsebnost celokupnih fenolov. Iz tega bi lahko zaključili, da ima na izražanje antioksidativnih lastnosti največji vpliv vsebnost preiskovanih aktivnih komponent. Vendar vzorec V24, ki po vrednostih celokupnih fenolov in procentu inhibicije pri isti koncentraciji prekaša vzorec V6, ni izkazoval tolikšne stopnje zaviranja. Zato lahko zaključimo, da na izražanje znotrajcelične antioksidativnosti vplivajo nedoločene komponente.

Najbolj pozitiven učinek je izkazal ekstrakt V6. Najvišjo inhibicijo je izkazoval pri koncentraciji 0,01g/mol, in sicer 55,7%, kar pa je ena izmed nižje izmerjenih vrednosti pri analizi DPPH. To nakazuje, da antioksidativne lastnosti ne izhajajo zgolj iz visokih vrednosti inhibicije, temveč v prihajajo tudi iz vsebovanih aktivnih spojin, v večji meri pa tudi iz nedoločenih spojin.

Upoštevati moramo, da na dobljene rezultate vpliva predvsem razporeditev celic po posameznih vodnjačkih, ki se je po nanosu ekstrakta in spiranju s pufrom PBS izkazala za nekoliko neenakomerno.

## 6 ZAKLJUČEK

---

### 6.1 Potrditev/zavrnitev hipotez

1. Ekstrakti, ekstrahirani s Soxhletovim aparatom bodo imeli večji izkoristek kot tisti, ekstrahirani s pomočjo ultrazvočne kopeli. **Potrjena.**

Izkoristki ekstraktov, pridobljenih po Soxhletu, kjer smo za topilo uporabili metanol, so presegali izkoristke ekstraktov, pridobljenih s pomočjo ultrazvočne kopeli, kjer je bil za topilo uporabljen metano, 50 % metanol, ali voda, zato smo hipotezo lahko potrdili.

2. Ekstrakti, ekstrahirani s 50 % metanolom, bodo imeli višjo znotrajcelično antioksidacijsko učinkovitost, kot tisti, ekstrahirani z metanolom. **Ovržena.**

Ekstrakti z najvišjo znotrajcelično antioksidacijsko učinkovitostjo, torej ekstrakti, z najvišjo izmerjeno fluorescenco, so bili ekstrakti, ekstrahirani po Soxhletu (vzorca V6 in V9). Kar se tiče ekstraktov, ekstrahiranih s pomočjo ultrazvočne kopeli, smo višjo fluorescenco izmerili pri vzorcu V24, kjer je za topilo bila uporabljena voda. Tako je najnižjo izmerjeno fluorescenco (ki pa še zmerom v vseh razredčinah presega kontrolo) izkazoval vzorec V17, ekstrahiran s pomočjo ultrazvočne kopeli s topilom 50 % metanol, zaradi tega smo hipotezo ovrgli.

3. Vsebnost skupnih fenolov bo pozitivno vplivala na izmerjeno znotrajcelično antioksidacijsko učinkovitost. **Delno potrjena.**

Vzorec, z najvišjo vsebnostjo skupnih fenolov je V6. Le – ta je izkazoval najvišjo fluorescenco pri razredčini 1:16. Najvišjo fluorescenco pri vseh ostalih razredčinah, je izkazoval vzorec V6,

čigar vsebnost izmerjenih skupnih fenolov je manjša v primerjavi z vzorcem V9. stem hipoteze ne moremo potrditi v celoti, zato smo jo potrdili delno.

4. Vpliv vsebnosti skupnih fenolov na znotrajcelično antioksidacijsko učinkovitost bo večji, kot vpliv DPPH. **Delno potrjena.**

V primeru vzorcev V17 in V24, pri katerih smo izmerili nižji fluorescenci kot pri vzorcih V6 in V9, vrednosti analize DPPH presegajo odstotek inhibicije v vseh razredčinah, zato lahko zaključimo, da je vpliv vsebnosti celokupnih fenolov višji, kot vpliv DPPH, s tem pa hipoteze ne moremo popolnoma potrditi, zato smo jo potrdili delno.

## 6.2 Odgovor na raziskovalno vprašanje

Temeljno raziskovalno vprašanje naloge je bilo, kakšni so antioksidacijski učinki ekstraktov različnih genotipov murve izven in znotraj celice. Glede na potek ekstrakcije, je vzorce moč razdeliti na 2 skupini, na ekstrakte, pridobljene po Soxhletu in ekstrakte pridobljene s pomočjo ultrazvočne kopeli. Znotraj slednje ekstrakcije vzorce razdelimo v 3 podskupine, glede na uporabljeno topilo – metanol, 50 % metanol, ali voda. V primeru ekstrakcije s Soxhletovim aparatom smo uporabili samo eno topilo, to je metanol. Število vseh vzorcev je 25.

Najprej smo dobljenim ekstraktom določali antioksidativno učinkovitost s pomočjo radikalne metode z DPPH. Rezultati so pokazali, da imajo vzorci, pridobljeni s pomočjo ultrazvočne kopeli s topilom voda (V24 in V25), v povprečju najvišje vrednosti odstotka inhibicije in s tem najvišjo antioksidativno učinkovitost. Ko med seboj primerjamo še ostale rezultate, torej ekstrakte, pridobljene po Soxhletu in ekstrakte, ekstrahirane s pomočjo ultrazvočne kopeli s topilom metanol ali 50 % metanol, opazimo, da pri vseh koncentracijah višji odstotek inhibicije izkazujejo ekstrakti, pridobljeni s pomočjo ultrazvočne kopeli, s topilom 50 % metanol, kot ekstrakti, pridobljeni po Soxhletu ali z ultrazvočno kopelijo in topilom metanol. Pri koncentracijah 0,1 mg/mL in 0,01 mg/mL odstotek inhibicije teh vzorcev presega tudi odstotek inhibicije vzorcev V24 in V25 pri isti koncentraciji.

Nato smo želeli ugotoviti, ali lahko rezultate antioksidativne učinkovitosti, izmerjene z metodo DPPH, prenesemo na antioksidativnost znotraj celice. Zaradi različne polarnosti topil, uporabljenih pri ekstrakciji, vsi ekstrakti niso zmožni enako dobro prehajati skozi celično membrano. Prav tako smo predpostavljali, da ima na antioksidativno učinkovitost znotraj

celice vpliv tudi vsebnost celokupnih fenolov in posameznih aktivnih komponent (klorogenska kislina, hesperidin in rutin). Zato smo za nanašanje ekstraktov na celice izbrali ekstrakte, ki so se razlikovali v metodi pridobivanja, uporabljenem topilu, izmerjeni antioksidativni učinkovitosti z metodo DPPH in vsebnosti skupnih fenolov (posledično pa tudi vsebnostjo posameznih aktivnih komponent), to so bili vzorci V6, V9, V17 in V24. Ugotovili smo, da so najvišjo antioksidacijsko učinkovitost znotraj celice izkazovali ekstrakti, ekstrahirani po Soxhletu s topilom metanol in visoko vsebnostjo skupnih fenolov. Zaključimo lahko, da na antioksidacijsko delovanje vpliva predvsem vsebnost celokupnih fenolov, med katerimi pa so tudi nedoločene aktivne komponente.

Zaključimo lahko, da najvišjo antioksidacijsko učinkovitost dajejo ekstrakti, pridobljeni z ekstrakcijo s pomočjo ultrazvočne kopeli s topilom voda, to sta bila vzorca V24 in V25, oba primera genotipa vrste murve (Kokuso – V24 in Florio – V25), ki izhaja iz Italije. Znotraj celice imajo višjo antioksidacijsko vrednost ekstrakti, ekstrahirani s Soxhletovim aparatom (V5-V9, V14 in V16) in visoko vsebnostjo skupnih fenolov (V6 in V9). Slednja vzorca sta primer križanca med belo in rdečo murvo (V6) ter murve s plodovi brez semen (V9).

### 6.3 Nadaljnje raziskave

V nadaljnjih raziskavah bi bilo smiselno preveriti, katera izmed trenutno nedoločenih aktivnih komponent je tista, ki daje največji vpliv pri antioksidacijski učinkovitosti znotraj celice.

## 7 DRUŽBENA ODGOVORNOST

---

Naloga je bila izdelana na kolikor se je dalo okolju prijazen način, odpadke smo odstranili in, v kolikor je to bilo mogoče, reciklirali. Pomemben je prispevek naloge k razvoju morebitnih zdravil, saj ekstrahirane aktivne komponente zaradi svoje antioksidacijske učinkovitosti lahko delujejo kot modulatorji oksidativnega stresa proti raku.



## 8 VIRI IN LITERATURA

---

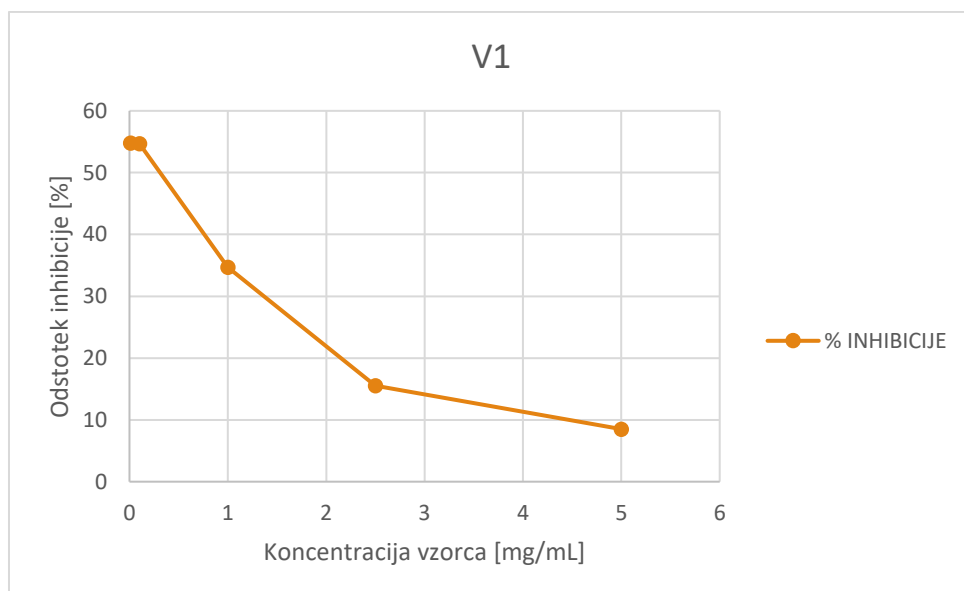
- 1 AL-MARIRI, A., SAFI, M. In Vitro Antibacterial Activity of Several Plant Extracts and Oils against Some Gram-Negative Bacteria. V: *Iranian journal of medical sciences* [online]. 2014, vol. 39 (1), str. 36-43 [14. 11. 2019]. Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3895893/>
- 2 ARFAN, M., KHAN, R., RYBARCZYK, A., AMAROWICZ, R. Antioxidant Activity of Mullberry Fruit Extracts. *International journal of Molecular Sciences*. 2012, vol. 13(2), str. 2472-2480. [online]. Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3292034/>. [20. 11. 2019]
- 3 BUDIMA, A., AULIFA, D., L., KUSUMA, A. S. W. IN SULASTRI, A. Antibacterial and Antioxidant Activity of Black Mulberry (*Morus nigra* L.) Extract for Acne Treatment. V: *Pharmacognosy journal* [online]. 2017, vol 9. (5), str. 611-614 [14. 11. 2019]. Dostopno na: <https://www.phcogj.com/article/368>
- 4 COWAN, M. Plant Products as Antimicrobial Agents. V: *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 1999, vol. 12 (4), str. 564-582 [14. 11. 2019]. Dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88925/>
- 5 GRAČNAR, M. *izolacija biološko aktivnih komponent iz plodov gozdnih borovnic (*Vaccinium myrtillus* L.)* (Magistrska naloga). Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Maribor.
- 6 GRAJEK, K., WAWRO, A. in PIPERZYK-KOKOCHA, D. Bioactivity of *Morus alba* L. extracts – an overview. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research*, 2017, 1-8-

- 7 HE, J., FENG, Y., OUYANG, H., YU, B., CHANG, Y., PAN, G., DONG, G., WANG, T. IN GAO, X. A sensitive LC–MS/MS method for simultaneous determination of six flavonoids in rat plasma: Application to a pharmacokinetic study of total flavonoids from mulberry leaves. V: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis [online]. 2013, vol. 84, str. 189-195 [14. 11. 2019]. Dostopno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0731708513002793>
- 8 Medical news today. Antioxidants. [online]. Dostopno na: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/301506.php>. [20. 1. 2020]
- 9 Murve, 2019. Hranilna vrednost listov. [online]. Dostopno na: <http://murve.um.si/sl/hranilna-vrednost-listov/> [15. 10. 2019]
- 10 Murve, 2019. Rdeča murva. [online]. Dostopno na: <http://murve.um.si/sl/rdeca/>. [20. 11. 2019]
- 11 ŠUMAK, U. Antibiotični učinki ekstraktov listov bele murve (*Morus alba* L.). Raziskovalna naloga. Druga gimnazija Maribor.
- 12 Wikipedia, Črna murva. [online]. Dostopno na: [https://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Crna\\_murva](https://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Crna_murva). [20. 11. 2019]
- 13 Wikipedia. Dichlorofluorescein. [online]. Dostopno na: <https://en.wikipedia.org/wiki/Dichlorofluorescein>. [20. 1. 2019]

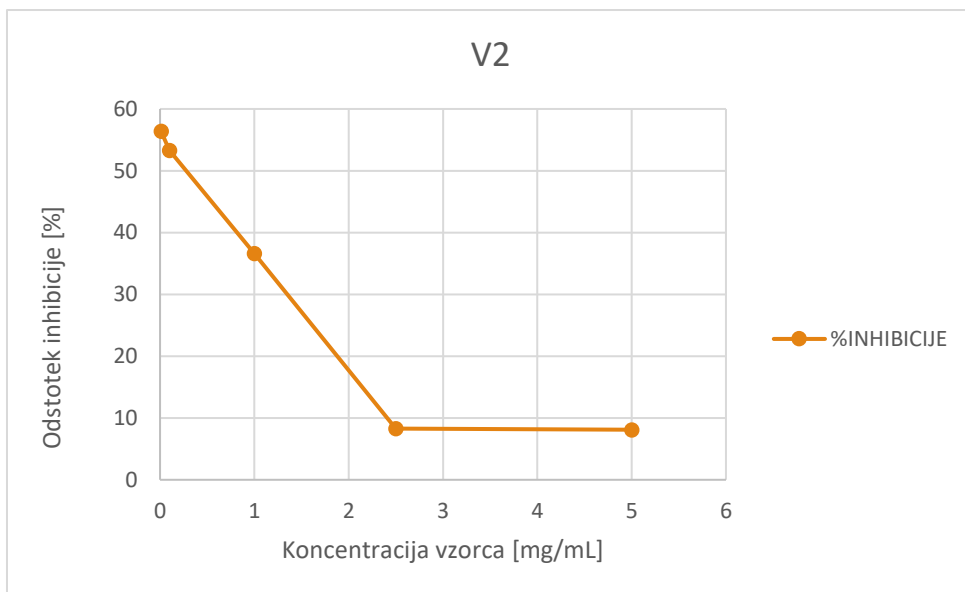
## 9 PRILOGE

---

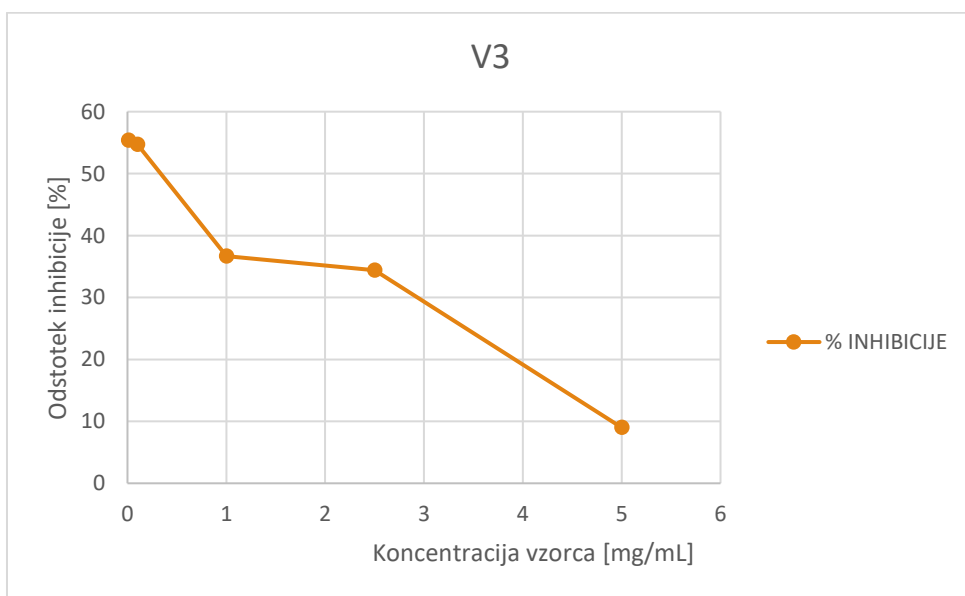
Priloga 1: Odstotek inhibicije pri posameznih koncentracijah V1



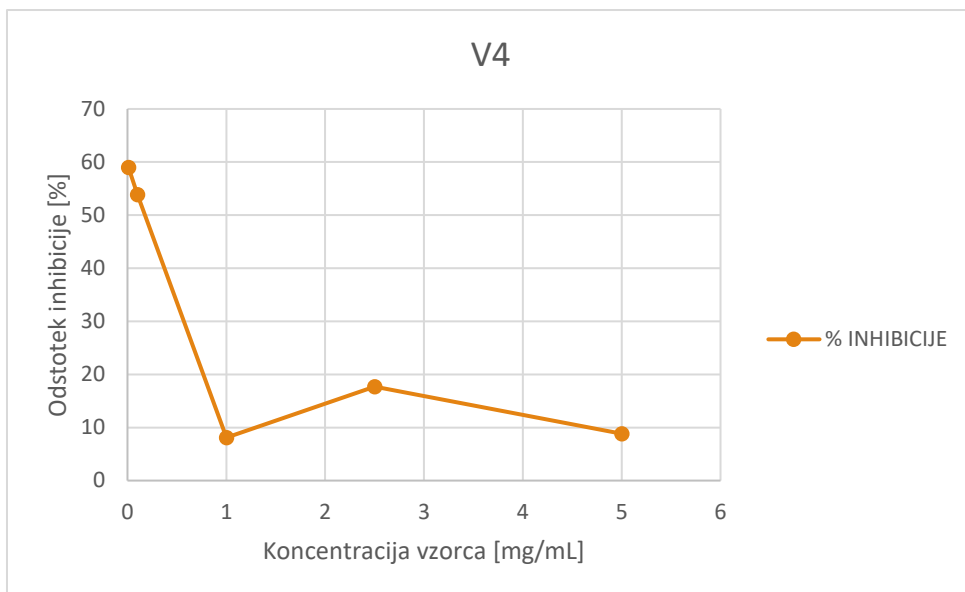
Priloga 2: Odstotek inhibicije pri posameznih koncentracijah V2



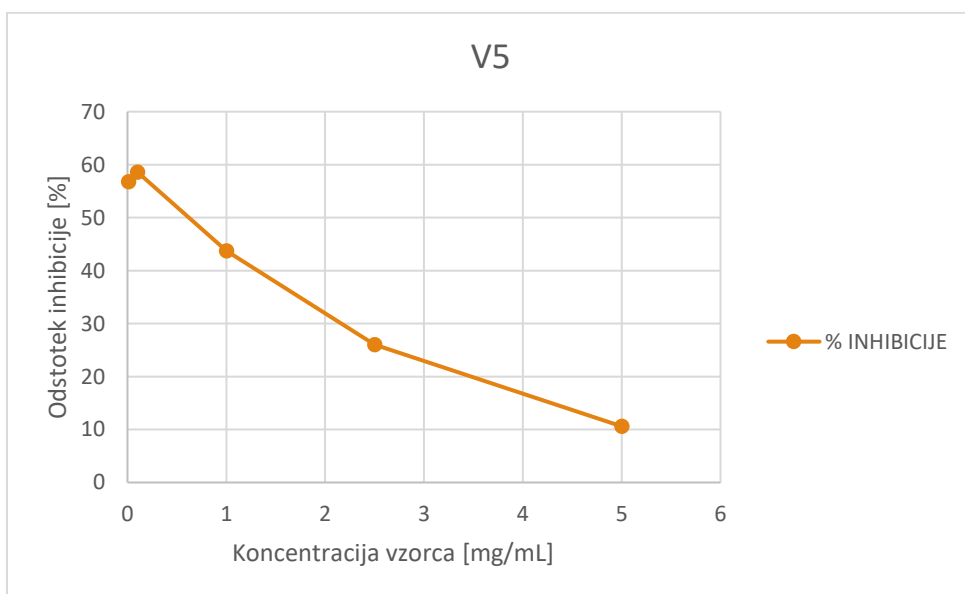
Priloga 3: Odstotek inhibicije pri posameznih koncentracijah V3



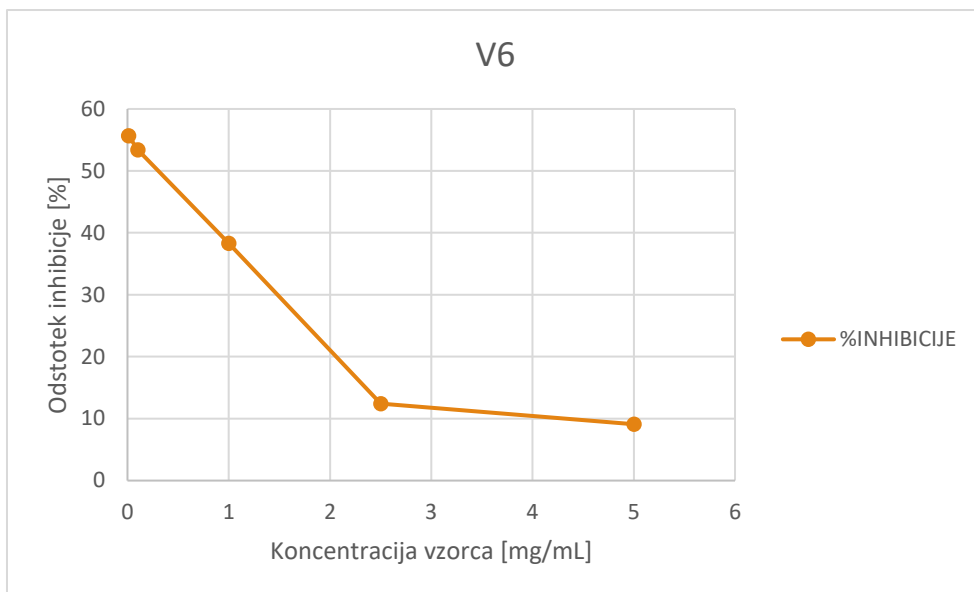
Priloga 4: Odstotek inhibicije pri posameznih koncentracijah V4



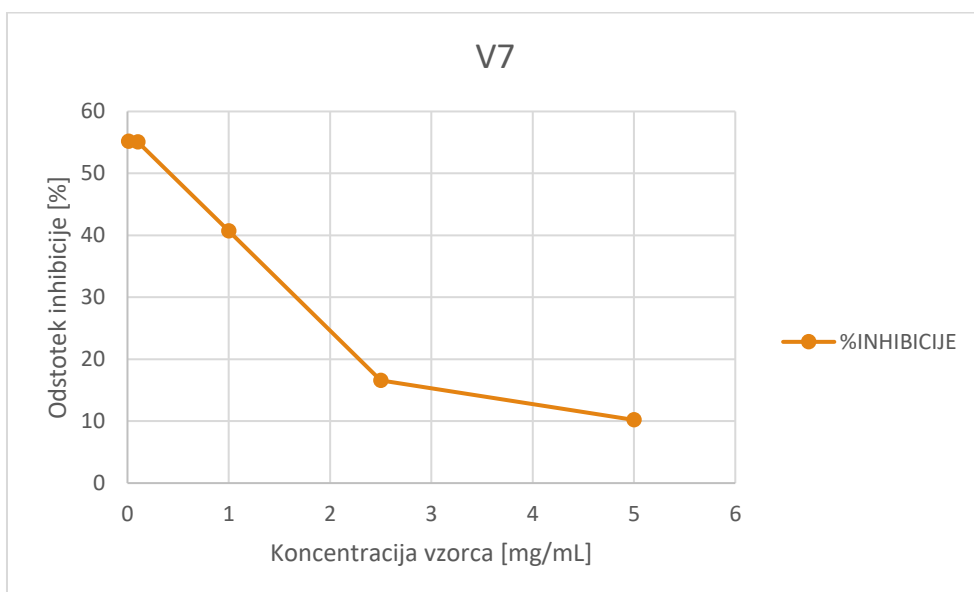
Priloga 5: Odstotek inhibicije pri posameznih koncentracijah V5



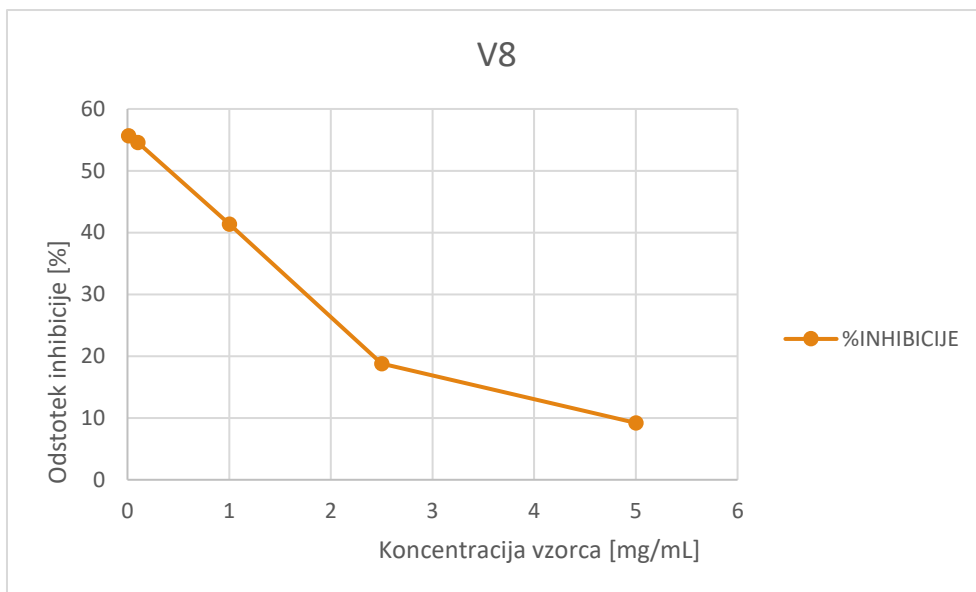
Priloga 6: Odstotek inhibicije pri posameznih koncentracijah V6



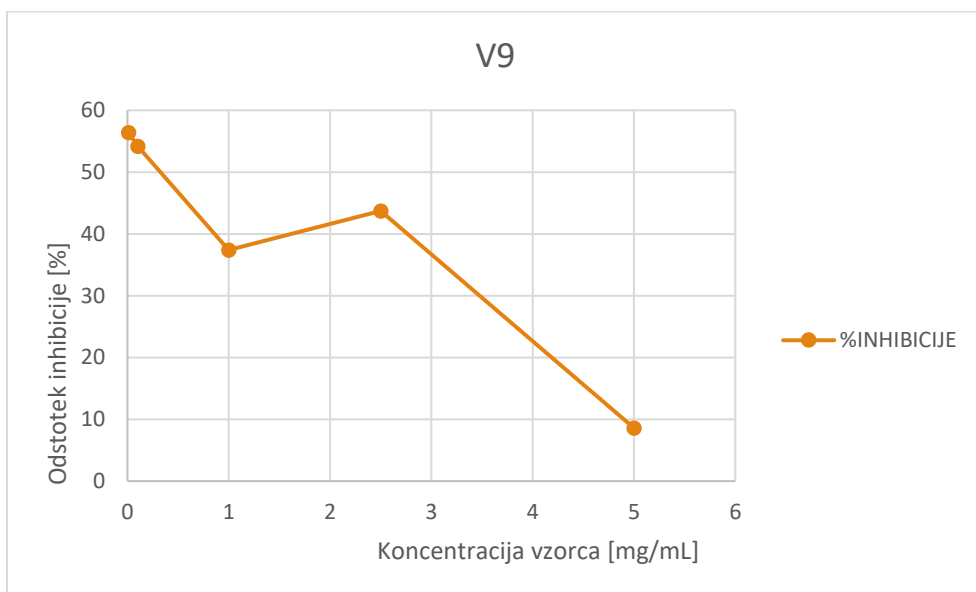
Priloga 7: Odstotek inhibicije pri posameznih koncentracijah V7



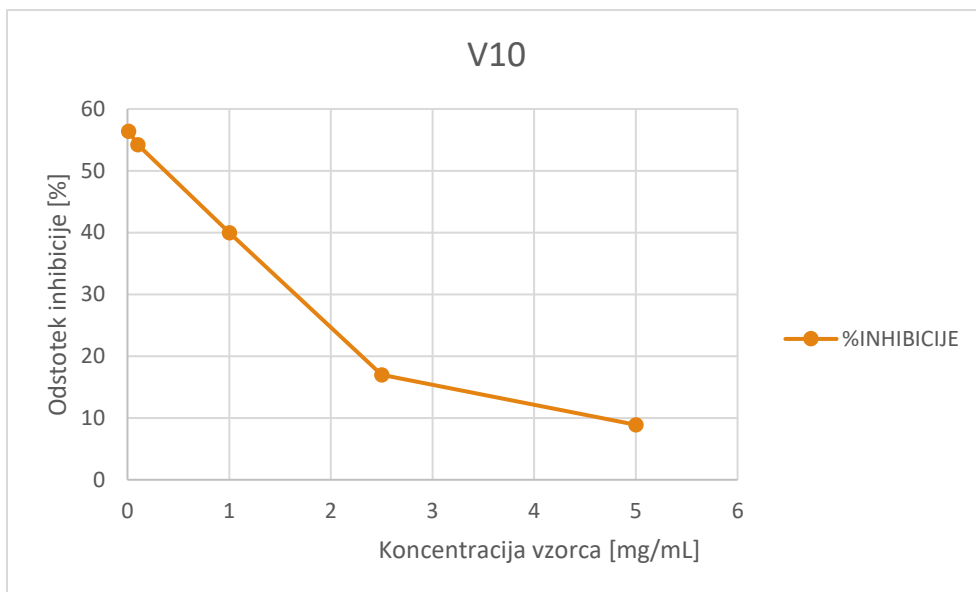
Priloga 8: Odstotek inhibicije pri posameznih koncentracijah V8



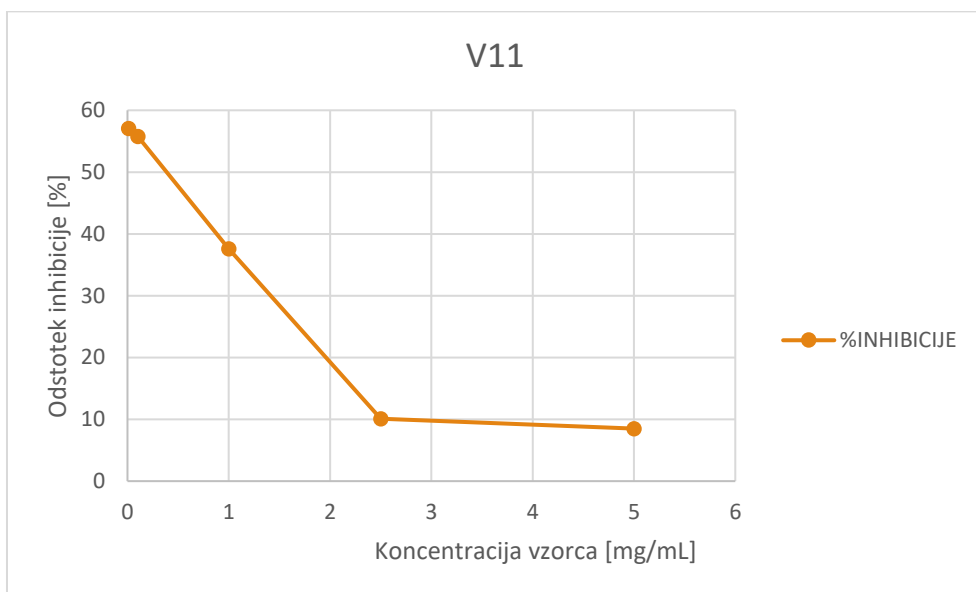
Priloga 9: Odstotek inhibicije pri posameznih koncentracijah V9



Priloga 10: Odstotek inhibicije pri posameznih koncentracijah V10

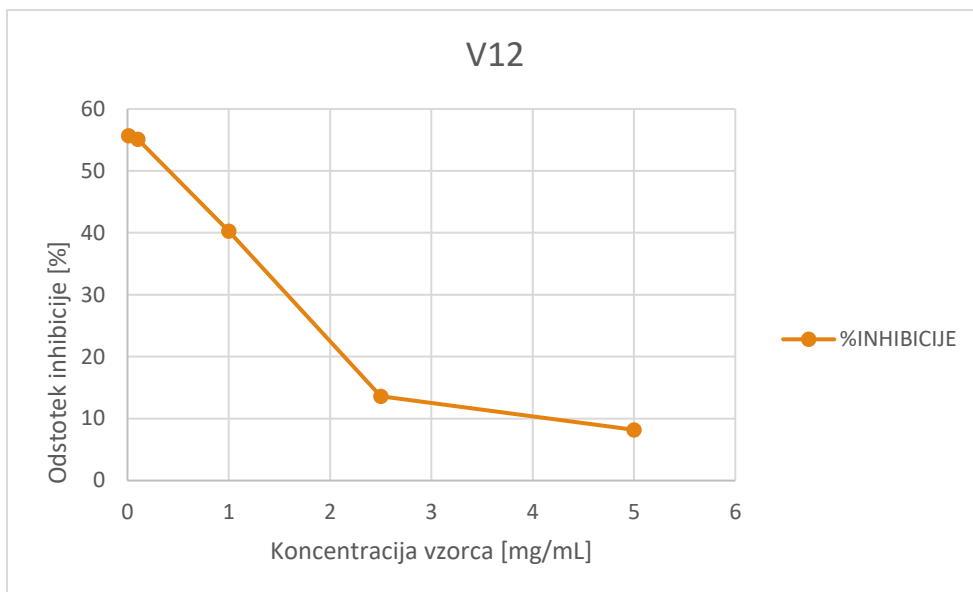


**Priloga 11: Odstotek inhibicije pri posameznih koncentracijah V11**

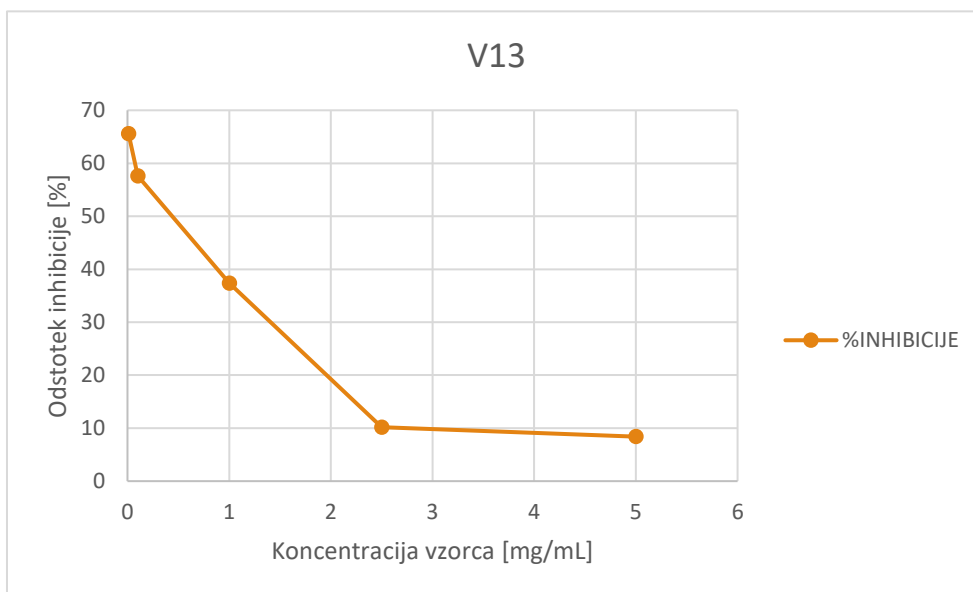


**Priloga 12: Odstotek inhibicije pri posameznih koncentracijah V12**

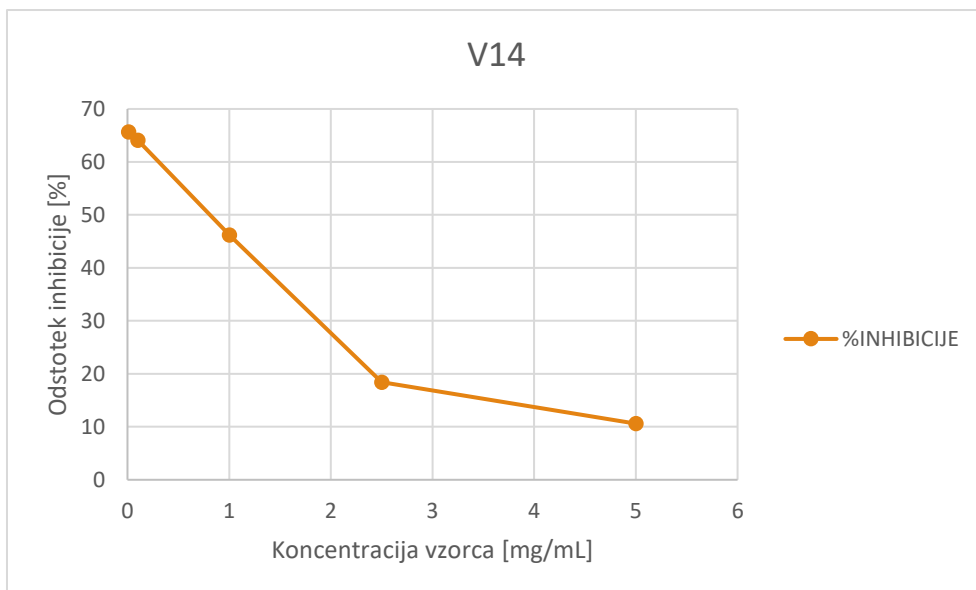




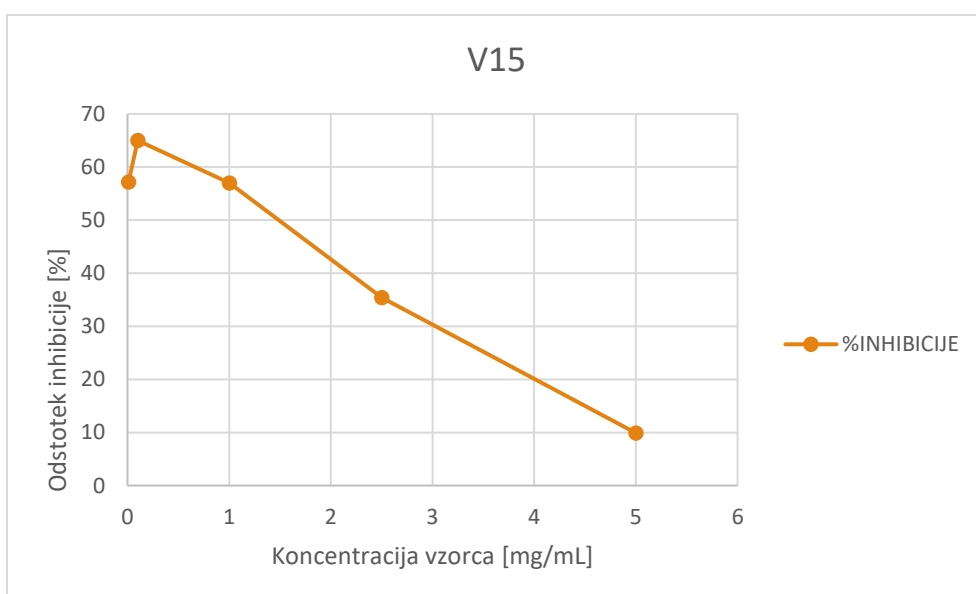
Priloga 13: Odstotek inhibicije pri posameznih koncentracijah V13



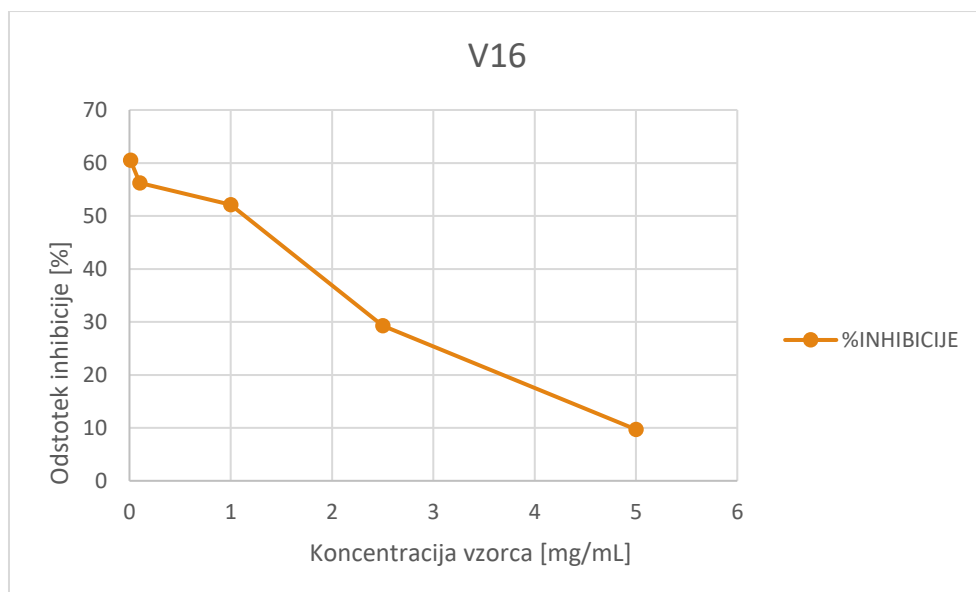
Priloga 14: Odstotek inhibicije pri posameznih koncentracijah V14



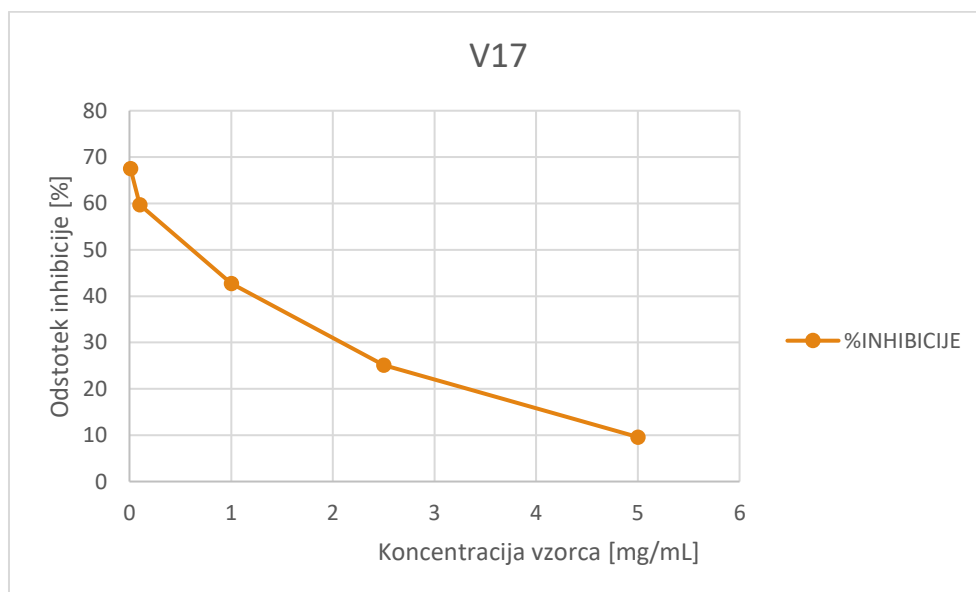
Priloga 15: Odstotek inhibicije pri posameznih koncentracijah V15



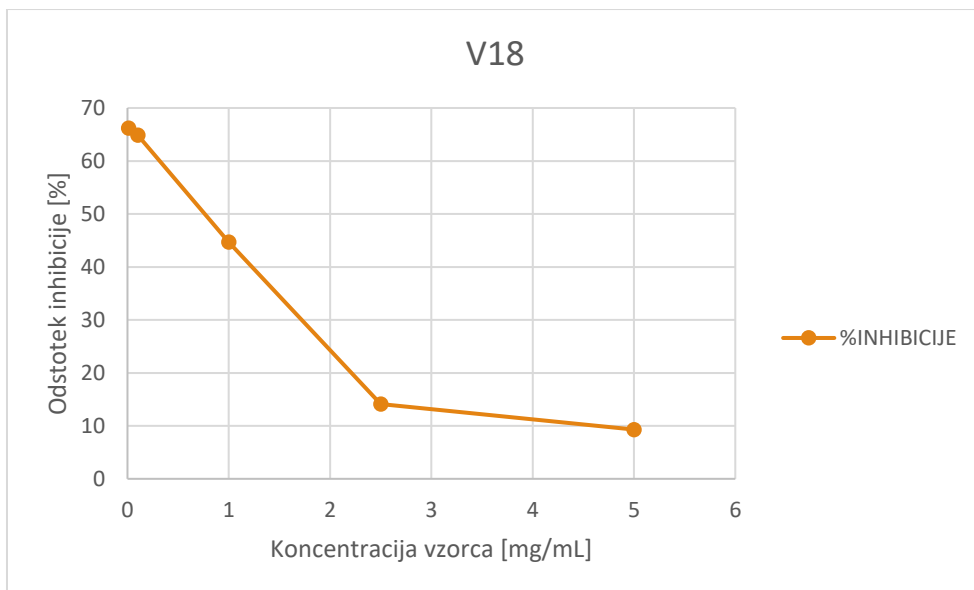
Priloga 16: Odstotek inhibicije pri posameznih koncentracijah V16



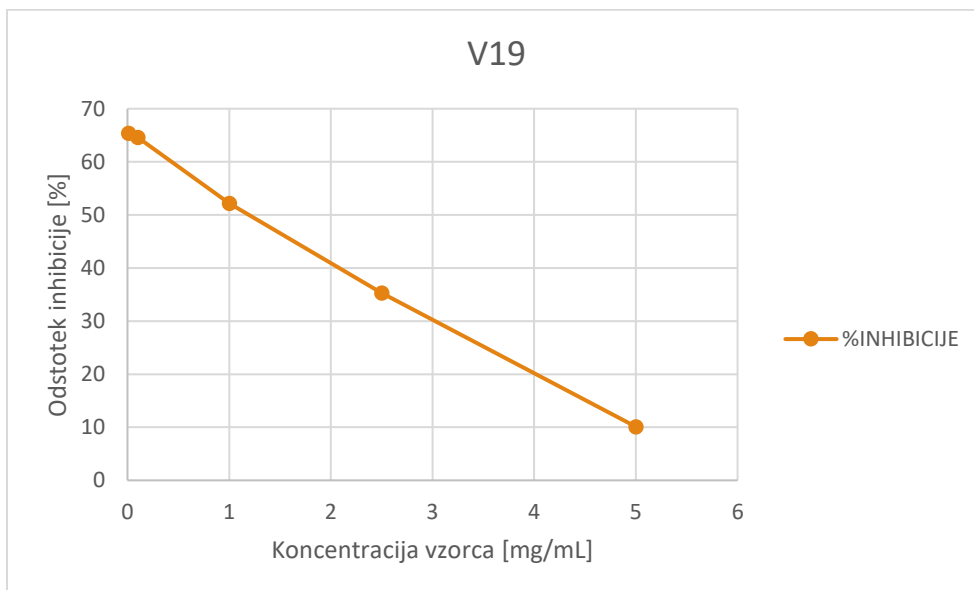
Priloga 17: Odstotek inhibicije pri posameznih koncentracijah V17



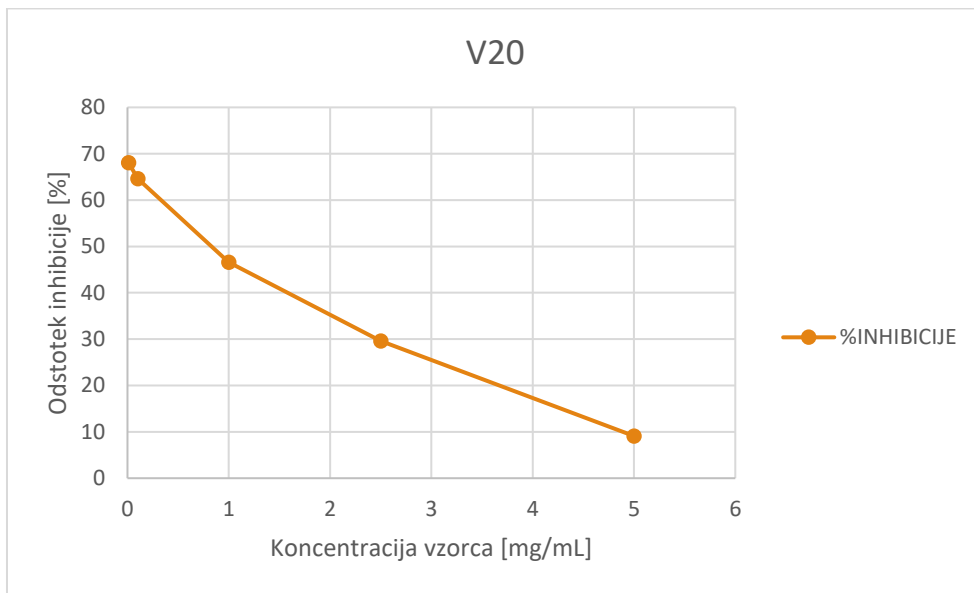
Priloga 18: Odstotek inhibicije pri posameznih koncentracijah V18



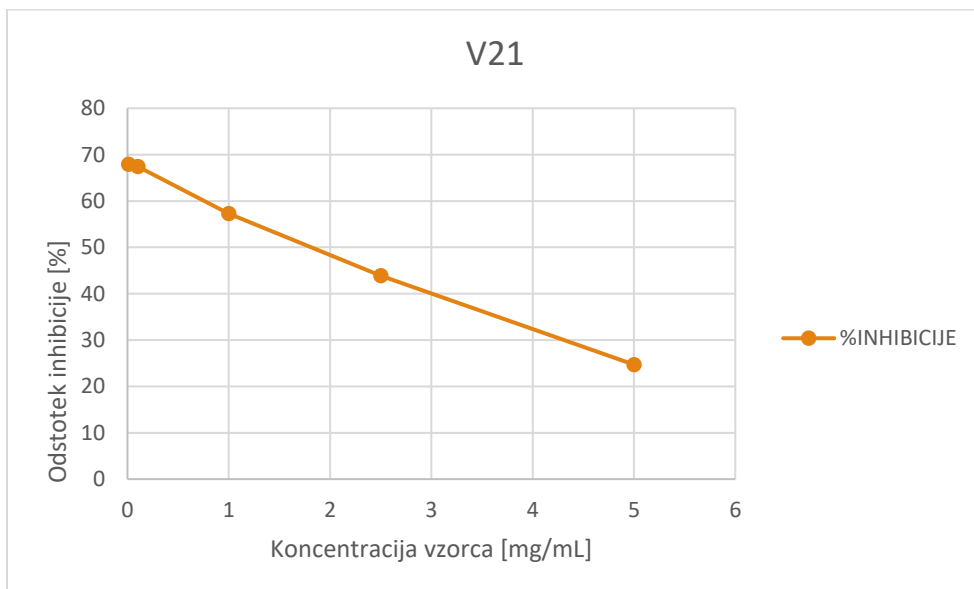
Priloga 19: Odstotek inhibicije pri posameznih koncentracijah V19



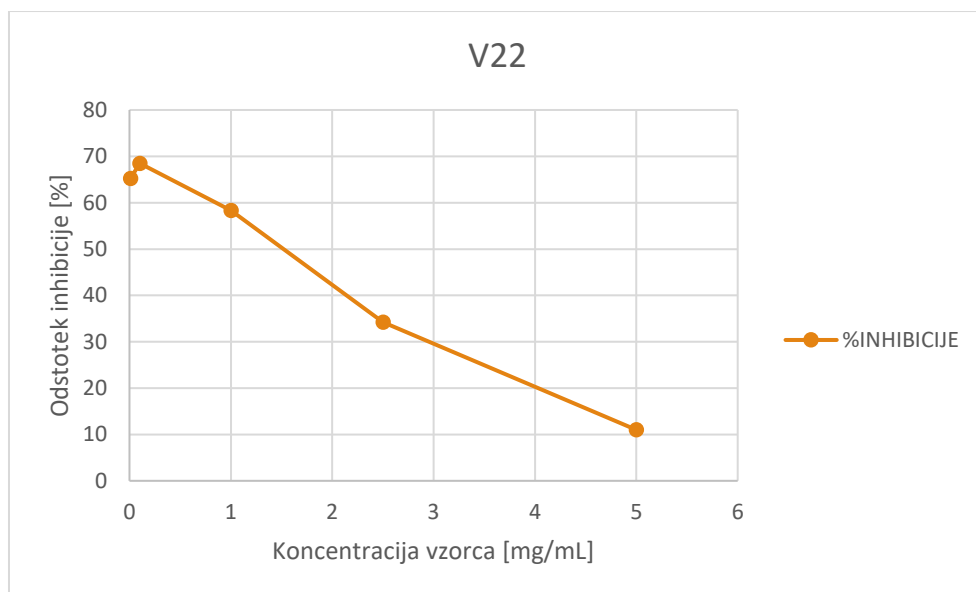
Priloga 20: Odstotek inhibicije pri posameznih koncentracijah V20



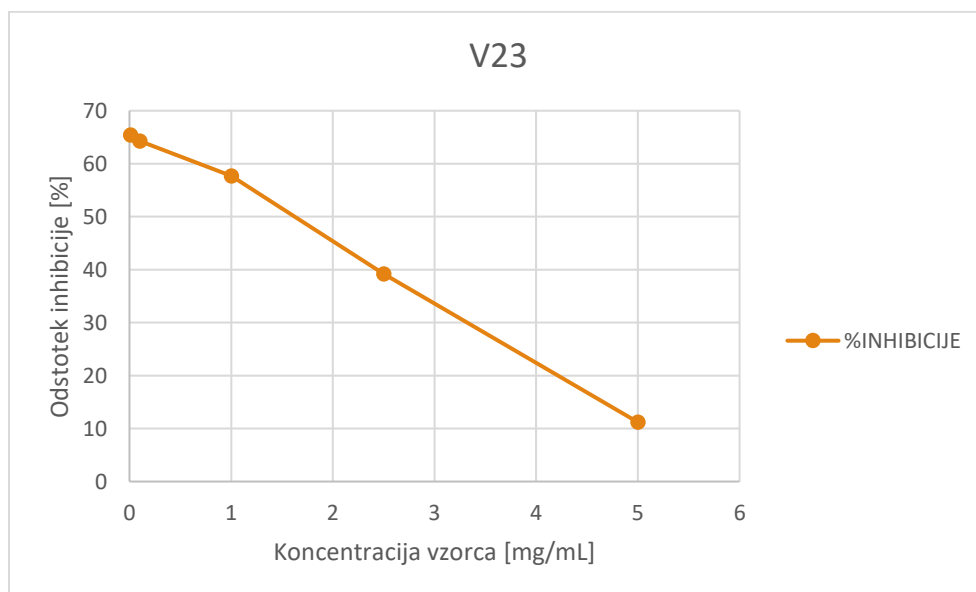
Priloga 21: Odstotek inhibicije pri posameznih koncentracijah V21



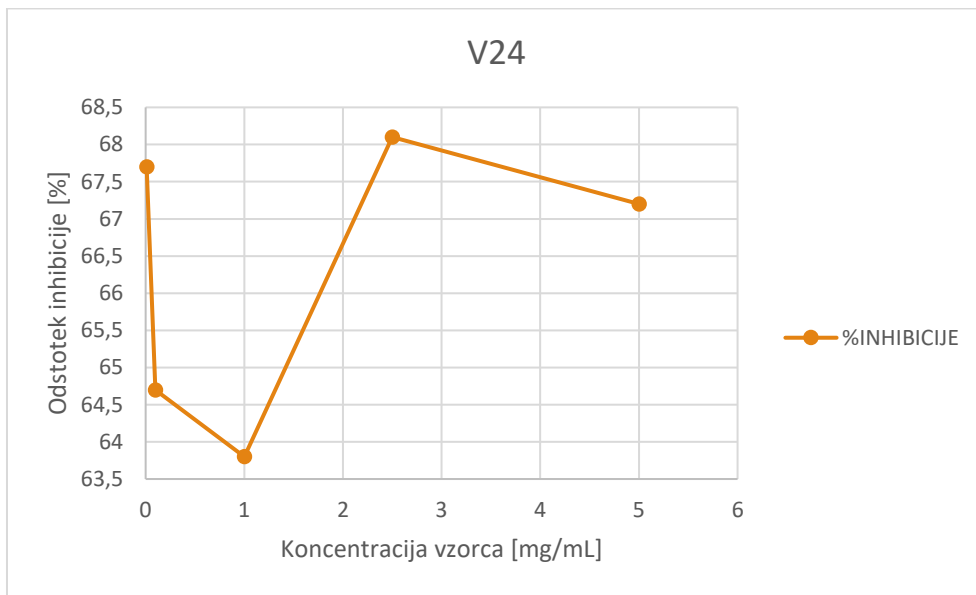
Priloga 22: Odstotek inhibicije pri posameznih koncentracijah V22



Priloga 23: Odstotek inhibicije pri posameznih koncentracijah V23



Priloga 24: Odstotek inhibicije pri posameznih koncentracijah V24



Priloga 25: Odstotek inhibicije pri posameznih koncentracijah V25

