



Univerza v Ljubljani
Pedagoška fakulteta



DiSSI
Diversity in Science
towards Social Inclusion



Center
Kemik

Um



Univerza v Ljubljani
Biotehniška fakulteta

Študija antioksidativne sposobnosti piperina in ostalih piperidinskih alkaloidov pri radikalskih reakcijah v celicah govejih jeter

RAZISKOVALNA NALOGA

Mentorja:
asist. Miha SLAPNIČAR, prof. kem., biol.
asist. Matej VOŠNJAK, mag. inž. hort.

Avtorica:
Tia KRALJ

Ljubljana, julij 2021

POVZETEK

Dandanes se vse bolj poudarja pomembnost uživanja sadja, zelenjave in začimb, zaradi njihovega zdravilnega učinka pri mnogih škodljivih procesih v telesu. Ena izmed pomembnih zdravilnih učinkovin je poper, ki ima veliko vlogo v prehrani, saj vsebuje ogromno število antioksidantov, kot so flavonoidi, fenolne spojine in vitamini. Antioksidanti so snovi, ki v nizkih koncentracijah upočasnijo ali celo zavirajo škodljivo delovanje radikalov in oksidacijske procese, ki so posledica le-teh v človeškem telesu. Preučevanje snovi z antioksidativno sposobnostjo, ki so prisotne v vsakdanjem življenju ima pomembno vlogo, saj številne študije dokazujejo, da imajo te snovi pozitiven učinek pri preprečevanju in zdravljenju različnih bolezni. V okviru raziskovalne naloge smo z metodo DPPH določali antioksidativno sposobnost piperina in ostalih piperidinskih alkaloidov v nevtralizacijski reakciji DPPH• radikalov z antioksidantom brez in ob prisotnosti govejih jeter, ki so bile uporabljene kot primer prenosa standardnega vzorca na konkreten primer organa v telesu, ki predstavlja organ, ki razstruplja in v katerem potekajo številne reakcije pretvorb strupenih in za telo škodljivih spojin. Antioksidativno sposobnost in razbarvanje DPPH raztopine (indikator antioksidativne sposobnosti) smo potrdili pri vseh izvlečkih poprov, tako brez in ob dodatku jetrnega macerata, te vrednosti pa so se med seboj razlikovale.

Ključne besede: Radikali, antioksidanti, piperidinski alkaloidi, piperin, antioksidativna sposobnost

ABSTRACT

Nowadays, the importance of consuming fruits, vegetables and spices is increasing, as they have a healing effect in many harmful processes in the body. One of the most important active substances is pepper, which plays a major role in the diet because it contains a large number of antioxidants such as flavonoids, phenolic compounds and vitamins. Antioxidants are substances that, in low concentrations, slow down or even inhibit the harmful effects of radical and oxidation processes that occur in the human body. The study of substances with antioxidant capabilities that are present in daily life plays an important role, as numerous studies show that these substances have a positive effect in the prevention and treatment of various diseases. In the project, the DPPH method was used to determine the antioxidant capacity of piperine and other piperidine alkaloids in the DPPH neutralization reaction of radicals with antioxidants without and in the presence of bovine liver, which were used as an example of transferring a standard sample to a concrete case in the human body, which is the detoxification organ and where many transformation reactions of toxic and body-damaging compounds take place. Antioxidant capacity and discoloration of DPPH solution (indicator of antioxidant capacity) were confirmed in all pepper extracts, both without and with the addition of liver macerate, and these values differed.

Keywords: radicals, antioxidants, piperidine alkaloids, piperine, antioxidant capacity

KAZALO VSEBINE

	str.
POVZETEK	II
ABSTRACT	III
KAZALO VSEBINE	IV
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PRILOG	X
KAZALO PREGLEDNIC	XI
SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV	XII
RAZISKOVALNI PROBLEM IN NAMEN RAZISKOVALNE NALOGE	1
1 UVOD	2
1.1 Nastanek radikalov	2
1.2 Delitev radikalov	6
1.3 Kemijske in fizikalne lastnosti radikalov	8
1.4 Reakcije radikalov	9
2 ANTIOKSIDANTI	12
2.1 Hierarhija antioksidantov	13
2.1.1 NIZKOMOLEKULARNI ANTIOKSIDANTI ENDOGENEGA IZVORA	13
2.1.1.1 Bilirubin	14
2.1.1.2 α -Keto kisline	14
2.1.1.3 Melatonin	14
2.1.1.4 Lipojska kislina	15
2.1.1.5 Koencim Q	15
2.1.1.6 Sečna kislina	16
2.1.2 NIZKOMOLEKULARNI ANTIOKSIDANTI EKSOGENEGA	17
2.1.2.1 Askorbinska kislina (vitamin C)	17
2.1.2.2 Vitamin E	18
2.1.2.3 Karotenoidi	18
2.1.2.4 Fenolin in polifenolni antioksidanti	19
2.1.3 ANTIOKSIDANTI KOT PREHRANSKA DOPOLNILA	20
2.1.4 ANTIOKSIDANTI KOT ODSTRANJEVALCI NEUGODNIH UČINKOV	20
2.1.5 OKSIDATIVNI STRES	21
3 ALKALOIDI	23

3.1	Naravni viri alkaloidov	25
3.2	Funkcija v naravi	25
3.3	Uporaba in pomen za človeka	25
3.4	Delitev na osnovi kemijske zgradbe	25
3.5	Primer rastline z visokimi vsebnostmi alkaloidov	26
3.6	Piperin	28
3.6.1	BIOSINTEZA PIPERINA	28
3.6.2	LABORATORIJSKA SINTEZA	29
4	ANTIOKSIDATIVNA SPOSOBNOST PIPERINA IN OSTALIH PIPERIDINSKIH ALKALOIDOV	31
5	METODE ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE SPOSOBNOSTI	34
5.1	Metoda DPPH	34
6	SPEKTROSKOPIJA	37
6.1	Molekulska spektroskopija	38
6.2	Fotoluminiscenca	39
6.3	Luminiscenca	39
6.4	Kemoluminiscenca	40
6.5	Infrardeča spektroskopija (IR)	40
6.6	Atomska spektroskopija	40
6.7	Atomska emisijska spektroskopija (AES)	41
6.8	Masna spektrometrija (MS)	41
7	MATERIALI IN METODE DELA	43
7.1	Materiali	43
7.1.1	REAGENTI IN TOPILA	43
7.1.2	LABORATORIJSKI MATERIAL	43
7.1.3	LABORATORIJSKA OPREMA	44
7.1.4	VZORCI	44
7.2	Metode	44
7.2.1	IZOLACIJA PIPERINA	44
7.2.2	DOKAZ IZOLIRANEGA PIPERINA S TANKOPLASTNO KROMATOGRAFIJO	46
7.2.3	SPECIFIČNE DOKAZNE REAKCIJE ZA PRISOTNOST ALKALOIDOV	47

7.2.4	PRIPRAVA RAZTOPINE DPPH	50
7.2.5	PRIPRAVA VZORCA ŽIVALSKIH CELIC	51
7.2.6	RAČUNANJE ZNIŽANJA ABSORBANCE	51
7.2.7	RAČUNANJE % INHIBICIJE	51
8	REZULTATI Z DISKUSIJO	52
8.1	TLC analiza	52
8.2	Rezultati drugih reakcij	52
8.2.1	DRAGENDORFFOV TEST	52
8.2.2	MAYERJEV TEST	53
8.2.3	WAGNERJEV TEST	53
8.2.4	HAGERJEV TEST	54
8.3	Razbarvanje raztopine	54
8.4	Spektrometrično določanje absorbance raztopine DPPH ob dodatku izvlečkov poprov brez substrata	55
8.5	Spektrometrično določanje absorbance raztopine DPPH ob dodatku izvlečkov poprov in substrata	56
9	ZAKLJUČEK	59
10	LITERATURA	60
	ZAHVALA	

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Regeneracija Fe(II) iz Fe(III) z ubikinonom (Mravljak in Pečar, 2015)	5
Slika 2: Pretvorba hidrokinona v kinon (Tišler, 1998)	5
Slika 3: Trifenilmetilni ali tritilni (9) radikal. Prikazana je možna delokalizacija nesparjenega elektrona znotraj enega obroča (9, 10, 11). Elektron je delokaliziran po vseh treh aromatskih obročih (π radikal) (Mravljak in Pečar, 2015)	7
Slika 4: Splošna struktura stabilnih nitroksilnih radikalov (1), ena izmed struktur tritilnega radikala (2) in struktura Fremy-jeve soli (3) v vodni raztopini. Na sliki desno so kristali nitroksilnega radikala (1), kjer je R=OH (Mravljak in Pečar, 2015)	7
Slika 5: S segrevanjem heksaendiina (13) se ta preko intermediata (14, bi π radikal) pretvori do benzena (15). Reakcija je znana kot Bergmnova ciklizacija, ki poteka tudi pri nekaterih antibiotikih (Mravljak in Pečar, 2015)	8
Slika 6: Shematski prikaz dogodkov v celici po nastanku $O_2^{\bullet-}$ (Mravljak in Pečar, 2015)	11
Slika 7: Življenjski krog antioksidantov pri redukciji ROS in RNS (Mravljak in Pečar, 2015)	13
Slika 8: Struktura molekule bilirubuna z označeno konfiguracijo dvojnih vezi (levo) in kristalna struktura molekule bilirubina (desno) (Mravljak in Pečar, 2015)	14
Slika 9: Skeletna formula molekule melatonina (Mravljak in Pečar, 2015)	15
Slika 10: Oksidacija dihidrolipoata do lipoata in regeneracija z encimom lipoamid dehidrogenazo (Mravljak in Pečar, 2015)	15
Slika 11: Redoks cikel koencima Q (Mravljak in Pečar, 2015)	16
Slika 12: Metabolne poti nastanka sečne kisline in njene nadaljnje razgradnje (Mravljak in Pečar, 2015)	17
Slika 13: Skeletne formule nekaterih derivatov in analogov askorbinske kisline (Mravljak in Pečar, 2015).	18
Slika 14: Antioksidativna aktivnost β -karotena kot funkcija koncentracije O_2 (Mravljak in Pečar, 2015)	19
Slika 15: Skeletna formula molekule morfija (ChemSpider)	24

Slika 16: Skeletna formula molekule strihnina (ChemSpider)	24
Slika 17: Skeletna formula molekule nikotina (ChemSpider)	24
Slika 18: Skeletna formula molekule kofeina (ChemSpider)	25
Slika 19: Reakcijska shema biosinteze piperidina iz aminokislina L-lizina (Slapničar in Boh Podgornik, 2021)	28
Slika 20: Reakcija piperidina s tioestrom piperoil-CoA (Slapničar in Boh Podgornik, 2021)	29
Slika 21: Umetna sinteza piperina (Slapničar in Boh Podgornik, 2021)	29
Slika 22: Skeletna formula molekule kavicina (Slapničar in Boh Podgornik, 2021)	30
Slika 23: Skeletna formula molekule izokavicina (Slapničar in Boh Podgornik, 2021)	30
Slika 24: Skeletna formula molekule izopiperina (Slapničar in Boh Podgornik, 2021)	30
Slika 25: Shematski prikaz reakcije DPPH radikala z antioksidantom (ScienceDirect)	34
Slika 26: Graf titracije DPPH s spojino cistein (ScienceDirect)	36
Slika 27: Spektrometer (ScienceDirect)	37
Slika 28: Elektromagnetni spekter (ScienceDirect)	38
Slika 29: Primer molekulskega spektra neke spojine (ScienceDirect)	39
Slika 30: Atomske spekter (ScienceDirect)	40
Slika 31: Kromatogram iz masnega spektra za nek material (ScienceDirect)	42
Slika 32: Zeleni, beli in črni poper (Slapničar in Boh Podgornik, 2021)	44
Slika 33: Rezultati TLC analize	52
Slika 34: Rezultati Dragendorffovega testa	53
Slika 35: Rezultati Mayerjevega testa	53
Slika 36: Rezultati Wagnerjevega testa	54
Slika 37: Rezultati Hagerjevega testa	54
Slika 38: Rezultati razbarvanja raztopine DPPH ob dodatku antioksidanta	55

Slika 39: Grafični prikaz meritev absorbanc v odvisnosti od valovnih dolžin	56
Slika 40: Grafični prikaz meritev absorbanc v odvisnosti od valovnih dolžin	57
Slika 41: Diagram povprečij s pripadajočimi standardnimi napakami (n=5) za % inhibicije glede na vrste popra in uporabo jetrnega macerata	58

KAZALO PRILOG

Priloga A: Izmerjene absorbance in izračunana povprečja in AOP vrednosti glede na odsotnost ali prisotnost jetrnega macerata

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Energija posameznih delov elektromagnetnega valovanja, delež v sončnem spektru in vplivi na organizem (Mravljak in Pečar, 2015)	3
Preglednica 2: Taksonomska klasifikacija črnega poprovca (Slapničar in Boh Podgornik, 2021)	26
Preglednica 3: Predstavitev fizikalno-kemijskih lastnosti plodov črnega poprovca	27
Preglednica 4: Osnovni podatki o piperinu (Slapničar in Boh Podgornik, 2021)	28
Preglednica 5: Sestava reagentov in dokaz prisotnosti alkaloidov pri posameznem testu	48
Preglednica 6: Povprečne vrednosti (\pm standardna napaka) absorbanca (A) ob dodatku izvlečkov popra brez substrata jetrnih celic	55
Preglednica 7: Povprečne vrednosti (\pm standardna napaka) absorbanca (A) ob dodatku izvlečkov popra in prisotnosti substrata jetrnih	56

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

A	Absorbanca
AMP	Adenozin monofosfat
AOP	Antioksidacijski potencial
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EPR	Elektronska paramagnetna resonanca
ESR	Elektronska spinska resonanca
GSH	Glutation
GSSH	Oksidairana oblika glutaciona
NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
RNS	Reaktivne dušikove spojine
ROS	Reaktivne kisikove spojine
TLC	Tankoplastna kromatografija
UV	Ultravijolično sevanje

1 RAZISKOVALNI PROBLEM IN NAMEN RAZISKOVALNE NALOGE

Celica je osnovna gradbena in funkcionalna enota vseh živih organizmov, v katerih potekajo številne spontane in katalizirane reakcije. Te predstavljajo sintezno pot nastajanja radikalov, ki povzročajo celične poškodbe. Radikali so atomi, ioni ali nevtralne spojine, ki imajo v valenčni orbitali vsaj en nesparjen elektron. V telesu imajo pomembno vlogo pri delovanju imunskega sistema, uravnavanju delovanja encimov in metabolizma. Pri pojavu stresa prihaja do povečevanja koncentracije radikalov v tkivih in s tem do neravnovesja med radikali in antioksidanti, kar pa negativno vpliva na delovanje celic.

Piperin je prevladujoči alkaloid v plodovih črnega poprovca (*Piper nigrum* L.), ki nevtralizira radikale. Na primer radikal DPPH• pretvori v produkt, ki v večini primerov izgubi oksidacijske sposobnosti in spremeni barvo.

Namen raziskave je bil ugotoviti, kakšno antioksidativno sposobnost ima piperin in ostali piperidinski alkaloidi pri nevtralizaciji DPPH• radikalov brez prisotnosti celic in v celicah govejih jeter, ki so uporabljene kot primer prenosa standardnega vzorca na konkreten primer organa v telesu. V raziskavi smo iz treh vrst plodov črnega poprovca (črni, beli in zeleni) izolirali zmes alkaloidov ter jih identificirali. Izolacijo smo izvedli z metodami povratne destilacije, nučiranja, uporabe rotavaporja ter kristalizacije in prekristalizacije. Piperin in ostale piperidinske alkaloidne spojine smo identificirali s TLC analizo in štirimi specifičnimi dokaznimi reakcijami. Na 0,08 mL raztopine jetrnih celic smo nanесли 3 mL 0,39 mM raztopine radikalov in dodali 0,04 mL 1,3 mM vodnega izvlečka poprov. Antioksidativno sposobnost piperidinskih alkaloidov različnih vrst plodov črnega poprovca smo preverili spektrofotometrično po metodi DPPH, pri čemer smo z meritvami absorbanca (*A*) spremljali razbarvanje DPPH raztopine. Analiza izmerjenih vrednosti absorbanca je pokazala, katera vrsta plodov ima največji delež razbarvanja DPPH raztopine, kar je indikator antioksidativne sposobnosti.

RAZISKOVALNA VPRAŠANJA

1. Izvleček katere vrste plodov črnega poprovca (*Piper nigrum* L.) ima največjo antioksidativno sposobnost?
2. Kakšno antioksidativno sposobnost imajo izolirani piperidinski alkaloidi plodov črnega poprovca (*Piper nigrum* L.) pri aplikaciji na macerat jetrnih celic?

1. UVOD

Celica je osnovna gradbena in funkcionalna enota vseh živih organizmov, v kateri so lahko prisotni radikali. To so atomi, ioni ali nevtralne spojine, ki imajo vsaj en nesparjen elektron v zunanji (valenčni) orbitali (Mravljak in Pečar, str. 12).

1.1 Nastanek radikalov

Radikali neprestano nastajajo tako v naši okolici, kot v celicah našega telesa. Prihaja do različnih procesov, eden izmed njih je oksidacija, ki je sprožena z radikali in neprestano poteka v majhnem obsegu. To zaznamo na primer pri porjavitvi jabolka, če ga narežemo na rezine, ali pa pri spreminjanju videza in lastnosti kože skozi leta življenja. Oba primera lahko pojasnimo s stalnim nastajanjem radikalov v telesu, ki nastajajo v nizkih koncentracijah, vendar nas le-ti s seštevanjem njihovih učinkov pripeljejo do številnih makroskopskih posledic.

Vzroki za nastanek radikalov v telesu so:

a) zunanji:

- sevanja elektromagnetnega valovanja z ustrežno energijo:
 - UV svetloba povzroča pretežno neposredno tvorjenje radikalov,
 - vidna svetloba povzroča pretežno posredno nastajanje radikalov,
 - IR svetloba povzroča samo posredno tvorjenje radikalov,
 - sevanje valov krajših valovnih dolžin in ionizacijska sevanja (npr.: gama, X, alfa (helijeve jedra) in beta žarki (elektroni)) povzročajo pretežno posredno nastajanje radikalov,

- ultrazvok,
- kajenje: radikali nastajajo pri visokih temperaturah tlenja substance tobaka v cigaretah in z dimom prihajajo v pljuča ter
- ozon, ki posredno povzroča tvorjenje radikalov,

b) notranji:

- spontane redoks reakcije z enim elektronom in avtooksidacije,
- prehod elektronov iz dihalne verige v mitohondrijih,
- reakcije, v katerih sodelujejo encimi (NO sintaze, različne oksidaze (npr. monoamin oksidaza (MAO), NADPH oksidaza (Nox), ksanin oksidaza (XO), ciklooksigenaze (COX) itd.),
- metabolizem snovi, predvsem nekaterih učinkovin in ksenobiotikov in
- reakcije radikalov pri nastajanju vnetja ter v primerih aktivacije našega imunskega sistema (Mravljak in Pečar, str. 18).

Radikale lahko v telesu povzročajo zunanji in notranji vzroki. Med temi ločimo Fotokemično nastajanje radikalov, katerih v naravi nastaja največ. Del sončne svetlobe, še zlasti ultravijolična svetloba (UV) ima dovolj energije, da lahko povzroči homolitsko cepitev kovalentne vezi. Zaradi tega v ozračju in na zemeljskem površju stalno nastajajo radikali. Tudi v koži, ki je izpostavljena sončni (ali umetni svetlobi, ki vsebuje v svojem delu tudi UV fotone npr. solarij) nastajajo radikali. Če jih nastane preveč, povzročijo vidne posledice: vnetje in sončne opekline (Mravljak in Pečar, str. 19). Radikali lahko nastajajo tudi zaradi Ionizacijskega sevanja. V našem okolju so tudi elektromagnetna sevanja višjih energij (rentgensko sevanje, žarki gama, kozmični žarki). Tudi pri izpostavljenosti tem sevanjem nastajajo radikali, vendar največkrat po posredni poti. Energije teh sevanj so bistveno večje, kot je disociacijska energija kovalentne vezi, zato se odvija drugačno zaporedje dogodkov. Če so visoke energije fotonov v območju energij elektronov v nižjih orbitalah spojine (npr. 1s elektroni), prihaja do izbitja takega elektrona (ionizacija). Nastaneta kation izhodne spojine in elektron. Spojina brez elektrona v s orbitali ni stabilna in se stabilizira po različnih poteh. Prazno mesto zapolnijo elektroni iz višjih orbital, sledi izsevanje ustrezne odvečne energije. Kation se stabilizira tudi tako, da razpade na manjše (stabilne) dele. Pogosto so med razpadlimi produkti tudi radikali. Različne valovne dolžine ionizacijskega sevanja imajo različen vpliv na organizem, kar vidimo v preglednici 1 (Mravljak in Pečar, str. 21).

Preglednica 1: Energije posameznih delov elektromagnetnega valovanja, delež v sončnem spektru in vplivi na organizem (Mravljak in Pečar, str. 21)..

Valovna dolžina [nm]	Vrsta elektromagnetnega valovanja in delež v sončnem spektru [%]*	Energija [Kcal/mol]	Vplivi na organizem
Nad 750	Infrardeča svetlobe (IR) ~ 54 %	Pod 30	Segrevanje tkiva Vpliv na tok elektronov v mitohondrijih.
Od 750 (rdeča) do 400 (vijolična)	Vidna svetloba ~ 37 – 39 %	30 - 71	Vid in fotosinteza, fotokemija, posreden nastanek singletnega kisika.
Ultravijolična (UV) svetloba 7 – 9 % v sončnem spektru			
400 - 315	UV-A, ~ 96,5 % v deležu UV svetlobe	71 – 89	Fotokemija in nastajanje radikalov.
315 - 280	UV-B, ~ 3,5 % v deležu UV svetlobe	89 – 101	Fotokemija in nastajanje radikalov, fotosinteza vitamina D v koži.
280 - 200	UV-C**	101 - 141	Fotokemija in nastajanje radikalov.

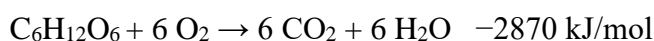
Visokoenergetska sevanja			
200 - 10	UV v vakuumu	Nad 141	Ionizacije
10 - 0,1	Rentgensko sevanje		
0,1 - 0,001	Gama žarki iz vesolja		

Vzrok nastajanja radikalov je tudi ultrazvok. Za ultrazvok so ugotovili, da lahko zaradi mikro lokalnih energijskih razmer (temperatura, tlak) povzroča cepitve kovalentnih vezi v molekulah. V vodi ultrazvok (močan ultrazvok s frekvenco med 20 in 100 kHz) povzroči nastajanje HO• in H• in posledično nastanek vodikovega peroksida. Radikali nastajajo v zelo omejenem obsegu tudi pri slikanju z ultrazvokom, kjer uporabljajo diagnostični ultrazvok s frekvenco med 5 in 10 MHz. Količina nastalih radikalov je majhna in v območjih, ki jih zdrav organizem zlahka prenese (Mravljak in Pečar, str. 22). Radikali nastajajo tudi pri kajenju. V nasprotju s prej omenjenimi zunanjimi vzroki nastajanja radikalov, ko se energija zunanjega izvora uporabi za prekinitev kovalentne vezi v molekuli, pa pri kadilcih z dimom prihajajo v pljuča radikali, ki so nastali pri tlenju tobaka v cigareti. Visoka temperatura je vzrok, da pri tlenju nastaja vrsta spojin, ki jih originalno v samem tobaku ni. Mnoge od njih so močno rakotvorne. Do sedaj so v cigaretnem dimu identificirali približno 4000 različnih spojin. Pri kajenju z dimom v pljuča neposredno vnašamo različne radikale.ocene o količini radikalov pravijo, da z dimom 1 cigarete kadilec dobi približno 10^{16} radikalov. V dimu so različni O- in C-radikali ter različni dušikovi oksidi. Radikali so tudi v katranu; v 1 gramu približno 10^{17} . Radikale v katranu razdelimo na skupino stabilnih radikalov in skupino nestabilnih radikalov ter reaktivnih spojin, kamor spadata HO• in vodikov peroksid. V katranu je tudi večina kancerogenih spojin (policiklični aromatski ogljikovodiki). Kadilci s kajenjem stalno obremenjujejo svoja pljuča (in telo) z radikali, kar predstavlja velik izziv za zaščitne sisteme v človeškem telesu (Mravljak in Pečar, str. 22). Vzrok nastajanja radikalov je tudi ozon. Ozon (triatomski alotrop kisika, O₃) nastaja v statusferi iz O₂ s pomočjo UV-C žarkov. Ker ozon absorbira v področju valovnih dolžin UV svetlobe, deluje kot filter za UV predvsem UV-C svetlobo, ki ji prepreči dostop do površine planeta in tako ščiti živa bitja. Industrializacija, intenzivna raba fosilnih goriv, razmah uporabe avtomobilov in še kaj, obremenjujejo spodnje plasti atmosfere s prahom, (nano)delci, ki stalno nastajajo pri izgorevanju fosilnih goriv, s hlapnimi ogljikovodiki in dušikovimi oksidi. To so razmere, pri katerih lahko nastaja ozon že s pomočjo do površine prispele UV svetlobe, torej tudi v nižjih plasteh atmosfere. Poleti so v velikih mestih dostikrat dosežene ali presežene mejne količine ozona (120 µg/m zraka). Ozon je močan oksidant (učinkovitejši kot O₂), ki oksidira mnoge organske spojine. V telo prihaja predvsem z vdihanim zrakom in zaradi oksidacij v pljučih povzroča številne težave. V procesu oksidacije organskih snovi z ozonom nastajajo radikali (HO•, HOO•) in vodikov peroksid (Mravljak in Pečar, str. 23). Drugi pomembni viri radikalov so spontane in katalizirane redoks reakcije, ki potekajo v našem telesu. V teh procesih nastajajo predvsem kratkoživi O- in N-radikali, ki se hitro pretvorijo v stabilnejše spojine iz skupine ROS in RNS, oziroma radikale v organizmu vedno spremljajo

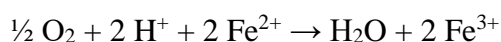
tudi njihovi reaktivni neradikalški produkti. Sodobne analizne metode omogočajo, da v mnogih primerih vemo, ali primarno nastaja radikal ali reaktivna spojina kisika oziroma dušika.

Nastajanje radikalov zaradi notranjih vzrokov povzroči nastanek množice produktov. Največkrat ne gre za homolitsko cepitev kovalentne vezi, pri čemer prevladujejo enoelektronske oksidacije, kjer se energija sprošča (eksotermne reakcije). S tem smo v reakcijo vpleteni kisik, ki ima ključno vlogo pri nastanku radikalov oziroma spojin s splošno formulo ROS (Mravljak in Pečar, str. 23).

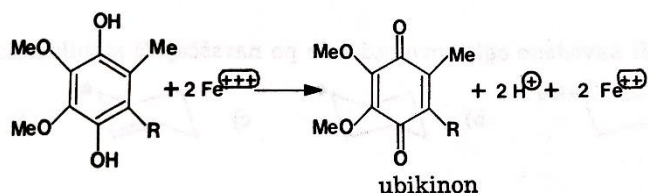
V našem telesu se ogljikovi hidrati kot sestavni del hrane deloma pretvorijo v energijo, npr. glukoza se oksidira v vodo in CO₂ (Tišler, str. 190):



Vendar oksidacija glukoze ni preprost sežig, ampak poteka vrsta oksido-reduktivnih reakcij. Za redukcijo O₂ v H₂O potrebne elektrone dajejo Fe(II) ioni:

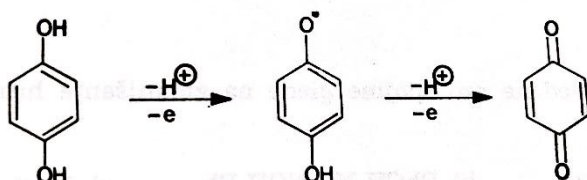


Ključna spojina pri tem je hidrokinon, ki se zlahka oksidira v *p*-benzokinon. Nasprotno pa se slednji zlahka reducira nazaj v hidrokinon. Fe(II) ion se v celicah regenerira iz Fe(III) iona s koencimom *Q* ali ubikinonom (R pomeni dolgo alkeno verigo z različno strukturo, odvisno od izvora ubikinona, npr. iz kvasa, celic sesalcev ipd.), kar vidimo na sliki 4.



Slika 1: Regeneracija Fe(II) iz Fe(III) z ubikinonom (Tišler, str. 191).

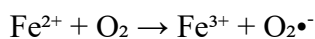
Pretvorba hidrokinona v kinon poteka s prenosom elektrona tako, da najprej nastane radikal semikinon, ki je dokaj obstojen. S ponovnim prenosom elektrona nastane nato kinon, Slika 2:



Slika 2: Pretvorba hidrokinona v kinon (Tišler, str. 191).

Kisik pride v živi celici v stik z alkilnimi skupinami različnih organskih spojin. Celične membrane vsebujejo lipide in njihove alkilne ali cikloalkilne skupine lahko reagirajo s kisikom.

Večina celic potrebuje kisik kot izvir energije in ena od stranskih reakcij je pretvorba kisika v H_2O_2 , ki se lahko dalje pretvori in nastanejo alkilni radikali. Sledijo pretvorbe teh in nastanejo produkti, ki so škodljivi za delovanje celične membrane. Kvarjenje membran je ena od značilnosti staranja celice. Živi organizmi se varujejo pred napadi ogljikovih radikalov z antioksidanti (vitaminoma C in E, ki sta oba dobra donorja vodika). Sintezne antioksidante rabimo danes v velikih količinah za preprečevanje oziroma upočasnjevanje procesov staranja gume, polimerov, kvarjenja hrane ipd. (Tišler, str. 191). V telesu potekajo poleg kataliziranih reakcij tudi nekatalizirane, ki so predvsem eksotermne, njihova energija aktivacije pa je majhna, njihova posledica pa je nastanek radikalov. Z besedo »nekatalizirane« želimo izraziti, da gre za reakcije, kjer ne sodelujejo encimi in nastajajo kljub temu radikali ter druge reaktivne spojine. Na te radikale celica ne more neposredno vplivati. Med te reakcije sodijo enoelektronske oksidacije, ki so vir endogenih radikalov in primer teh je oksidacija Fe^{2+} v Fe^{3+} . Elektron, ki ga odda Fe^{2+} , sprejme kisik, ki je v vodi raztopljen:



V tej oksidaciji nastaja superoksidni radikal ($O_2^{\bullet -}$), ki zaradi svoje reaktivnosti reagira dalje in v vodi zaznamo le produkte njegovih nadaljnjih pretvorb. V našem telesu poteka podobna oksidacija, čeprav so razmere nekoliko drugačne. Ocenjujejo, da je v našem organizmu približno 4,5 g železa. Večina (približno 2/3) ga je kot Fe^{2+} v hemoglobinu, ostala tretjina pa je v mioglobinu. V različnih encimih (predvsem citokromih) in v skladiščih (kompleksi Fe^{3+} v proteinih kot so feritin, transferin in laktoferin. Za primerjavo povejmo, da je v telesu 80 mg bakrovih ionov. Vsaka motnja v ravnotežju med vezanimi in prostimi ioni v smeri večje koncentracije nevezanih ionov v vodi povečano nastajanje predvsem hidroksilnih radikalov (Mravljak in Pečar, str. 23).

1.2 Delitev radikalov

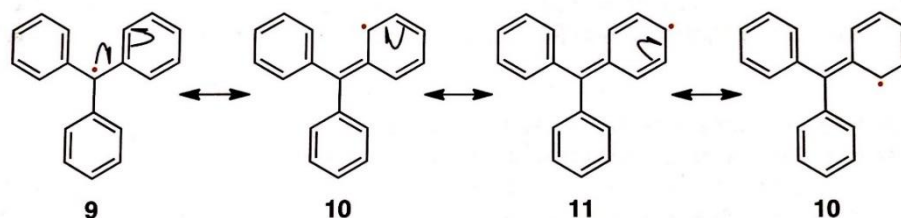
Radikale razvrščamo v skupine po različnih kriterijih. Glede na atom, kjer se najverjetneje nahaja nesparjen elektron, razlikujemo več različnih tipov:

- kisikove ali O-radikale
- dušikove ali N-radikale
- žveplove ali S-radikale
- ogljikove ali C-radikale itd.

Prvi trije tipi so v celici stalno prisotni, ker so vpleteni v fiziološke (presnova) in patofiziološke procese, C-radikali pa nastajajo le občasno (Mravljak in Pečar, str. 16). Glede na orbitalo, kjer se nahaja nesparjen elektron, oziroma, ali je nesparjen elektron prostorsko omejen, ali pa je porazdeljen po širšem področju molekule, ločimo:

- sigma (σ) radikale, npr. metilni radikal, $\bullet CH_3$, in

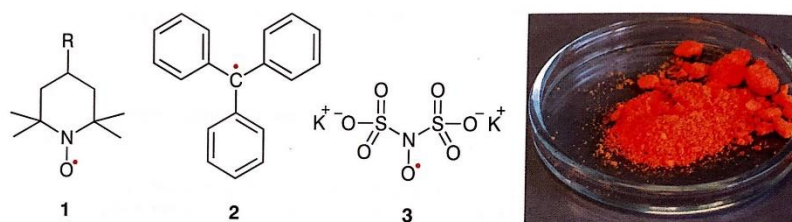
- pi (π) radikale, kjer je elektron po molekuli delokaliziran, npr. trifenilmetilni ali tritilni radikal (9 - 11, Slika 1 (Mravljak in Pečar, str. 17)).



Slika 3: Trifenilmetilni ali tritilni (9) radikal. Prikazana je možna delokalizacija nesparjenega elektrona znotraj enega obroča (9, 10, 11). Elektron je delokaliziran po vseh treh aromatskih obročih (π radikal) (Mravljak in Pečar, str. 17).

Glede na stabilnost poznamo:

- Nestabilne radikale (večina); njihova življenjska doba v okolju celice je do 1 sekunde, npr.: $\bullet\text{NO}$.
- Metastabilne radikale; življenjska doba je do nekaj ur, npr. askorbilni radikal.
- Stabilne radikale, ki so stabilni v organizmu daljši čas (Mravljak in Pečar, str. 17) Slika 2.



Slika 4: Splošna struktura stabilnih nitroksilnih radikalov (1), ena izmed struktur tritilnega radikala (2) in struktura Fremy-jeve soli (3) v vodni raztopini. Na sliki desno so kristali nitroksilnega radikala (1), kjer je $\text{R}=\text{OH}$ (Mravljak in Pečar, str. 17).

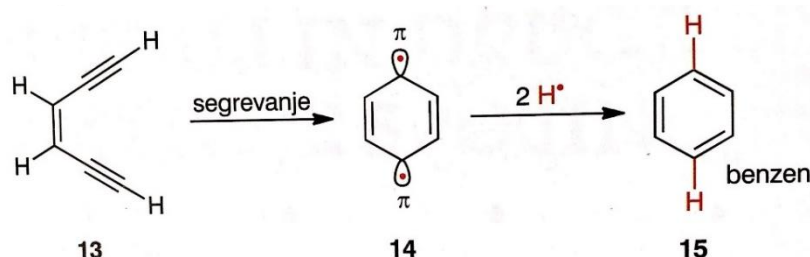
Glede na vrsto redoks reakcije, v katero radikal vstopa, ločimo (Mravljak in Pečar, str. 17):

- redukativne radikale, npr.: radikal ogljikovega dioksida ($\text{CO}_2\bullet$),
- oksidativne radikale, npr.: hidroksilni radikal ($\text{HO}\bullet$).

Glede na število nesparjenih elektronov ločimo (Mravljak in Pečar, str. 17):

- monoradikale (velika večina) ali kar radikale z enim nesparjenim elektronom in

- biradikale z dvema neparjenima elektronoma, npr.: *para*-benzin biradikal.



Slika 5: S segrevanjem heksaendiina (13) se ta preko intermediata (14, bi π radikal) pretvori do benzena (15). Reakcija je znana kot Bergmannova ciklizacija, ki poteka tudi pri nekaterih antibiotikih (Mravljak in Pečar, str. 17).

Pomembna lastnost reaktivnih radikalov v primerjavi z ostalimi spojinami je, da reagirajo nespecifično, navadno kar z bližnjo spojino, ki jo srečajo. Če te možnosti ni (npr. v vesolju, kjer je snov zelo redka ali v inertnem plinu), potem so tudi reaktivni radikali dolgoživi. HO• lahko v celici reagira z lipidi, proteini ali z nukleinskimi kislinami, skratka s snovjo, ki je v njegovi neposredni bližini. Drugi predstavniki ROS (reaktivne kisikove spojine) in RNS (reaktivne dušikove spojine) pa zaradi različnih omejitev reagirajo bolj specifično in le z določenimi funkcionalnimi skupinami, npr. s tiolnimi skupinami (-SH) proteinov (Mravljak in Pečar, str. 18).

1.3 Kemijske in fizikalne lastnosti radikalov

V primerjavi z drugimi spojinami so radikali zaradi prisotnosti neparjenega elektrona v svoji strukturi po svojih kemijskih in fizikalnih lastnostih nekoliko drugačni. Vsem radikalom, ki tako ali drugače nastajajo v našem organizmu, je skupna velika reaktivnost, ki se odraža v njihovi kratki življenjski dobi, oziroma radikal, ki nastane nekje v telesu, zelo hitro reagira s snovjo (ali radikalom) v okolici. Zaradi te lastnosti, so 'fiziološke' koncentracije radikalov v telesu izredno nizke: večinoma v območju nmol/L. Te koncentracije so vedno rezultat razlike med hitrostjo nastajanja in reaktivnostjo posameznega radikala. Če je hitrost nastajanja večja, kot je hitrost reagiranja, potem z izbranimi metodami radikal lahko neposredno zaznamo in dokažemo, sicer moramo proučevati nastale sledi in s pomočjo poznavanja kemičnih reakcij retrogradno sklepati na vrsto primarnih radikalov.

Zaradi neparjenega elektrona so vsi radikali paramagnetni, kar omogoča, da jih v primeru zadostne stabilnosti in koncentracije lahko neposredno zaznamo z metodo elektronske spinske resonance (ESR) ali elektronske paramagnetne resonance (EPR). Ta metoda je edina neposredna metoda za zaznavo in proučevanje radikalov, zlasti za proučevanje stabilnih radikalov. Žal pa so radikali v *in vivo* pogojih v tako nizkih koncentracijah ter tako kratkoživi, da omenjene metode ne moremo neposredno uporabljati. Za zaznavo so potrebni posredni postopki, katerih uspešnost je v naslednjem koraku odvisna od koncentracije radikalov (Mravljak in Pečar, str. 29).

1.4 Reakcije radikalov

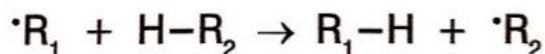
Večina reakcij v plinski fazi je radikalskih, potekajo pa tudi v raztopini v neioniziranih topil (ogljikovodiki, CS₂, CCl₄ ipd.). Nasprotno heterolitskim reakcijam, ki potekajo predvsem na polarnih ali polariziranih vezeh, potekajo homolitske reakcije v glavnem na nepolarnih ali šibko polarnih vezeh. Glavna značilnost homolitskih reakcij so verižne reakcije. Znane so pri nasičenih, nenasičenih in aromatskih spojinah ter lahko potekajo kot substitucije, adicije, eliminacije, premestitve ali fragmetacije. V začetku tega stoletja je Gomberg ugotovil, da daje heksafeniletan, ki ga je pripravil iz trifenilmetilklorida in srebra, v nepolarnih topilih rumeno obarvana raztopina. Nastala spojina lahko reagira z vrsto drugih spojin kot na primer s kisikom, jodom itd. Domneval je, da nastane v raztopini trifenilmetil radikal, ki je v ravnotežju s heksafeniletanom. Kasneje so ugotovili, da ima dimer strukturo cikloheksadiena (Tišler, str. 179).

Podobno kot organske reakcije, ki jih razvrščamo v več skupin (adicije, eliminacije, substitucije, redukcije, oksidacije, periciklične reakcije, premestitve, fotokemične reakcije itd.), radikalske reakcije razdelimo na pet tipov, ki jih vse srečamo tudi v našem telesu. Pri organskih reakcijah iz dveh reaktantov nastane najmanj eden, največkrat pa vsaj dva produkta. Določen reaktant lahko reagira le z omejenim naborom drugih reaktantov. Pri radikalskih reakcijah je situacija drugačna. Najpomembnejša značilnost radikalskih reakcij je poleg hitrosti ta, da isti radikal lahko reagira z zelo velikim naborom snovi, kar vodi v nastanek množice različnih produktov, odvisno od snovi, s katero primarni radikal reagira. Zelo reaktivni radikali reagirajo kar z bližnjimi spojinami (Mravljak in Pečar, str. 29).

Poznamo naslednje tipe radikalskih reakcij:

a) Odvzem vodikovega atoma

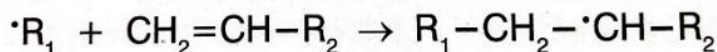
Pri tej reakciji primarni radikal ($\cdot R_1$) odvzame atom vodika spojini (H-R₂). V heterogeni zmesi spojin v celici, je H-R₂ lahko DNA, protein, molekula lipida itd. Rezultat je nastanek novega radikala ($\cdot R_2$), ki lahko na isti način reagira naprej. Če ima primarni radikal na voljo več različnih spojin z vodikom, potem bo verjetnost reakcije obratno sorazmerna z energijo kovalentne vezi med H in R₂ v spojini H-R₂. V reakciji nastali radikal ($\cdot R_2$) je praviloma manj reaktiven in zato stabilnejši. Odvzem vodika je tipičen za reaktivne radikale, kot je npr. HO \cdot , manj reaktivni radikali (npr. O₂ \cdot) pa tega ne zmorejo. Ta kriterij je pomemben za toksičnost radikalov. Radikali, ki tega ne zmorejo, so manj nevarni (Mravljak in Pečar, str. 29).



b) Adicija radikala na dvojno vez

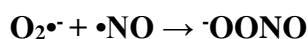
Radikal se lahko adira na dvojno vez alkena. Tudi v tej reakciji nastane nov radikal, ki reagira naprej po enem izmed petih tipov radikalskih reakcij. Omenjena reakcija, ki prispeva k pestrosti

produktov, je omejena na spojine z dvojnimi vezmi, ki so predvsem v membranah z nenasičenimi maščobnimi kislinami. V industriji je ta reakcija pomembna za pripravo polimerov, ko s primarnim radikalom sprožimo radikalno polimerizacijo (Mravljak in Pečar, str. 29-30).

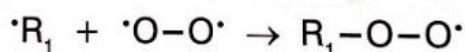
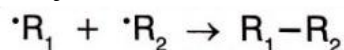


c) Reakcija med dvema radikaloma

Ta reakcija je obratna homolitski cepitvi kovalentne vezi. Iz dveh enakih ali različnih radikalov nastane nova kovalentna vez in nova neradikalna spojina. Pri prvem in drugem tipu radikalnih reakcij vedno nastane nov radikal, v tem primeru se to zgodi le, če monoradikal reagira z diradikalom, npr. s tripletnim kisikom. V okviru te reakcije se prvič srečamo z možnostjo, da monoradikali izginjajo iz sistema. Pri tem nastajajo nove spojine. V celici je ta tip reakcije pomemben pri reakciji $O_2\cdot$ in $\cdot NO$. Nastane peroksinitrit, ki je eden najučinkovitejših in zato najnevarnejših oksidantov v telesu (Mravljak in Pečar, str. 30).

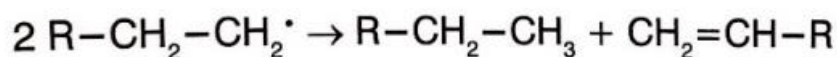


Reakcija med dvema radikaloma je verjetnejša na mestih, kjer je možno lokalno koncentriranje radikalov, npr. v celični membrani, kjer reagirajo med seboj alkilni radikali na verigah fosfolipidov. Možne so še reakcije med radikalom membranskega proteina in alkilnimi radikali fosfolipidov, nadalje med radikalom nukleinske kisline in radikalom proteina, ki je adsorbiran na nukleinsko kislino in reakcija dveh proteinskih radikalov, ki sta v funkcionalnem kompleksu. V vseh teh primerih nastanejo nove kovalentne vezi med omenjenimi sestavinami celice, torej nove spojine pri čemer se spremeni funkcija teh komponent, kar močno prizadene delovanje celice (Mravljak in Pečar, str. 30).



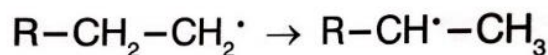
d) Reakcija dismutacije

V tej reakciji iz dveh molekul istega radikala nastane produkt, ki nista radikala. Reakcija je znana tudi med neradikalnimi spojinami, npr. dismutacija benzaldehida v benzilni alkohol in benzojsko kislino itd. V telesu je izredno pomembna dismutacija $O_2\cdot$, ki $O_2\cdot$ pretvori v kisik in vodikov peroksid (H_2O_2). Ta reakcija, s katero sme odstrani prvi radikal v skupini ROS, poteka v celicah neprestano, ker tudi $O_2\cdot$ neprestano nastaja. Možni sta dve poti dismutacije $O_2\cdot$: nekatalizirana in katalizirana dismutacija (Mravljak in Pečar, str. 30).



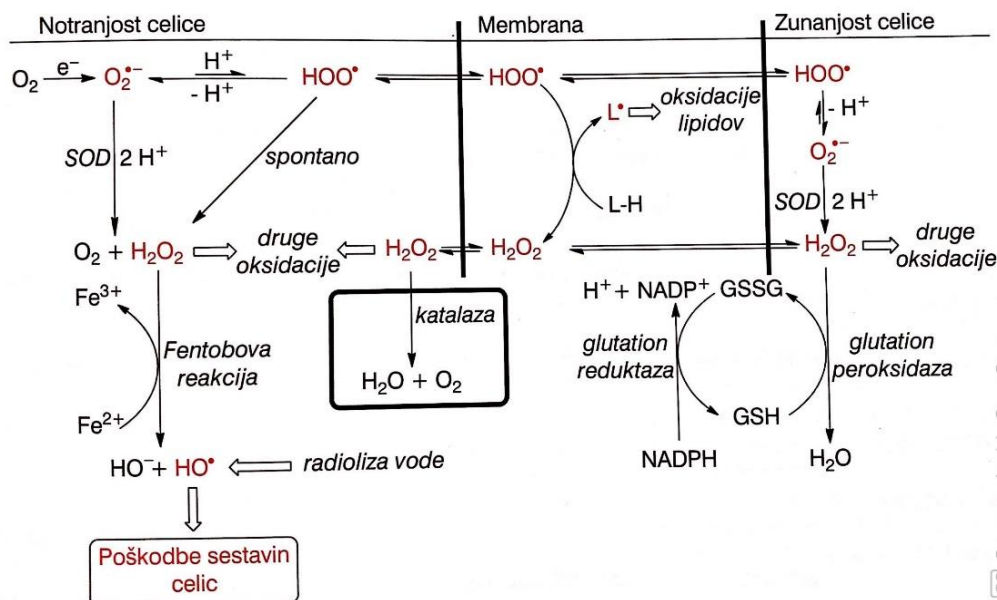
e) Reakcija izomerizacije

Pri tej reakciji se nesparjen elektron znotraj molekule radikala premesti, tako da je nov radikal stabilnejši glede na prvotnega, npr. primarni C-radikal preide v stabilnejši sekundarni C-radikal. Tudi ta vrsta reakcije poteka v telesu (Mravljak in Pečar, str. 32).



Kljub temu, da imamo le pet tipov radikalskih reakcij, pa v reakcijah, kjer so prisotni radikali nastaja ogromno različnih produktov. V teh primerih težko napovemo kakšni produkti bodo nastali, zato tovrstne reakcije predstavljajo »šume« tako v naravi, kot v človeškem telesu. Ne glede na evolucijo človeka, teh »šumov« ni bilo mogoče v celoti odstraniti, zato se še dandanes v svetu iščejo alternativne rešitve, ki bi jih omejile na najnižjo možno raven.

Evolucija si prizadeva odstraniti primarni superoksidni radikal, kar lahko vidimo tudi na spodnji sliki (Slika X). Prikazuje pretvorbe $O_2\cdot^-$ v celičnem okolju do vodikovega peroksida. V primeru, da je količina $O_2\cdot^-$ prevelika, pa potečejo tudi druge radikalske reakcije. pH je v celici približno 7,4 in ravnotežje je močno pomaknjeno v smeri $O_2\cdot^-$, takrat je desni del sheme zanemarljiv. Če se lokalno zniža vrednost pH, moramo upoštevati tudi desni del sheme na sliki. Ko SOD ne more več odstranjevati $O_2\cdot^-$, pa se začnejo razvijati neugodni procesi za celice (slika 6).



Slika 6: Shematski prikaz dogodkov v celici po nastanku $O_2\cdot^-$ (Mravljak in Pečar, str. 32).

2. ANTIOKSIDANTI

Antioksidanti so v prvi vrsti reducenti, ki v reakciji z radikalnimi strukturami ali oksidanti donirajo vodikov atom ali elektron. Cilj vseh teh reakcij je, da se reaktivni radikal ali oksidant pretvori v manj reaktiven radikal ali nereaktiven produkt. Pri reakciji antioksidanta z radikalom vedno nastane stabilen radikal, ki v splošnem ni več sposoben nadaljevati reakcije oksidacije. Namesto, da bi primarni radikali odvzeli vodikov atom kaki lipidni ali kaki drugi celični sestavini, vodik odvzamejo antioksidantu. Tako delovanje antioksidantov varuje pomembne celične sestavine pred nenadzorovano oksidacijo. Če je radikalov in oksidantov malo, potem obstoječi celični, tkivni ali telesni antioksidanti zadržujejo spontane oksidacije na najnižji in fiziološko sprejemljivi ravni. Uspešen antioksidant mora, poleg tega, da je ob pravem času na pravem mestu, izpolnjevati še nekaj pogojev:

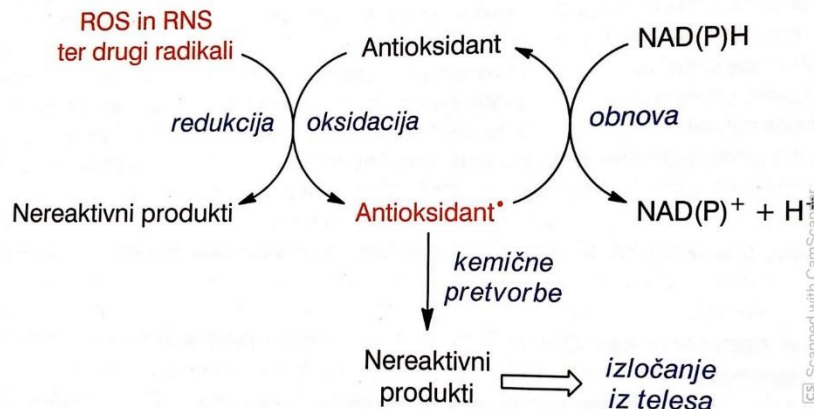
- reakcija med antioksidantom in radikalom mora biti hitrejša kot reakcija radikala s posamezno celično sestavino.
- antioksidant mora biti prisoten dobesedno povsod zaradi nepredvidljivega mesta nastanka hidroksilnega radikala.

Do sedaj so bile izvedene številne študije, kjer so si njihovi naročniki obetali dokaze o koristnosti in o uporabnosti antioksidantov. Rezultati so pokazali, da dodatno uživanje antioksidantov po predpisanem protokolu študije pogosto ne daje pričakovanih rezultatov.

Antioksidativni učinek je določen z vrsto antioksidanta, z njegovim mehanizmom delovanja, z njegovim interakcijami z drugimi antioksidanti in v primeru, ko vnesemo antioksidante z nekega zunanega sistema, še z njegovo absorpcijo v prebavilih, odmerkom, s pogostostjo vnosa v telo, s presnovo in izločanjem iz telesa. Dober antioksidant je antioksidant, ki je ob pravem času na pravem mestu. Sami kriteriji niso nič novega, ker jim ves čas sledi tudi evolucija, ki je razvila antioksidante, ki delujejo po vsem prostoru celice oziroma organizma, so stalno na voljo in so obnovljivi (Mravljak in Pečar, str. 138).

V naših celicah neprestano potekajo nadzorovani redoks procesi, pretežno v mitohondrijih. V večini so to oksidacije, kjer sodelujejo encimi, ki nadzorovano usmerjajo tok elektronov iz substrata na kisik, ki je njihov končni prejemnik. V nizu povezanih redoks reakcij v mitohondriju nastaja ATP, tako da njegova sinteza ni v neposrednem stiku s tokom elektronov. Poleg teh encimsko kataliziranih oksidacij potekajo še spontane oksidacije. To so nenadzorovane enoelektronske oksidacije, v katerih nastajajo spojine s splošno formulo ROS. Odločilnega pomena za življenje je dosežek evolucije, da nadzorovano izvaja (dvoelektronske) oksidacije v celicah, kjer so hkrati navzoči tako kisik kot številni reducenti (sestavine celice). Spontane oksidacije evolucija ni zmogla v celoti odstraniti, jih je pa omejila na najnižjo možno in relativno raven in za doseg takega stanja so se v razvoju na prizorišču pojavili antioksidanti,

katerih primarna naloga je, da na različne načine zadržujejo delež spontanih oksidacij na nizki ravni (Mravljak in Pečar, str. 139), Slika 7.



Slika 7: Življenjski krog antioksidantov pri redukciji ROS in RNS (Mravljak in Pečar, str. 139).

2.1 Hierarhija antioksidantov

Antioksidante lahko razvrstimo po hierarhiji, kjer jih razporejamo glede na njihovo učinkovitost pri delovanju in glede na količino vsebnosti v organizmu. Po učinkovitosti delovanja, vodijo endogeni antioksidanti (encimi), katerih koncentracija se lahko prilagaja potrebam. Sem štejemo superoksid dismutaze, katalaze in peroksidaze. Drugi po učinkovitosti so antioksidanti, ki jih imenujemo blažilci šoka, ker so na voljo v krvi in drugih tkivih v visokih koncentracijah. Za razliko od encimskih antioksidantov oksidativni stres ne spodbuja njihovega nastajanja. Tukaj srečamo antioksidante albumin, transferin in senčno kislino. V tretjo skupino spadajo esencialni antioksidanti (vitamini, mikroelementi) in tiste strukture, ki jih človeško telo tvori kot intermediate pri grajenju kompleksnejših spojin ali pa so del bolj kompleksnih molekul. Četrto skupino antioksidantov, ki je najštevilčnejša, predstavljajo strukturno različnih naravnih spojin med katerimi so karotenoidi in flavonoidi/polifenoli (Mravljak in Pečar, str. 143).

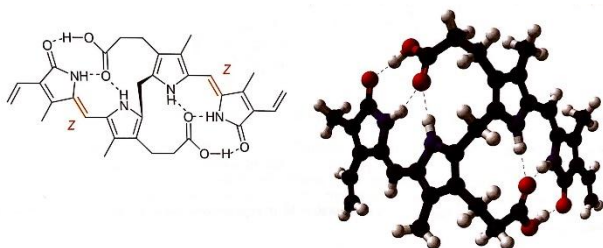
2.1.1 NIZKOMOLEKULARNI ANTIOKSIDANTI ENDOGENEGA IZVORA

Med nizkomolekularnimi antioksidanti endogenega izvora so najpomembnejši tioli in med njimi GSH. Tiolne skupine na proteinih so »stacionarni« antioksidanti, GSH pa je mobilni tio antioksidanta, ki opravlja svojo vlogo reducenta v celicah in v izvenceličnem prostoru (Mravljak in Pečar, str. 165).

Pomembni antioksidanti v tej skupini so tudi bilirubin, koencim Q, sečna kislina, melanin, melatonin, α -keto kisline in lipojska kislina.

2.1.1.1 Bilirubin

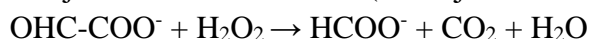
Bilirubin (Slika 8) je razgradnji produkt hema: encim hem oksigenaza ga razgradi do modro-zelenega biliverdina, tega pa biliverdin reduktaza reducira do rumeno obarvanega bilirubina. Večina (80 %) bilirubina izvira iz presnove hemoglobina, preostanek (20 %) pa iz hema drugih encimov (mioglobin, katalaze, citokromi itd.) Kot antioksidant bilirubin *in vitro* odstrani ONOOH, ROO•, RO• in $^1\text{O}_2$. Nekatere ROS ga oksidirajo v biliverdin, tega pa obnovi biliverdin reduktaza. Bilirubin, vezan na albumin, ščiti sam protein in na albumin vezane maščobne kisline red reakcijami z radikali. Da je bilirubin pomemben antioksidant, so najprej dokazali na celičnih kulturah, zlasti nevronih, kasneje tudi na živalih. Bilirubin v prisotnosti svetlobe lahko poveča možnost za tvorbo $^1\text{O}_2$. Pri njegovi oksidativni razgradnji lahko nastanejo potencialno toksične vazokonstriktorne spojine, ki so jih določili v cerebrospinalni tekočini pacientov (Mravljak in Pečar, str. 165-166).



Slika 8: Struktura molekule bilirubuna z označeno konfiguracijo dvojnih vezi (levo) in kristalna struktura molekule bilirubina (desno) (Mravljak in Pečar, str. 165).

2.1.1.2 α -keto kisline

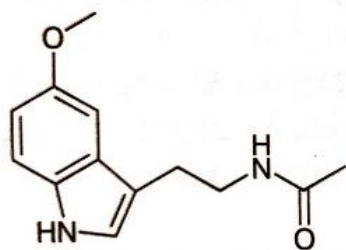
α -keto kisline se oksidirajo s H_2O_2 brez prisotnosti encimov in ga na ta način odstranijo, če jih dodamo mediju za celične kulture v mM koncentracijah. Zelo verjetno lahko keto kisline odstranjujejo tudi HOCl in ONOOH. V reakciji med α -keto kislino in H_2O_2 poteče oksidativna dekarboksilacija, ki jo pri 2-oksoglutaratu izkoriščamo tudi za določanje H_2O_2 . Piruvat je pomemben metabolni substrat za človeški zarodek v zgodnjih fazah in lahko do neke mere deluje tudi kot antioksidant (Mravljak in Pečar, str. 166). Poteče reakcija:



2.1.1.3 Melatonin

Melatonin (Slika 9) nastaja v žlezi češariki kot endokrini hormon, v manjši meri tudi v mrežnici, leči, gastrointestinalnem traktu in nekaterih drugih tkivih. Najdemo ga tudi v hrani npr. oreh, grozdju, paradižniku, vendar pri nobeni izmed naštetih ter tudi drugih produktih, ki jih uživamo ni dokazano, da bi vplivala na plazemsko koncentracijo melatoninina. Pomemben pa je pri uravnavanju cirkadianih ritmov številnih bioloških funkcij, svojo antioksidativno lastnost pa kaže posebej pri zaščiti jedrne in mitohondrijske DNA. Nastane z metiliranjem in acetiliranjem serotonina. Je šibak antioksidant *in vivo* (lahko donira vodikov atom iz NH skupine), in še to

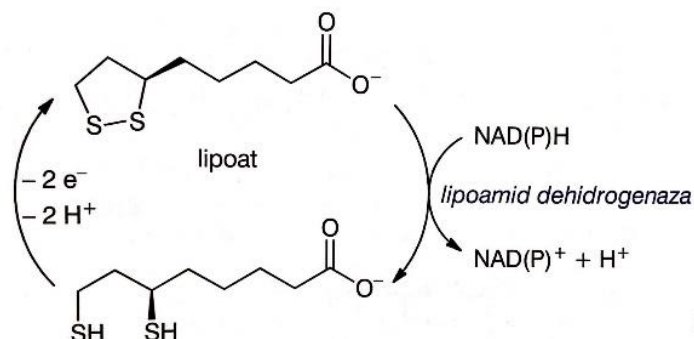
pri koncentracijah, ki so nekaj velikostnih razredov višje od fizioloških koncentracij (ki so manjše od 1 nM) (Mravljak in Pečar, str. 167).



Slika 9: Skeletna formula molekule melatonina (Mravljak in Pečar, str. 167).

2.1.1.4 Lipojska kislina

Lipojska kislina ((*R*)-6,8-dimerkaptooktanojska kislina) je kot lipoamid (lipoil-lizinska ročica) esencialni del nekaterih encimskih kompleksov (npr. piruvat dehidrogenaze in α -ketoglutarat dehidrogenaze). Tako oksidirana (disulfid), kot reducirana (ditiol) lipojska kislina imata lastnosti *in vitro*, ker odstranjujeta ROO \cdot , HOCl, CO₃ \cdot^- , NO₂ \cdot , HO \cdot in ONOOH. Poleg vsega tega, pa reagira tudi z železovimi in bakrovimi ioni v netopne spojine. Dehidrolipoat je močan reducent, ki reducira GSSG do GSG, dehidroaskorbat do askorbata in α -tokoferilni radikal do tokoferola. *In vivo* lipojsko kislino reducira encim lipoamid dehidrogenaza do dehidrolipojske kisline ob porabi NADH ali NADPH, Slika 10.



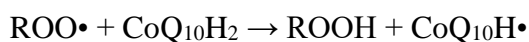
Slika 10: Oksidacija dihidrolipoata do lipoata in regeneracija z encimom lipoamid dehidrogenazo (Mravljak in Pečar, str. 167).

Lipojska kislina ima učinke na oksidativni stres, zmanjša aktivnost encima z AMP aktivirane proteinkinaze v hipotalamusu in poveča njegovo aktivnost v mišicah, sodeluje pa tudi v obrambi s peroksiredoksinom in odstranjuje perokside in ONOO⁻ ter brani patogeni mikroorganizem pred ROS iz fagocitov (Mravljak in Pečar, str. 167-168).

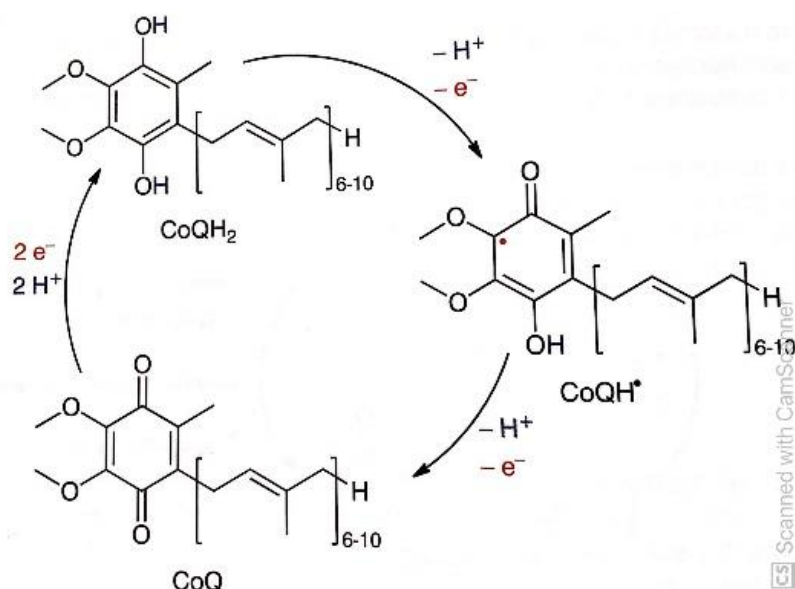
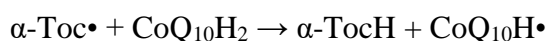
2.1.1.5 Koencim Q

Koencim Q ali ubikinon (CoQ) je benzokinonski derivat, ki je topen v lipidih. Ubikinon ne štejemo med vitamine, saj ga lahko sintetizirajo številni organi v telesu, problem pa nastane pri starejših ljudeh, saj ga pri njih nastaja bistveno premalo in ga morajo dodajati z dodatnimi pripravki. Prisoten je skoraj v vseh evkariontskih celicah in lipoproteinih, predvsem na notranji

mitohondrijski membrani. V procesu dihalne verige raznaša e^- iz *kompleksa I* in *II* do *kompleksa III*, pri čemer prehaja iz oksidirane oblike (1,4-kinon; ubikinon) do reducirane oblike (1,4-dihidrokinon, ubikinol) preko radikalskega semikinonskega intermedija ($\text{CoQ}_{10}\text{H}^\bullet$). *In vitro* reducira ROO^\bullet ter kot obnovljivi telesni antioksidant zavre lipidno peroksidacijo (Slika 11):



Ubikinon lahko kot antioksidant regenerira tudi α -tokoferil radikal v lipoproteinih in membranah (Mravljak in Pečar, str. 168):

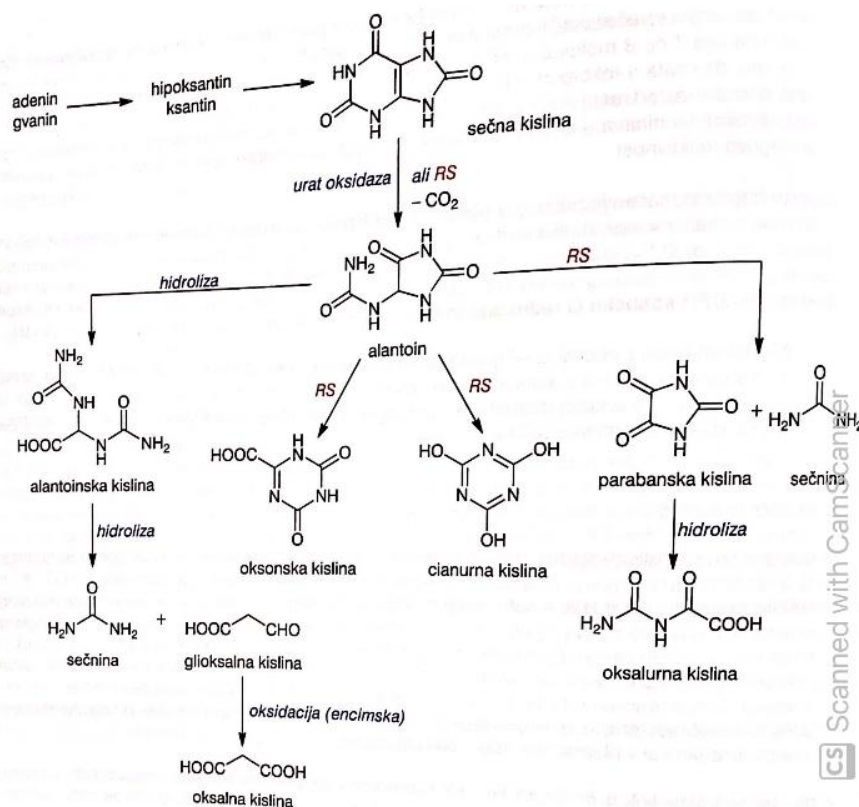


Slika 11: Redoks cikel koencima Q (Mravljak in Pečar, str. 168).

2.1.1.6 Sečna kislina

Sečna kislina je produkt oksidacije ksantina ali hipoksantina s ksantin oksidazo (XO) ali ksantin dehidrogenazo (XDH). V večini organizmov jo encim urat oksidaza v peroksisomih oksidira do alantoina in H_2O_2 . Alantoin hidrolizira najprej do alantoata in nato do glioksalata in sečnine. Ker ljudje in ostali primati nimamo funkcionalnega gena za urat oksidazo, se ta kopiči v krvni plazmi, kjer je prisoten v visokih koncentracijah. V nizkih koncentracijah je prisoten znotraj celic in v telesnih tekočinah kot so npr. mleko, mukus respiratornega trakta, slina, solze in sinovialna tekočina. Pri prekomerni tvorbi *in vivo* pride do kristalizacije, ki se kaže pri bolezni putike. Urat do radikala oksidirajo reaktivne zvrsti, kot so npr. HO^\bullet in ROO^\bullet , radikal pa je resonančno stabiliziran in ne reagira hitro z O_2 do peroksilnega radikala, Slika 12. Urat je zmogljiv lovilcec ROS *in vitro* in je predpostavljeno da deluje kot biološki oksidant *in vivo*. Je tudi lovilcec O_3 in NO_2^\bullet ter varuje proteine pred nitriranjem z ONOO^- . Visoke koncentracije

urata *in vivo* omogočajo njegovo antioksidativno delovanje, kar pa se kaže v oksidativnem stresu pri npt. bolnikih z Wilsonovo boleznijo, Dawnovim sindromom, prezgodnjem porodu, hemokromatozi, reumatoidnemu artritisu in intenzivnem naporu (Mravljak in Pečar, str. 169-170).



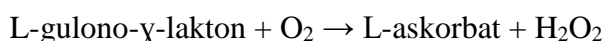
Slika 12: Metabolne poti nastanka sečne kisline in njene nadaljnje razgradnje (Mravljak in Pečar, str. 170).

2.1.2 NIZKOMOLEKULARNI ANTIOKSIDANTI EKSOGENEGA IZVORA

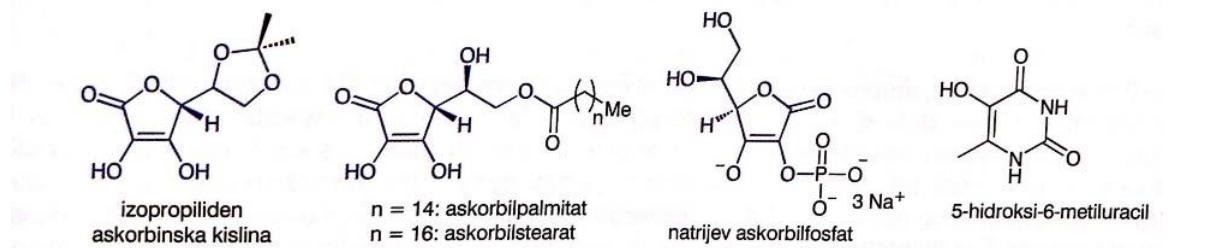
Antioksidanti, ki jih v naš organizem vnesemo s hrano in so za nas najpomembnejši, so askorbinska kislina (vitamin C), tokoferol (vitamin E), karotenoidi in (poli)fenoli rastlinskega izvora (Mravljak in Pečar, str. 171).

2.1.2.1 Askorbinska kislina (vitamin C)

L-Askorbinska kislina (vitamin C) (Slika 13) je najpomembnejši vodotopni neencimski antioksidant in hkrati kofaktor vsaj osmih encimov. Je vinilogna kislina, ki ima dve kislinski -OH skupini, zato je pri fiziološkem pH monoanion, imenovan askorbat. Rastline in živali ga lahko sintetizirajo, ljudje pa ne, saj je pri nas prišlo do okvare gena za encim L-gulonolaktom oksidazo in smo posledično odvisni od omenjenega antioksidanta, ki ga dobimo s hrano. Encim L-gulonolaktom oksidaza katalizira zadnjo stopnjo sinteze askorbata po reakciji:



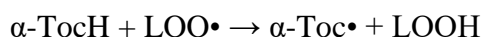
Askorbat kot antioksidant reagira z mnogimi predstavniki ROS in RNS ter drugimi radikali (jih reducira). Reducira $O_2^{\bullet-}$, HOO^{\bullet} , HO^{\bullet} , ROO^{\bullet} , tiolne radikale, uratni radikal, nitroksidne radikale itd. Poleg vsega tega varuje membrane in lipoproteine pred lipidno peroksidacijo, deluje protivnetno in še bi lahko naštevali. Do izčrpanja telesnih zalog askorbata lahko pride pri bolnih ljudeh, na primer na intenzivni negi ali pri odpovedi ledvic. Da bi izboljšali stabilnost in povečali lipofilnost, so pripravili številne derivate askorbinske kisline, ki se najpogosteje uporablja v prehranski in kozmetični industriji (Mravljak in Pečar, str. 171-175).



Slika 13: Skeletne formule nekaterih derivatov in analogov askorbinske kisline (Mravljak in Pečar, str. 171).

2.1.2.2 Vitamin E

Izraz »vitamin E« ne označuje le ene spojine, ampak skupino več spojin. S krovnim imenom vitamin E označujemo skupino osmih naravnih izomerov: d- α -, d- β -, d- γ - in d- δ -tokoferolov ter d- α -, d- β -, d- γ - in d- δ -tokotrienolov. Za antioksidativno delovanje vitamina E je bistvena fenolna skupina, ki je donor vodika in elektrona. Po reakciji vitamina E z radikalom nastane tokoferilni radikal, ki je manj reaktiven. Vitaminu E pogosto pripisujejo lastnost, da je najpomembnejši (toda ne edini) zaviralec lipidne peroksidacije *in vivo*. Lipidno peroksidacijo lahko preprečijo encimi, ki odstranjujejo sprožilne predstavnike ROS in vse snovi, ki kelirajo ione prehodnih kovin kot najzgodnejša obrambna linija. Poteče reakcija:

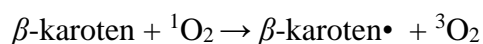


Pomanjkanje vitamina E povzroči mnoge simptome med drugim sterilnost pri samcih in odmrtnost zarodkov pri brejih samicah glodavcev, pri ljudeh pa ne povzroči očitnih bolezenskih znakov, saj začne njegova plazemska koncentracija vidneje upadati šele po nekaj mesecih. Viri vitamina E v hrani so npr. pšenični kalčki, rastlinska olja, margarina, oreški, semena in zelena listnata zelenjava (Mravljak in Pečar, str. 176-177).

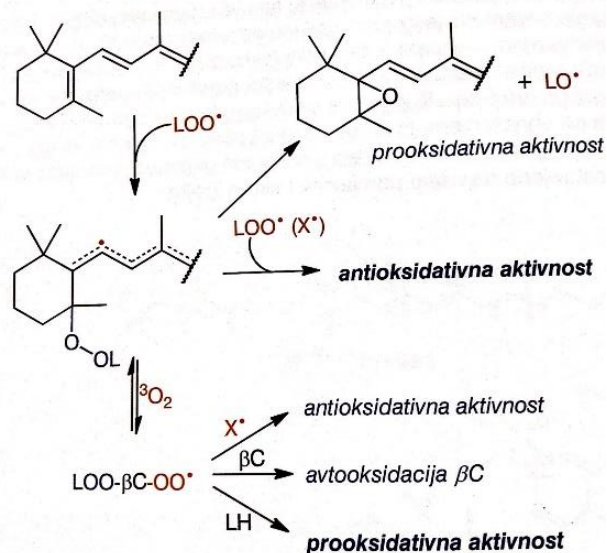
2.1.2.3 Karotenoidi

Karotenoidi so obširna skupina barvil, izredno lipofilnega značaja (najpogosteje rumena, rdeča in oranžna) in so pogosta v rastlinskih tkivih. Našli so jih tudi v nekaterih živalih (polži, losos, jastogi), nekaterih bakterijah in glivah, opisanih pa jih je preko 700. Imajo dolge razvejane verige s konjugiranimi dvojnimi vezmi, kar omogoča obsežno delokalizacijo elektronov, zato absorbirajo svetlobo v vidnem delu spektra in so intenzivno obarvani. V rastlinah so karotenoidi

pomembni antioksidanti, ki odstranjujejo $^1\text{O}_2$ in preprečujejo njegovo nastajanje v procesu fotosinteze. Najboljši odstranjevalec $^1\text{O}_2$ *in vitro* je likopen. Prevladujoč mehanizem odstranjevanja singletnega kisika je fizikalno dušenje, kjer karotenoid pretvori tega v tripletni kisik. Poteče reakcija:



Antioksidativno obnašanje β -karotena (Slika 14) je v celoti odvisno od usode $\text{LOO}\cdot\beta\text{C}\cdot$ radikalov, kar pa je odvisno od pogojev v okolju, predvsem od koncentracije kisika. Antioksidativne vloge karotenoidov v bioloških sistemih še ne poznamo dovolj, ne moremo pa zanikati, niti ne moremo izključiti drugih pozitivnih učinkov (Mravljak in Pečar, str. 180-184).



Slika 14: Antioksidativna aktivnost β -karotena kot funkcija koncentracije O_2 (Mravljak in Pečar, str. 180).

2.1.2.4 Fenolni in polifenolni antioksidanti

Fenoli in polifenoli so skupina sekundarnih metabolitov v rastlinskem svetu, ki so zastopana v največjem obsegu. Poznamo pet glavnih razredov polifenolnih spojin. Glavna biosintezna pot se začne iz fenilalanina, ki se pretvori v cimeto kislino in ta nato še v številne druge razrede spojin, ki se zaključijo z antocianidini. Fenolne skupine najdemo v rastlinah, ki so bogat vir najrazličnejših le-teh. Tam imajo različne funkcije, kot so barvila v listih, cvetovih in plodovih, imajo protimikrobno in protiglivično delovanje, varujejo rastline pred zajedavci ter poškodbami zaradi UV sevanja, kelirajo kovinske ione in nudijo antioksidativno zaščito pred reaktivnimi zvrstmi, ki se tvorijo med fotosintezo (Mravljak in Pečar, str. 184-185).

2.1.3 ANTIOKSIDANTI KOT PREHRANSKA DOPOLNILA

Precejšen del antioksidantov zaužijemo s hrano, večja količina hrane pa običajno pomeni tudi več vitaminov. Ker pa se pogosto dogaja, da mnoge osebe ne dosegajo priporočenih dnevnih vnosov antioksidantov zaradi različnih prehranjevalnih navad, se jim priporoča, da količino vnosa povečajo z uživanjem prehranskih dopolnil. Na drugi strani pa imamo tudi ljudi, ki dnevno zaužijejo zadostno količino vitaminov in antioksidantov s hrano, tem pa se dodaten vnos s prehranskimi dopolnili odsvetuje, saj so ta zaradi prooksidativnega učinka tudi škodljiva. Glavni problem pri pravilnem odmerjanju antioksidantov je namreč najpogosteje v merjenju oksidativnega stresa. Vedeti moramo, da vsaka *in vitro* učinkovita spojina, ni nujno aktivna tudi *in vivo*. Iz tega vidimo, da je trend uporabe visokih odmerkov antioksidantov lahko tudi škodljiv (Mravljak in Pečar, str. 193-194).

2.1.4 ANTIOKSIDANTI KOT ODSTRANJEVALCI NEUGODNIH UČINKOV

Uspešnost preprečevanja in odstranjevanja neugodnih učinkov ROS/RNS je tesno povezana s količino in »kondicijo« celičnih/telesnih antioksidantov in ker se oksidativni stres pojavi, ko telesni antioksidanti odpovedo, je bila smiselna in logična usmeritev, da je treba organizmu »pomagati« z zunanjimi viri antioksidantov. Izoblikovalo se je več pristopov:

- V mnoge prehranske proizvode so začeli dodajati naravne antioksidante.
- Pojavijo se prehranska dopolnila z enim ali kombinacijo več antioksidantov.
- Pojavijo se pripravki iz eksotičnih rastlin z vsebnostjo različnih antioksidantov in, ne nazadnje, priporočajo naravno prehrano z več sadja in zelenjave (Mravljak in Pečar, str. 194).

Potrebno je vedeti, da imajo oboji, tako ROS/RNS kot antioksidanti koristno, kot tudi škodljivo vlogo. Problem je v tem, kako ugotoviti, kdaj prestopijo mejo in postanejo škodljivi ter kdaj lahko pričakujemo njihovo pozitivno in koristno delovanje.

Škodljivost ROS/RNS je vedno povezana z njihovo povečano koncentracijo v lokalno omejenem delu telesa: v tkivu ali organu. Pri lokalno omejenih vnetnih procesih oziroma oksidativnih stresih so količine ROS/RNS povečane in škodljive v teh predelih. Drugje v telesu so redoks ravnotežja več ali manj normalna in ne potrebujejo kakega zunanjega posega z antioksidanti. Zaradi lokalno povečanih količin ROS/RNS bi bila uporaba dodatnih antioksidantov vsekakor koristna, vendar samo v področje, kjer so potrebni. Žal zaužitje pripravkov z antioksidanti poveča koncentracijo posameznega antioksidanta po celem telesu. Končni rezultat so morebitni koristni učinki v področju vnetja, za ostale dele telesa pa povišana koncentracija posameznega antioksidanta najbrž ni vedno koristna, ker moti redoks signaliziranje in delovanje imunskega sistema (Mravljak in Pečar, str. 194).

Antioksidanti nimajo opredeljene tarče. Vplivajo na redoks ravnovesja in njihova uporaba v starosti je v določenih okoliščinah primernejša kot v drugih (Mravljak in Pečar, str. 195).

Če je organizem zdrav in mreža antioksidantov sproti in učinkovito odstranjuje morebitne presežne količine ROS/RNS, z uravnoteženo prehrano telo dobi dovolj antioksidantov, in je dodatno uživanje le-teh nepotrebno. Če pa do tega vseeno prihaja, potem majhni in občasni odmerki antioksidantov ne povzročijo opaznih sprememb, uporaba čez daljši čas pa lahko moti redoks signalne poti.

Če je organizem še vitalen, vendar obremenjen s fizičnimi, psihičnimi ali drugimi obremenitvami in je v dobri kondiciji, potem normalne fizične obremenitve ne bi smele sprožiti oksidativnega stresa. Problematične pa so predvsem dolgotrajne obremenitve, tudi obremenitev pljučnega tkiva zaradi kajenja in obremenitev jeter zaradi uživanja alkohola. Vedeti moramo, da je kapaciteta mreže navzgor omejena in da delovanje mreže na samem robu zmogljivosti pomeni veliko porabo NADPH za redukcijo GSSG, preko katerega se obnavljajo drugi fiziološki antioksidanti. Če je organizem soočen s stalnim pojavljanjem oksidativnih stresov zaradi kroničnih vnetnih reakcij (v pljučih pri intenzivnih kadilcih in v jetrih pri kroničnih alkoholikih), ki spremljajo nekatera obolenja. Prisotnost oksidativnih stresov pomeni, da se v posameznih tkivih in organih pojavljajo ROS/RNS v količinah, ki jim obstoječa mreža antioksidantov ni več kos. V takem primeru bodo dodatni antioksidanti upočasnili napredovanje oksidativnega stresa, morda ga tudi omejili, ne bodo pa odpravili že nastalih posledic, ker antioksidanti ne morejo poseči v sistem biokemičnih reakcij, ko so bile te zaradi napačnih signalov že sprožene. Pomembno je vedeti tudi to, da je starejši organizem vedno bolj izpostavljen s starostjo pogojenim oksidativnim stresom (vpliv časa), zaradi postopnega zmanjševanja kapacitete mreže oksidantov (Mravljak in Pečar, str. 195-196).

2.1.5 OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres je vsako stanje v celici ali v tkivu, kjer začnejo prevladovati oksidativni procesi, predvsem nenadzorovane eno elektronske oksidacije, s čimer se poruši prvotno in z antioksidanti nadzorovano ravnotežje med oksidacijami in redukcijami (Mravljak in Pečar, str. 200).

Za pojav oksidativnega stresa je odgovorna vrsta dejavnikov (stresorji), ki so zunanjsa ali notranjsa izvora ali pa gre za kombinacijo obeh virov. Dejavniki, ki povzročajo nastanek oksidativnega stresa, so:

- Ionizirajoča sevanja: v normalnih razmerah življenja je to dokaj redka možnost.
- Sončna svetloba, še posebno njeno UV področje; ta zunanji dejavnik je poleti zelo pogost vzrok oksidativnih stresov v koži.
- Vdihavanje ozona z zrakom.
- Kajenje in sestavine v cigaretnem dimu.

- Vsa obsežna in kronična vnetja, katerih pogostost raste s staranjem.
- Prekomerne in dolgotrajne fizične obremenitve.
- Vsa druga stanja, kjer pride do dvigov koncentracij ROS in RNS v posameznih delih našega telesa.

Ko antioksidanti v nekem predelu telesa ne zmorejo več odstranjevati oksidantov (ROS in RNS), se začne lokalni oksidativni stres (Mravljak in Pečar, str. 199).

Dogajanje naj bi potekalo po naslednjih stopnjah:

- Stresorji v nizki stopnji intenzitete povzročijo omejen in šiber oksidativni stres, kar pomeni, da se minimalno poveča količina nekaterih predstavnikov ROS oziroma RNS.
- Posamezni predstavniki ROS in RNS kot sestavina nekaterih signalnih poti v telesu povzročijo izraz točno določenih ustreznih genov in posledično grajenje proteinov.
- Nastali proteini omogočijo, oziroma pomagajo celici, da preživi kljub dejavnosti stresorjev.

Pozitivni oksidativni stres je tisti del oksidacij, ki jih evolucija izrablja za odziv na zunanje okolje (temperatura, koncentracija kisika, prehrana, fizična aktivnost, itd.) in za oblikovanje prilagoditvenega odgovora.

3. ALKALOIDI

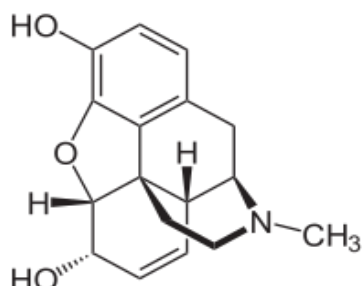
Alkaloidi so široka skupina naravnih organskih spojin, ki vsebujejo atom dušika, vezan v heterociklični sistem. Po svojih lastnostih so zaradi dušikovega atoma alkalni in imajo že v zelo majhnih odmerkih pomembne biološke učinke na živalske in človeške organizme. Obstajajo tudi alkaloidi, ki ne vsebujejo dušikovega atoma in niso alkalni. Vsem pa je skupno to, da so fiziološko aktivni. Najdemo jih predvsem v rastlinah, najpogosteje v cvetočih rastlinah. Najdemo jih tudi v hrani in pijači ter kot stimulans drug. Alkaloidi so se izkazali s svojimi protivnetnimi in antikancerogenimi učinkovinami, prav tako pa so znani kot analgetiki in lokalni anestetiki za lajšanje bolečin. Uporabni so tudi kot prehranski dodatki, v farmaciji in medicini ter v drugih aplikacijah v človeškem življenju. So pomembne spojine v organski sintezi za iskanje novih sintetičnih spojin z morebiti boljšo biološko aktivnostjo kot matične spojine.

Nekatere skupine strukturno povezanih alkaloidov so prisotne v rastlinah v različnem številu, od minimalnega števila do kar 30. Ti alkaloidi spadajo v isti razred, vendar se razlikujejo v strukturi, eden pa se vedno pojavlja v večini. Nekatere rastlinske družine so zelo bogate z alkaloidi. Na primer, v rastlinah, kot so opija mak (*Papaver somniferum*) in ergot glive (*Klaviceps*), obstaja približno 30 različnih alkaloidnih tipov. Čeprav so spojine že dobro poznane, je njihova funkcija v rastlinah še vedno deloma neznana. Zaradi svojega grenkega okusa odganjajo organizme, uporablja se jih kot naravne pesticide, predvsem pa ščitijo rastline pred uničujočo aktivnostjo nekaterih vrst žuželk. Prisotni so tudi v nekaterih živalskih vrstah (Augustyn idr, 2019).

Najbolj znani alkaloidi so morfij, strihnin, kinin, efedrin in nikotin. V čisti obliki so običajno bele barve, brez vonja in kristalinične, lahko pa se pojavijo kot rumenkaste tekočine. Imajo grenak okus. V vodi so zelo slabo topni, dobro topni pa so v nepolarnih organskih topilih, poleg tega so optično aktivni. Znanih je več kot 10000 različnih alkaloidov.

a) Morfij

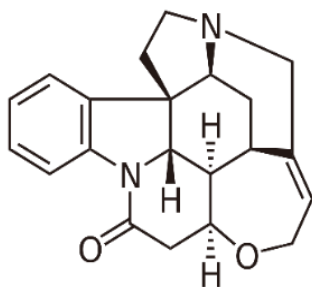
Morfij (Slika 15) je eden najbolj znanih alkaloidov, ki se uporablja v medicinske namene. Je eden najmočnejših analgetikov, ki se uporablja za lajšanje bolečin, njegova uporabnost pa je omejena zaradi zasvojenosti. Ima tudi druge stranske učinke, kot so haluciniranje, motnje zavesti, zaprtje, težko dihanje in hipotenzija. Morfij je bil prvi alkaloid, ki so ga izolirali v čisti obliki in je predstavljal začetek nove discipline- farmakologije. Pridobiva se ga iz opija-posušenega mlečka nezrelih glavic vrtnega maka (Kurek, b.d.).



Slika 15: Skeletna formula molekule morfija (ChemSpider).

b) Strihnin

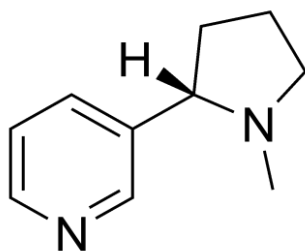
Strihnin (Slika 16) je alkaloid, ki se nahaja v semenih rastline bljuvače. Uporablja se ga kot pesticid za uničevanje malih vretenčarjev, predvsem podgan. V zelo majhnih odmerkih deluje kot poživilo, v večjih pa predstavlja strup (Kurek, b.d.).



Slika 16: Skeletna formula molekule strihnina (ChemSpider).

c) Nikotin

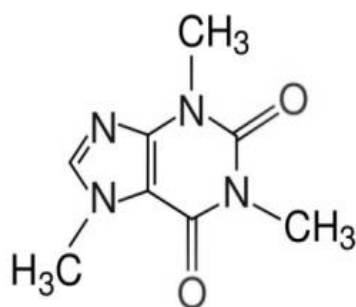
Nikotin (Slika 17) je tekoči alkaloid, ki ga najdemo v rastlinah iz družine razhudnikovk, največ v tobaku in koki, v manjših količinah pa v krompirju, paradižniku in jajčevcu. V manjših koncentracijah deluje stimulatивно in vodi do zasvojenosti. Je nevrotoksin, ki se je v preteklosti uporabljal kot insekticid, danes pa so v te namene v uporabi njegovi derivati (Kurek, b.d.).



Slika 17: Skeletna formula molekule nikotina (ChemSpider).

d) Kofein

Kofein (Slika 18) je naravni alkaloid, ki ga najdemo v mnogih rastlinah kot so listi čaja, semena kave in kakavovca itd. in deluje kot poživilo. Zmanjšuje utrujenost in povečuje budnost. Poleg tega stimulirajoče deluje na centralni živčni sistem in srce ter pospeši odvajanje urina. V večjih količinah je za človeka strupen in povzroča odvisnost (Kurek, b.d.).



Slika 18: Skeletna formula molekule kofeina (ChemSpider).

3.1 Naravni viri alkaloidov

Alkaloide sintetizirajo rastline iz primarnih metabolitov tj. aminokislina, ogljikovi hidrati, lipidi, beljakotivne, nukleozidi itn. Najbolj so razširjeni v dvokaličnicah, ki se nahajajo v obliki vodotopnih polarnih soli najrazličnejših organskih kislin. Število prisotnih alkaloidov je odvisno od vrste rastline in se med njimi razlikuje. Večji delež rastlin vsebuje enega ali več glavnih alkaloidov, redkeje pa srečamo rastline s samo enim alkaloidom ali pa z večjim številom. Alkaloidi so vezani na polisaharide membran, beljakovine ali pa na čreslovine. V največjem obsegu jih najdemo v rastlinah tropskih predelav. Najdemo pa jih tudi v glivah in sesalcih. Primer živalskega organizma, ki vsebuje alkaloid je žaba iz rodov *Dendrobates* in *Phyllobates*, v katerih najdemo močan toksičen alkaloid batrahotoksin, ki povzroča ohromelost in smrt.

3.2 Funkcija v naravi

Alkaloidi ščitijo rastline pred virusi, bakterijami, glivami in rastlinojedimi živalmi, torej imajo obrambno funkcijo. Poleg te, pa imajo tudi vlogo privlaka spolnih partnerjev, saj jih nekatere žuželke potrebujejo za ta namen. Alkaloide najdemo v pikapolonicah in ognjenih mravljah.

3.3 Uporaba in pomen za človeka

Uporaba alkaloidov je v današnjem času kljub toksičnosti zaradi njihovih farmakoloških aktivnosti zelo razširjena. Imajo vloge: spazmolitična, diuretična, antimigrenična, antihistaminična, antihipertenzivna, analgetična, emetična, antiemetična, vloga lokalnega anestetika, vloga antimalarikov, vloga hipnotikov.

3.4 Delitev na osnovi kemijske zgradbe

Alkaloide na osnovi kemijske zgradbe in biosintezni izvor delimo na tri večje skupine: protoalkaloidi, psevdalkaloidi in pravi alkaloidi.

a) Protoalkaloidi

Protoalkaloidi so enostavni amini, v katerih dušikov atom ni sestavni del heterocikla. So bazični in sintetizirani neposredno iz aminokislin. V to skupino sodijo:

- Efedrin
- Kapsaicin
- Kolhicin
- meskalin.

b) Psevdoalkaloidi

Psevdoalkaloidi imajo lastnosti pravih alkaloidov, vendar niso sintetizirani iz aminokislin, dušikov atom pa se pri tej skupini v molekuli vgradi naknadno. V to skupino sodijo:

- Solanidin
- Tomatidin
- Akonitin
- koniin.

c) Pravi alkaloidi

Za skupino pravih alkaloidov velja, da je najobsežnejša. Dušikov atom je v spojinah vezan v ciklični sistem. V biosintezi se sintetizirajo iz dveh delov in sicer:

- iz spojine z atomom dušika (npr. ornitin, lizin, fenilalanin itn.)
- iz spojine brez dušikovega atoma (tj. acetatna, acetoacetatna skupina itn.)

3.5 Primer rastline z visoko vsebnostjo alkaloidov

Črni poprovec (*Piper nigrum* L.)

Črni poprovec (*Piper nigrum* L.) je rastlina ovijalka, s koničastim, podolgovatim in ozkim socvetjem, ki nosi bele cvetove in katerih se razvijejo jagode.

Preglednica 2: Taksonomska klasifikacija črnega poprovca (Slapničar in Boh Podgornik, 2021)

Sistemska kategorija	Znanstveno ime
Kraljestvo	<i>Plantae</i> (rastline)
Deblo	<i>Magnoliophyta</i> (semenke)
Razred	<i>Magnoliopsida</i> (dvokaličnice)

Red	<i>Piperales</i> (poprovci)
Družina	<i>Piperaceae</i> (poprovke)
Rod	<i>Piper</i> (poprovec)
Vrsta	<i>Piper nigrum</i> L. (črni poprovec)

Raste predvsem v Indiji, med večjimi proizvajalkami pa so tudi države Malezija, Indonezija, Brazilija in Vietnam. Vrste poprovca se razlikujejo na podlagi načina predelave.

Črni poper so cele nedozorele poprove jagode, katere poberejo, ko postanejo rumene s pomočjo tresenja in teptanja. Plodove nato sušijo 5-7 dni na bambusovih podstavkih na soncu, dokler se vsebnost vlage ne zmanjša na 12-13%. Po koncu procesa, se lupina plodov skrči in počrni.

Beli poper pridobijo po obiranju zrelih jagod rdečih plodov, katere zapakirajo v vreče iz jute in jih namočijo v vodo. Vodo v plodovih nato odstranijo in jih namočijo v vodo, kjer jih poteptajo, da odstopi zunanja lupina. Tako sivo-bele plodove še enkrat sperejo in jih sušijo na soncu na bambusovih podstavkih.

Zeleni poper pridobivajo iz nedozorelih poprovih jagod, pri čemer posušene zelene plodove obdelajo z žveplovim dioksidom, liofilizacijo ali pa s konzerviranjem v slanici ali kisu in tako ohranijo zeleno barvo plodov.

Preglednica 3: Predstavitev fizikalno-kemijskih lastnosti plodov črnega poprovca.

	Črni poper	Beli poper	Zeleni poper
Premer	2,5-7,0 mm	2,0-6,0 mm	2,0-6,0 mm
Izgled	Rjava do temno rjava ali črna	Mat siva do rjavkasta	Zelena do temno zelena
Okus	Pekoč in oster	Rahlo oster in zelo aromatičen	Najmanj pekoč in aromatičen
Vsebnost suhe snovi	6 %	3,5 %	5 %
Vsebnost eteričnega olja	2 %	1,5 %	1,5 %
Vsebnost piperina	3,5 %	4 %	< 3,5 %

V eteričnem olju popra so v največjem deležu prisotni alkaloidi: piperin, piperidin, piperetin, piperanin, piperid. Najpomembnejši od naštetih je piperin (Slapničar in Boh Podgornik, 2021).

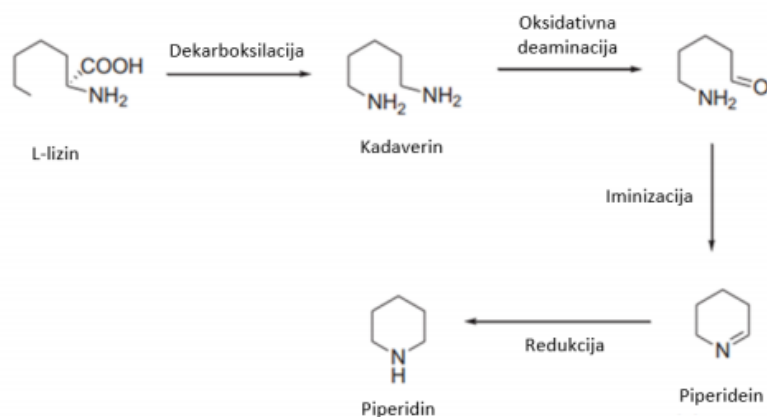
3.6 Piperin

Preglednica 4: Osnovni podatki o piperinu.

IUPAC-ovo ime	1-[5-(1,3-benzodioksol-5-il)-1-okso-2,4-pentadienil]piperidin
Molekulska formula	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃
Relativna molekulska masa (M_r)	285,34
Izgled	Rumena kristalinična spojina
Talilni interval	[128 °C -130 °C]
Topnost v vodi	40 mg/L

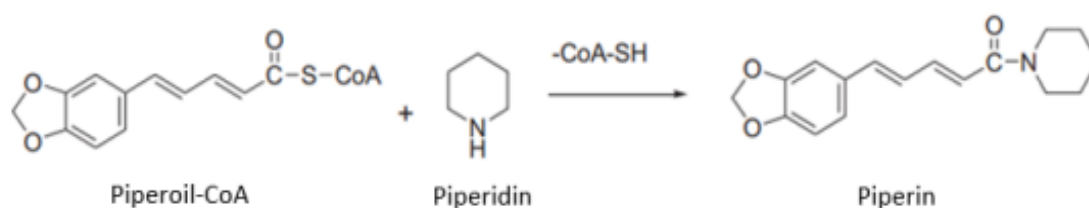
3.6.1 Biosinteza piperina

Prikazana je reakcijska shema biosinteze piperidina iz aminokislina L-lizina (Slika 19). V prisotnosti piridoksal 5'- fosfata poteče dekarboksilacija L-lizina do nastanka smrdljivega diamina kadaverina (pentan-1,5-diamin). Sledi reakcija neposredne oksidativne deaminacije kadaverina z encimom diamin oksidaze do nastanka aminoaldehida, ki se nato v reakciji iminizacije ciklizira v piperidein. V zadnji stopnji biosinteze poteče redukcija piperideina v piperidin



Slika 19: Reakcijska shema biosinteze piperidina iz aminokislina L-lizina (Slapničar in Boh Podgornik, 2021).

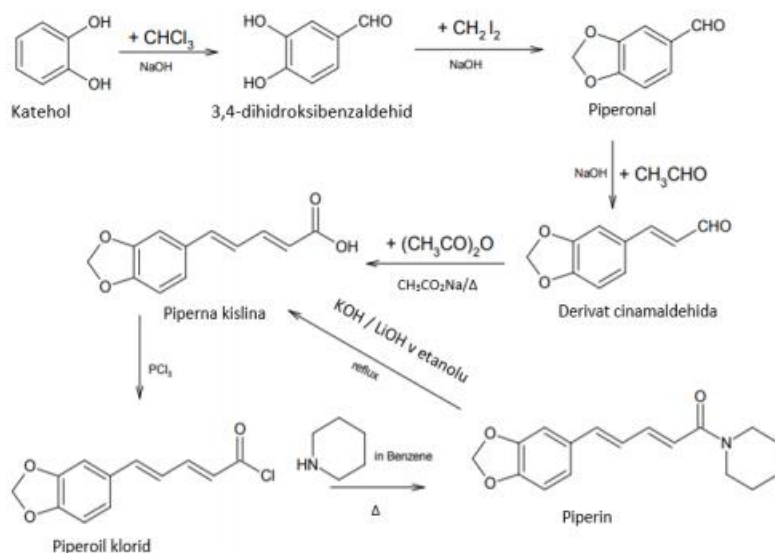
Piperidin reagira s tioestrom piperoil-CoA (Slika 20) v piperin s pomočjo encimskega katalizatorja piperidin piperoiltransferazo po shemi:



Slika 20: Reakcija piperidina s tioestrom piperoil-CoA (Slapničar in Boh Podgornik, 2021).

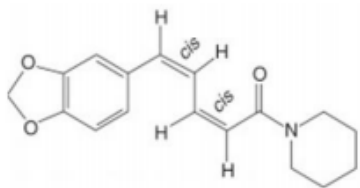
3.6.2 Laboratorijska sinteza

Piperin umetno sintetiziramo v več stopnjah (Slika 21); vsaka izmed njih predstavlja svoj mehanizem ustrezne reakcije (glejte spodnjo shemo). Prva stopnja sinteze, ki se odvija po mehanizmu Reimer-Tiemannove reakcije, je reakcija sinteze 3,4-dihidroksibenzaldehida iz katehola (1,2-dihidroksibenzena). Gre za reakcijo aktiviranih aromatskih spojin (npr. fenolov) – ortoformiliranje fenolov, pri kateri lahko predpostavimo reakcijo diklorokarbena, ki nastane iz kloroforma (triklorometana) v alkalnem, kot elektrofila in fenolatnega iona kot aromatske spojine v elektrofilni aromatski substituciji. V nadaljnji stopnji sinteze piperonala oziroma heliotropina (1,3-benzodioksol-5-karbaldehid) ob prisotnosti acetaldehida v bazičnem mediju potече aldolna kondenzacija piperonala v derivat cinamaldehida (cinamaldehyd ali (2E)-3-fenilprop-2-enal) (Claisen-Schmidtova reakcija). Nastali produkt nato v raztopini acetanhidrida in natrijevega acetata katalizirano kondenzira do nastanka piperne kisline (Perkinova reakcija), ki se ob dodatku fosforjevega pentaklorida pretvori v kislinski klorid piperoil klorid. S segrevanjem piperoil klorida v zmesi piperidina in benzena pridobimo piperin. Iz piperina lahko piperino kislino pridobimo z reflukso alkalno hidrolizo v etanolu (Slapničar in Boh Podgornik, 2021).

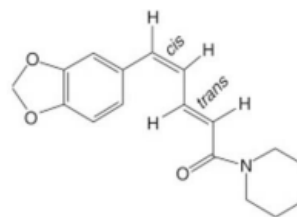


Slika 21: Umetna sinteza piperina (Slapničar in Boh Podgornik, 2021).

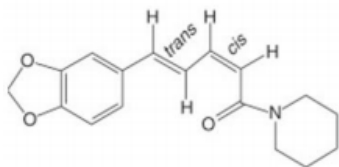
Piperin ima tri geometrijske izomere: kavicin (Slika 22), izokavicin (Slika 23) in izopiperin (Slika 24) (Slapničar in Boh Podgornik, 2021).



Slika 22: Skeletna formula molekule kavicina izokavicina



Slika 23: Skeletna formula molekule



Slika 24: Skeletna formula molekule izopiperina

4. ANTIOKSIDATIVNA SPOSOBNOST PIPERINA IN OSTALIH PIPERIDINSKIH ALKALOIDOV

Alkaloidi so strukturno edinstvene bioaktivne molekule. So velika in raznolika skupina, ki nosi širok spekter fizioloških dejavnosti, katere so zelo pomembne za rastline, živali in ljudi, z zelo pomembnimi farmacevtskimi lastnostmi. Alkaloide se pogosto vidi kot "zlikovce", zaradi njihove visoke toksičnosti, kljub temu pa je dokazano, da imajo iztočnice za boj proti specifičnim boleznim. Primarne funkcije alkaloidov se lahko razlikujejo po različnih rastlinskih vrstah, njihovi presnovni profili pa se lahko povezujejo s specifičnimi okoljskimi dejavniki in razvojnimi signali, pogosto pa dajo jasno prilagodljivo vrednost (Srivastava in Singh, 2020).

Rastline so že več tisoč let odličen vir zdravil. Izkazalo se je, da številne zdravilne rastline modulirajo specifične celične in humoralne imunske funkcije. Vrste rodu *Piper* spadajo med pomembne zdravilne rastline, uporabljene v različnih vejah medicine. *Piper longum* L., *Piper nigrum* L. in *Piper galeatum* L. (Piperaceae), se nahajajo v tropskih in subtropskih regijah sveta, po vsem indijskem delu kontinenta, Šrilanki, bližnje vzhodnih državah in Ameriki. To so pomembne sestavine indijske tradicionalne medicine, za katero se poroča, da se uporablja kot zdravilo za zdravljenje okužbe dihal, kronične bolečine v trebuhu, menstrualne bolečine, tuberkuloze, artritičnih stanj itd. Alkaloidi imajo zaradi farmakoloških aktivnosti celo vrsto uporabnih lastnosti za človeka.

Blažijo krče gladkih mišic v prebavilih, žolčniku in v urinarnem traktu, odvajajo odvečne oziroma presežne količine vode iz telesa, blažijo tudi glavobole in migrene, zavirajo delovanja histaminskega receptorja in posledično zmanjšujejo alergijske reakcije. Poleg naštetega zdravijo zvišan krvni tlak, blažijo hude bolečine in lokalno omrtvičijo tkiva. Imajo tudi emetično vlogo in antimetrično vlogo.

Alkaloidi povečajo tonus gladke mišičnine v stenah žil in na ta način povzročijo zoženje žil, povzročijo spremembe v zaznavanju in miselnih procesih, uničujejo endoparazite, zdravijo malarijo, služijo za ugotavljanje prave ostrine vida (širijo zenico) in se uporabljajo pri izbiri očal, delujejo kot uspavala, blokirajo kašelj ter širijo zožene sapnice in tako uspešno blažijo težave, kot je na primer težko dihanje (Slapničar in Boh Podgornik, 2021).

Vnetje je znak patogeneze različnih vnetnih bolezni, kot so astma, kronična obstruktivna pljučna bolezen (KOPB), rak in bolezni srca in ožilja. TNF povzroči prosto radikalno generacijo, kot je H_2O_2 , ki aktivira vnetne signalne poti, vključno z NF- κ B v žilnih celicah. Izkazalo se je, da je v patogenezo različnih presnovnih motenj, kot so ateroza, rak, sladkorna bolezen in nevrodegeneracija, vpletena presežna proizvodnja ali zmanjšan odmik reaktivnih vrst kisika (ROS). Tako je antioksidantna terapija pridobila pomembnost pri zdravljenju takšnih bolezni, povezanih s prostimi radikali. V iskanju novih majhnih molekul iz naravnih virov že več let preučujejo rod *Piper* in poročajo o svojih antioksidantnih in protivnetnih dejavnostih. Našli so številne nove spojine iz vrste *Piper* in sintetiizirali njihove derivate za preučevanje odnosov dejavnosti strukture. Torej, piperin ima protivnetno lastnost. V *in-vitro* poskusih je bilo ugotovljeno, da piperin ščiti pred oksidativnimi poškodbami z nevtralizacijo prostih

radikalov in reaktivnih vrst kisika ter hidroksilnih radikalov. Poročali so tudi o vplivu na peroksidacijo lipidov. Deluje kot močan superoksidni odganjalec z IC_{50} 1,82 mM in 52-odstotno zaviranje peroksidacije lipidov. Rezultati so pokazali, da ima piperin neposredno antioksidativno aktivnost proti različnim prostim radikalom. Piperine s svojim radikalnim ugasnjenim učinkom in s preprečevanjem izčrpanosti GSH izkaže antioksidativnost v eksperimentalnih pogojih *in-vivo* in *in-vitro* (Kumar idr. 2015).

Številne zdravilne naravne spojine, ki pozitivno učinkujejo kot antioksidanti ali antioksidativno delujejo na centralni živčni sistemi, so dobile veliko pozornosti kot prehransko dopnilo za izboljšanje kognitivne funkcije, vključno s težjimi boleznimi, kot je Alzheimerjeva bolezen. Na podlagi teh informacij je bil raziskan tudi učinek piperina, ki predstavlja glavni aktivni alkaloid v črnem poprovcu, na delovanje spomina in nevrodegeneracijo v živalskem modelu Alzheimerjeve bolezni. Rezultati študije so pokazali, da je piperin bistveno izboljšal okvaro spomina in nevrodegeneracijo v hipokampusu. Mehanizmi so delno povezani z zmanjšanjem peroksidacije lipidov in encima acetilholineteraze. Poleg tega, pa je bilo v tej študiji dognano tudi to, da ima piperin pozitiven nevrotrofni učinek v hipokampusu. Na tem področju je potrebno narediti še več raziskav, vendar je iz študije razvidno, da ima piperin pozitiven antioksidacijski vpliv pri okvari spomina in nevrodegeneraciji v telesu (Chonpathompikunlert idr., 2010).

Uporabljene so bile tudi elektrokemične tehnike za vrednotenje redoks lastnosti piperina. Pri študiji so ugotavljali potencialne antioksidativne lastnosti piperina v kombinaciji z različnimi radikali, ioni ipd. Ugotovili so, da antioksidant iz črnega poprovca vrši *in vitro* peroksidacije, zmanjšuje presežke določenih spojin in nevtralizira radikale. Študijo so izvedli na: DPPH; 2,2,6,6-tetrametilpiperidinil-1-oksi (TEMPO), Fe^{3+} ionih; vodikov peroksid (H_2O_2). Rezultati kažejo, da piperin hitro reagira z visoko oksidantnim radikalom in na podoben način kot antioksidanti, ki se uporabljajo kot model, zapirajo redoks-aktivne kovinske ione (Carp idr., 2016).

Učinek piperina na centralni živčni sistem pa je bil preizkušen tudi v študiji, kjer so ga testirali na podganah. Piperin so jim dajali v različnih odmerkih, enkrat na dan 4 tedne, določevali pa so nevrofarmakološko aktivnost po enkratnem, 1, 2, 3 in 4 tednih zdravljenja. Rezultati so pokazali, da je piperin v vseh razponih odmerkov, uporabljenih v tej študiji, ob vsem trajanju zdravljenja zmanjševal depresijo in izboljšal kognitivni učinek. Zato se lahko piperin predaja kot potencialna funkcionalna hrana za izboljšanje delovanja možganov (Wattanathorn idr., 2008).

Tudi malarija ostaja problem javnega zdravja v tropskih in subtropskih regijah in raziskave o odkritju in razvoju novih alternativnih antimalarialnih zdravil so nujno potrebno. Študijo so zgradili na preučevanju antimalarialnega delovanja piperina, pri čemer so s testi določali antimalarialno aktivnost. Dokazali so, da alkaloid kaže obetavno aktivnost in bi bil lahko obetaven kandidat za nadaljnji razvoj kot zdravilo, ki temelji na njegovi potencialu in majhnem tveganju za razvoj odpornosti (Thiengsusuk idr., 2018).

Piperin krepi jetrno oksidirano glutaion (GSSG, za 100 %) in zmanjšuje ledvično glutaion (GSH, za 35 %) koncentracijo in aktivnost glutaiona ledvic (GR) (za 25 %), meritev je bila izvedena na diabetičnih podganah (diabetičnost je povzročil streptozotocin). Poročali so, da je piperin zatl telesno maso in izboljšal občutljivost na inzulin in leptin. Piperin ima antihiperglikemično aktivnost, ki se je kazala na diabetičnih miših zaradi vnosa aloksana, saj je ta znižal raven glukoze v krvi, ob 14 dnevnom oralnem vnosu 20 mg/kg. Po drugi strani pa je ista študija pokazala, da visok odmerek (40 mg/kg) akutno dviguje raven glukoze. Potrjeno je bilo, da piperin poveča učinkovitost različnih zdravil za tiste, ki se zdravijo za sladkorno boleznijo. V drugi študiji na diabetičnih podganah, so piperin kombinirali s terapevtskim odmerkom metformina (10 mg/kg + 250 mg/kg) in primerjali koncentracijo glukoze v krvi v primerjavi z metforminom. Prisotnost piperina je povečala vse farmakokinetične parametre (C_{max} , AUCtotal, $T_{1/2}$, MRT). Poleg naštetega piperin zmanjšuje holesterol v plazmi.

Poleg imunomodulacije, ima piperin pomemben antialergični učinek. Piperin je občutno zatl kihanje, drgnjenje in pordelost, ki jo je povzročila senzibilizacija živčnih končičev, posledica histamina, ki se je sprostil kot odziv na protitelesa, znižal pa je tudi raven dušikovega oksida (NO), ko posledica manjših migracij eozinofilov v nosno epitelno tkivo. Tako kot v histopatološkem delu nosne sluznice so ugotovili, da zdravljenje s piperinom zmanjša vnetje, pordelost in motnje alveolov in bronhiolov. V modelu astme, ki jo povzroči ovalbumin, je zdravljenje s piperinom zmanjšalo nfiltracijo eozinofilov in hiperresponzivnost zračnih poti s zaviranjem aktivnosti celic T in Th2.

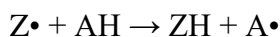
Ugotovili so, ima piperin imunomodulatorne in antitumorne sposobnost. Piperin zmanjšuje možnost nastanka raka, saj zmanjšuje peroksidacijo lipidov in zaščiti encime. V telesu zavira razmnoževanje endotelijskih celic v žilah popkovine in angiogenezo, ki jo povzroči oblika raka v telesu (rak na dojkah). Mehanizem protirakaste aktivnosti deluje proti celicam raka, delovanje pa je tesno povezano z odmerkom, ki ga oseba prejme. Študije in vitro na različnih rakavih celicah so pokazale, da ima piperin citotoksični vpliv (selektiven za tumorske celice) proti več vrstam raka, vključno z rakom na dojki, pljučih, prostati, materničnim vratu in drugih oblikah te bolezni (Stojanović-Radić idr. 2019).

5. METODE ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE SPOSOBNOSTI

Metod za določevanje antioksidativne sposobnosti spojin je veliko, v projektni nalogi bo predstavljena ena izmed najpogosteje uporabljenih, metoda DPPH.

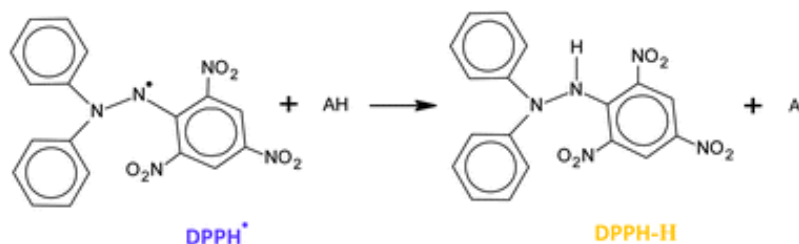
5.1 Metoda DPPH

V naših telesih se oblikujejo različne reaktivne kisikove in dušikove vrste, ki se kažejo v oksidativnih poškodbah našega DNK, lipidov, beljakovin ter drugih molekul v telesu in lahko vodijo do hujših poškodb, kot so razvoj raka, srčnih bolezni, bolezni ožilja in podobno. Prav zato so antioksidanti še posebno potrebni pri zaščiti pred temi boleznimi, saj lahko *in vitro* izvršijo prooksidativno delovanje (Halliwell, 1996). Za določevanje antioksidativne moči posameznih antioksidantov se uporabljajo različne metode, ena izmed njih pa je metoda DPPH. Ta temelji na reakciji med stabilnim prostim radikalom DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazila) in donorjem vodika (antioksidanti npr. vitamini), zaradi česar se zmanjša absorbanca vzorca (Grzetič, str. 10). Reakcija poteče po naslednjem mehanizmu:



Pri čemer Z• predstavlja prosti radikal DPPH, AH pa donor vodika. ZH je tako DPPH₂, A• pa nov radikal, ki je nastal pri reakciji.

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) se v biokemiji pogosto uporablja za ocenjevanje lastnosti rastlinskih sestavin za ovrednotenje prostih radikalov. Pri tej metodi pride do spremembe koncentracije DPPH, kar je posledica reakcije z antioksidantom (Slika 25), pri tem pa je potrebno upoštevati različne pogoje, kot so različni reakcijski časi, topila, pH in različne spojine, ki se uporabljajo kot antioksidativni standardi (Pyrzynska in Pękal, 2013).



Slika 25: Shematski prikaz reakcije DPPH radikala z antioksidantom (ScienceDirect).

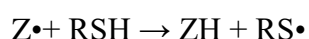
Kot vidimo na (Slika 25), je molekula DPPH sama po sebi stabilen radikal, ki ima nesparjen elektron, ki je delokaliziran po celotni molekuli, kar pa onemogoča dimerizacijo molekul, kot je to pogosto pri ostalih radikalih. Prav ta delokalizacija pa je vzrok za intenzivno vijolično obarvanje raztopine, ki ima absorpcijski maksimum pri 517 nm (Grzetič, str. 10).

Študije kažejo, da na količino nereaktivnega DPPH v vzorcu pomembno vplivajo vrsta in količina topila, ki se uporabljata za raztapljanje antioksidantov, vsebnost vode in koncentracija vodika ali kovinskega iona v sistemu vzorca. Pomembnost standardizacije metode DPPH pa se kaže v rezultatih študije, ki je potrdila, da prisotnost etil acetata/dioksana/kovinskih ionov v sistemu zmanjšuje kinetiko reakcije med DPPH in butilohidroksitoluenom v zvezi z njegovo kinetiko v sistemu, ki vsebuje le metanolične raztopine. Nasprotni učinek je opažen pri vodi, nizki koncentraciji kloroformnih ali vodikovih ionov (Dawidowicz idr., 2012). Poleg tega ima pomembno vlogo pri doseganju rezultatov tudi faktor razredčevanja vzorca (Magalhães idr., 2006). Do razbarvanja raztopine pride (razbarva se v blede oranžno barvo), saj poteče redukcija DPPH, ko vzorcu, ki vsebuje DPPH primešamo antioksidante, ki so donorji vodikovih atomov, s tem pa se zmanjša tudi absorbanca. Pri tej reakciji iz molekule antioksidanta nastane nov radikal in v naslednji stopnji reakcije reagira z novo molekulo DPPH (Grzetič, str. 10). Za oceno antioksidativne moči pri preprečevanju oksidativnih poškodb, je bilo razvitih ogromno različnih kemičnih modelov *in vitro*; med tistimi, ki merijo zmogljivosti razširjanja radikalov, velja metode DPPH za eno izmed najbolj razširjenih (Locatelli idr., 2009).

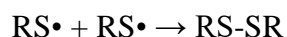
Rezultat meritev, pridobljen z metodo DPPH lahko podamo na več načinov. Najbolj razširjen pa je način podajanja z efektivno koncentracijo EC₅₀ (tudi IC₅₀), ki je definirana, kot koncentracija substrata, ki povzroči zmanjšanje aktivnosti DPPH molekule za 50 %. To metodo lahko uporabimo tako za trdne, kot tudi za tekoče vzorce, poleg tega pa ni specifična za posamezni antioksidant (Grzetič, str. 10). Razmerje med vrednostjo EC₅₀ in vsebnostjo antioksidantov pa lahko opišemo s pravilom, da nižja, kot je EC₅₀ vrednost, višja je vsebnost antioksidantov v vzorcu (Kalpna idr., 2011).

DPPH metoda velja za natančno, enostavno in ekonomsko metodo pri merjenju radikalske aktivnosti ob prisotnosti antioksidantov. Prav tako je prednost v tem, da je spojina stabilna in je ni treba ustvariti. Z njo pa izvajamo reakcije pri sobni temperaturi, saj s tem odpravimo možnost tveganja toplotne razgradnje spojine. Meritve lahko izvajamo tako v brezbarvnih raztopinah, kot tudi v obarvanih. Metoda pa ima tudi nekatere omejitve, kot je na primer to, da je spojina topna le v organskih topilih. Poleg tega, pa lahko pride tudi do motenj vpivanja iz vzorčne spojine, kar pa je problematično v nadaljevanju pri kvantitativni analizi. Metoda ni uporabna za merjenje antioksidativne aktivnosti v plazmi in za merjenje v emulzijah (Kedare in Singh, 2011).

Metodo je leta 1958 uvedel Marsden Blois, ki je kot vzorec antioksidanta uporabil cistein. Izvedel je reakcijo po spodnjem modelu, kjer RSH predstavlja molekula cisteina, Z• pa radikal DPPH:

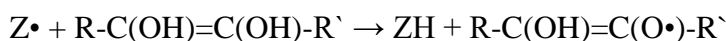


Ko pri reakciji nastane nov radikal RS•, poteče še vzporedna reakcija:



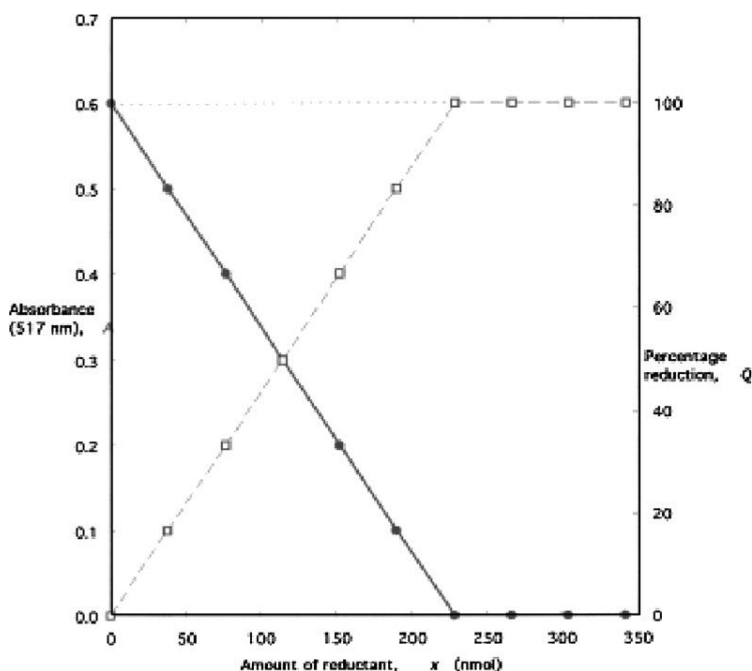
Stehiometrijsko razmerje je torej 1:1.

Če ima molekula dve vezavni mesti vodika, potem lahko pride do nadaljnje reakcije (primer take molekule je molekula askorbinske kisline):



Tukaj pa je stehiometrijsko razmerje 2:1, kjer koeficient 2 pripisujemo DPPH, koeficient 1 pa askorbinski kislini. Poleg askorbinske kisline, lahko tak primer najdemo tudi pri hidrokinonu (1,4-dihidroksibenzen), ki v dvostopenjski reakciji tvori kinin (1,4-benzokinon) (Kedare in Singh, 2011).

Pri tej metodi merimo absorbcijo, ki jo lahko prikažemo tudi na grafičen način. Graf oblikujemo na način, kjer prikažemo absorbcijo v odvisnosti od količine dodanega reducenta. Primer grafa lahko vidimo na spodnji sliki, ta pa prikazuje titracijo DPPH s spojino cistein:



Slika 26: Graf titracije DPPH s spojino cistein (ScienceDirect).

Za računanje aktivnosti antioksidantov, glede na spreminjanje absorbance pri različnih koncentracijah uporabimo enačbo (Kedare in Singh, 2011):

$$\% \text{ Aktivnost antioksidanta} = [E_{(\text{radikal})} - E_{(\text{standard})} / E_{(\text{radikal})}]$$

6. SPEKTROSKOPIJA

Spektroskopija se ukvarja z ugotavljanjem lastnosti snovi na osnovi interakcij njenih gradnikov, atomov in molekul z različnimi energijami svetlobe oz. elektromagnetnega valovanja (Pihlar in Prosen, 2019). Za merjenje se uporablja spektrometer (Slika 27).



Slika 27: Spektrometer (ScienceDirect).

Spektroskopske analizne metode veljajo za zelo razširjeno tehniko. Izhajajo iz različnih interakcij med analitom (B) in elektromagnetnim valovanjem (ΔE):

Absorpcija		Emisija
$B + \Delta E$	\square	$B^* \rightarrow B + \Delta E$
Sprejemanje		Oddajanje

Analit teži k vrnitvi v osnovno, energetsko bolj ugodno stanje (čim hitreje želi oddati/sprejeti elektrone), zato prebitno energijo emitira, ta proces imenujemo tudi relaksacija. Nestabilno vzbujeno stanje (metastabilno stanje) analita (B^*) je zelo kratko in znaša v povprečju med 10^{-6} in 10^{-9} s (Pihlar in Prosen, 2019).

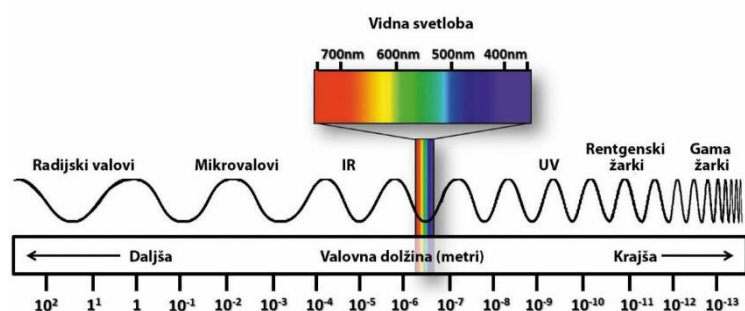
Spektroskopske tehnike glede na vrsto analita ločimo na (Pihlar in Prosen, 2019):

- Atomske tehnike,
- Molekulske tehnike.

Spektroskopske tehnike glede na vrsto interakcij, ločimo:

- absorpcijske tehnike,
- emisijske tehnike,

Svetlobe je edinstvena, njeno delovanje z analitom pa v kemiji opisujemo s pomočjo valovanja (lom, uklon, odboj, sipanje), pojave kot so absorpcija ali emisija pa razlagamo s korpuskularno naravo svetlobe, torej s tokom delcev oziroma z diskretnim energijskim tokom fotonov. Pri tej metodi lahko uporabimo elektromagnetno valovanje od energijsko najbogatejših X-gama žarkov ($\lambda = 10^{-9} - 10^{-12}$ m) do radijskih valov ($\lambda = 1\text{m} - \text{km}$). Celotno območje elektromagnetnega valovanja imenujemo elektromagnetni spekter (Slika 28).



Slika 28: Elektromagnetni spekter (ScienceDirect).

Za računanje energije elektromagnetnega valovanja se uporablja Planckov zakon (Gilchrist, b.d.):

$$E = hv = h \frac{c}{\lambda}$$

6.1 Molekulska spektroskopija

Molekulska absorpcijska spektrometrija je relativna tehnika. Molekulski spektri (Slika 29) so zvezni in odvisni od strukture, saj pri tovrstni spektroskopiji prihaja do elektronskih prehodov, vibracij, rotacij ter do sprememb kinetične energije molekul (Svanberg, 2001).

Tukaj se uporablja ozek spekter elektromagnetnega valovanja in sicer le ultravijolično območje-UV (10-400 nm), vidno območje-VIS (400-700 nm) in infrardeče območje-IR (700 nm-1mm), saj v tem območju absorbira svetlobo večina organskih, biološko aktivnih ter koordinacijskih spojin (Zwinkels, 2015).

IR spektroskopijo uporabljamo za določanje funkcionalne skupine in strukture organskih molekul. UV in VIS spektroskopijo pa uporabljamo za kvantitativno določanje različnih spojin. V spektrometrični tehniki je pomembna povezava med absorbanco in množinsko koncentracijo, kar prikazuje Beer-Lambertov zakon (Robinson, 1996):

$$A = -\log I/I_0 = -\log T = \epsilon I c$$

Iz tega zakona sledi, da se absorbanca večja z naraščanjem koncentracije analita, enako velja tudi pri daljšanju optične poti.

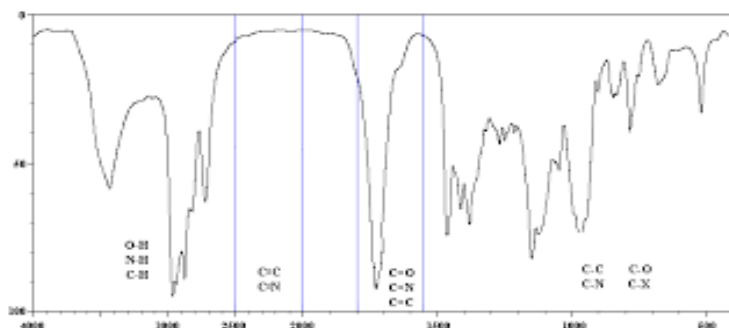
Beer-Lambertov zakon velja, kadar:

- svetlobni vir oddaja monokromatsko svetlobo,
- so koncentracije raztopin nizke: pod 10^{-3} M.

Ko pri točno določeni valovni dolžini v raztopini absorbira več različnih molekulskih zvrsti, velja aditivnost absorbancc:

$$A = A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n$$

Pri tej metodi se poslužujemo tudi metode umeritvene krivulje in metode standardnega dodatka.



Slika 29: Primer molekulskega spektra neke spojine (ScienceDirect).

Molekulsko spektroskopijo uporabljamo za (Pihlar in Prosen, 2019):

- direktne določitve analitov, ki absorbirajo svetlobo v UV delu spektra,
- indirektne določitve analitov s pomočjo organske ali anorganske spojine, ki tvori obarvane koordinacijske spojine,
- spektrofotometrične titracije
- študij kinetike reakcij, stabilnost, sinteze...

Poznamo nekaj specifičnih oblik sevanja elektromagnetnega valovanja, ki so posledica reakcij, ali pa spremembe določenih parametrov. To so:

6.2 Fotoluminiscenca

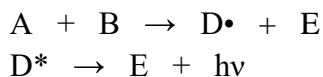
Gre za pojav, pri katerem pride do interakcije med analitom in elektromagnetnim valovanjem (svetlobo). Na tem mestu analit najprej absorbira svetlobo točno določene valovne dolžine in preide v višje energetske stanje, nato pa fotone odda, pri čemer se zopet vrne v osnovno energetske stanje. Najpreprostejša vrsta takšnega prehoda je resonančna radiacija, kjer se fotoni določene valovne dolžine absorbirajo in nato emitirajo pri enaki valovni dolžini. Ta proces ne zajema nobene notranje energijske pretvorbe. Poznamo še dve vrsti prehodov, ki se razlikujeta v mehanizmu in času pretvorbe, to sta fluorescenca in fosforescenca.

6.3 Luminescenca

Luminescenca je emisija ultravijoličnih, vidnih ali infrardečih fotonov analita, ki nima izrazito povišanje temperature. Je posledica interakcije s toploto, električnim poljem, elektromagnetnim valovanjem ipd. (Valeur, 2001).

6.4 Kemoluminiscenca

Kemoluminiscenca je emitiranje svetlobe, ki je posledica kemijskih reakcij. Kemoluminiscenčne reakcije so tiste, pri katerih zaradi kemijske reakcije (praviloma brez dovajanja toplote), nastane svetloba. Navadno sta za to potrebna dva reagentna.



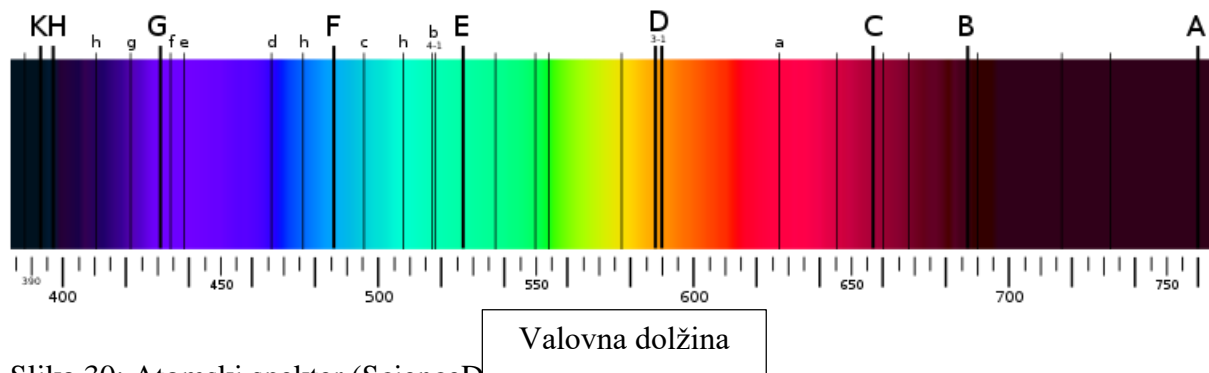
Zanjo veljajo visoka selektivnost, enostavnost določanja, občutljivost ter poceni in dostopni instrumentacija (Bard, 2006).

6.5 Infrardeča spektroskopija (IR)

Infrardeča spektroskopija je ena od klasičnih metod za določevanje strukture majhnih molekul. Je posledica občutljivosti na kemijsko sestavo molekul. Visoka vsebnost informacij v infrardečem spektru se prenaša tudi na biološke sisteme. Elektromagnetno valovanje infrardečega dela spektra ima dovolj energije, da v molekulah vzbudi nihanje atomov, kateri lahko nihajo na več načinov in sicer vzdolžno, simetrično, asimetrično ali prečno. Možni načini nihanj naraščajo z velikostjo molekul, zato je pri kompleksnih molekulah skoraj nemogoče določiti, kateremu nihanju ustreza določen absorpcijski trak (Barth, 2007).

6.6 Atomska spektroskopija

Valovne dolžine emitirane ali absorbirane svetlobe so točno določene za vsak element posebej, saj se lahko elektroni v atomih nahajajo samo na določenih energetske nivojih, ki so značilni za atom vsakega elementa. Tako atomi kemijskih elementov (še posebej atomi kovin), emitirajo svetlobo točno določene valovne dolžine, kadar jim dovedemo dovolj energije, da pride do vzbujanja elektronov. Valenčni elektroni atomov kovin veliko lažje preidejo v vzbujeno stanje kot valenčni elektroni atomov nekovin, zato pri atomski spektroskopiji analiziramo praviloma kovine in njihove soli. Atomske spekter je nezvezen (Slika 30).



Slika 30: Atomske spekter (ScienceDirect).

Na emisijske kot tudi na absorpcijske procese pomembno vpliva temperatura. Pri spremembi temperature se torej spremeni delež vzbujenih atomov. Temperatura vpliva tudi na ionizacijo, ki predstavlja nezaželeno, a konkurenčno reakcijo v plamenu (Robinson, 1996).

6.7 Atomska emisijska spektroskopija (AES)

Pri tej metodi, atome elementa, ki ga določamo, uvajamo v plamen, v katerem preidejo atomi iz osnovnega v vzbujeno stanje. Pri tem procesu emitirajo točno določen del spektra elektromagnetnega valovanja z značilno valovno dolžino. Nato s pomočjo monokromatorja izberemo ustrezno valovno dolžino, značilno spektralno črto, ki je osnova za kvalitativno delo, medtem ko je intenziteta spektralne črte odvisna od koncentracije analita.

Osnovni procesi, ki potekajo v plamenu so:

- Tvorba aerosola; izparevanje topila v plamenu.
- Taljenje in izparevanje (ali sublimacija).
- Disociacija, vzbujanje, ionizacija.
- Sekundarne reakcije v plamenu med atomi, radikali in molekulami.

6.8 Atomska absorpcijska spektroskopija (AAS)

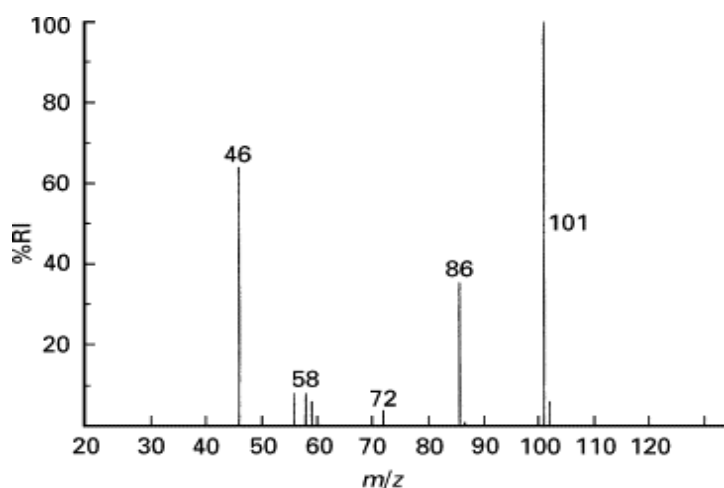
Pri tej metodi, svetloba iz votle katode prehaja skozi plamen, v katerega razpršujemo preiskovano raztopino- analit v topilu. Atomi elementa, ki ga določamo pri tem absorbirajo del svetlobe zanj karakteristične valovne dolžine, intenziteta spektralne črte pa se po prehodu skozi plamen zmanjša. Monokromator, s katerim izberemo ustrezno valovno dolžino, prepušča le svetlobo določenega območja - značilno spektralno črto. Nato iz deleža absorbirane svetlobe določimo množino analita v vzorcu (iz Beer-Lambertovega zakona), valovna dolžina absorbirane svetlobe pa določa element kovine - analit.

6.9 Masna spektrometrija (MS)

Masna spektrometrija je metoda za karakterizacijo snovi, ki temelji na osnovi značilne molekulske mase posameznega analita. Z uporabo te metode določamo molekulsko maso, formulo in strukturo ter identifikacijo snovi na osnovi analize ionov. To je metoda za določanje sledov, saj lahko določamo analite v območju nekaj ng ali pg. Ločujemo ione v plinski fazi glede na naboj in maso. Ločitev poteka na več načinov, največkrat pa v homogenem magnetnem polju ali v visokofrekvenčnih električnih poljih.

Masni spektrometer je sestavljen iz ionskega izvora, masnega analizatorja, ionskega detektorja in sistema za obdelavo podatkov. Molekule analita se ionizirajo v ionskem izvoru. Električno polje tako nastale ione pospeši in s tem dobimo curek pozitivnih ionov. Naloga analizatorja je, da loči curek pozitivnih ionov v posamezne komponente, ki imajo različne vrednosti razmerja masa/naboj. Ioni pa se odklonijo zaradi razlik v hitrosti. Tako dobimo vrsto signalov, ki predstavljajo masni spekter. S pomočjo teh signalov lahko v nadaljevanju sklepamo na strukturo, koncentracijo in vrsto analita. Za to metodo velja visoka učinkovitost, omogoča speciacijo analitov in izotropske sestave, ima odlične meroslovne značilnosti, je primerna tudi za kompleksne matrikse. Vsekakor pa ima metoda slabosti, kot so visoka cena, zahtevno in drago vzdrževanje opreme, togost, usposobljenost analitikov itd. (Beynon, 1960).

Masni spekter (Slika 31) je grafični prikaz ionskih intenzitet v odvisnosti od razmerja masa/naboj. Molekulski vrh predstavlja nabit ion, ki bo razmerju masa/naboj ustreza molekuli masi spojine-analita.



Slika 31: Kromatogram iz masnega spektra za nek material (ScienceDirect).

7. MATERIALI IN METODE DE LA

7.1 Materiali

7.1.1 REAGENTI IN TOPI LA

- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)
- metanol
- izvlečki poprov
- macerat govejih jeter
- diklorometan
- dietil eter
- aceton
- heksan
- etanol
- standard pierina
- bizmutov nitrat(V) pentahidrat
- koncentrirana klorovodikova kislina
- kalijev jodid
- živosrebrov diklorid
- jod
- pikrinska kislina

7.1.2 LABORATORIJSKI MATERIAL

- destilacijska bučka
- merilni valj
- vrelni kamenčki
- štirinožno stojalo
- steklokeramična plošča
- gorilnik
- povratni hladilnik
- nuča
- presesalna erlenmajerica
- rotavapor ali izparilnica
- ledena kopel
- epruveta
- kapalka
- spatula
- čaša
- steklena palčka

- steklena kadička
- kromatografska plošča
- UV lučka
- stojalo za epruvete
- hladilnik
- kivete
- epica
- Terilnica
- lij
- trinožno stojalo
- kovinski obroč
- filtrirni papir

7.1.3 LABORATORIJSKA OPREMA

- Centrifugator (Cold LabExperts)
- UZ kopel (Ultrasonic cleancer ASonic 220V/50Hz, PRO 50)
- Spektrometer (Go direct Spectrovis plus)

7.1.4 VZORCI

Za vzorce smo izbrali izvlečke piperina in ostalih piperidinskih alkaloidov treh vrst popra (črni, beli, zeleni) (Slika 32), standard piperina in macerat govejih jeter. Izvlečki so bili kristalinične oblike (zelene, bež in temno zelene barve), standard pa je bil v obliki prahu (bele barve).



Slika 32: Zeleni, beli in črni poper (Slapničar in Boh Podgornik, 2021).

7.2 Metode

7.2.1 IZOLACIJA PIPERINA

Piperin v laboratoriju lahko izoliramo na več načinov. Za izolacijo se uporabljajo različne metode, ki se med seboj razlikujejo v trajanju izolacije, uporabljenem inventarju ipd. in različni

reagenti, ki vplivajo na stopnjo strupenosti končnega produkta (npr. vodna ekstrakcija, diklorometanska ekstrakcija, metanolna ekstrakcija itd.).

Destilacija

Destilacija je najpogostejša metoda ločevanja in čiščenja tekočin. Pri njej tekočo zmes s segrevanjem pretvorimo v paro in nastalo parov hladilniku ponovno utekočinimo. Ločitev temelji na fizikalni lastnosti- razlik parnih tlakov sestavin zmesi. Podvrsta destilacije je tudi hidrodestilacija, pri kateri sta zmaceriran rastlinski material in vrelna voda v neposrednem stiku. Hlapne komponente eteričnega olja potujejo skupaj z vodno paro v za to namenjen zbiralnik na napravi. Postopek je v uporabi za trše rastlinske dele, kot je na primer les, in za dobro obstojna eterična olja. Poznamo tudi destilacijo z vodno paro, katero uporabljamo za čiščenje in izolacijo spojin, ki se z vodo ne mešajo. To metodo se uporablja pri ločevanju eteričnih olj od rastlinskega materiala in se izvaja v treh korakih: priprava vodne pare (izparevanje), destilacija s kondenzacijo in separacija (ločevanje) faz oziroma izolacija eteričnega olja z ekstrakcijo v organsko topilo (Slapničar in Boh Podgornik, 2021).

Kristalizacija

Spojine, ki jih izoliramo iz reakcijske zmesi ali naravnih virov, so redkokdaj čiste. Skoraj vedno vsebujejo primesi drugih spojin oziroma nečistoče. Kristalizacija je poleg metod sublimacije, destilacije, ekstrakcije in kromatografije ena izmed tehnik čiščenja organskih spojin. Metodo, s katero poskusimo očistiti izolirano spojino, izberemo na osnovi fizikalnih in kemijskih lastnosti spojine in primesi. Postopek za čiščenje in izolacijo želene spojine moramo prilagoditi naslednjim lastnostim: 1) hlapnost (pomembno pri odparevanju topila); 2) polarnost (pomembno pri ekstrakciji iz vodnih raztopin); 3) stabilnost v vodi, kislinah in v bazah; 4) obstojnost pri višji temperaturi, na svetlobi ali v prisotnosti kisika. Uspešnost čiščenja preverimo z določitvijo fizikalnih konstant (tališče, vrelišče, ipd.), z različnimi kromatografskimi metodami (tankoplastna, plinska, visokotlačna tekočinska kromatografija), z elementno analizo in s spektroskopskimi metodami (masna spektroskopija, UV in vidna spektroskopija ipd.). Kristalizacijo definiramo kot nastanek in rast kristalov iz nasičene raztopine spojine. Postopek temelji na razliki topnosti spojine in primesi v danem topilu pri različnih temperaturah. Postopek kristalizacije delimo na več korakov: 1) priprava nasičene raztopine spojine v primernem topilu pri vrelišču topila; 2) adsorpcija primesi na aktivnem oglju; 3) filtracija vroče, nasičene raztopine (odstranjevanje neraztopljenih primesi); 4) hlajenje filtrata (izločanje kristalov iz prenasičene raztopine); 5) filtracija kristalov od matičnice; 6) spiranje kristalov s hladnim čistim topilom in sušenje. Uspešnost čiščenja z metodo kristalizacije je odvisna od izbire primerne topila. Spojina, ki jo kristaliziramo, mora biti dobro topna v vročem in slabo topna v istem hladnem topilu. Nečistoče morajo biti v tem topilu dobro topne – v vročem in tudi hladnem stanju – in tako ostanejo raztopljene v raztopini oziroma morajo biti zelo slabo topne tudi v vročem topilu, da jih lahko odstranimo s filtracijo. Topilo, ki ga izberemo, ne sme reagirati s spojino, ki jo kristaliziramo; spojina mora iz njega

izpasti v čim lepše oblikovanih kristalih. Pomembna lastnost topila je še ta, da ne sme imeti previsoke temperature vrelišča (od kristalov se ga lahko odstrani) (Slapničar in Boh Podgornik, 2021).

Postopek izvedbe izolacije piperina:

V 100 mL destilacijsko bučko smo dodali 15,0 g mletega črnega ali belega ali zelenega popra. Z merilnim valjem smo odmerili 25 mL diklorometana in ga zlili v destilacijsko bučko z mletim poprom. V destilacijsko bučko smo dodali še tri vrelnne kamenčke in zmes v bučki dobro premešali. Pod bučko smo podstavili štirinožno stojalo s steklokeramično ploščo in gorilnik. Destilacijsko bučko smo opremili s povratnim hladilnikom in zmes 30 minut refluktirali. Po 30-minutnem refluxu smo počakali pet minut, da se zmes ohladi, nato netopni ostanek odnučirali v suho presesalno erlenmajerico. Ostanek na filtru nuče (t. i. matičnico oz. filtrat) smo dvakrat sprali s 5 mL diklorometana. Filtrat smo prenesli v bučko in diklorometan oddestilirali z uporabo rotavaporja (destilacija pod znižanim tlakom). Izparevanje diklorometana lahko izvedemo tudi v izparilnici ob segrevanju na steklokeramični plošči. Izparevanje izvajamo v digestoriju. Oljnati snovi temno rjave barve, ki ostane v bučki (oziroma v izparilnici) po destilaciji, smo dodali 5 mL dietil etra in ohladili. Za hlajenje smo uporabili ledeno kopel. Med 15-minutnim hlajenjem olje smo s spatulo ves čas intenzivno mešali z drgnjenjem ob steno bučke (oziroma ob steno izparilnice), da smo izzvali kristalizacijo alkaloida piperina. Surov piperin smo nato prekrystalizirali iz sveže pripravljene zmesi topil acetona : heksana v razmerju 3:2, tako da smo v epruveto s kapalko odmerite 3 mL acetona in 2 mL heksana. Zmesi izolata s kapalko smo dodali 1 mL pripravljene zmesi topil. Nastalo zmes smo s spatulo intenzivno mešali, da se ves surov piperin raztopil v zmesi in dokler vse topilo ni popolnoma izhlapelo. Prekrystaliziran produkt je bil zmes s teksturo paste.

7.2.2 DOKAZ IZOLIRANEGA PIPERINA S TANKOPLASTNO KROMATOGRAFIJO

TLC kromatografija

Kromatografija je metoda za ločevanje komponent zmesi in čiščenje spojin (trdnih, tekočih in plinastih). Metoda ločevanje temelji na različni porazdelitvi sestavin zmesi med dvema fazama. Pri tekočinski kromatografiji vzorec (homogeno tekočo zmes), pogosto v toku topila, spustimo skozi stacionarno (mirujočo) fazo. Ta miruje in je lahko tekoča ali plinasta. Med obema fazama se ves čas vzpostavlja ravnotežje. Navadno ima vsaka čista komponenta zmesi značilno separacijsko hitrost, na podlagi katere določimo čisto komponento, ki sestavlja prvotno zmes. Topilo imenujemo mobilna (gibajoča se) faza in se vedno premika po stacionarni fazi. Lahko je tekoča ali plinasta. Pri tankoplastni kromatografiji (*ang. Thin Layer Chromatography*, TLC), je stacionarna faza s primernim vezivom pritrjena na stekleno, plastično ali na kovinsko (največkrat aluminijsko) ploščo. Mobilna faza se po stacionarni fazi premika zaradi kapilarnih sil (kapilarni vlek) ali centrifugalne sile, ki nastane kot posledica vrtenja plošče (radialna kromatografija). Gre za adsorpcijsko-kromatografsko metodo za ločevanje s 100-200 μm

debelo plastjo silicijevega(IV) oksida SiO_2 ali aluminijevega(III) oksida Al_2O_3 , ki je enakomerno nanesena na nosilno ploščo (spojine se ločijo po polarnosti) (Slapničar in Boh Podgornik, 2021).

Postopek izvedbe TLC kromatografije:

Pripravili smo zmes sveže mobilne faze za tankoplastno kromatografijo, tako da smo zmešali 30 mL acetona in 20 mL heksana (razmerje komponent 3:2). Zmes mobilne faze smo previdno prelili v stekleno kadičko do višine 1 cm. Kadičko smo zaprli, da se nasiti s hlapi mobilne faze, kar pripomore k boljši ločbi. Na primerno veliko kromatografsko ploščo (širina 12 cm, dolžina 15 cm) smo s svinčnikom rahlo narisali startno črto 2 cm od spodnjega roba. Pazili smo, da pri tem nismo poškodovali plasti silikagela. Standardni vzorec in vzorec izoliranega piperina smo pripravili tako, da smo v majhno stekleno posodico s kapalko odmerili pet kapljic acetona in v njih raztopili konico spatule ustreznega piperina. S stekleno kapilaro smo nanesite izoliran piperin in standardni vzorec piperina na startno črto, tako da smo se kromatografske plošče pod pravim kotom enkrat dotaknili s kapilaro. Med posameznimi nanosi smo mesto na kromatografski plošči osušili. Pri nanašanju izoliranega piperina in njegovega standarda s kapilarama smo pazili, da nismo poškodovali plasti silikagela. Na kromatografski plošči smo označite, kateremu izvlečku pripada posamezna lisa na startni črti. Kromatografsko ploščo smo z nanešenima vzorcema izoliranega piperina in njegovega standarda previdno postavili v kadičko, ki je bila nasičena s hlapi mobilne faze. Ko je mobilna faza pripotovala približno dva centimetra do zgornjega roba plošče, smo vzeli kromatografsko ploščo iz kadičke. S svinčnikom smo takoj rahlo označili mejo, do katere je pripotovala mobilna faza. Topila iz kromatografske komore smo zlili v posebej za to označeno posodo. Izoliran piperin in njegov standardni vzorec smo v zatemnjenem prostoru vizualizirali z UV-lučko. Na stacionarni fazi smo impregnirali s fluorescentno spojino (npr. cinkov silikat aktiviran z manganom), ki fluorescira po absorpciji UV svetlobe 254 nm, so spojine vidne kot temne lise na fluorescentnem, svetlozeleno obarvanem ozadju.

7.2.3 SPECIFIČNE DOKAZNE REAKCIJE ZA PRISOTNOST ALKALOIDOV

Specifične obarjalne reakcije za dokazovanje prisotnosti alkaloidov

Obarjanje ali precipitacija je proces nastanka oborine (trdnine ali precipitata) iz raztopine. Za splošno kvalitativno dokazovanje prisotnosti alkaloidov v izoliranem rastlinskem vzorcu obstaja več različnih dokaznih obarjalnih reakcij, izpostavljene pa so štiri najpogostejše (Slapničar in Boh Podgornik, 2021):

- a) Dragendorffov test;
- b) Mayerjev test;
- c) Wagnerjev test;
- d) Hagerjev test.

Preglednica 5: Sestava reagentov in dokaz prisotnosti alkaloidov pri posameznem testu.

Ime testa	Kemijska sestava reagenta	Dokaz prisotnosti alkaloidov
Dragendorffov test	Kisla raztopina bizmutovega nitrata(V) in kalijevega jodida	Oranžno-rdeča oborina
Mayerjev test	Vodna raztopina živosrebrovega diklorida in kalijevega jodida	Belo-kremasta oborina
Wagnerjev test	Vodna raztopina kalijevega trijodida	Rdeče-rjava oborina
Hagerjev test	Vodna raztopina pikrinske kisline (2,4,6-trinitrofenol)	Rumena oborina

a) Dokazna reakcija: Dragendorffov test

Postopek izvedbe Dragendorffovega testa:

Pripravili smo standardno raztopino piperina, ki smo jo kot enega izmed dveh kontrolnih vzorcev potrebovali v vseh štirih dokaznih reakcijah izoliranega piperina (izoliranih alkaloidov). V 50 mL čašo smo dali konico spatule standardnega piperina in s kapalko dodali 5 mL 96 % etanola. Zmes smo s stekleno palčko mešali toliko časa, da se je v etanolu raztopil ves piperin. Pripravili smo raztopino izoliranega piperina (raztopino izoliranih alkaloidov), tako da smo v 50 mL čašo s kapalko odmerili 5 mL 96 % etanola, v katerem smo raztopili konico spatule izoliranega piperina. Zmes smo s stekleno palčko mešali toliko časa, da se je v etanolu raztopil ves izoliran piperin. Pripravili smo Dragendorffov reagent, tako da smo v eno 50 mL čašo zatehtali 0,25 g bizmutovega nitrata(V) pentahidrata in vanjo s kapalko dodali 5 mL koncentrirane klorovodikove kisline. Zmes smo s stekleno palčko mešali toliko časa, da se je ves bizmutov nitrat(V) pentahidrat raztopil v klorovodikovi kislini. V drugo 50 mL čašo smo zatehtali 2,0 g kalijevega jodida in vanjo z merilnim valjem odmerili 10 mL destilirane vode. Zmes smo s stekleno palčko mešali toliko časa, da se je ves kalijev jodid raztopil v destilirani vodi. Vodno raztopino kalijevega jodida smo s kapalko po kapljicah dodajali v kislno raztopino bizmutovega nitrata(V) do obstojne temno oranžne barve. Novonastala raztopina je bil Dragendorffov reagent. Pripravite smo tri epruvete. V prvo epruveto (kontrolni vzorec 1) smo s kapalko odmerili 1 mL etanolne raztopine standardnega piperina, v drugo epruveto (kontrolni vzorec 2) 1 mL 96% etanola in v tretjo epruveto 1 mL etanolne raztopine izoliranega piperina. V vsako epruveto smo s kapalko dodali 1 mL pripravljenega Dragendorffovega reagenta. Vsako epruveto smo dobro pretresli.

b) Dokazna reakcija: Mayerjev test

Postopek izvedbe Mayerjevega testa:

Pripravili smo raztopino izoliranega piperina (raztopino izoliranih alkaloidov), tako da smo v 50 mL čašo s kapalko odmerili 5 mL 96 % etanola, v katerem smo raztopili konico spatule izoliranega piperina. Zmes smo s stekleno palčko mešali toliko časa, da se je ves izoliran piperin

raztopil v etanolu. Pripravili smo Mayerjev reagent, tako da smo v eno 50 mL čašo zatehtali 0,68g živosrebrovega diklorida in z merilnim valjem vanjo odmerili 30 mL destilirane vode. Zmes smo s stekleno palčko mešali toliko časa, da se je v destilirani vodi raztopil ves živosrebrov diklorid. V drugo 50 mL čašo smo zatehtali 2,5 g kalijevega jodida in vanjo z merilnim valjem odmerili 10 mL destilirane vode. Zmes smo s stekleno palčko mešali toliko časa, da se je v destilirani vodi raztopil ves kalijev jodid. Pripravljeni raztopini smo prelili v 50 mL bučko in raztopino z destilirano vodo razredčili do oznake. Bučko z nastalo raztopino Mayerjevega reagenta smo dobro pretresli. Pripravili smo tri epruvete. V prvo epruveto (kontrolni vzorec 1) smo s kapalko odmerili 1 mL etanolne raztopine standardnega piperina, v drugo epruveto (kontrolni vzorec 2) 1 mL 96 % etanola in v tretjo epruveto 1 mL etanolne raztopine izoliranega piperina. V vsako epruveto smo s kapalko dodali 1 kapljico koncentrirane klorovodikove kisline in 1 mL pripravljenega Mayerjevega reagenta. Vsako epruveto smo dobro pretresli.

c) Dokazna reakcija: Wagnerjev test

Postopek izvedbe Wagnerjevega testa:

Pripravili smo raztopino izoliranega piperina (raztopino izoliranih alkaloidov), tako da smo v 50 mL čašo s kapalko odmerili 5 mL 96 % etanola, v katerem smo raztopili konico spatule izoliranega piperina. Zmes smo s stekleno palčko mešali toliko časa, da se je ves izoliran piperin raztopil v etanolu. Pripravili smo Wagnerjev reagent, tako da smo v eno 100 mL čašo zatehtali 3,0 g kalijevega jodida in z merilnim valjem vanjo odmerili 80 mL destilirane vode. Zmes smo s stekleno palčko mešali toliko časa, da se je v destilirani vodi raztopil ves kalijev jodid. V pripravljeno raztopino kalijevega jodida smo dodali 1,3 g joda in zmes s stekleno palčko mešali toliko časa, da se ves jod raztopil. Pripravljeno raztopino smo prelili v 100 mL bučko in raztopino z destilirano vodo razredčili do oznake. Bučko z nastalo raztopino Wagnerjevega reagenta smo pretresli. Pripravili smo tri epruvete. V prvo epruveto (kontrolni vzorec 1) smo s kapalko odmerili 1 mL etanolne raztopine standardnega piperina, v drugo epruveto (kontrolni vzorec 2) 1 mL 96 % etanola in v tretjo epruveto 1 mL etanolne raztopine izoliranega piperina. V vsako epruveto smo s kapalko dodali 1 mL pripravljenega Wagnerjevega reagenta. Vsako epruveto smo dobro pretresli.

d) Dokazna reakcija: Hagerjev test

Postopek izvedbe Hagerjevega testa:

Pripravili smo raztopino izoliranega piperina (raztopino izoliranih alkaloidov), tako da smo v 50 mL čašo s kapalko odmerili 5 mL 96 % etanola, v katerem smo raztopili konico spatule izoliranega piperina. Zmes smo s stekleno palčko mešali toliko časa, da se je ves izoliran piperin raztopil v etanolu. Pripravili smo Hagerjev reagent, tako da smo v 100 mL čašo zatehtali 1,0 g pikrinske kisline in z merilnim valjem vanjo odmerili 80 mL destilirane vode. Zmes smo s

stekleno palčko mešali toliko časa, da se v destilirani vodi raztopila vsa pikrinska kislina. Pripravljeno raztopino smo prelili v 100 mL bučko in raztopino z destilirano vodo razredčili do oznake. Bučko z nastalo raztopino Hagerjevega reagenta smo pretresli. Pripravili smo tri epruvete. V prvo epruveto (kontrolni vzorec 1) smo s kapalko odmerili 1 mL etanolne raztopine standardnega piperina, v drugo epruveto (kontrolni vzorec 2) 1 mL 96 % etanola in v tretjo epruveto 1 mL etanolne raztopine izoliranega piperina. V vsako epruveto smo s kapalko dodali 1 mL pripravljene Hagerjevega reagenta. Vsako epruveto smo dobro pretresli.

7.2.4 PRIPRAVA RAZTOPINE DPPH

DPPH metoda za merjenje antioksidativne sposobnosti

DPPH metoda velja za enostavno, hitro in poceni metodo, s katero določamo antioksidativni potencial posameznih spojin. Pogosto se uporablja za ocenjevanje lastnosti rastlinskih sestavin za ovrednotenje prostih radikalov. Metoda temelji na reakciji med stabilnim prostim radikalom DPPH• (2,2-difenil-1-pikrilhidrazila) in donorjem vodika (antioksidanti npr. vitamini), zaradi česar se zmanjša absorbanca vzorca. Proces poteka pri sobni temperaturi v polarnem organskem topilu (npr. metanol, etanol). Pri tej metodi pride do spremembe koncentracije DPPH, kar je posledica reakcije z antioksidantom, pri tem pa je potrebno upoštevati različne pogoje, kot so reakcijski čas, topila, pH in različne spojine, ki se uporabljajo kot antioksidativni standardi. Pri redukciji pride še do spremembe barve, pri čemer se vijolično obarvana raztopina pretvori v blede rumeno barvo. Reakcija se zaključi po približno 15-30 minutah, spremembo koncentracije DPPH radikalov pa določimo s merjenjem absorbance s pomočjo spektrofotometra. Meritev izvedemo pri valovni dolžini 517 nm. Rezultat se po navadi poda z EC₅₀, ki predstavlja koncentracijo antioksidanta, ki ga potrebujemo za odstranitev 50% DPPH radikalov. Paziti moramo, da raztopino DPPH hranimo v temnem okolju, da ne pride do fotokemičnega razpada zaradi svetlobe (Grzetič, str. 10).

Spektrofotometrična metoda

S pomočjo spektrometra se meri absorbance raztopin v kivetah. Te morajo biti iz materiala, ki prepušča sevanje željene valovne dolžine in je inerten za merjenje raztopin. To merjenje ni zahtevno. Za analizo si izberemo valovno dolžino pri kateri je absorbanca maksimalna in jo odčitamo iz grafa. Pomembno je, da je spektrometer umerjen, To pomeni, da nastavimo absorbance referenčnega vzorca na 0. Ko vzorce vstavljamo v spektrometer moramo biti pozorni, da ne umažemo kivete, saj nam da taka meritev napačne rezultate (Pihlar in Prosen, 2019).

Postopek izvedbe priprave raztopine DPPH:

V 25 mL merilno bučko smo zatehtali 6,90 mg DPPH. V bučko smo do polovice dolili topilo tj. mešanica metanola in vode v razmerju 1:1 in kristale DPPH raztopili s pomočjo ultrazvočne kopeli. S topilom smo dopolnili bučko do oznake in raztopino še enkrat premešali z obračanjem

bučke. Bučko smo nato zavili v aluminijasto folijo, da smo preprečili fotolitski razpad DPPH in jo shranili v hladilnik. Pri tem smo dobili raztopino radikalske strukture spojine DPPH v metanolu, katero bomo po redčenju v naslednjem koraku nevtralizirali (pretvorili v nereaktiven produkt). Raztopino, ki smo jo uporabljali za izvedbo poskusa (delovna raztopina) smo pripravili tako, da smo osnovno raztopino DPPH redčili s topilom v razmerju 1:5. V 25 mL merilno bučko smo odmerili 5 mL osnovne raztopine DPPH in do oznake napolnili s topilom (20 mL). Pripravili smo dve paralelki vzorcev, kjer smo v prvi pripravili 2 slepa vzorca s topilom, v drugi pa 2 vzorca z raztopino DPPH. Ko smo napolnili vzorce z raztopino, ki smo jo uporabljali za izvedbo poskusa, smo te najprej dobro premešali in jih dali v vodno kopel s temperaturo približno 50 °C za 15 minut in jih nato še 3 minute centrifugiramo (6600 obratov pri sobni temperaturi). Izvedli smo meritve absorbanc z UV-VIS spektrofotometrom pri valovni dolžini 517 nm v kivetah. Najprej smo izvedli meritev absorbance čistega topila, ki jo je program odštél od vsake meritve, nato smo izvedli meritev absorbance raztopine, ki smo jo uporabljali za izvedbo poskusa. Na koncu smo pomerili še absorbanco vzorcev obeh paralelk (2 slepa vzorca s topilom ter 2 vzorca z raztopino DPPH). Vzorec macerata jeter in raztopino DPPH smo mešali v razmerju 100 µL : 3900 µL. Jetra so morala biti sveža in ohlajena.

7.2.5 PRIPRAVA VZORCA ŽIVALSKIH CELIC

Postopek izvedbe priprave vzorca živalskih celic:

Majhen kos jeter (cca. 30 g) smo s pestilom strli v terilnici. Nastalo snov smo prefiltrirali skozi filtrirni papir, kot topilo smo uporabili vodo (razmerje med vodo in filtratom naj bo 1:1), da smo dobili jetrni macerat. Bister filtrat smo zmešali z vnaprej pripravljeno delovno raztopino DPPH.

7.2.6 RAČUNANJE ZNIŽANJA ABSORBANCE

$$\% \text{ znižanje } A = \frac{A(\text{kontrola})}{A(\text{vzorec})} 100\%$$

A(kontrola) ... absorbanca vzorca DPPH (z/brez jetrnega macerata) pred dodatkom antioksidanta

A(vzorec) ... absorbanca vzorca DPPH (z/brez jetrnega macerata) po dodatku antioksidanta

7.2.7 RAČUNANJE % INHIBICIJE

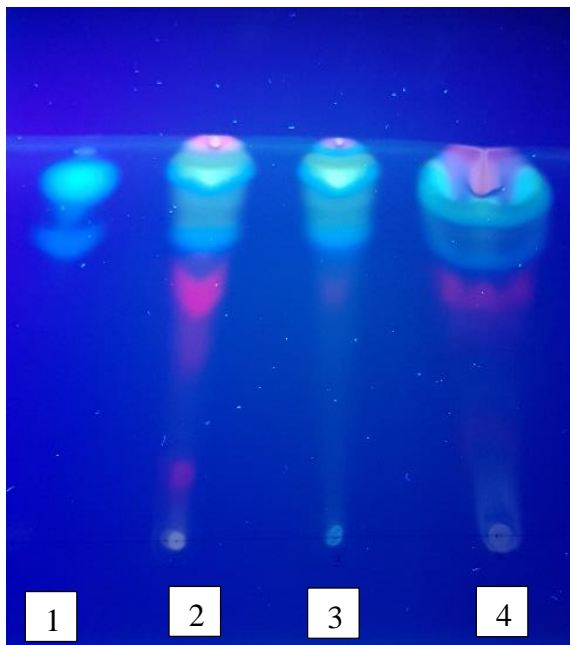
$$\% \text{ inhibicija} = \frac{A(\text{kontrola}) - A(\text{vzorec})}{A(\text{kontrola})} 100\%$$

A(kontrola) ... absorbanca vzorca DPPH (z/brez jetrnega macerata) pred dodatkom antioksidanta

A(vzorec) ... absorbanca vzorca DPPH (z/brez jetrnega macerata) po dodatku antioksidanta

8. REZULTATI Z DISKUSIJO

8.1 TLC analiza



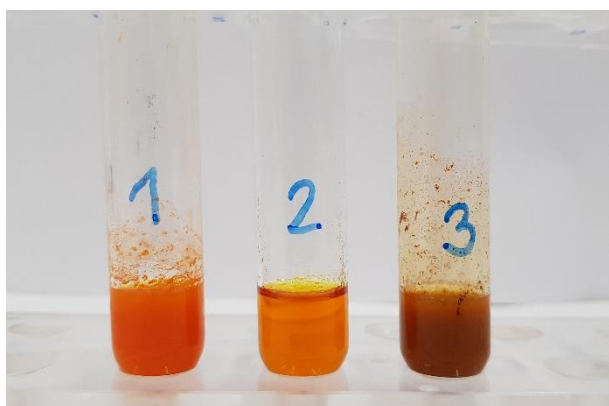
Slika 33: rezultati TLC analize.

Na TLC ploščo smo nanegli vzorce piperina v zaporedju od leve proti desni (Slika 33): standard piperina (1), črni poper (2), zeleni poper (3) in beli poper (4). Iz velikost lis vidimo, da največ piperina v primerjavi s standardom vsebuje beli poper, sledi črni poper in na koncu zeleni poper. Lise drugih barv nam kažejo, da so v vzorcih prisotne tudi druge snovi (piperidinski alkaloidi in ostali sekundarni metaboliti), katerih v standardu ne najdemo.

8.2 Rezultati dokaznih reakcij

8.2.1 DRAGENDORFFOV TEST

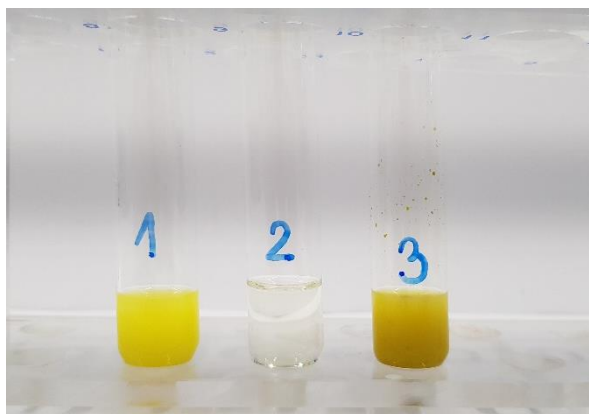
Dragendorffov test dokazuje prisotnost alkaloidov z nastankom oranžno-rdeče oborine ob dodatku reagenta. V epruveti št. 1 je prisotna etanolna raztopina standardnega piperina z reagentom, v epruveti št. 2 sta prisotna etanol in reagent, v epruveti št. 3 pa sta etanolna raztopina izoliranega piperina in reagent. Vidimo (Slika 34), da je intenzivnost barve oborine največja v epruveti št. 3, kar nakazuje na največjo vsebnost alkaloidov v tej epruveti. Po intenzivnosti sledi epruveta št. 1, v epruveti št. 2 pa ni oborine, saj ta predstavlja slepi vzorec in ne vsebuje alkaloidov.



Slika 34: rezultati Dragendorffovega testa.

8.2.2 MAYERJEV TEST

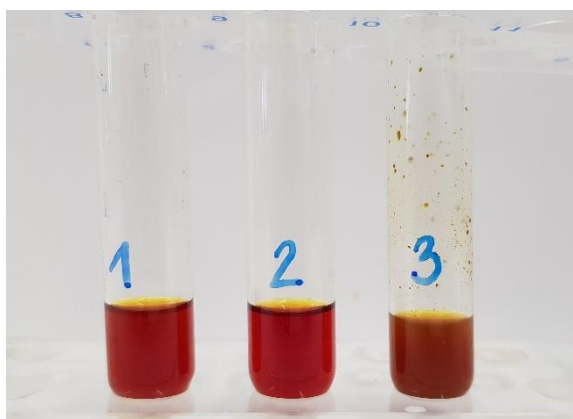
Mayerjev test dokazuje prisotnost alkaloidov z nastankom bele-kremaste oborine ob dodatku reagenta. V epruveti št. 1 je prisotna etanolna raztopina standardnega piperina z reagentom, v epruveti št. 2 sta prisotna etanol in reagent, v epruveti št. 3 pa sta etanolna raztopina izoliranega piperina in reagent. Opazimo (Slika 35), da je intenzivnost barve oborine največja v epruveti št. 3, kar nakazuje na največjo vsebnost alkaloidov v tej epruveti. Sledi epruveta št. 1, v epruveti št. 2 pa ni oborine, saj tako kot v prejšnjem poskusu ta predstavlja slepi vzorec.



Slika 35: rezultati Mayerjevega testa.

8.2.3 WAGNERJEV TEST

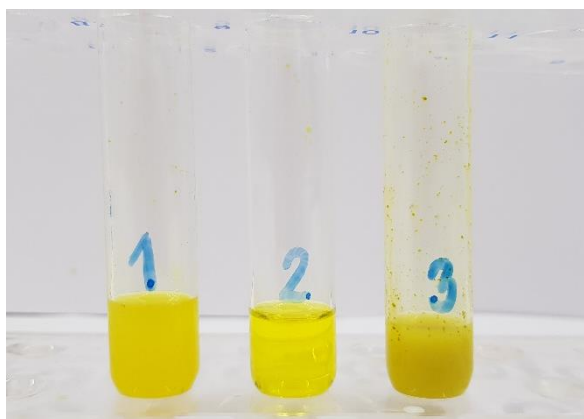
Wagnerjev test dokazuje prisotnost alkaloidov z nastankom rdeče-rjave oborine ob dodatku reagenta. Epruveta št. 1 vsebuje etanolno raztopino standardnega piperina z reagentom, epruveta št. 2 sta etanol in reagent, epruveta št. 3 pa etanolno raztopino izoliranega piperina in reagent. Vidimo (Slika 36), da je intenzivnost barve oborine največja v epruveti št. 3, kar nakazuje na največjo vsebnost alkaloidov v tej epruveti. Po intenzivnosti sledi epruveta št. 1, v epruveti št. 2 pa ni oborine, saj ta predstavlja slepi vzorec in ne vsebuje alkaloidov.



Slika 36: rezultati Wagnerjevega testa.

8.2.4 HAGERJEV TEST

Hagerjev test dokazuje prisotnost alkaloidov z nastankom rumene oborine ob dodatku reagenta. V epruveti št. 1 je prisotna etanolna raztopina standardnega piperina z reagentom, v epruveti št. 2 sta prisotna etanol in reagent, v epruveti št. 3 pa sta etanolna raztopina izoliranega piperina in reagent. Vidimo (Slika 37), da je intenzivnost barve oborine največja v epruveti št. 3, kar nakazuje na največjo vsebnost alkaloidov v tej epruveti. Po intenzivnost sledi epruveta št. 1, v epruveti št. 2 pa ni oborine, saj ta predstavlja slepi vzorec in ne vsebuje alkaloidov.



Slika 37: rezultati Hagerjevega testa.

8.3 Razbarvanje raztopine

Razbarvanje raztopine DPPH je indikator antioksidacijske sposobnosti. Raztopine DPPH ob nevtralizaciji (antioksidacijskem delovanje piperina) spremeni barvo iz vijolične v rumeno. Leva kiveta prikazuje raztopino DPPH brez dodatka izvlečka piperina. Od leve proti desni je bil v kivete dodan izvleček piperina, zato se je posledično spremenila tudi barva raztopine (Slika 38). Bolj desno je kiveta, večja je koncentracija antioksidanta.



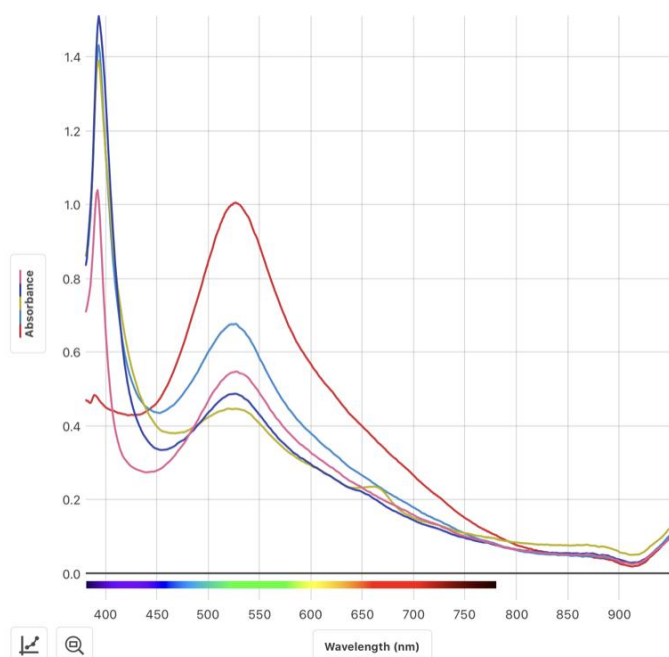
Slika 38: rezultati razbarvanja raztopine DPPH ob dodatku antioksidanta.

8.4 Spektrometrično določanje absorbance raztopine DPPH ob dodatku izvlečkov poprov brez substrata

Preglednica 6: Povprečne vrednosti (\pm standardna napaka) absorbanc (A) ob dodatku izvlečkov popra brez substrata jetrnih celic.

Vrsta popra	A
Črni poper	$0,4774 \pm 0,0018$
Beli poper	$0,4482 \pm 0,0027$
Zeleni poper	$0,6702 \pm 0,0025$
Standard piperina	$0,5362 \pm 0,0023$

Povprečna absorbanca DPPH raztopine pri meritvah: $A(\text{DPPH}) = 0,945$



Slika 39: Grafični prikaz meritev absorbanc v odvisnosti od valovnih dolžin.

Legenda:

Rdeča krivulja = DPPH

Svetlo modra krivulja = zeleni poper

Roza krivulja = standard piperina

Temno modra krivulja = črni poper

Zelena krivulja = beli poper

Rezultati spektrometričnega določevanja absorbanc kažejo (Slika 39), da ima pri radikalski reakciji največjo antioksidativno sposobnost beli poper (znižanje A za 52,6 %), sledi črni poper (49,5 %), zeleni poper (29,1 %) in standard piperina (43,3 %). Rezultati raziskave so skladni z rezultati drugih raziskav, kjer so preverjali antioksidativno sposobnost piperina in ostalih piperidinskih alkaloidov (Friedman idr., 2008). Ugotovili smo, da imajo pri radikalskih reakcijah različne vrste popra različno antioksidativno sposobnost, največjo ima beli poper, sledita črni poper in standard, najmanjšo pa imazeleni poper.

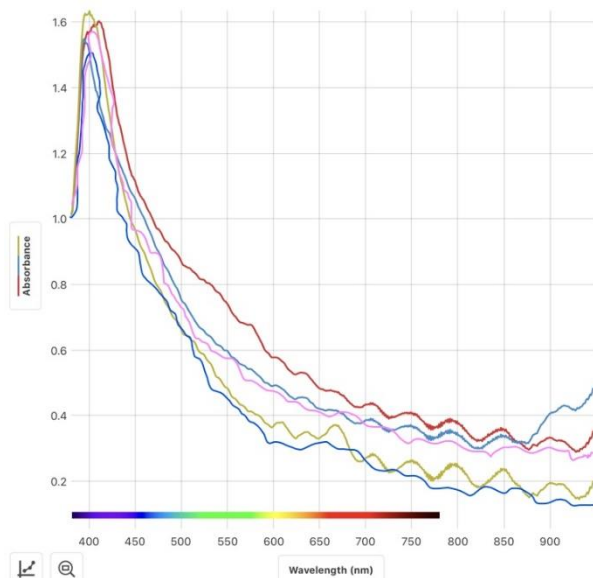
8.5 Spektrometrično določanje absorbance raztopine DPPH ob dodatku izvlečkov poprov in substrata

Preglednica 7: Povprečne vrednosti (\pm standardna napaka) absorbanc (A) ob dodatku izvlečkov popra in prisotnosti substrata jetrnih celic.

Vrsta popra	A
Črni poper	$0,6090 \pm 0,0019$
Beli poper	$0,4816 \pm 0,0016$
Zeleni poper	$0,6428 \pm 0,0010$

Standard	$0,6760 \pm 0,0022$
-----------------	---------------------

Povprečna absorbanca DPPH raztopine pri meritvah: $A(\text{DPPH}) = 0,7322$



Slika 40: Grafični prikaz meritev absorbanca v odvisnosti od valovnih dolžin.

Legenda:

Rdeča krivulja= DPPH

Svetlo modra krivulja= standard

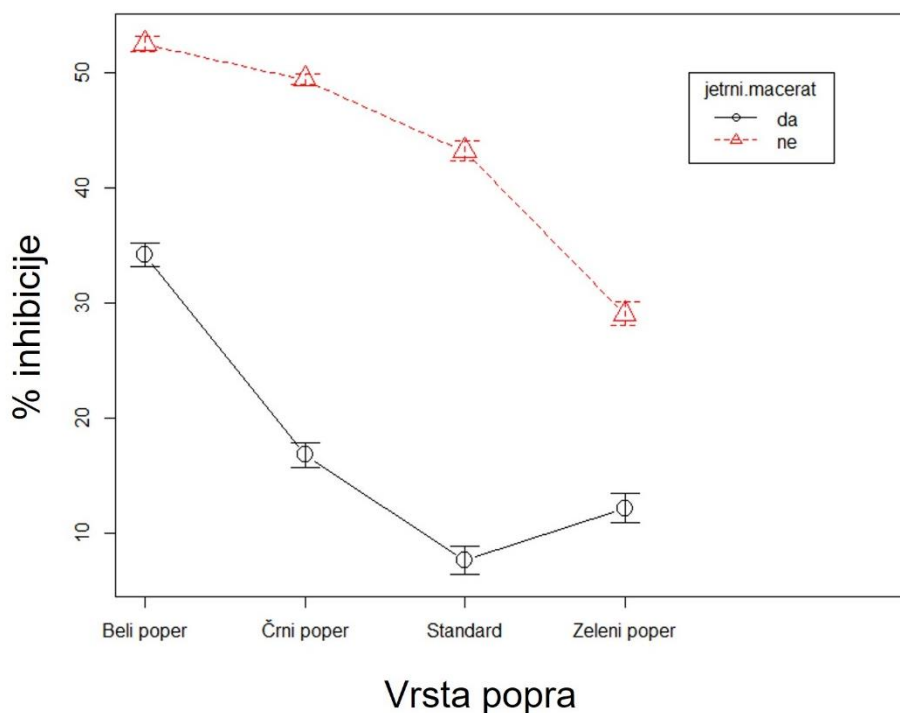
Roza krivulja= zeleni poper

Temno modra krivulja= beli poper

Zelena krivulja= črni poper

Analiza izmerjenih vrednosti absorbanca (Slika 40) je pokazala, katera vrsta plodov ima največji delež razbarvanja DPPH raztopine, kar je indikator antioksidativne sposobnosti. Rezultati kažejo, da ima pri radikalskih reakcijah v celicah govejih jeter največjo antioksidativno sposobnost (največji delež razbarvanja DPPH) beli poper (znižanje absorbanca za 34,2 %), sledi črni poper (16,8 %), zeleni poper (12,2 %), medtem ko je imel standard piperina najmanjšo antioksidativno sposobnost (znižanje absorbanca za 7,7 %). Rezultati raziskave so skladni z rezultati drugih raziskav, kjer so antioksidativno sposobnost piperina in ostalih piperidinskih alkaloidov preverjali na živalskih celicah različnih tkiv in organov (Graidist idr., 2019). Z našo raziskavo smo ugotovili, da imajo pri radikalskih reakcijah v celicah govejih jeter plodovi večjo antioksidativno sposobnost, kot standard piperina, kar je najverjetneje posledica prisotnosti tudi drugih snovi v plodovih. Ugotovili smo, da imajo plodovi različno antioksidativno sposobnost, kar je lahko povezano z različno zrelostjo in obdelavo plodov, ki vpliva na vsebnost sekundarnih metabolitov in ostalih antioksidantov.

Statistični model ocenjuje, da se je antioksidativni potencial statistično značilno različno spreminjal med različnimi vrstami poprov uporabljenih in glede na prisotnost oz. odsotnost jetrnega macerata. Prav tako je bila statistično značilna interakcija med glavnima faktorjema.



Slika 41: Diagram povprečij s pripadajočimi standardnimi napakami (n=5) za % inhibicije glede na vrsto popra in uporabo jetrnega macerata.

S slike 41 je razvidno, da je bil % inhibicije največji pri belem popru ob odsotnosti jetrnega macerata. Ob odsotnosti jetrnega macerata se % inhibicije belega popra ni razlikoval od črnega, je pa imel standard manjši % inhibicije kot beli poper, zeleni poper pa najmanjši % inhibicije od vseh oblik ob odsotnosti macerata.

Ob prisotnosti jetrnega macerata je imel beli poper največji % inhibicije, sledil mu je črni poper. Zeleni poper in standard sta imela najmanjši % inhibicije in med njima ni bilo statistične razlike.

9 ZAKLJUČEK

V raziskovalni nalogi smo ugotavljali antioksidacijsko sposobnost piperina in ostalih piperidinskih alkaloidov treh vrst plodov črnega poprovca (beli, črni, zeleni) in standarda piperina pri radikalskih reakcijah z in brez prisotnosti živalskih celic iz govejih jeter.

Antioksidacijska sposobnost smo preverili spektrometrično po DPPH metodi. Ugotovili smo, da imajo popri antioksidacijsko sposobnost. Najvišje izmerjeno antioksidacijsko sposobnost smo zaznali pri belem popru, kateremu je sledil črni poper, sposobnost standarda in zelenega popra pa je bila obrnjena pri poskusu na jetrih in brez teh, pri jetrih je imel boljšo sposobnost standard, v poskusu brez jeter pa zeleni poper.

Na podlagi predstavljenih rezultatov lahko zaključimo, da so dobljeni rezultati % inhibicije poprov najvišji v belem popru. Ne moremo zagotovo vedeti ali je vzorec najboljši, če je njegov antioksidacijski potencial najvišji, saj so pomembne tudi ostale komponente, ki bi jih morali izvesti z drugimi metodami. Zaključimo lahko, da imajo ekstrakti popra dobre antioksidativne sposobnosti. Jetra so organ, ki človeško telo raztriplja, reakcije pa potekajo na nivoju jetrnih celic, v katerih najdemo tudi radikalske reakcije. Zato je bilo pomembno ujemanje rezultatov ob dodatku jetrnega macerata in brez, saj smo s tem potrdili učinek piperina in ostalih piperidinskih alkaloidov na živalske celice pri radikalskih reakcijah, katere ima vsako človeško telo. Tako smo dokazali, da celicam ob vnosu različnih vrst popa v telo pomagamo pri hitrejši nevtralizaciji tovrstnih reakcij in pretvorbi strupenih in škodljivih snovi.

10 LITERATURA

1. Slapničar, M. in Boh Podgornik, B. (2021). Naravne spojine v živih sistemih. Univerzitetni učbenik. Univerza v Ljubljani, Pedagoška fakulteta.
2. K. Nakajima, M. Ogushi, Y. Yoshie-Stark, (2009), Food Chemistry: Comparison of ACE inhibitory and DPPH radical scavenging activities of fish muscle hydrolysates, ScienceDirect, 844-851.
3. Y. Aniya a, H. Gibo d, T. Nagamine c, M. Shimabukuro d, K. Shimada b, T. Yokomakura a, M. Yonamine a, (1999), General Pharmacology: The Vascular System, ScienceDirect, 225-231.
4. Z. Akar, M. Küçük, H. Doğan, (2017), A new colorimetric DPPH• scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 640-657.
5. R. Dacinger, (2019), Antioksidanti in radikali: Ugriznimo znanost, RTV SLO.
6. K. Manurung, N. Nerdy, (2018), Spectrophotometric method for antioxidant activity test and total phenolic determination of red dragon fruit leaves and white dragon fruit leaves, Rasayan journal, 1183 – 1192.
7. H. Liu, P. Liu, F. Zeng, J. Zheng, (2018), Pulverizing processes affect the chemical quality and thermal property of black, white, and green pepper (*Piper nigrum* L.), J Food Sci Technol, NCBI, 2130–2142.
8. B. Halliwell, (1996). Commentary Oxidative Stress, Nutrition and Health. Experimental Strategies for Optimization of Nutritional Antioxidant Intake in Humans, Taylor and Francis online, 57-74.
9. A. Pečkal, K. Pyrzyńska, (2013), Analytical Methods: Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples, RSC Publishing, 4288-4295.
10. A. L. Dawidowicz, M. Olszowy, D. Wianowska, (2012), Food Chemistry: On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity), ScienceDirect, 1037-1043.
11. J. L.F.C. Lima, S. Reis, M. A. Segundo, L. M. Magalhães, (2006), Analytica Chimica Acta: Automatic method for determination of total antioxidant capacity using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay, ScienceDirect, 310-318.
12. M. Arlorio, J. D. Coisson, R. Gindro, M. Locatelli, M. Rinaldi, F. Travaglia, (2009), Food Chemistry: Study of the DPPH -scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data, ScienceDirect, 889-897.
13. S. B. Kedare, R. P. Singh, (2011), Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay, J Food Sci Technol, 412–422.
14. Pihlar, B. in Prosen, H. (2019), Osnove analize kemije, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.

15. J. H. Beynon, (1960), *Mass Spectrometry and Its Applications to Organic Chemistry*, Elsevier, Amsterdam
16. J. Zwinkels, (2015), *Light, Electromagnetic Spectrum*, *Encyclopedia of Color Science and Technology*, 1-5.
17. J. R. Gilchrist, C. Hsi, (b.d.), *Spectroscopy: Mastering the Techniques*, Photonics
18. A. Barth, (2007), *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetic*, ScienceDirect, 1073-1101.
19. V. K. Singh, A. K. Srivastava, (2020), *Physiological Role of Some Alkaloids*, eScientific.
20. S. Kumar, S. Malhotra, A. K. Prasad, E. V. Van der Eycken, M. E. Bracke, W. G. Stetler-Stevenson, V. S. Parmar, B. Ghosh, (2015), *Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Piper Species: A Perspective from Screening to Molecular Mechanisms*, NCBI, 886–893.
21. P. Chonpathompikunlert J. Wattanathorn, S. Muchimapura, (2010), *Food and Chemical Toxicology: Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer’s disease*, ScienceDirect, 798-802.
22. O. ElenaCarp, A. Moraru, M. Pinteala, A. Arvinte, (2021), *Food Chemistry: Electrochemical behaviour of piperine. Comparison with control antioxidants*, ScienceDirect.
23. J. Wattanathorn, P. Chonpathompikunlert, S. Muchimapura, A. Priprem, O. Tankamnerdthai , (2008), *Food and Chemical Toxicology: Piperine, the potential functional food for mood and cognitive disorders*, ScienceDirect, 3106-3110.
24. A. Thiengsusuk, P. Muhamad, W. Chaijaroenkul, K. Na-Bangchang, (2018), *Antimalarial Activity of Piperine*, Hindawi.
25. Z. Stojanović-Radić, M. Pejčić, M. Dimitrijević, A. Aleksić, N. V. Anil Kumar, B Salehi, W. C. Cho, J. Sharifi-Rad, (2019), *Piperine-A Major Principle of Black Pepper: A Review of Its Bioactivity and Studies*, Applied sciences.
26. J. Lunec, (1990), *Free radicals: their involvement in disease processes*, SAGE Journals, 173-182.
27. G. R. Buettner, S. W. Flanager, P. L. Moseley, (1998), *Increased flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia: detection by electron paramagnetic resonance spin trapping*, FEBS Letters, 285-286.
28. M. Meghwal, T. K. Goswami, (2013), *Piper nigrum and piperine: An update*, *Phytotherapy Research*, 1121-1130.
29. D. Banji, B. Bindu Madhavi, M. Naga Madhu, R. Ramalingam, A. Ravinder Nath, D. Swetha, (2009), *Extraction, identification, formulation and evaluation of piperine in alginate beads*, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 156-161.
30. P. Graidist, A. Khoka, S. Madla, S. Sriwieiyajan, A. Tadasen, (2019), *Anticancer effects of piperine-free Piper nigrum extract on cholangiocarcinoma cell lines*, *Pharmacognosy Magazine*, 26(2): 28-38.

31. P. Molyneux, (2004), The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, Songklanakarin J. Sci. Technol., 211-219.
32. Mravljak J., Pečar S., (2015), Šumi življenja ali radikali in druge reaktivne snovi v telesu, Slovensko farmacevtsko društvo, Fakulteta za farmacijo.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorjema asist. Mihi Slapničarju, prof. kem., biol. in asist. Mateju Vošnjaku, mag. inž. hort. za pomoč, usmerjanje in strokovno sodelovanje.

Zahvaljujem se prof. dr. Iztoku Devetaku za zanimanje in pomoč pri uresničitvi izvedbe raziskovalne naloge.

Raziskava je potekala v kemijskem laboratoriju v sklopu dejavnosti Centra KemikUm na Pedagoški fakulteti Univerze v Ljubljani. Raziskavo je podprl ERASMUS+ projekt 'Diversity in Science toward Social Inclusion – Non-formal Education in Science for Students` Diversity (DiSSI)' (612103-EPP-1-2019-1-DE-EPPKA3-IPI-SOC-IN), ki ga financira Evropska Unija. Vodja projekta za Slovenijo je prof. dr. Iztok Devetak.

Zahvaljujem se tudi svoji družini in vsem najbližjim, ki so me spodbujali in mi stali ob strani na celotni poti.

