

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Anže ROGELJ

**ANTIOKSIDANTI IN NJHOVA UČINKOVITOST V
RAZLIČNIH TKIVIH INVAZIVNIH TUJERODNIH
DRESNIKOV**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Anže ROGELJ

**ANTIOKSIDANTI IN NJIHOVA UČINKOVITOST V RAZLIČNIH
TKIVIH INVAZIVNIH TUJERODNIH DRESNIKOV**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**ANTIOXIDANTS AND THEIR EFFICIENCY IN DIFFERENT
TISSUES OF INVASIVE ALIEN KNOTWEED SPECIES**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija 2. bolonjske stopnje Strukturna in funkcionalna biologija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za biokemijo in kemijo živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani in v Laboratoriju za prehrabeno kemijo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Po sklepu Komisije za študij 1. in 2. stopnje oziroma Senata oddelka z dne 29. 01. 2014 je bila za mentorico magistrskega dela imenovana doc. dr. Lea Pogačnik, za somentorico dr. Irena Vovk in za recenzentko doc. dr. Jasna Dolenc Koce.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Matevž LIKAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Lea POGAČNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: dr. Irena VOVK
Kemijski inštitut, Laboratorij za prehrabeno kemijo

Članica: doc. dr. Jasna DOLENC KOCE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 16. september 2015

Podpisani izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Anže Rogelj

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 582:577(043.2)=163.6
KG	antioksidanti/antioksidativna učinkovitost/TLC/tkiva dresnikov
AV	ROGELJ, Anže, diplomirani biolog (UN)
SA	POGAČNIK, Lea (mentorica)/VOVK, Irena (somentorica)/DOLENC KOCE, Jasna (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij strukturne in funkcionalne biologije
LI	2015
IN	ANTIOKSIDANTI IN NJIHOVA UČINKOVITOST V RAZLIČNIH TKIVIH INVAZIVNIH TUJERODNIH DRESNIKOV
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP	XIV, 125 str., 12 pregl., 33 sl., 13 pril., 361 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V naši raziskavi smo preverjali vsebnost antioksidantov v ekstraktih različnih tkiv invazivnih tujerodnih dresnikov, prisotnih v Sloveniji. Zanimalo nas je, kako se med seboj razlikujejo japonski dresnik (<i>Fallopia japonica</i>), sahalinski dresnik (<i>Fallopia sachalinensis</i>) in njun križanec, češki dresnik (<i>Fallopia × bohemica</i>). Pripravili smo 48 % etanolne, <i>n</i> -butanolne in vodne ekstrakte različnih tkiv dresnikov in njihovo antioksidativno učinkovitost (AOU) preverili z dvema analiznima metodama, luminescenčno metodo in metodo ABTS. Najvišjo AOU smo izmerili v ekstraktih socvetij, najnižjo pa v ekstraktih stebel. Ugotovili smo, da je korelacijska povezanost obeh metod za merjenje AOU, ne glede na ekstrakcijsko topilo, visoka ($r = 0,70$). Kot najučinkovitejše topilo za ekstrakcijo antioksidantov se je izkazal 48 % etanol. Izmerjena AOU ekstraktov je odvisna od ekstrakcijskega topila, vrste tkiva, taksona dresnika in časa/sezone vzorčenja. V nadaljevanju smo s pomočjo tankoplastne kromatografije (TLC) naredili presejalne teste na vsebnost fenolnih spojin v ekstraktih in ugotovili, da je profil fenolnih spojin češkega dresnika bolj podoben japonskemu dresniku. Socvetja, listi in stebela imajo podoben, a kvantitativno različen fenolni profil. Največjo pestrost in količino fenolnih spojin smo dokazali v socvetjih in mladih listih. S pomočjo raztopin standardov smo v tkivih ugotovili prisotnost trans-resveratrola, klorogenske kisline, (+)-katehina in kvercetina. Korenika japonskega dresnika je, tudi glede na naše ugotovitve, najbogatejši vir resveratrola. Resveratrol je lahko prisoten tudi v nadzemnih delih dresnikov. Nadzemni in podzemni deli vseh treh taksonov dresnikov imajo pester nabor in količino antioksidantov, zato bi v prihodnosti lahko predstavljali nov in poceni vir rastlinskih sekundarnih metabolitov – naravnih antioksidantov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 582:577(043.2)=163.6
CX antioxidants/antioxidative capacity/TLC/tissues of knotweeds
AU ROGELJ, Anže
AA POGAČNIK, Lea (supervisor)/VOVK, Irena (co-advisor)/DOLENC KOCE, Jasna (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study Programmes in Structural and Functional Biology
PY 2015
TI ANTIOXIDANTS AND THEIR EFFICIENCY IN DIFFERENT TISSUES OF INVASIVE ALIEN KNOTWEED SPECIES
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO XIV, 125 p., 12 tab., 33 fig., 13 ann., 361 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The aim of our study was to determine the content of antioxidants in tissue extracts of different invasive alien knotweed species present in Slovenia. The main interest was to discover differences between Japanese knotweed (*Fallopia japonica*), Giant knotweed (*Fallopia sachalinensis*) and their interspecific hybrid – Bohemian knotweed (*Fallopia × bohemica*). Preparations of 48 % ethanol, *n*-butanol and water extracts were tested with two different analytical methods, the chemiluminescence and ABTS assay, to determinate antioxidant capacity (AOC). The highest AOC was observed in flowers, while the stalks had the lowest AOC. Correlation between chemiluminescence and ABTS assay was high, with the Pearson correlation coefficient (*r*) being 0.70. The level of correlation was independent of the solvent used for extraction. The most potent antioxidants were extracted by 48 % ethanol. Extraction solvent, plant tissue, plant taxon and the harvest season contributed to differences in AOC. Using thin-layer chromatography (TLC), phenolic screenings of extracts were made and showed that the composition of phenols in Bohemian knotweed is closer to Japanese knotweed. Flowers, leaves and stalks had similar, but quantitatively different phenolic profiles. We have demonstrated the biggest amount and variation of phenols in flowers and young leaves. The presence of trans-resveratrol, chlorogenic acid, (+)-catechin and quercetin was confirmed by using standard compounds. The rhizomes of Japanese knotweed were the main source of trans-resveratrol, but we were able to find them in the above-ground parts of knotweeds as well. The results indicate that above and below-ground parts of different knotweed taxons could be a new and inexpensive source of secondary plant metabolites – natural antioxidants, in the future.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN DELA IN RAZISKOVALNI CILJI.....	2
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 DRESNIKI (ROD <i>FALLOPIA</i> SECT. <i>REYNOUTRIA</i>)	4
2.1.1 Taksonomija in botanični opis.....	4
2.1.2 Izvor in širjenje	6
2.1.3 Prisotnost dresnikov v Sloveniji	7
2.1.4 Ekološke značilnosti	8
2.1.5 Uporaba dresnikov v medicini in prehrani	9
2.2 ANTIOKSIDANTI IN PROSTI RADIKALI.....	11
2.2.1 Prosti radikali.....	11
2.2.2 Splošno o antioksidantih	15
2.2.3 Različne delitve antioksidantov	15
2.2.4 Fenolne spojine	16
2.2.4.1 Flavonoidi	18
2.2.4.2 Fenolne kisline.....	19
2.2.4.3 Stilbeni.....	20
2.2.4.3.1 Resveratrol.....	21
2.2.5 Ostali antioksidanti.....	23
2.2.6 Prooksidativno delovanje antioksidantov	24
2.2.7 Vnos fenolnih spojin v telo in vpliv na zdravje	25
2.3 POMEN ANTIOKSIDANTOV ZA RASTLINE.....	26
2.3.1 Sezonske spremembe v vsebnosti antioksidantov v rastlinah.....	27
2.4 RASTLINE KOT VIR ANTIOKSIDANTOV	27
2.4.1 Prisotnost antioksidantov v različnih tkivih dresnikov.....	27

2.5	SPLOŠEN PREGLED UPORABLJENIH RAZISKOVALNIH METOD	29
2.5.1	Določanje celotne antioksidativne učinkovitosti (AOU)	29
2.5.1.1	Metoda ABTS	31
2.5.1.2	Luminescenčna metoda	32
2.5.2	Tankoplastna kromatografija (TLC).....	33
2.6	SPLOŠEN PREGLED UPORABLJENIH EKSTRAKCIJSKIH TOPIL	36
3	MATERIAL IN METODE	38
3.1	RASTLINSKI MATERIAL	38
3.2	KEMIKALIJE.....	40
3.3	APARATURE	41
3.4	DRUGI MATERIAL IN PRIPOMOČKI	41
3.5	PRIPRAVA VZORCEV IN EKSTRAKTOV	41
3.5.1	Ekstrakti	44
3.6	DOLOČANJE VSEBNOSTI VODE V TKIVIH	45
3.7	DOLOČANJE AOU Z METODO ABTS	46
3.7.1	Priprava umeritvene krivulje za metodo ABTS	47
3.8	DOLOČANJE AOU Z LUMINESCENČNO METODO	49
3.8.1	Priprava umeritvene krivulje za luminescenčno metodo.....	51
3.9	TROLOKS (VODOTOPNI ANALOG VITAMINA E)	52
3.10	PRIPRAVA TESTNIH RAZTOPIN ZA ANALIZE S TLC.....	53
3.11	PRVI PRESEJALNI TESTI S TLC	53
3.12	UPORABA STANDARDOV FENOLNIH SPOJIN PRI TLC.....	54
3.13	ANALIZA IN VREDNOTENJE REZULTATOV	56
3.13.1	Rezultati meritev AOU.....	56
3.13.2	Rezultati kromatografske analize	57
4	REZULTATI.....	58
4.1	VSEBNOST VODE V TKIVIH DRESNIKOV.....	58
4.2	REZULTATI DOLOČANJA ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI (AOU) TKIV DRESNIKOV	59
4.2.1	Primerjava vrednosti AOU med različnimi tkivi in ekstrakcijskimi topili.....	59
4.2.1.1	Primerjava AOU med različnimi tkivi.....	64
4.2.1.2	Primerjava AOU pri uporabi različnih ekstrakcijskih topil.....	65
4.2.2	Primerjava AOU med ekstrakti prvega in drugega vzorčenja	66
4.2.3	Primerjava AOU med taksoni dresnikov	67
4.3	KORELACIJE	68
4.3.1	Korelacija med luminescenčno metodo in metodo ABTS.....	68
4.3.2	Korelacija med luminescenčno metodo in metodo ABTS v odvisnosti od ekstrakcijskega topila	69
4.4	PRVI PRESEJALNI TESTI S TLC	71
4.5	REZULTATI UPORABE STANDARDOV FENOLNIH SPOJIN PRI TLC ..	77
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	81

5.1	RAZPRAVA.....	81
5.1.1	Delež vode v tkivih dresnikov	81
5.1.2	Primerjava AOU med različnimi tkivi, ekstrakcijskimi topili in taksoni dresnikov.....	82
5.1.2.1	Razlike v AOU med različnimi tkivi dresnikov	83
5.1.2.2	Razlike v AOU med mladimi in starimi listi	84
5.1.2.3	Razlike v AOU med ekstrakcijskimi topili.....	84
5.1.3	Razlike v AOU med prvim in drugim vzorčenjem	86
5.1.4	Razlike v AOU med taksoni dresnikov	87
5.1.5	Korelacija med luminescenčno metodo in metodo ABTS.....	88
5.1.6	Prvi presejalni testi s TLC	89
5.1.7	Uporaba standardov fenolnih spojin pri TLC	91
5.2	PREDLOGI ZA NADALJNJE RAZISKAVE	93
5.3	SKLEPI.....	94
6	POVZETEK	96
7	VIRI	98

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Pregl. 1: Oznake pripravljenih rastlinskih ekstraktov	44
Pregl. 2: Reagenti in njihovi volumni, uporabljeni pri pripravi umeritvene krivulje za vodne in etanolne ekstrakte pri metodi ABTS.....	48
Pregl. 3: Reagenti in njihovi volumni, uporabljeni pri pripravi umeritvene krivulje za butanolne ekstrakte pri metodi ABTS	48
Pregl. 4: Reagenti in njihovi volumni, uporabljeni pri pripravi umeritvene krivulje za vodne in etanolne ekstrakte pri luminescenčni metodi.....	51
Pregl. 5: Reagenti in njihovi volumni, uporabljeni pri pripravi umeritvene krivulje za butanolne ekstrakte pri luminescenčni metodi	52
Pregl. 6: Volumni (V) nanosov testnih raztopin vzorcev in standardov ter mase nanesenih standardov na ploščo (m).....	55
Pregl. 7: Rezultati faktorjske analize variance glede vsebnosti vode v tkivih dresnikov pri različnih taksonih (Sl. a) in časih vzorčenja (Sl. b).....	59
Pregl. 8: Rezultati faktorjske analize variance za AOU ekstraktov prvega vzorčenja pri japonskem (a), češkem (b) in sahalinskem (c) dresniku.....	63
Pregl. 9: Rezultati faktorjske analize variance za AOU ekstraktov drugega vzorčenja pri japonskem (a), češkem (b) in sahalinskem (c) dresniku.....	64
Pregl. 10: Statistično značilne razlike v AOU med tkivi dresnikov, izračunane neodvisno od uporabljenega ekstrakcijskega topila	65
Pregl. 11: Statistično značilne razlike v AOU v odvisnosti od uporabljenega ekstrakcijskega topila (vzorčenje 1, N = 4; vzorčenje 2, N = 5)	65
Pregl. 12: Retencijski faktorji (R_F) standardov fenolnih spojin in prisotnost spojin v različnih tkivih dresnikov	79

KAZALO SLIK

	str.
Sl. 1: Socvetje, oblika listne ploskve in listnega dna pri posameznem taksonu dresnikov	6
Sl. 2: Prikaz homeostaze med reaktivnimi kisikovimi spojinami (ROS) in antioksidanti (AO)	14
Sl. 3: Osnovna delitev fenolnih spojin in flavonoidov ter najbolj znani predstavniki flavonoidov in stilbenov.....	17
Sl. 4: Kemijska zgradba različnih flavonoidov, ki so razdeljeni v 6 osnovnih skupin .	19
Sl. 5: Osnovna delitev fenolnih kislin in njihovi glavni predstavniki.....	20
Sl. 6: Potencialni mehanizem delovanja polifenolov pri preprečevanju razvoja rakavega obolenja	25
Sl. 7: Kemijska struktura glavnih antioksidantov v dresnikih: stilbeni in antrakinoni .	28
Sl. 8: Shematski prikaz ločbe s tankoplastno kromatografijo	34
Sl. 9: Sestoji dresnikov na vzorčnih lokacijah	38
Sl. 10: Nabrana tkiva češkega dresnika iz katerih smo pripravili različne ekstrakte	39
Sl. 11: Prikaz postopkov dela v naši raziskavi	42
Sl. 12: Priprava nabranega rastlinskega materiala za ekstrakcijo	43
Sl. 13: Ekstrakti različnih tkiv češkega dresnika, pridobljeni z različnimi ekstrakcijskimi topili	45
Sl. 14: Spektrofotometer, s katerim smo merili absorbanco reakcijske mešanice (a) ter prikaz molekule ABTS in njenega oksidacijskega produkta (b).....	47
Sl. 15: Fluorimeter, s katerim smo merili kemiluminescenco (a) in osnoven potek reakcij oksidacije luminola (b).....	50

Sl. 16:	Molekula vitamina E (alfa tokoferola) in njegov vodotopni analog – troloks	53
Sl. 17:	Polavtomatski nanašalec (Slika a), kromatografska plošča z nanesenimi testnimi raztopinami (Slika b) in razvijanje kromatografske plošče v kadi s prekatom (Slika c).....	54
Sl. 18:	Delež vode v različnih tkivih dresnikov	58
Sl. 19:	AOU ekstraktov različnih tkiv japonskega dresnika prvega (a) in drugega vzorčenja (b) (povprečje \pm SN, N = 4)	60
Sl. 20:	AOU ekstraktov različnih tkiv češkega dresnika prvega (a) in drugega vzorčenja (b) (povprečje \pm SN, N = 4).....	61
Sl. 21:	AOU ekstraktov različnih tkiv sahalinskega dresnika prvega (a) in drugega vzorčenja (b) (povprečje \pm SN, N = 4)	62
Sl. 22:	AOU vodnih ekstraktov prvega in drugega vzorčenja pri japonskem (a), češkem (b) in sahalinskem (c) dresniku (povprečje \pm SN; N = 4).....	66
Sl. 23:	AOU butanolnih ekstraktov prvega in drugega vzorčenja pri japonskem (a), češkem (b) in sahalinskem (c) dresniku (povprečje \pm SN; N = 4).....	67
Sl. 24:	AOU etanolnih ekstraktov prvega in drugega vzorčenja pri japonskem (a), češkem (b) in sahalinskem (c) dresniku (povprečje \pm SN; N = 4).....	67
Sl. 25:	AOU etanolnih ekstraktov tkiv različnih taksonov dresnikov drugega vzorčenja (povprečje \pm SN; N = 4).....	68
Sl. 26:	Povezava med AOU izmerjeno z luminescenčno metodo in metodo ABTS	69
Sl. 27:	Povezava med AOU izmerjeno z luminescenčno metodo in metodo ABTS v odvisnosti od vodnega (a), butanolnega (b) in etanolnega (c) ekstrakcijskega topila. Vrednosti so prikazane na logaritmski skali. Slika d prikazuje korelacijske koeficiente (r) in njihove intervale zaupanja (0,95 CI) pri različnih ekstrakcijskih topilih	70
Sl. 28:	Kromatografske plošče HPTLC silikagel 60 (20 cm \times 10 cm) z nanesenimi etanolnimi (a), vodnimi (b) in butanolnimi (c) testnimi raztopinami drugega vzorčenja. Plošče so bile razvite v topilu etil acetat-voda-mravljinčna kislina (85 : 15 : 10, v/v/v) in po derivatizaciji z reagentom NST posnete pri 366 nm..	73

- Sl. 29: Kromatografski plošči HPTLC silikagel 60 (20 cm × 10 cm) z nanesenimi etanolnimi (a) in butanolnimi (b) testnimi raztopinami prvega vzorčenja. Plošči sta bili razviti v topilu etil acetat-voda-mravljinčna kislina (85 : 15 : 10, v/v/v) in po derivatizaciji z reagentom NST posneti pri 366 nm 74
- Sl. 30: Kromatografske plošče HPTLC silikagel 60 (20 cm × 10 cm) z nanesenimi etanolnimi (a), vodnimi (b) in butanolnimi (c) testnimi raztopinami drugega vzorčenja. Plošče so bile razvite v topilu *n*-heksan-etil acetat-mravljinčna kislina (20 : 19 : 1, v/v/v) in po derivatizaciji z reagentom NST posnete pri 366 nm.... 76
- Sl. 31: Kromatografska plošča HPTLC silikagel 60 (20 cm × 10 cm) z nanesenimi butanolnimi testnimi raztopinami drugega vzorčenja. Plošča je bila razvita v topilu *n*-heksan-etil acetat-mravljinčna kislina (20 : 19 : 1, v/v/v) in po derivatizaciji z reagentom NST posneta pri uporabi bele svetlobe..... 77
- Sl. 32: Kromatografska plošča HPTLC silikagel 60 (20 cm × 10 cm), razvita v topilu toluen-etil acetat-mravljinčna kislina (6 : 5 : 1, v/v/v), slikana pri 366 nm, pred (a) in po (b) derivatizaciji z anisaldehydним derivatizacijskim reagentom. Nanosi (10 µL) 1–5 in 12–16: testne raztopine drugega vzorčenja, nanosi 6–11: trans-resveratrol (T-RVT, 0,5 µg), (+)-katehin (C, 1 µg), klorogenska kislina (CHA, 0,8 µg), rutin (RUT, 1,5 µg), kvercetin (QE, 0,8 µg), ferulna kislina (FA, 0,5 µg), *p*-kumarna kislina (pCA, 2 µg) in kavna kislina (CA, 0,8 µg)..... 78
- Sl. 33: Kromatografska plošča HPTLC silikagel 60 (20 cm × 10 cm), razvita v topilu toluen-etil acetat-mravljinčna kislina (6 : 5 : 1, v/v/v), slikana pri uporabi bele svetlobe, po derivatizaciji z anisaldehydним derivatizacijskim reagentom. Nanosi (10 µL) 1–5 in 12–16: testne raztopine drugega vzorčenja, nanosi 6–11: trans-resveratrol (T-RVT, 0,5 µg), (+)-katehin (C, 1 µg), klorogenska kislina (CHA, 0,8 µg), rutin (RUT, 1,5 µg), kvercetin (QE, 0,8 µg), ferulna kislina (FA, 0,5 µg), *p*-kumarna kislina (pCA, 2 µg) in kavna kislina (CA, 0,8 µg)..... 79

KAZALO PRILOG

- PRIL. A1: Ortofoto slika Slovenije in prikazane lokacije vzorčenja
- PRIL. A2: Opis lokacij vzorčenja dresnikov
- PRIL. B: Z metodo ABTS izmerjene absorbance za pripravo umeritvenih krivulj in umeritveni krivulji za pripravljene ekstrakte
- PRIL. C: Z luminescenčno metodo izmerjeni časovni zamiki za pripravo umeritvenih krivulj in umeritveni krivulji za pripravljene ekstrakte
- PRIL. D: Prikaz postopnega izračuna AOU
- PRIL. E1: Podatki, ki smo jih uporabili pri analizi korelacijske povezanosti med obema metodama za merjenje AOU in ostali podatki potrebni za izračun AOU
- PRIL. E2: Združeni podatki obeh metod za merjenje AOU, ki smo jih uporabili pri statističnih analizah
- PRIL. F: Podatki o deležu vode v različnih tkivih dresnikov
- PRIL. G: Primerjava AOU ekstraktov prvega in drugega vzorčenja
- PRIL. H: Vpliv rastlinskega tkiva in uporabljenega ekstrakcijskega topila na izmerjeno AOU ekstraktov prvega vzorčenja
- PRIL. I: Vpliv rastlinskega tkiva in uporabljenega ekstrakcijskega topila na izmerjeno AOU ekstraktov drugega vzorčenja
- PRIL. J: Primerjava vrednosti AOU med različnimi taksoni dresnikov
- PRIL. K: Izračuni korelacij med luminescenčno metodo in metodo ABTS

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca
ABTS	2,2'-azobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina)
ANOVA	analiza variance (ang. analysis of variance)
AO	antioksidativna obramba
AOU/AOC	antioksidativna učinkovitost/kapacitivnost (ang. AntiOxidant Capacity)
ATP	adenozin trifosfat, energijsko bogata molekula v celicah
a. e.	arbitrarne enote (ang. arbitrary units)
DNK	deoksiribonukleinska kislina (ang. DeoxyriboNucleic Acid)
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal
ET	metoda prenosa elektronov (ang. Electron Transfer method)
FRAP	antioksidativna sposobnost redukcije železa (ang. Ferric Reducing Antioxidant Power)
GAE	ekvivalenti galne kisline (ang. Gallic Acid Equivalents)
HAT	metoda prenosa vodika (ang. Hydrogen Atom Transfer method)
HEPES	puferska raztopina 4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etansulfonske kisline
herbarij LJU	herbarij Univerze v Ljubljani
HRP	hrenova peroksidaza, encim (ang. HorseRadish Peroxidase)
LDL	lipoproteini nizke gostote (ang. Low Density Lipoproteins)
m.s.	sveža snov, svež rastlinski material

NST	naturstoff reagent A
ORAC	učinkovitost lovljenja prostih kisikovih radikalov (ang. Oxygen Radical Absorbance Capacity)
R _F	retencijski/zadrževalni faktor
ROS	reaktivne kisikove spojine (ang. Reactive Oxygen Species)
s.s.	suha snov, dehidriran rastlinski material
TE	ekvivalenti troloksa (ang. Trolox Equivalents)
TEAC	troloksu ekvivalentna antioksidativna učinkovitost (ang. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)
TRAP	parameter celokupne sposobnosti lovljenja radikalov (ang. Total Radical-Trapping antioxidant Parameter)
troloks	6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kislina (sintetični analog vitamina E)
UV	ultravijolično valovanje (ang. UltraViolet light)

1 UVOD

Uživanje raznovrstne hrane je pomembno z vidika zagotavljanja telesu nujno potrebnih hranil. Pri zagotavljanju optimalnega zdravja imajo v človekovi prehrani pomembno vlogo tudi antioksidanti, ki omogočajo, da se organizem uspešno brani pred oksidativnim stresom, onesnaženim okoljem in ostalimi strupenimi snovmi (Pandey in Rizvi, 2009).

Rastlinska hrana nam zagotavlja veliko bioaktivnih snovi, ki delujejo samostojno in sinergijsko ter preprečujejo razvoj kroničnih in z oksidativnim stresom povezanih bolezni. Bioaktivne molekule rastlin se imenujejo fitokemikalije, med katerimi prevladujejo antioksidanti. Antioksidanti zmanjšujejo število prostih radikalov v telesu, poleg tega pa zmanjšujejo tudi količino ostalih reaktivnih spojin. Domneva se, da antioksidanti na organizem delujejo pozitivno zaradi antioksidativne aktivnosti, poleg tega pa delujejo tudi preko ostalih mehanizmov, ki omogočajo obnavljanje celic in popravilo poškodovane DNK (Carlsen in sod. 2010).

Človek že od nekdaj želi odkriti čudežni pripravek, ki bi ohranjal večno mladost. Staranja še ne znamo preprečiti, kljub temu je na voljo veliko informacij o tem, kako upočasniti degenerativne procese, ki se dogajajo v našem telesu. Pomemben del pri tem ima zdrava, uravnotežena prehrana, ki zagotavlja telesu dovolj hranilnih in zaščitnih snovi. Vse bolj se priporoča uživanje različnih prehranskih dopolnil, ki temeljijo na osnovi rastlinskih izvlečkov in delujejo antioksidativno (Bjelakovic in sod., 2014; Woo in Tang, 2004).

Invazivni tujerodni dresniki predstavljajo velik ekološki problem, saj lahko zaradi svojega hitrega širjenja in prilagodljivosti močno spremenijo biodiverzitetu nekega območja. Na sposobnost rastlin za invazijo nekega področja močno vpliva njihova prilagodljivost, regeneracijska sposobnost in odpornost. K vsem naštetim lastnostim prispevajo tudi različne snovi, sekundarni metaboliti, ki jih rastline vsebujejo in/ali izločajo v okolico (Fan in sod., 2010; Hammerschmidt, 1999; Lattanzio in sod., 2006).

V Sloveniji uspevajo trije taksoni dresnikov – japonski dresnik (*Fallopia japonica*), sahalinski dresnik (*Fallopia sachalinensis*) in češki dresnik (*Fallopia × bohemica*), križanec omenjenih dveh vrst (Strgulc Krajšek in Jogan, 2011). Vsi trije taksoni se med seboj razlikujejo v stopnji invazivnosti. O invazivnih tujerodnih dresnikih se pogosto govori le kot o izvoru okoljskih in družbenih težav, vendar imajo te rastline na nekaterih delih sveta pomembno vlogo pri ohranjanju človekovega zdravja in so celo vključene v vsakodnevno prehrano ljudi (Kirino in sod., 2012; Nice, 2007).

Na invazivnih tujerodnih dresnikih so bile že narejene številne raziskave tako na ekološkem področju, v povezavi z njihovo invazivnostjo, kot tudi na področju

farmacevtike in uporabe teh rastlin za izolacijo različnih koristnih snovi, predvsem tistih z antioksidativno aktivnostjo (Peng, 2013; Weston, 2005).

Resveratrol, ena glavnih in tudi komercialno zanimivih aktivnih snovi japonskega dresnika, ima antioksidativno delovanje. Pri večini modelnih organizmov vpliva na dolgoživost in procese staranja. V prehranskih dopolnilih, kozmetični industriji in medicini se pogosto uporablja resveratrol, ki je izoliran iz korenike japonskega dresnika (Baur in sod., 2006; Wang in sod., 2013; Wood in sod., 2004).

Uporaba dresnikov je znana v azijski tradicionalni medicini za zdravljenje različnih obolenj. Nekateri deli sveta jih uživajo kot mlado divjjo zelenjavo, pripravke iz korenin pa pijejo v obliki zdravilnega čaja Itadori (Kirino in sod., 2012; Matsuda in sod., 2001; Nice, 2007; Strgulc Krajšek in Jogan, 2011).

Glede na to, da so dresniki zelo odporne, hitro rastoče rastline, ki v večini primerov povzročajo le težave v sodobni družbi, bi bilo zanimivo odkriti tudi širšo korist teh rastlin za človeka (Vrchotová in sod., 2010). Analiza antioksidantov in antioksidativne učinkovitosti (AOU) različnih tkiv dresnikov je zato zanimiva tematika, ki lahko spremeni pogled sodobne družbe na te rastline, hkrati pa pripomore k oblikovanju uspešnejše strategije pri omejevanju njihovega širjenja. To so bili tudi glavni razlogi, ki so prispevali k motivu za oblikovanje in uspešno izvedbo naše raziskave.

1.1 NAMEN DELA IN RAZISKOVALNI CILJI

Namen raziskave je ugotoviti antioksidativno učinkovitost (AOU) in vsebnost posameznih antioksidantov v različnih tkivih (organih) dresnikov – mladi listi, stari listi, stebela, korenike in socvetja. Analize smo opravili pri vseh treh taksonih dresnikov (japonski, sahalinski in češki dresnik), ki rastejo v Sloveniji. Ekstrakte za analizo smo pripravili iz liofiliziranega rastlinskega tkiva in z uporabo treh različnih ekstrakcijskih topil z različno polarnostjo. Analize treh različnih taksonov dresnikov, petih različnih tkiv in uporaba treh različnih ekstrakcijskih topil nam omogočajo dober vpogled v vsebnost in pestrost antioksidantov pri dresnikih.

Naši rezultati nam bodo lahko pomagali spoznati novo uporabno vrednost teh rastlin kot novega vira prehranskih antioksidantov, vir antioksidantov uporabnih v prehranskih dopolnilih, ali pa bodo v pomoč pri nadaljnjih raziskavah invazivnosti teh rastlin.

V naši raziskavi smo si zastavili sledeče cilje:

1. Z uporabo dveh metod za merjenje antioksidativne učinkovitosti (AOU), luminescenčno metodo in metodo ABTS (2,2'-azobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina)), izmeriti AOU ekstraktov mladih listov, starih listov, stebel, socvetij in korenik japonskega, češkega in sahalinskega dresnika.
2. Ugotoviti, ali imajo mladi listi v primerjavi s starimi listi višjo AOU, in kako se razlikuje AOU pri ostalih tkivih – rastlinskih organih (stebela, korenike in socvetja).
3. Ugotoviti, katero ekstrakcijsko topilo – 48 % etanol, butanol ali voda – je najbolj učinkovito za ekstrakcijo antioksidantov iz različnih tkiv.
4. Ugotoviti razlike v AOU pri prvem in drugem vzorčenju vseh treh taksonov dresnikov.
5. Ugotoviti povezanost med rezultati luminescenčne metode in metode ABTS.
6. S tankoplastno kromatografijo (TLC) ugotoviti pestrost fenolnih spojin in ostalih antioksidantov, ki jih vsebujejo različna tkiva dresnikov.
7. Ugotoviti, ali je korenika japonskega dresnika glavni vir resveratrola, saj ravno iz nje najpogosteje izolirajo resveratrol za uporabo v prehranskih dopolnilih. Ugotoviti, ali je resveratrol prisoten tudi v ostalih tkivih dresnikov.
8. Ugotoviti, kateri del rastline – mladi listi, stari listi, steblo, socvetje ali korenika – vsebuje največji delež vode.

2 PREGLED OBJAV

2.1 DRESNIKI (ROD *FALLOPIA* SECT. *REYNOUTRIA*)

2.1.1 Taksonomija in botanični opis

Dresniki (rod *Fallopia* sect. *Reynoutria*) spadajo v družino dresnovk (*Polygonaceae*), kamor uvrščamo tudi ajdo in rabarbaro (Mabberley, 1997: 858). Sekcija *Reynoutria* je večinoma obravnavana znotraj rodu *Fallopia*, nekateri avtorji pa jo obravnavajo kot samostojen rod (Strgar 1981; Strgar, 1982).

Rod *Fallopia* glede na molekularne analize in morfologijo delimo v tri sekcije: *Reynoutria* (dresniki), *Fallopia* (slakovci) in *Sermentosae* (slakovci) (Bailey in sod., 2009). K prepoznavnosti dresnikov v javnosti je zaradi svoje invazivnosti in nekontroliranega širjenja najbolj prispeval japonski dresnik.

V Evropi so prisotni štirje taksoni, ki vključujejo dve varieteti japonskega dresnika (*F. japonica* (Houtt.) Ronse Decr. var. *japonica* in var. *compacta* (Hook. f.) J. P. Bailey)), sahalinski dresnik (*F. sachalinensis* (F. Schmidt Petrop.) RonseDecr.) in češki dresnik (*F. × bohemica* (Chrtek et Chrtková) J. P. Bailey), križanec med prej omenjenima vrstama (Suda in sod., 2010). Tipska varieteta japonskega dresnika *japonica* je v Evropi bolj razširjena, visokogorska varieteta *compacta* pa je redkejša in prisotna le v severozahodni ter osrednji Evropi (Bailey in sod., 2009). V magistrskem delu se bo izraz japonski dresnik vedno nanašal na tipsko varieteto *japonica*, ki je bila doslej edina opažena na slovenskem ozemlju (Strgulc Krajšek in Jogan, 2011).

Japonski, češki in sahalinski dresnik spadajo med invazivne tujerodne vrste. V novem okolju so se rastline ohranile, njihova populacija pa se širi in ogroža ekosisteme ter lokalno biodiverziteteto. Tujerodne vrste so tiste vrste, podvrste ali taksoni, ki so bili s pomočjo človeka prenesene v okolje, kjer prej niso bile naravno prisotne (Richardson in sod., 2000). Vse štiri taksoni dresnikov, ki so prisotni v Evropi uvrščamo tudi med neofite, saj so bili na novo območje naseljeni po letu 1492 (Schroeder, 2000).

Dresnike je mogoče med seboj ločiti na osnovi morfoloških razlik, z analizo dednega materiala, tako imenovanimi (t. i.) DNK-prstnimi odtisi (angl. DNK-fingerprinti) in tudi z analizo metabolitov v različnih tkivih, s t. i. TLC-prstnimi odtisi (angl. TLC-fingerprinti). Kim in sod. (2000) so dokazali, da je ločevanje med predstavniki sekcije *Fallopia* iz rodu *Fallopia* mogoče s pomočjo TLC in določanja flavonoidov v listih (Bailey in sod., 1996; Kim in sod., 2000; Suda in sod., 2010).

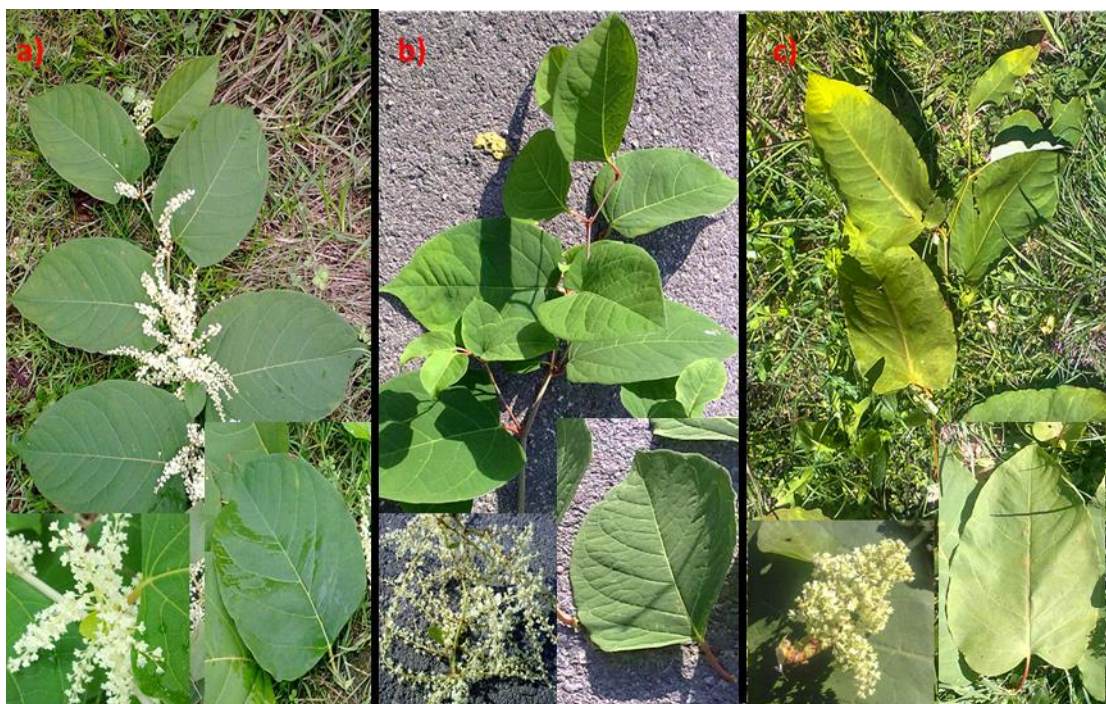
Dresniki so grmasto razrasle zelnate trajnice s kolenčasto členjenim stebлом. Steblo je votlo in spominja na bambus. Pogosto je rdečkasto, rdeče barve so tudi mladi poganjki s prvimi razvitimi listi. Nadzemni deli rastlin pozimi odmrejo, preživijo pa podzemni obsežni prepleti korenin, ki se v tleh razširjajo tako vertikalno kot horizontalno. Posledično rastline tvorijo goste sestoje in preprečujejo rast ostalim rastlinam (Frajman, 2008; Hagemann, 1995). Dokazana je tudi alelopatska aktivnost, pri kateri z izločanjem snovi v okolico povzročajo škodo bližnje rastočim rastlinam in tako delujejo fitotoksično (Moravcová in sod., 2011; Murrell in sod., 2011). Celorobi listi so na stebela, ki imajo pri japonskem in češkem dresniku cik-cak videz, pri sahalinskem pa so ravna, premenjalno nameščeni. Kot večina tujerodnih rastlin tudi dresniki v Evropi cvetijo ob koncu poletja, konec julija in v septembru. Rastline tvorijo drobne cvetove, združene v latasta socvetja. Plod je trikotne oblike, črno obarvan, botanično pa ga uvrščamo med oreške (Frajman, 2008).

Latinska imena, s katerimi poimenujemo predstavnike dresnikov (sekcija *Reynoutria*) so: *Reynoutria*, *Fallopia* in *Polygonum* (Prather in sod., 2009). Japonski dresnik zato lahko najdemo pod imeni: *Reynoutria japonica*, *Fallopia japonica* ali *Polygonum cuspidatum*.

Japonski dresnik zraste do dveh metrov visoko. Listi so dolgi od 6 do 15 cm, listna baza je presekana (Fuentes in sod., 2011). Listi so široko jajčasti in približno enako široki kot dolgi. Abaksialna površina listov je skoraj neporasla s papilami, enoceličnimi izboklinami, ki so kratke in komaj opazne. Rob lista ni porasel z laski (Prather in sod., 2009). V Evropi so prisotni le ženski predstavniki japonskega dresnika, zato imajo vsi cvetovi sterilne prašnike (Bailey in sod., 2009). Podzemni prepleti korenin tvorijo veliko biomaso in na en hektar tal dosežejo 14 ton (Bailey, 1994).

Sahalinski dresnik se od japonskega najbolj razlikuje po višji rasti, saj rastlina doseže celo štiri metre. Njegovi listi so dolgi od 15 do 40 cm, njihova širina pa je dvakrat manjša. Dno lista je oblikovano srčasto. Abaksialna površina listov in žile na listih so porasle z večceličnimi laski, ki so dolgi okrog 0,6 mm. Rob lista ima opazne laske (Frajman, 2008; Fuentes in sod., 2011; Prather in sod., 2009). V Evropi so prisotne le rastline z ženskimi ali dvospolnimi cvetovi (Bailey in sod., 2009).

Križanec med zgoraj navedenima vrstama, češki dresnik, je po velikosti malo višji od japonskega dresnika. Njegovi listi imajo rahlo srčasto oblikovano dno. Rastlina je po videzu bolj podobna japonskemu dresniku, dolžina njenih listov pa je malo večja od širine (Sl. 1). Abaksialna površina, žile in robovi listov so porasli s kratkimi nekajceličnimi laski, ki so podobni tistim pri japonskem dresniku (Frajman, 2008). Večina cvetov je moških. Znotraj socvetij so prisotni tudi posamični dvospolni cvetovi (Bailey in sod., 2009; Prather in sod., 2009).



Slika 1: Socvetje, oblika listne ploskve in listnega dna pri posameznem taksonu dresnikov. Japonski dresnik (a), češki dresnik (b) in sahalinski dresnik (c)

Morfološka znaka, ki nam lahko pomagata razločevati med dresniki, sta tudi hrapavost in debelina listne ploskve. Japonski dresnik ima tanjšo in gladko listno ploškev, sahalinski debelejšo in hrapavo. Češki dresnik ima kombinacijo lastnosti obeh starševskih rastlin (Strgulc Krajšek in Jogan, 2011).

V preteklosti se je, zaradi morfološke podobnosti, češki dresnik pogosto zamenjevalo z japonskim, v nekaterih primerih tudi s sahalinskim dresnikom. Razširjenost češkega dresnika je zato verjetno podcenjena. Lokalitete, na katerih je določeno, da uspeva japonski dresnik, morda predstavljajo rastišča češkega dresnika. Strgulc Krajšek in Jogan (2011) zato omenjata, da bi bil v Sloveniji potreben ponovni popis razširjenosti obeh taksonov (Bailey in sod., 1996; Strgulc Krajšek in Jogan, 2011).

2.1.2 Izvor in širjenje

Naravna razširjenost japonskega dresnika obsega Japonsko, Kitajsko, Korejo in Tajvan (Mangold in Parkinson, 2010). V Evropo je bil prinesen v prvi polovici 19. stoletja, natančneje leta 1840. Nato je bil s pomočjo Philipa Franza von Siebolda in njegovega hortikulturnega podjetja iz Nizozemske prenesen v druge vrtove po Evropi. V Evropo so bile prinesene le ženske rastline. Molekularne analize so pokazale, da so vse rastline v

Evropi kloni ene materinske rastline (Bailey, 1994). Kljub temu japonski dresnik v Evropi tvori kaljivo seme, saj se cvetovi lahko oprašijo s pelodom sahalinskega dresnika. Križanec, ki pri tem nastane, je češki dresnik in je bolj invaziven kot starševski rastlini (Bailey in sod., 2009; Sołtysiak in Brej, 2014). Prvič je bil opisan ravno v Evropi, in sicer leta 1983 v mestu Nachod, severovzhodnem delu Bohemije na Češkem (Chrtok in Chrtkova, 1983). V Angliji je bil sicer opažen že 11 let prej (Bailey in Conolly, 2000).

Sahalinski dresnik prav tako kot japonski izvira iz vzhodne Azije, in sicer severnega dela otoka Sahalina, južnega dela Kurilskih otokov, japonskega otoka Hokaido in korejskega otoka Honšu (Sukopp in Starfinger, 1995). V Evropo je bil prinesen 1855, ko je bil iz otoka Sahalin prenesen v sanktpeterburški botanični vrt. Od tam je bil kot okrasna rastlina prenesen v druge botanične vrtove po Evropi (Bailey in Conolly, 2000).

Invazivni tujerodni dresniki so danes široko razširjeni in prisotni po vsej Evropi, Severni Ameriki, pojavljajo se tudi v Avstraliji in na Novi Zelandiji (Beerling in sod., 1994). Japonski dresnik je zaradi svojega razraščanja uvrščen med 100 najbolj invazivnih vrst organizmov (Luque in sod., 2013). Japonski in sahalinski dresnik sta bila v Evropo prinesena v okrasne namene. Zaradi njune odpornosti in prilagodljivosti sta bila namenjena za utrjevanje rečnih brežin in kot medonosni ter krmni rastlini (Laznik in Trdan, 2012).

2.1.3 Prisotnost dresnikov v Sloveniji

Japonski dresnik je razširjen po vsej Sloveniji, prvič je bil zabeležen v okolici Celja (Frajman, 2008; Vreš 2007: 211). Urbančič-Zemljič in Škerlavaj (1999) poročata, da japonski dresnik v Sloveniji pogosto oblikuje kaljivo seme, vendar nekateri avtorji poročajo, da je tvorba semen japonskega dresnika v Evropi redka, prav tako tudi razmnoževanje s semeni (Bailey in sod., 2009). Z odkritjem križanca – češkega dresnika so ugotovili, da sahalinski dresnik deluje kot donor pelodnih zrn in omogoči razvoj semen na japonskem dresniku (Bailey, 2001). Obstaja tudi verjetnost, da se češki dresnik povratno križa s starševsko rastlino (Tiébré in sod., 2007).

V Slovenijo je bil sahalinski dresnik prinesen okrog leta 1935, v okolico Celja (Strgar, 1981). Rastišče sahalinskega dresnika pri Igu, kjer je tudi potekalo naše vzorčenje, vključuje le ženske primerke sahalinskega dresnika (Strgulc Krajšek, ustno).

Pojav češkega dresnika je bil v Sloveniji prvič omenjen šele leta 2006 (Jogan, 2006), čeprav je jasno, da je na našem ozemlju prisoten že dlje časa. Najstarejši primerek so našli v herbariju LJU iz leta 1989. Vzorec je bil nabran v okolici Celja, a je bil napačno določen kot japonski dresnik (Strgulc Krajšek in Jogan, 2011).

2.1.4 Ekološke značilnosti

Vrsta, ki je invazivna, je odporna na različne okoljske stresorje in ima dobro fenotipsko plastičnost. Globalne spremembe, ki vplivajo na spreminjanje rastnih razmer in okolje, kjer ni prisotnih naravnih škodljivcev, lahko favorizirajo razširjanje takih organizmov (Laznik in Trdan, 2012; Pintó-Marijuan in Munné-Bosch, 2013). Gre za ekofiziološke lastnosti, ki rastlinam omogočajo boljšo toleranco na različne dejavnike okolja in hitrejšo razširjanje ter kolonizacijo novega okolja. Sinteza antioksidantov je eden izmed mehanizmov, ki povečujejo sposobnost obrambe rastlin na okoljske stresorje (Pintó-Marijuan in Munné-Bosch, 2013).

Širjenja dresnikov ne omejuje onesnaženost tal s težkimi kovinami, uspevajo lahko tudi v tleh z nizko vsebnostjo hranilnih snovi, vode in se hitro prilagodijo na rast v spremenjenih razmerah. Vse to so v primerjavi z ostalimi rastlinami pomembne kompetitivne prednosti (Beerling in sod., 1994; Sołtysiak in Brej, 2014).

V korenikah dresnikov je bilo odkritih nekaj biološko aktivnih sestavin, kot so stilbeni in katehini, ki imajo antioksidativno, protimikrobno in protiglivno delovanje. Njihova odpornost na različne onesnaževalce v okolju je lahko tudi posledica prisotnosti omenjenih fenolnih spojin v korenikah. V raziskavi Vrchotove in sod. (2005) so dokazali, da korenika japonskega dresnika v primerjavi s koreniko sahalinskega dresnika vsebuje več stilbenov. Zaključili so, da bi bil to lahko eden izmed razlogov za večjo invazivnost japonskega dresnika v primerjavi s sahalinskim.

Rastišča, na katerih najpogosteje uspevajo dresniki, so bila z veliko verjetnostjo predhodno podvržena človeškemu vplivu. Gre za t. i. antropogena, degradirana območja. Japonskega in češkega dresnika je veliko zaslediti ob rečnih nasipih, avtocestah, železnicah, urbanih področjih, deponijah gradbenega materiala in prsti. Sahalinski dresnik je manj razširjen (Bailey in sod., 2007; Bailey in sod., 2009; Mandák in sod., 2004; Sołtysiak in Brej, 2014), se ne razrašča zelo hitro in je manj invaziven kot ostala dva taksona. Običajno ohranja stalno velikost svojega rastišča (Bímová in sod., 2003; Strgulc Krajšek in Jogan, 2011), zato je bolj omejen na vrtove in parke. Češki dresnik je pogosto prisoten ob vodnih površinah in se najraje širi tudi na nedegradiranih območjih (Mandák in sod., 2004).

Nespolno razmnoževanje je glavni način razmnoževanja dresnikov. Z regeneracijo koščkov nadzemnih poganjkov in korenik se uspešno in hitro vegetativno razmnožujejo (Bailey in sod., 2009). Poleg vegetativnega razmnoževanja se lahko razmnožujejo tudi spolno, kar še poveča njihovo uspešnost pri širjenju (Bailey in sod., 2007, Tiébré in sod., 2007). Spolno se najpogosteje razmnožuje češki dresnik, zato je bolj agresiven, z boljšimi kompeticijskimi sposobnostmi. To mu omogoča predvsem večja variabilnost genetskega

materiala, dosežena s spolnim razmnoževanjem (Bímová in sod., 2001; Lee, 2002; Sołtysiak in Brey, 2014).

Glavni prispevek k hitremu razširjanju dresnikov ima, zaradi globalizacije in ustvarjanja degradiranih površin, človek. Naravno se dresniki na velike razdalje razširjajo predvsem z vodnim tokom (Laznik in Trdan, 2012).

Dresniki imajo velik vpliv na zmanjševanje biodiverzitete, saj zaradi tvorbe gostih sestojev preprečujejo rast samoniklim, avtohtonim rastlinskim vrstam (Bímová in sod., 2004). Povzročajo tudi veliko gospodarsko škodo, saj lahko na primer japonski dresnik prodre skozi 5 cm debele plasti asfalta in poškoduje infrastrukturo, zarašča pa lahko tudi kmetijske površine (Frajman 2009; Mangold in Parkinson, 2010).

Pri odstranjevanju in omejevanju dresnika se zaradi prepoznavnosti pogosto omenja le japonski dresnik (Mangold in Parkinson, 2010). Na enak način bi se bilo sicer potrebno lotiti tudi odstranjevanja in omejevanja češkega dresnika (Strgulc Krajšek in Jogan, 2011). Za omejevanje razraščanja dresnika je ključno izobraževanje splošne populacije in gradbenih podjetij o teh rastlinah ter pazljivost pri gradbenih delih (Laznik in Trdan, 2012). Možni načini odstranjevanja so mehanski (puljenje, rezanje, kopanje, prekrivanje) in kemični, z uporabo pesticidov. Zaenkrat je najučinkovitejša kombinacija mehanskega in kemičnega načina odstranjevanja (Kabat in sod., 2006). V Evropi, natančneje Veliki Britaniji, so leta 2003, z vnosom naravnega škodljivca v okolje, začeli s poskusom biotičnega načina omejevanja japonskega dresnika. Iz Japonske so prinesli bolšico (*Aphalara itadori*), ki je naravni sovražnik dresnika. S sesanjem rastlinskega soka, nimfe, ki se izležejo iz jajčec bolšice, povzročajo škodo na rastlinah in s tem omejujejo njihovo rast. Na Japonskem ima japonski dresnik okrog 180 različnih naravnih sovražnikov, vendar zgolj ta vrsta lahko učinkovito vpliva na preprečevanje širjenja dresnika. Jajčeca lahko izleže tudi na češki in sahalinski dresnik, vendar manj pogosto kot na japonskega. Prvi rezultati učinkovitosti bolšice v Evropi še niso objavljeni (Laznik in Trdan, 2012; Shaw in sod., 2009).

2.1.5 Uporaba dresnikov v medicini in prehrani

Nekatere invazivne rastline imajo negativen vpliv na človekovo zdravje, kar za dresnike ne velja (Alberternst in Böhmer, 2011; Basnou in Vilà, 2006; Smith in sod., 2008). Japonski in sahalinski dresnik se na Kitajskem in Japonskem uporabljata celo v ljudski medicini (Jurecek in sod., 2012).

Sahalinski dresnik je v literaturi, ki omenja uporabo rastlin v zdravstvene namene, redko omenjen. Isto bi lahko trdili za češki dresnik, saj je bil ta takson zgodovinsko gledano odkrit šele pred kratkim.

V tradicionalni kitajski medicini se za zdravljenje uporabljajo predvsem korenike japonskega dresnika, ki spodbujajo delovanje žolčnika, preprečujejo bolezni jeter, pljuč, bolezni, povezanih z oslabljeno cirkulacijo krvi, zdravijo povišano količino lipidov v krvi, tumorje, vnetja, levkorejo, ... Kitajska farmakopeja opisuje in navaja uporabo japonskega dresnika pod imenom Hu Zhang. Sodobne eksperimentalne in klinične raziskave dokazujejo, da posamezne aktivne sestavine japonskega dresnika delujejo pozitivno na potek številnih bolezni. Pozitivni učinki se kažejo predvsem pri razvoju srčno-žilnih in živčnih bolezni (Choi in sod., 2002; Zhang H. in sod., 2013). Dokazano je tudi protivirusno, protimikrobno in protiglivično delovanje japonskega dresnika (Zhang L. in sod., 2013). Podobno delovanje so odkrili tudi za koreniko sahalinskega dresnika (Konstantinidou-Doltsinis, 1998; Yuji Kawai in sod., 2004). Alternativna medicina opisuje japonski dresnik kot ključno sestavino pri zdravljenju limske borelioze (Buhner, 2013).

Korenika japonskega dresnika je sicer najbolj znana po visoki vsebnosti stilbenov, predvsem resveratrola, spojine za katero je bilo ugotovljeno, da ima številne pozitivne učinke na človekovo zdravje (Brisdelli in sod., 2009; Burns in sod., 2002). Večina trans-resveratrola, ki se prodaja v obliki prehranskih dopolnil je danes že izolirana iz korenike japonskega dresnika (Chen in sod. 2012).

Poleg terapevtske uporabe se japonski dresnik uporablja tudi v kulinariki. Mlade poganjke dresnika se uživa na podoben način kot beluše, v nekaterih kuharskih receptih pa dresnik lahko nadomesti rabarbaro (Angier, 1974: 122). Nabirajo se mladi poganjki visoki do 20 cm. Steve Brill v svojih knjigah, »The wild vegan cookbook« in »Shoots and greens of early spring in Northeastern North America«, opisuje japonski dresnik kot odlično spomladansko zelenjavo rahlo kislega okusa. V knjigi je dresnik omenjen tudi kot dober vir vitaminov A in C, mangana, cinka, kalija ter številnih fenolnih spojin (Brill, 2008; Brill, 2010: 98–105).

V Nemčiji je Peter Becker uvedel projekt bioničnega omejevanja japonskega dresnika. S tem, ko bi se rastlino množično uporabljalo v prehrani, bi se preprečevalo njeno širjenje. Slogan projekta NewTritonInk se glasi: »Ohranjanje narave z vilico in nožem.«. Leta 2005 je ustanovil podjetje Knöterich, ki trži prehranske izdelke iz japonskega dresnika, organizira predavanja in izobraževanja o invazivnih rastlinah ter njihovi uporabi (Becker, 2007; Becker, 2013).

Sok korenike japonskega dresnika se v Aziji uporablja za izdelavo rumenega barvila in obarvanje riževe moke (Peng in sod., 2013). V Indiji in južni Aziji liste dresnika

uporabljajo kot nadomestek za tobak (Kirino in sod., 2012). Iz korenike japonskega dresnika pripravljajo čaj z imenom Itadori, ki v japonskem jeziku pomeni dobro počutje. Glede na študijo Burnsa in sod. (2002) je čaj dober prehranski vir resveratrola in primeren nadomestek za rdeče vino. Ljudje, ki se vina izogibajo zaradi alkohola, bi koristi resveratrola lahko občutili s pitjem čaja Itadori.

Podatkov in raziskav glede toksičnosti dresnikov je malo. Odsvetuje se uporaba nosečnicam, saj učinkovine vplivajo na delovanje maternice. Tanini, ki so prisotni v rastlini lahko delujejo karcinogeno (Lewis in Elvin-Lewis, 1977, cit. po Spainhour, 1997) in preprečijo aktivnost nekaterih prebavnih encimov (Horigome in sod., 1988). Dresnik vsebuje oksalno kislino, podobno kot rabarbara, zato so užitni zgolj mladi poganjki. Uživanje hrane z višjo vsebnostjo oksalne kisline se odsvetuje ljudem s povečanim tveganjem za razvoj artritisa, revmatizma, protina in ledvičnih kamnov. Obstajajo tudi podatki, da bi lahko uživanje dresnika pri določenih osebah vodilo do povečane občutljivosti kože na svetlobo, kar so opazili tudi pri uživanju poganjkov ajde (Leffmann, 1919; Tavčar Benković, 2014). Za ekstrakt korenike je sicer ugotovljena nizka toksičnost za vodne organizme (Ogwuru in Adamczeski, 2000).

Pregledne študije o farmakoloških učinkih japonskega dresnika navajajo, da bi bilo raziskavam toksičnosti japonskega dresnika v prihodnosti potrebno nameniti več pozornosti. Prav tako bi bilo zaželeno bolj natančno raziskati spojine, ki jih vsebujejo nadzemni deli rastline in ugotoviti njihove pozitivne vplive na organizem (Peng in sod., 2013; Zhang H. in sod., 2013).

2.2 ANTIOKSIDANTI IN PROSTI RADIKALI

2.2.1 Prosti radikali

Prosti radikali so molekule, atomi in ioni, ki imajo najmanj en nesparjen elektron v svoji zunanji spinski orbiti (Van Remmen in sod., 2003). So zelo nestabilni in reaktivni, zato so v prevelikih količinah nezaželeni, saj v in na celicah povzročajo različne poškodbe ter nepravilnosti (Pietta, 2000). Zaradi svoje kratkoživosti (Devasagayam in sod., 2004) hitro reagirajo z ostalimi molekulami v bližini in preidejo v bolj stabilno stanje (Sarma in sod., 2010).

Ironično je, da je kisik ključni element za življenje na Zemlji, a glavni krivec za nastajanje večine prostih radikalov (Kumar, 2011; Miller in sod. 1990). Reaktivne kisikove spojine (ROS) so najbolj znani in pogosti prosti radikali (Van Remmen in sod., 2003). Delimo jih na reaktivne kisikove proste radikale, med katere uvrščamo hidroksilne (OH^\bullet), superoksidne ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroksilne (ROO^\bullet) in lipidne peroksilne (LOO^\bullet) radikale ter

neradikalске reaktivne kisikove spojine, kot so vodikov peroksid (H_2O_2), ozon (O_3), singletni kisik ($^1\text{O}_2$) in lipidni peroksid (LOOH). Neradikalске reaktivne kisikove spojine sodelujejo pri radikalskih reakcijah in vplivajo na nastajanje prostih radikalov. Prosti radikali ne vključujejo zgolj ROS, vendar tudi dušikove in klorove spojine (Cuzzocrea in sod., 2001; Genestra, 2007; Pietta, 2000).

Prosti radikali v telesu nastajajo na dva načina. Redoks potencial definira sposobnost neke snovi za vezavo elektronov v primerjavi z vodikovim atomom. Snovi, ki so bolj elektronegativne od vodika, to pomeni, da vodik lahko oksidirajo, imajo pozitiven redoks potencial in delujejo kot oksidanti. Reducenti imajo negativen redoks potencial. Redoks reakcije so reakcije oksidacije in redukcije, v telesu pa morajo biti v ravnovesju (Chapple in Matthews, 2007). Prvi način nastajanja prostih radikalov je torej z oddajanjem oz. sprejemanjem elektronov (Sarma in sod., 2010). V tem primeru prosti radikali delujejo kot reducenti ali oksidanti (Cheeseman in Slater, 1993). Drugi način je preko homolitične cepitve kovalentnih vezi. Homolitična cepitev vezi se pogosto zgodi med dvema atomoma z enako elektronegativnostjo (Sarma in sod., 2010).

Vsakodnevno v telesni celici nastane med enim in tremi milijoni prostih radikalov (Ames in sod., 1993). Prosti radikali v največji meri nastajajo med procesom mitohondrijskega celičnega dihanja. Elektronska transportna veriga, preko katere potujejo elektroni, omogoča nastajanje protonskega gradienta in sintezo ATP ter redukcijo kisika do vode (Enačba 1).



Kisik je v tem primeru končni prejemnik elektronov. Več kot 5 % kisika, ki ga vdihnemo, oz. več kot 2 % kisika, ki prispe do mitohondrijev, se porabi za nastanek superoksidnega aniona, saj elektronska transportna veriga »pušča«. Elektroni, ki potujejo po elektronski transportni verigi, lahko prehitro reagirajo s kisikom, kar vodi v nastanek superoksidnega aniona (Maxwell, 1995; Miles, 2003; Vercesi in sod., 1997).

Redukcija kisika v telesu poteka v več korakih, ki vodijo v nastanek različnih prostih radikalov (Breen in Murphy, 1995). Na začetku se kisik s sprejetjem enega elektrona reducira do superoksidnega aniona. Superoksidni anion se nato pretvori v H_2O_2 . Zaradi prisotnosti železovih (Fe^{2+}) in delno tudi bakrovih (Cu^+) ionov se s t. i. Fentonsko reakcijo relativno nereaktiven H_2O_2 spremeni v hidroksilni radikal (Enačba 2) (Van Remmen in sod., 2003).



Fentonska reakcija je ena najpomembnejših reakcij v biologiji prostih radikalov (Sutton in Winterbourne, 1989), saj je hidroksilni radikal najbolj reaktivna vrsta prostih kisikovih radikalov (Chapple in Matthews, 2007).

Ko prosti radikal reagira z neko molekulo, se sproži radikalska verižna reakcija. Nastanek enega radikala je povod za nastanek drugega in tako pride do kaskadnega odvijanja procesov. Radikalske verižne reakcije lahko delimo v tri faze: iniciacija (začetek), propagacija (nadaljevanje) in terminacija (zaključek). V fazi iniciacije iz stabilne molekule nastane prosti radikal, ali pa že prisotni prosti radikali povzročijo nastanek novih radikalov. Proces se v fazi propagacije kaskadno nadaljuje, vendar se količina prostih radikalov ne povečuje. V fazi terminacije iz dveh radikalov nastane stabilen produkt, zato se število prostih radikalov zmanjša. Superoksidni anionski radikal je relativno nereaktiven, vendar predstavlja podlago za nastanek bolj reaktivnih radikalov in spodbuja nastajanje novih. To lahko ponazorimo s primerom redukcije trivalentnega (feri) železa v dvovalentno (fero) železo, ki potem lahko vstopi v Fentonsko reakcijo (Chapple in Matthews, 2007; Sarma in sod., 2010).

Prosti radikali prav tako nastajajo pri fagocitozi tujkov (makrofagi in celice ubijalke) v procesih delovanja imunskih celic in pri procesih razstrupljanja (citokrom P450) ter delovanju encimov (ciklooksigenaze, lipooksigenaze), ki sodelujejo pri nastajanju številnih tkivnih hormonov z regulatorno vlogo. Nastajajo tudi v številnih procesih, povezanih z nepravilno funkcijo organizma, pri razvoju patoloških stanj (Devasagayam in sod., 2004), ob stresnih situacijah in zaradi različnih okoljskih (onesnaževala, toksini, sevanja) in ostalih vplivov (življenjski slog, staranje) (Sarma in sod., 2010).

Čeprav se prosti radikali povezujejo z razvojem številnih bolezni, so ključnega pomena pri uravnavanju določenih telesnih funkcij. Sodelujejo v procesih signalizacije, rasti celic, sintezi biološko pomembnih molekul in izražanju genetskega materiala (Pietta, 2000; Sarma in sod., 2010) ter prispevajo k ohranjanju homeostaze v tkivih (Devasagayam in sod., 2004). Delujejo namreč kot sekundarni sporočevalci (Sarma in sod., 2010).

Oksidativni status organizma opisuje dinamično ravnotežje med antioksidativnim sistemom in prooksidativno obremenitvijo organizma ter je povezan z ravnotežjem reakcij oksidacije in redukcije (Sl. 2) (Chapple in Matthews, 2007; Halliwell, 1996).



Slika 2: Prikaz homeostaze med reaktivnimi kisikovimi spojinami (ROS) in antioksidanti (AO) (prirejeno po: Chapple in Matthews, 2007: 161; Devasagayam in sod., 2004: 796 in 800)

Kadar je v telesu nastajanje prostih radikalov hitrejše kot dovoljuje učinkovitost procesov njihovega odstranjevanja, se poruši stanje med prooksidativnimi in antioksidativnimi reakcijami, kar vodi v poškodbe lipidov, proteinov in DNK (Pham-Huy in sod., 2008; Valko in sod., 2007). V takšnem primeru govorimo o oksidativnem stresu. Oksidativni stres je udeležen pri razvoju različnih bolezni: nevrodegenerativne, srčno-žilne bolezni in rak ter pri procesih staranja (Devasagayam in sod., 2004; Pham-Huy in sod., 2008; Ramarathnam, 1995; Thannickal in Fanburg, 2000).

Telo v obrambo proti prostim radikalom aktivira procese sinteze endogenih antioksidantov, antioksidante pa vnašamo v telo tudi s hrano, pijačo in prehranskimi dopolnili (Pham-Huy in sod., 2008). Raziskave dokazujejo, da lahko antioksidanti pozitivno vplivajo na preprečevanje bolezni in podaljšajo življenjsko dobo (Lobo in sod., 2010).

ROS niso aktivni le v telesu, saj delujejo tudi pri procesih avtooksidacije v prehranskih izdelkih. Avtooksidacija je počasna oksidacija spojin ob prisotnosti kisika. S tem vplivajo na sensoriko in izgled ter trajnost prehranskih proizvodov (Li in sod., 2008; Nawar, 1985: 140–244). Živilska industrija zato med proizvodnim procesom živilom dodaja različne antioksidante in naravne rastlinske učinkovine, na primer ekstrakt rožmarina, z antioksidativnim delovanjem (Jałosińska in Wilczak, 2009).

2.2.2 Splošno o antioksidantih

Antioksidanti preprečujejo in popravljajo poškodbe, ki jih povzročajo ROS in ostali oksidanti (Pham-Huy in sod., 2008). Na mestu delovanja so prisotni v nižjih koncentracijah kot molekule, ki so tekom radikalskih reakcij oksidirane (Halliwell, 1995).

Rastlinska hrana, predvsem sadje, zelenjava in zelišča, lahko vsebuje širok nabor različnih antioksidantov – fenolne spojine, dušikove spojine, vitamini, minerali, terpenoidi in nekateri preostali endogeni metaboliti z antioksidativno aktivnostjo (Uttara in sod., 2009). Zaradi pestrosti antioksidantov v rastlinskih tkivih lahko z merjenjem AOU rastlinskih tkiv na najboljši način ocenimo potencial nekega tkiva za nevtralizacijo oksidantov (Gupta in Sharma, 2006).

2.2.3 Različne delitve antioksidantov

V bioloških sistemih poznamo štiri glavne vrste antioksidantov – encime (superoksid dismutaza, glutation peroksidaza, katalaza), velike molekule (albumine, ceruloplazmin, feritin), majhne molekule (askorbinska kislina, glutation, tokoferoli, fenolne spojine) in nekatere hormone (estrogen, angiotenzin, melatonin), ki lahko delujejo kot antioksidanti (Uttara in sod., 2009).

Antioksidante lahko glede na uporabo različnih kriterijev razvrščamo na različne načine. Endogeni antioksidanti so telesu lastni, medtem ko eksogene v telo vnesemo sami in so lahko umetno sintetizirani ali naravni. Lahko jih delimo tudi na encimske in neencimske, glede na polarnost (polaren, nepolaren) in topnost v vodi oz. maščobi (hidrofilen, lipofilen) ter mesto delovanja (znotrajcelični, zunajcelični, membranski) (Gilgun-Sherki in sod., 2001; McClements in Decker, 2008; Wanasundara in Shahidi, 2005).

Glede na način delovanja jih delimo na primarne in sekundarne. Primarni (ArOH) delujejo kot lovilci prostih radikalov. S tem preprečijo tako začetek radikalskih reakcij kot tudi nadaljnje širjenje radikalskih verižnih reakcij. Prostemu radikal (R[·]) posredujejo vodikov atom ali elektron in ga tako stabilizirajo. Končni produkt obeh načinov je enak (Enačba 3) (Huang in sod., 2005; McClements in Decker, 2008; Wanasundara in Shahidi, 2005).



Sekundarni antioksidanti lahko obnovijo antioksidativno sposobnost primarnih antioksidantov, tako da jim posredujejo vodikov atom. V procesu kelacije se lahko povežejo s prostimi kovinskimi ioni. Tako delujejo nekateri telesu lastni proteini (transferin, laktoferin), kot tudi nekatere fenolne spojine. Sekundarne antioksidante

pogosto označujemo kot sinergiste, saj ne sodelujejo pri stabilizaciji prostih radikalov (McClements in Decker, 2008; Reische in sod., 2002; Wanasundara in Shahidi, 2005).

Vpliv na to, katera reakcija bo potekla, ima predvsem polarnost. V polarnih topilih zaradi stabilizacije nabitih molekul, antioksidantov, pogosteje poteče reakcija posredovanja elektrona, medtem ko v nepolarnih topilih posredovanje vodika (Foti in sod., 2004; Wright in sod., 2001).

Antioksidante lahko razdelimo tudi glede na položaj v antioksidativni mreži, kot so raziskovalci poimenovali različne ravni obrambe pred oksidativnim stresom. Z izrazom so želeli poudariti, da se vse ravni med seboj prepletajo in dopolnjujejo. Antioksidativna mreža je sestavljena iz treh ravni. V prvo linijo obrambe uvrščamo antioksidante, ki preprečujejo nastajanje oksidantov. V to skupino sodijo encimi z antioksidativnim delovanjem (superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza, glutation reduktaza), nekateri minerali (Cu, Zn, Se, Mn), ki so ključni za delovanje predhodno naštetih encimov in hormoni (melatonin) ter proteini (transferin, feritin, ceruloplazmin), ki vežejo kovinske ione. Glutation, vitamine (A, C, E), polifenole, terpenoide (karotenoidi) in sintetične antioksidante uvrščamo v sekundarno linijo obrambe, ki vsebuje lovilce ROS. Encimi (lipaze, proteaze in transferaze), ki popravljajo poškodovano DNK, proteini in maščobne kisline sodijo v zadnjo linijo obrambe (Gupta in Sharma, 2006; Sies in sod., 2005).

Rastline sintetizirajo od 100 000 do 200 000 različnih sekundarnih metabolitov. Za sintezo velike večine fenolnih spojin se v fenilpropanoidni poti porabi 20 % vsega pri fotosintezi vezanega ogljika (Metcalf, 1987; Ralston in sod., 2005).

Med učinkovite lovilce prostih radikalov uvrščamo tudi fenolne spojine. Za fenolne spojine (fenoli) se pogosto uporablja tudi izraz »polifenoli«, kar glede na kemijsko strukturo ni pravilno, saj obstajajo tudi monofenoli, ki pa se zaradi svojih lastnosti imenujejo kar »funkcionalni polifenoli« (Dixon, 2004).

2.2.4 Fenolne spojine

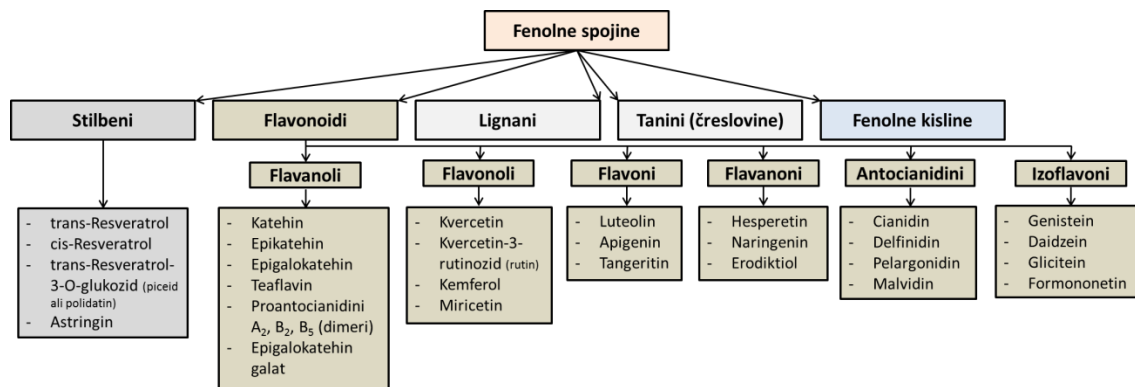
Fenolne spojine so skupina več kot 8000 naravnih sekundarnih metabolitov rastlin, ki imajo eno skupno lastnost – najmanj en fenolni aromatski obroč z vezano najmanj eno hidroksilno skupino (-OH) (Bravo, 1998; Shahidi in sod., 1992). Prisotni so v vseh rastlinskih delih in so pomemben del človekove prehrane (Dai in Mumper, 2010; D'Archivio in sod., 2007).

Večina fenolnih spojin je sintetizirana iz šikimske kisline, ki je intermediat šikimatne biosintezne poti (Tohge in sod., 2013). Kot antioksidanti lahko delujejo z lovljenjem

prostih radikalov, kelacijo kovinskih ionov in posredovanjem vodika ali elektrona. Nekateri lahko tudi inhibirajo encime (ksantin oksidazo), ki so odgovorni za nastanek radikalov in vplivajo na telesu lastne antioksidativne obrambne mehanizme (Cotelle, 2001; Nijveldt in sod., 2001).

Večinoma so prisotni v glikozilirani obliki. Glikozilacija in hidroksilne skupine povečajo njihovo topnost v vodi. Glikozilacija tudi prepreči avtooksidacijo reaktivnih hidroksilnih skupin in omogoča shranjevanje in prenos fenolnih spojin znotraj celic. Glikozidi imajo sicer manjšo AOU glede na odgovarjajoči aglikon, iz česar lahko sklepamo na velik pomen prostih reaktivnih hidroksilnih skupin, ki so nameščene na specifičnih mestih aglikona (Brunetti in sod., 2013; Rice-Evans in sod., 1996). Vezava metilnih in izopentilnih skupin poveča njihovo lipofilnost (Crozier in sod., 2006).

Fenolne spojine se v osnovi delijo na flavonoide in neflavonoide (Crozier in sod., 2006). Rastlinski fenoli vključujejo fenolne kisline (C_6-C_1 in C_6-C_3), flavonoide ($C_6-C_3-C_6$) in tanine ($(C_6-C_3-C_6)_n$), ter še dve manj zastopani skupini: stilbene ($C_6-C_2-C_6$) in lignane ($(C_6-C_3)_2$) (Sl. 3) (Dai in Mumper, 2010; D'Archivio in sod., 2007; Robbins in Bean, 2004). Nekateri avtorji omenjajo še preproste fenole (C_6), kumarine in lignine ($(C_6-C_3)_n$) (Ewane in sod., 2012; Wahle in sod., 2010).



Slika 3: Osnovna delitev fenolnih spojin in flavonoidov ter najbolj znani predstavniki flavonoidov in stilbenov (prirejeno po: Crozier in sod., 2006: 2–12; Robbins in Bean, 2004: 98; Wahle in sod., 2010: 4)

Variabilnost različnih fenolnih spojin je v rastlinah še veliko večja (Cécile in sod., 2012). V nadaljevanju bom predstavil osnovne in najbolj pogoste skupine fenolnih spojin.

2.2.4.1 Flavonoidi

Leta 1936 so Szent-Gyorgyi in sod. izolirali novo spojino, ki je kazala pozitivne učinke na delovanje kapilarnih sten in jo poimenovali citrin oz. vitamin P. Nato so ugotovili, da je v rastlinah prisotnih še veliko spojin s podobnim koristnim delovanjem. Koristni učinki so bili posledica delovanja flavonoidov, ki so jih na začetku poimenovali tudi kot vitamine P. Ker ne spadajo med vitamine, ta izraz v znanstvenih krogih ni več v uporabi (Mobh, 1938).

Osnovna struktura flavonoidov je flavanska molekula (flavan; 2-fenil-1,4-benzopiran), zgrajena iz 15 ogljikovih atomov, ki oblikujejo tri aromatske obročje: A, B in C (Dai in Mumper, 2010; D'Archivio in sod., 2007). Obročja A in B sta fenilna, obroč C pa je heterociklični piran (flavanoli, antocianidini) ali piron (flavonoli, flavoni in flavanoni) (Aherne in O'Brien, 2002). Pozicija ogljikovih atomov na obročih se označuje s številkami, pri obroču B je ob številki dodan še opuščaj (Sl. 4).

Veliko flavonoidov je pri rastlinah odgovornih za obarvanost cvetov, plodov in listov (De Groot in Rauen, 1998). Ker so pogosto v glikozilirani obliki, so vodotopni in se zato v rastlinskih celicah večinoma nahajajo v vakuolah (Day in sod., 1998).

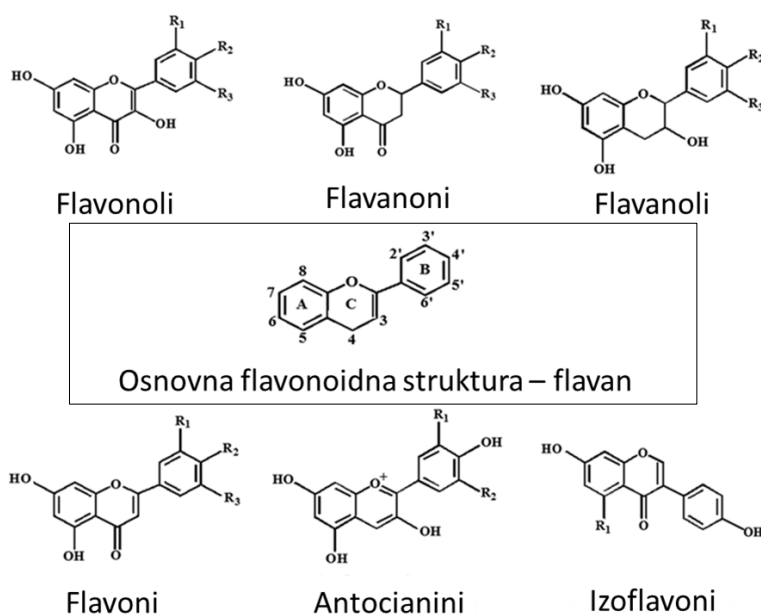
Razlike med flavonoidi so posledica hidroksilacije obroča C, prisotnosti oz. odsotnosti dvojnih vezi, z dvojno vezjo vezanega kisikovega atoma na mestu četrtega ogljikovega atoma v obroču C in števila hidroksilnih skupin vezanih na obročja A in B (Pitchaon, 2006). Delimo jih v 6 osnovnih skupin: flavanoli, flavonoli, flavoni, flavanoni, antocianidini in izoflavoni (Crozier in sod., 2006; Wahle in sod., 2010). Nekateri raziskovalci k tej delitvi dodajajo še sedmo skupino, halkone (butein, izolikviritigenin) (Bruneton, 1999: 309–368).

Flavanoli (flavan-3-oli) in flavonoli imajo podobno kemijsko zgradbo. Vsi imajo hidroksilno skupino vezano na tretjem ogljikovem atomu obroča C. Med seboj se razlikujejo po tem, da flavonoli na četrtem ogljikovem atomu obroča C vsebujejo z dvojno vezjo vezan kisikov atom in dvojno vez znotraj istega obroča (Pitchaon, 2006). Flavanoli so najbolj kompleksna skupina flavonoidov, ki vključuje monomerne (+)-katehine, njihove izomere (-)-epikatehine ter oligomere in polimere, kamor uvrščamo proantocianidine, znane tudi pod izrazom kondenzirani tanini (Crozier in sod., 2006). Flavanoli so edini flavonoidi, ki v živilih niso glikozilirani (Manach in sod., 2004).

Flavanoni in flavoni so po strukturi podobni flavanolom, toda na obroču C nimajo več prisotne hidroksilne skupine. Flavoni imajo v obroču C prisotno dvojno vez, flavanoni pa so brez nje (Pitchaon, 2006). Flavoni so redko zastopana skupina, prisotna le v nekaterih zeliščih, zeleni in peteršilju. Lahko so prisotni še v nekaterih citrusih in prosu (Crozier in sod., 2006). Flavanoni so glavni flavonoidi citrusov (Peterson in sod., 2006).

Antocianini so vodotopni in eni glavnih flavonoidov v rastlinskih tkivih. Večinoma gre za 3-glukozide antocianidinov. V nekaterih primerih imajo lahko acilirane sladkorne ostanke. Hidroksilirani antocianidini so: delfinidin, cianidin in pelargonidin. Obstajajo tudi metilirani antocianidini kamor uvrščamo malvidin (Pitchaon, 2006). Antocianidini so podobno kot njihovi konjugirani derivati antocianini med rastlinami široko zastopani in odgovorni za rdečo, modro in vijolično obarvanost rastlinskih organov. Pomembni so pri zaščiti rastlin pred UV-sevanjem in kot atraktanti za opraševalce. Prisotni so v vseh rastlinskih tkivih. Najbolj pogosti so cianidini, rdeče-vijolična barvila, ki spreminjajo barvo v odvisnosti od vrednosti pH, pelargonidini kot oranžna in delfinidini kot modra barvila (Crozier in sod., 2006).

Izoflavoni so večinoma prisotni v stročnicah, predvsem soji. Poznani so kot rastlinski estrogini (fitoestrogeni), saj lahko zaradi svoje kemijske strukture posnemajo delovanje telesu lastnega hormona, estradiola (Crozier in sod., 2006).

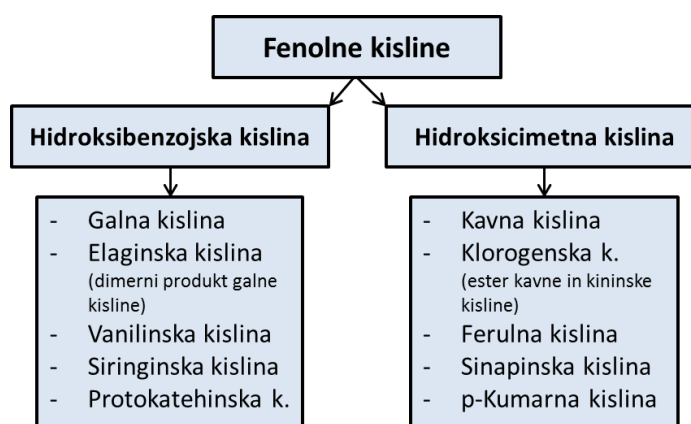


Slika 4: Kemijska zgradba različnih flavonoidov, ki so razdeljeni v 6 osnovnih skupin. Razvrščeni so na osnovi razlik v heterocikličnem obroču C. V sredini je prikazana osnovna flavonoidna struktura (prirejeno po: Pandey in Rizvi, 2009: 272)

2.2.4.2 Fenolne kisline

Za vse fenolne kisline je značilno, da imajo eno karboksilno skupino (-COOH). Različne fenolne kisline se med seboj razlikujejo glede na število in položaj vezanih hidroksilnih skupin na aromatskem obroču. V odvisnosti od izhodne spojine za njihovo sintezo jih nato

lahko razdelimo v dve skupini. Nekatere se sintetizirajo iz benzojske kisline (C_6-C_1), druge iz cimetine (C_6-C_3) (Sl. 5). Derivati cimetine kisline so veliko pogosteje prisotni v rastlinskih tkivih. V rastlinah so pogosto prisotni v glikozilirani obliki ali kot estri kina, šikimske ali vinske kisline. Kina kislina, zaestrena s kavno kislino, tvori klorogensko kislino (D'Archivio in sod., 2007; Manach in sod., 2004). Od derivatov benzojske kisline sta najbolj znani galna kislina in njen dimerni kondenzacijski produkt elaginska kislina (Mattila in Kumpulainen, 2002). Večjo AOU kažejo derivati hidroksicimetine kisline, kar je verjetno posledica vezane stranske skupine iz treh ogljikovih atomov ($-CH=CH=COOH$) (Rice-Evans in sod., 1996).



Slika 5: Osnovna delitev fenolnih kislin in njihovi glavni predstavniki (prirejeno po: Crozier in sod., 2006: 1–2; Robbins in Bean, 2004: 98; Wahle in sod., 2010: 4)

Benzojska kislina je sestavina kompleksnih struktur, kot so hidrolizirajoči tanini (Schuster and Hemann, 1985).

Lignani so difenolne spojine, ki vsebujejo 2,3-dibenzilbutan. Nastanejo pri dimerizaciji dveh ostankov cimetine kisline (Pitchaon, 2006).

2.2.4.3 Stilbeni

Večina stilbenov v rastlinah ima vlogo protiglivnega delovanja. Med te snovi uvrščamo fitoaleksine, ki se sintetizirajo zgolj ob poškodbi ali okužbi rastline. Resveratrol in njegovi derivati so najbolj poznani in raziskani stilbeni. Glikozilirana oblika trans-resveratrola, trans-resveratrol-3-O-glukozid, je znana tudi pod imenom piceid ali polidatin (Crozier in sod., 2006; Pandey in Rizvi, 2009).

2.2.4.3.1 Resveratrol

Resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben) je polifenolna spojina in se uvršča med stilbene (Soleas in sod., 1997). Rastline ga pogosto proizvajajo v odgovor na različne okoljske stresorje, med katerimi so pomembne glivne infekcije (Aggarwal in sod., 2004; Langcake in Pryce, 1976). Poznamo cis in trans izomero resveratrola ter različne glikozide, med katerimi je najbolj poznan piceid (resveratrol-3-O-beta-glukozid) (Romero-Perez in sod., 1999). Resveratrol spada med lipofilne molekule. Znanstveniki so si zaradi njegove prisotnosti v rdečem vinu z njim pomagali razložiti »francoski paradoks« (Criqui in Ringel, 1994; Renaud in de Lorgeril, 1992; St Leger in sod., 1979). Zadnje raziskave dokazujejo, da ima tudi vlogo pri preprečevanju razvoja različnih bolezni: srčno-žilnih, raka in nevrodegenerativnih (Nikolova, 2007). Prav tako deluje na podobne transkripcijske faktorje in molekularne mehanizme kot kalorično omejevanje hrane, zato ga lahko uvrščamo med gerontoprotektivne spojine in spojine, ki bi lahko vplivale na podaljšanje življenjske dobe (Chung in sod., 2012; Howitz in sod., 2003; Ito in sod., 2012; Jang in sod., 1997). Te lastnosti mu pripisujejo tudi raziskave na sesalcih (Colman in sod., 2014).

Raziskave resveratrola so v velikem porastu predvsem od leta 1992 naprej, ko so njegovo prisotnost prvič zaznali v rdečem vinu (Siemann in Creasey, 1992). Prvič je bil sicer omenjen leta 1940, ko ga je japonskemu raziskovalcu Takaoki uspelo izolirati iz korenike strupene, a medicinsko uporabne rastline, bele čmerike (*Veratrum album*) (Takaoka, 1940). Naravno je trans-resveratrol prisoten v jagodičevju (borovnice z vsebnostjo 32 ng/g sveže mase), oreščkih (pistacije z 0,09–1,67 µg/g), kuhanih arašidih (5,1 µg/g), grozdju (0,16–3,45 µg/g), rdečem (0,1–14,3 mg/L) in belem vinu (0,1–2,1 mg/L) ter koreniki japonskega dresnika (0,5 mg/g) (Baur in Sinclair, 2006; Burns in sod., 2002; Chachay in sod., 2011). Tudi čaj Itadori, ki je pripravljen iz 1 g prahu korenike japonskega dresnika na 100 mL vode in s 5 min vretjem, je dober naravni vir resveratrola (0,7 mg/L) (Burns in sod., 2002). Glukozida resveratrola, trans-piceida, je v rdečem vinu običajno pod mejo zaznavnosti, medtem ko ga je v rdečem grozdju 1,5–7,3 µg/g, koreniki japonskega dresnika 1,65 mg/g in Itadori čaju 9,1 mg/L (Baur in Sinclair, 2006). Leta 2006 so kot nov vir resveratrola opisali kakav (1,8 µg/g) (Counet in sod., 2006; Hurst in sod., 2008).

Najbolj koncentriran vir resveratrola naj bi predstavljala korenika japonskega dresnika (Vastano in sod., 2000), od koder ga je prvi leta 1963 izoliral Nonomura s sod. Iz tega vira se izolira tudi večina resveratrola za prehranska dopolnila (Nikolova, 2007). Danes ga pridobivajo tudi s kemijsko sintezo in s pomočjo gensko spremenjenih mikroorganizmov (Farina in sod., 2006; Trantas in sod., 2009; Wang in sod., 2007). Zanimivo je tudi, da korenika vsebuje 3-krat več piceida, glikozilirane oblike trans-resveratrola, kot pa samega trans-resveratrola (Burns in sod., 2002), kar velja tudi za grozdje. Vino vsebuje enaka deleža trans- in cis-resveratrola, glikozilirano obliko trans-resveratrola pa le izjemoma.

Vzrok nizke vsebnosti trans-resveratrola je v cepitvi glukoze med procesom vinifikacije (Burns in sod., 2000; Burns in sod., 2002; Malele in Zvikomborero, 2014).

Resveratrol ima antioksidativni učinek, kar so dokazali tako *in vivo* kot *in vitro*. *In vivo* so dokazali, da ima v primerjavi z vitaminoma E in C boljše sposobnosti lovljenja prostih radikalov (Stojanovic in sod., 2001). Nekaterе druge študije, vsaj za vitamin C, tega niso potrdile (Martinez in Moreno, 2000). *In vivo* naj bi bilo njegovo antioksidativno delovanje povezano predvsem s povečanjem sinteze dušikovega oksida (NO), ki lahko učinkuje kot lovilec superoksidnih radikalov (Cadenas in Barja, 1999; Hattori in sod., 2002).

Resveratrol je občutljiv na svetlobo in se pod vplivom UV-sevanja spreminja iz trans v cis izomero (Nikolova, 2007). Poleg tega je občutljiv na visoko temperaturo, kar so dokazali s preverjanjem vsebnosti resveratrola v borovnicah pred in po 30 min peki na 190 °C. Količina resveratrola se je zmanjšala v obsegu od 17 do 46 % (Lyons in sod., 2003). Kljub temu so raziskave pokazale, da je pri različnih okoljskih razmerah izolirana kristalinična oblika stabilna (Jensen in sod., 2010).

Raziskave pozornost posvečajo tudi biorazpoložljivosti resveratrola (Walle in sod., 2004; Wenzel in Somoza, 2005). Odkrili so, da je biološko najbolj aktivna trans izomera resveratrola (Nikolova, 2007), vendar se po zaužitju v krvni plazmi pojavi manj kot 1 % zaužite količine (Walle, 2011). Pojav ni posledica njegove absorpcije, ki znaša okrog 75 %, vendar hitrega metabolizma v jetrih in enterocitih tankega črevesa. Trans-resveratrol se metabolizira v sedem, do sedaj znanih, različnih glukuronidov in sulfatnih konjugatov (Burkon in Somoza, 2008; Goldberg in sod., 2003; Walle, 2011; Wenzel in Somoza, 2005). Metabolizmu prvega prehoda se lahko izognemo s sublingvalnim oz. bukalnim doziranjem resveratrola. Metabolizem upočasnijo tudi nekateri flavonoidi, kot je na primer kvercetin (De Santi in sod., 2000).

Walle in sod. (2004) so tudi odkrili, da je razpolovna doba metabolitov resveratrola v krvni plazmi približno 9,2 ure, medtem ko je razpolovna doba intaktnega trans-resveratrola zgolj 8 do 14 min. Telo je zato metabolitom resveratrola izpostavljeno veliko dlje kot nespremenjeni obliki trans-resveratrola (Asensi in sod., 2002; Marier in sod., 2002). Odkrili so tudi, da se ob zaužitju 25 mg resveratrola, najvišja koncentracija resveratrola in metabolitov v krvi pojavi po 60 min in znaša zgolj 491 µg/L. Neka druga raziskava pa je najvišjo koncentracijo v krvi, ki je variirala med posamezniki od 416 do 471 µg/L, določila po 30 min (Gescher in Steward, 2003).

Podatki o dostopnosti resveratrola v organizmu so pomembni predvsem z vidika podajanja kritične ocene zaključkov različnih raziskav. Te so večinoma narejene *in vitro*, z uporabo čistega trans-resveratrola in koncentracijo, ki je 10- do 100-krat višja od tiste, dosežene v krvni plazmi po oralnem zaužitju (Gescher in Steward, 2003).

Zadnje raziskave kažejo, da imajo pomembno vlogo in biološko aktivnost tudi metaboliti resveratrola. Poleg tega obstaja možnost, da se le-ti v celicah ponovno dekonjugirajo (Calamini in sod., 2010; Hoshino in sod., 2010; Maier-Salamon in sod., 2013). V tkivih so ugotovili tudi akumulacijo resveratrola, zato ni nujno, da je učinkovanje trans-resveratrola v telesu pogojeno z njegovo koncentracijo in zaznavo v krvni plazmi (Patel in sod., 2010).

Pojavlja se tudi vprašanje interakcije resveratrola in ostalih sestavin v hrani. Raziskave so dokazale, da resveratrol in elagična kislina sinergistično omogočita apoptozo rakavih celic, resveratrol in kvercetin pa skupaj ščitita celice pred beta amiloidnimi plaki (Conte in sod., 2003; Mertens-Talcott in Percival, 2005). Ti vplivi lahko pojasnijo, zakaj imajo nekatere spojine v hrani, že v veliko nižjih koncentracijah, pozitiven vpliv na zdravje organizma (Baur in Sinclair, 2006).

2.2.5 Ostali antioksidanti

Vitamini delujejo kot antioksidanti in prostim radikalom oddajajo elektrone ali vodikove ione. Tako jih stabilizirajo in zmanjšajo količino oksidativnih poškodb (Thompson in sod., 2008: 386–412). Askorbinska kislina ali vitamin C je pomemben vodotopen antioksidant v človeškem telesu. Ime askorbinska kislina pojasnjuje njegovo antiskorbutno delovanje, saj je zgodovinsko gledano vitamin C povezan predvsem z zdravljenjem skorbuta pri pomorščakih, ki so na dolgih potovanjih malokrat uživali hrano, ki je vsebovala dovolj tega vodotopnega vitamina. V telesu je vitamin C v ravnovesju z dehidroaskorbinsko kislino, ki ima popolno vitaminsko aktivnost. Vitamin E je najpomembnejši antioksidant, ki je topen v maščobah. V naravi obstaja osem oblik vitamina E. Štiri oblike so tokoferolne in štiri tokotrienolne (nenasičeni tokoferoli). Alfa tokoferol je tokotrienol in je najpogostejši tokoferol ter pri živalih predstavlja kar 90 % vseh oblik vitamina E. Najpomembnejše delovanje se kaže pri zaščiti membranskih lipidov celic (Kočevar Glavač, 2013).

Minerali (Se, Cu, Zn, Mn) delujejo kot antioksidanti ali kot kofaktorji encimov, ki pretvarjajo radikale v manj škodljive spojine, ki se nato izločijo iz telesa (Thompson in sod., 2008: 386–412).

Karotenoidi so kemijsko terpenoidne spojine iz osmih izoprenskih enot. Razdelimo jih na karotene in ksantofile, hidrosilirane derivate karotenov. So lipofilne spojine, zato se v telesu lahko koncentrirajo v maščobnih komponentah (membrane, lipoproteini, adipociti) in preprečujejo oksidacijo lipidnih molekul, membran celic in holesterola LDL. Zaradi prisotnih konjugiranih dvojnih vezi v njihovi kemijski strukturi, karotenoidi delujejo kot antioksidanti. Pomemben del predstavlja tudi provitaminsko delovanje alfa in beta

karotena ter beta kriptoksantina, saj se iz njih tvori vitamin A (Geissler in Powers, 2009: 89–106; Kočvar Glavač, 2013; Thompson in sod., 2008: 386–412).

Karotenoidi pri fotosinteznih procesih omogočajo absorpcijo in prenos svetlobne energije na klorofil. Delujejo tudi zaščitno pred premočno osvetlitvijo, zato je več karotenoidov prisotnih v listih, ki so neposredno izpostavljeni sončni svetlobi (Tracewell in sod., 2001; Yang in sod., 2002).

Nekatere endogene antioksidante, kot sta alfa lipoična kislina in koencim Q10, lahko v telo vnesemo tudi s hrano (Durrani in sod., 2010; Pravst in sod., 2010).

2.2.6 Prooksidativno delovanje antioksidantov

Antioksidanti v določenih razmerah lahko delujejo tudi kot prooksidanti. To pomeni, da spodbujajo nastajanje prostih radikalov. Visoke koncentracije antioksidantov in prisotnost kovinskih ionov lahko celo povečajo količino nastalih prostih radikalov. Prevelike količine antioksidantov so nezaželene, saj ROS preprečujejo, da delujejo kot signalne molekule in spodbudijo telo k sintezi endogenih, njemu lastnih, antioksidantov (Devasagayam in sod., 2004; Raza in John, 2005; Wätjen in sod., 2005). To je tudi razlog, da nekatere raziskave ugotavljajo škodljive posledice vnašanja velikih količin antioksidantov v telo (Bergström in sod., 2012), predvsem s pomočjo prehranskih dopolnil.

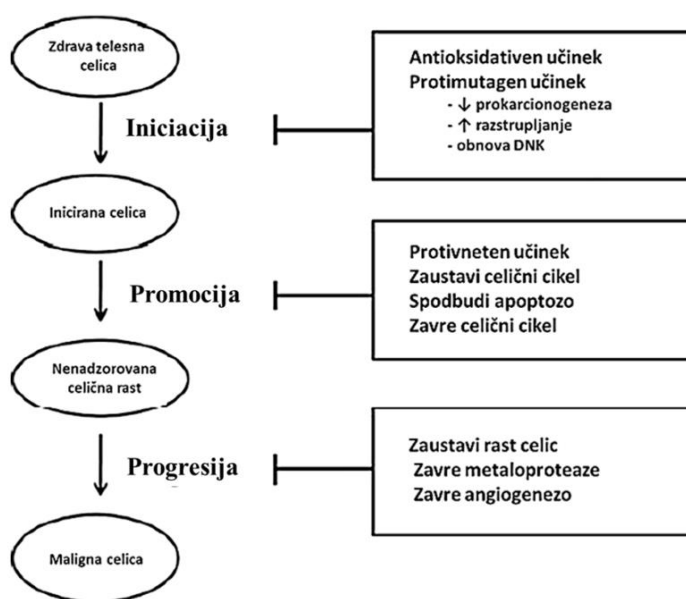
Študije antioksidantov so pogosto opravljene *in vitro*, kar ne odraža nujno njihovega delovanja *in vivo* (Yordi in sod., 2012: 41). Ob zaužitju je namreč njihovo delovanje odvisno od absorpcije, metabolizma in razporejanja v tkivih ter celicah. Prav tako študije uporabljajo kemijsko čiste antioksidante, ki ne delujejo nujno na enak način kot antioksidanti v živilih. Antioksidanti so v živilih vezani znotraj naravne prehranske matrike (Bouayed in Bohn, 2010). Epidemiološke študije na ljudeh, ki ugotavljajo pozitivne vplive fitokemikalij na telo, so večinoma opravljene z uporabo pravih živil. Fitokemikalije imajo *in vivo* poleg antioksidativnega delovanja tudi druge naloge in vloge. Celotni njihovi metaboliti imajo lahko pomembnejšo biološko vlogo in aktivnost kot izvirne spojine, pri čemer ima pomembno vlogo tudi črevesna mikrobiota (Buttriss in sod., 2002; Cardona in sod., 2013). Poleg tega nekatere študije ugotavljajo, da je prooksidativni učinek antioksidantov v telesu lahko celo koristen, saj z vplivom na procese apoptoze in oksidativne poškodbe DNK predstavlja potencialen mehanizem boja telesa proti rakavim celicam (Galati in O'Brien, 2004; Lambert in Elias, 2010).

2.2.7 Vnos fenolnih spojin v telo in vpliv na zdravje

Fenolne spojine so naravne spojine, prisotne v rastlinski hrani. Največ jih vsebujejo sadje, zelenjava, žita in različni napitki (Scalbert in sod., 2005). Z njimi v telo vnesemo največji delež antioksidantov. S prehrano jih vnesemo približno 10-krat več kot vitamina C in 100-krat več kot vitamina E in karotenoidov (Scalbert in Williamson, 2000).

Pozitivne učinke fenolnih spojin pripisujejo njihovi antioksidativni vlogi (Heim in sod., 2002), vendar zaradi različnih učinkov na telo to ni edini mehanizem njihovega delovanja (Cardona in sod., 2013). Ker prispevajo največji delež k antioksidativnim lastnostim hrane, lahko predstavljajo pomemben naravni vir antioksidantov (Parr in Bolwell, 2000). Epidemiološke študije dokazujejo pozitivno korelacijsko povezanost med uživanjem antioksidantov in zmanjšano smrtnostjo ter možnostjo za razvoj različnih bolezni (Devasagayam in sod., 2004), tudi rakavih (Sl. 6) (Dai in Mumper, 2010).

Dve glavni skupini fenolnih spojin sta flavonoidi in fenolne kisline. Z normalno zdravo hrano v telo vnesemo do 2 g flavonoidov dnevno (Havsteen, 2002). Najbolj pogosti flavonoidi so kvercetin, flavonol, prisoten v čebuli in jabolkih; katehin, flavanol, prisoten v čajih in nekaterih sadežih; hesperetin, flavanon, značilen za citrusce; cianidin, antocianin rdečih sadežev; daidzein, glavni izoflavon soje in proantocianidini, ki prispevajo k trpkosti in grenkosti nekaterih sadežev. Ena glavnih fenolnih kislin je klorogenska kislina, najbolj znana po prisotnosti v kavi (Bennick, 2002).



Slika 6: Potencialni mehanizem delovanja polifenolov pri preprečevanju razvoja rakavega obolenja. Polifenoli lahko med celotnim razvojnim stadijem obolenja vplivajo na potek razvoja rakavega obolenja (prirejeno po Dai in Mumper, 2010: 7324)

Fenolne spojine lahko prispevajo h grenkobi, trpkosti, barvi, okusu, vonju in oksidativni stabilnosti hrane (Pandey in Rizvi, 2009). Tanini prispevajo k trpkosti, saj se vežejo na proteine v slini. Z vezavo na zaužite beljakovine in inhibicijo delovanja prebavnih encimov so za organizem lahko rahlo strupeni (Crozier in sod., 2006).

Raziskave so pokazale, da preveliko uživanje fenolnih spojin lahko privede do nastanka različnih stranskih učinkov, kot so povečanje oksidativnega stresa, mutagenosti, pospeševanja razvoja raka, vpliva na delovanje ščitnice in absorpcijo nekaterih mineralov (železa) (Scalbert in sod., 2005). Tako kot je tekom evolucijskega razvoja antioksidativni obrambni sistem koevolviral s sistemom oksidativnega stresa, so se pri nekaterih rastlinojedih živalih in ljudeh v slini pojavile beljakovine, bogate s prolinom in histatini. Te vežejo in aktivirajo nekatere polifenole (tanine) ter preprečijo njihovo potencialno škodljivo delovanje (Bennick, 2002).

2.3 POMEN ANTIOKSIDANTOV ZA RASTLINE

Fenolne spojine rastlinam omogočajo obrambo proti okoljskim patogenom, herbivorom, virusom in abiotskemu stresu. Preprečujejo oksidacijske procese v celicah, saj v njih že tekom normalnega metabolizma nastajajo ROS. Pomembno vlogo imajo tudi pri razvoju, vplivajo na izražanje genov, delujejo kot atraktanti za oprasovalce, mikrobe in živali, ki raznašajo plodove. Znotraj tkiv in med rastlino ter okoljem delujejo kot signalne molekule. Fenolne spojine lahko rastlina izloča v svojo okolico in s tem preprečuje rast ostalim rastlinam, kar imenujemo alelopatija (Bhattacharya in sod., 2010; Brunetti in sod., 2013; Li in sod., 2010). Njihova glavna vloga je zaščita rastlin pred različnimi stresorji, saj so Ferreres in sod. (2011) odkrili, da je v listih 80 % vseh flavonoidov, ki delujejo antioksidativno, prisotnih v epidermalnih celicah in palisadnem parenhimskem tkivu adaksialne strani lista.

Rastline se branijo proti različnim stresorjem s konstituiranimi in induciranimi obrambnimi mehanizmi. Fenolne spojine, ki so v rastlini prisotne že pred pojavom stresorja se imenujejo fitoanticipini, medtem ko med fitoaleksine sodijo tiste fenolne spojine, ki jih rastline sintetizirajo v odgovor na stresor (Cécile in sod., 2012). Pričakovati gre, da imajo rastline, ki so izpostavljene različnim stresorjem višjo vsebnost antioksidantov (Agati in sod., 2012).

2.3.1 Sezonske spremembe v vsebnosti antioksidantov v rastlinah

Različne fenolne spojine imajo vlogo uravnavanja rasti in razvoja vegetativnih in reproduktivnih delov rastline. Nadzemni in podzemni deli rastline so izpostavljeni različnim stresorjem iz okolja, kar posledično pomeni tudi različen nabor sekundarnih metabolitov, ki so odgovorni za odpornost proti stresorjem. Raziskave so pokazale, da se tekom različnih razvojnih stadijev posameznega rastlinskega tkiva vsebnost fenolnih spojin spreminja (Ozeker in Kara, 1999).

2.4 RASTLINE KOT VIR ANTIOKSIDANTOV

Pred razvojem moderne medicine in farmacije so stare civilizacije za zdravljenje bolezni uporabljale različne naravne pripravke, ekstrakte, izvlečke, tinkture, mazila in čaje. Egipčanski Ebers Papyrus, iz leta 1550 pred našim štetjem, je opisoval 700 različnih možnosti uporabe rastlin v zdravstvene namene (American ..., 2007; Arab, 2000). Čeprav je v sodobni medicini 25 % vseh zdravil pridobljenih iz rastlin, 80 % svetovne populacije še vedno posega po tradicionalnih načinih zdravljenja, vključno z uporabo naravnih rastlinskih učinkovin (Newman in Cragg, 2007; Soetan in Aiyelaagbe, 2009).

2.4.1 Prisotnost antioksidantov v različnih tkivih dresnikov

Dresniki vsebujejo veliko različnih sekundarnih metabolitov z antioksidativnim delovanjem (Ogwuru in Adamczeski, 2000), njihove glavne aktivne sestavine pa so stilbeni in kinoni (Sl. 7) (Frantíka in sod., 2013). Raziskovalci so v podzemnih in nadzemnih delih dresnikov določili podobne bioaktivne sestavine, razlike pa so opazili v vsebnosti teh snovi med organi (listi, stebila, korenike in socvetja). Specifične razlike so prisotne tudi med taksoni, na pojavljanje določenih metabolitov pa vpliva tudi geografska lega rasti rastlin (Fan in sod., 2010; Piola in sod., 2013; Vrchotová in sod., 2010). Najbolj proučene so sicer korenike japonskega dresnika, vendar tudi korenike sahalinskega in češkega dresnika ter listi, stebila in socvetja predstavljajo potencialen vir naravnih bioaktivnih antioksidantov (Beňová in sod., 2008; Huang in sod., 2008).

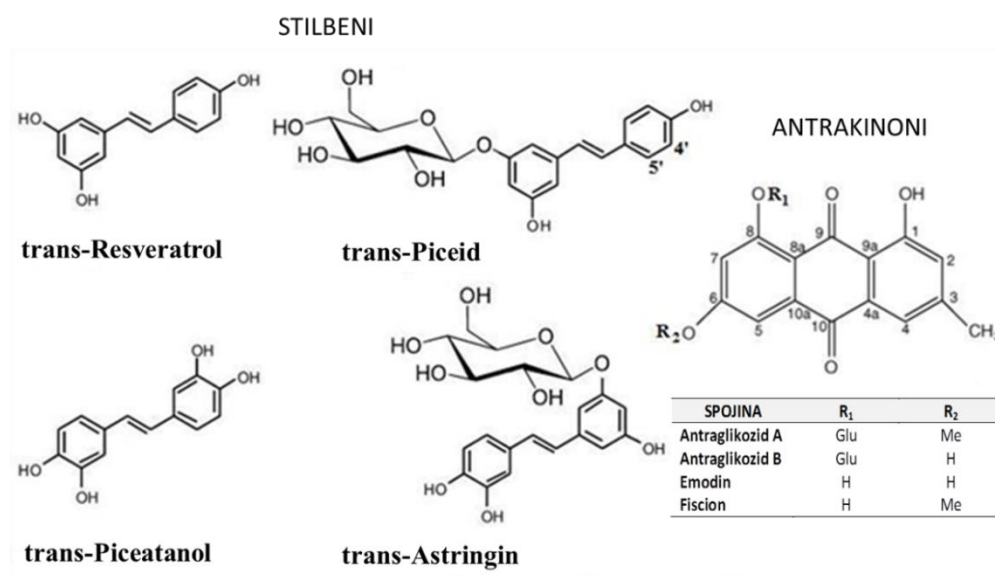
Prisotnost mikoriznih povezav v koreniki češkega dresnika poveča količino resveratrola in njegovih derivatov (Fuiyosh in sod., 2005; Harley in Harley, 1987). Glive vplivajo tudi na razmerje med resveratrolom in njegovimi glukozidi. Ker se glukoza iz rastline prenaša do glivnega simbionta, da le-ta lahko pokrije svoje energijske potrebe za fiksacijo dušika, ostane manj glukoze na voljo za tvorbo glukozidov (Kovářová in sod., 2010). Iz tega bi lahko sklepali, da bo češki dresnik vseboval najvišjo vsebnost resveratrola in njegovih derivatov, saj spadata japonski in sahalinski dresnik med rastline brez mikoriznih povezav

(Fuiyosh in sod., 2005; Harley in Harley, 1987). Glede na objavljene podatke najboljši vir resveratrola vseeno predstavlja korenika japonskega dresnika (Frantík in sod., 2013).

Korenike dresnikov so vir stilbenov, medtem ko nadzemni deli vsebujejo več flavonolov (Vrchotová in sod., 2007), med bolj prepoznavnimi pa so tudi derivati kavne kisline (Vrchotová in sod., 2005). V nadzemnih delih rastline so prisotni tudi kinoni in stilbeni, vendar v nižjih koncentracijah kot v korenikah (Vaheer in Koel, 2003). Sahalinski dresnik vsebuje do 70-krat nižjo koncentracijo stilbenov kot korenike japonskega dresnika (Vrchotová in sod., 2005). Piceida je lahko v tkivu 10-krat več kot prostega resveratrola (Frantík in sod., 2013; Regev-Shoshani in sod., 2003; Su in sod., 2013). V korenikah naj bi bila najvišja vsebnost stilbenov jeseni, ko je tudi njihova masa največja, v nadzemnem delu rastline pa spomladi. Vsebnost stilbenov v nadzemnem delu dresnikov je v primerjavi s korenikami zelo nizka (Frantík in sod., 2013).

Glede na kvalitativno in kvantitativno vsebnost antioksidantov je češki dresnik bolj podoben japonskemu (Piola in sod., 2013). V vsebnosti stilbenov, kot sta piceatanol in astringin, lahko češki dresnik celo prekaša japonski dresnik (Benová in sod., 2008). Koreniko japonskega dresnika lahko okarakteriziramo po prisotnosti stilbenov in nekaterih antrakinonov, koreniko sahalinskega dresnika pa po vsebnosti antrakinonov (Inoue in sod., 1992; Yi in sod., 2007) in fenilpropanoidnih glukozidov (Fan in sod., 2010).

Mladi poganjki vsebujejo podobne sestavine kot korenike, vendar so le-te v njih prisotne v nižjih koncentracijah (Vrchotová in sod., 2007).



Slika 7: Kemijska struktura glavnih antioksidantov v dresnikih: stilbeni in antrakinoni (prirejeno po Benová in sod., 2008: 2404; Thermo ..., 2012: 43)

Ekstrakt listov sahalinskega dresnika bi se v prihodnosti lahko uporabljal za nadzor različnih rastlinskih bolezni, saj ima fungicidno delovanje, kar so raziskovalci pripisali visoki vsebnosti katehinov (Hromádková in sod., 2010; Konstantinidou-Doltsinis in Schmitt, 1998).

Zaradi velike količine biomase, ki jo dresniki letno proizvedejo, njihove razširjenosti, invazivnosti in vsebnosti stilbenov ter ostalih sekundarnih metabolitov, predstavljajo odličen vir za ekstrakcijo antioksidantov. Na en hektar lahko proizvedejo od 20 do 30 ton rastlinske biomase, ki vsebuje več kot 80 kg stilbenov (Fan in sod., 2010; Frantíka in sod., 2013).

2.5 SPLOŠEN PREGLED UPORABLJENIH RAZISKOVALNIH METOD

2.5.1 Določanje celotne antioksidativne učinkovitosti (AOU)

Antioksidativna učinkovitost (AOU) je sposobnost določene sestavine ali kompleksne mešanice, da prepeči oksidativne poškodbe, ki jih povzročajo prosti radikali. V znanstveni literaturi je zaslediti tudi izraza antioksidativna aktivnost ali antioksidativni potencial (Borar in sod., 2011; Ghiselli in sod., 2000; Sreeramulu in sod., 2009). Raziskujemo lahko AOU različnih prehranskih izdelkov, sadja, zelenjave, čajev in celo telesnih tekočin, kot je krvna plazma (Roginsky in Lissi, 2005).

Za merjenje AOU kemijsko čistih snovi ali kompleksnih vzorcev obstajajo številne metode, ki temeljijo na različnih mehanizmih merjenja učinkovitosti antioksidantov. S temi metodami se lahko preverja učinkovitost lovljenja kisikovih in hidroksilnih radikalov, vpliv na zmanjševanje lipidnih peroksilnih radikalov, zmanjševanje lipidne peroksidacije in sposobnost kelacije prostih kovinskih ionov (Apak in sod., 2013; Huang in sod., 2005).

Število raziskav v povezavi s to tematiko je v zadnjih dvajsetih letih močno naraslo, saj so raziskave pokazale obratno sorazmerno povezavo med vnosom antioksidantov v telo in razvojem z oksidativnim stresom povzročenih bolezni. Prav tako je uporaba rastlin z visoko AOU smiselna v živilski industriji, saj omenjene snovi služijo kot naravni konzervansi, ki podaljšajo trajnost nekega živila (Huang in sod. 2005; Negi, 2012; Prior in sod., 2005; Sagdic, 2011; Stratil in sod., 2006).

Način merjenja AOU je lahko posreden ali neposreden. Neposredne metode proučujejo antioksidativen vpliv antioksidantov pri oksidativno povzročenih poškodbah na bioloških sistemih, kot so lipidne membrane, posamezni lipidi, DNK in krvna plazma (Roginsky in Lissi, 2005). Pričakuje se, da bolj kot je modelni sistem preverjanja AOU podoben resničnemu biološkemu stanju, pa naj gre za *in vivo* (biološke membrane) ali *in vitro*

(hrana, ki vsebuje lipide) poskuse, bolj so rezultati poskusov relevantni (Kristinova, 2008). Metode posrednega merjenja AOU temeljijo na merjenju redukcijske sposobnosti antioksidantov za oddajo elektrona in se imenujejo metode ET (electron transfer), med katere uvrščamo Folin-Ciocaltau metodo, FRAP, DPPH, ABTS in TEAC. Druga skupina so metode, ki temeljijo na merjenju sposobnosti oddajanja vodikovega atoma in se imenujejo metode HAT (hydrogen atom transfer), kamor sodita metodi ORAC in TRAP (Huang in sod., 2005). Posredne metode pogosto merijo sposobnost antioksidantov za lovljenje stabilnih, obarvanih in sintetičnih prostih radikalov. Kritiki takega načina merjenja AOU pravijo, da imajo te metode malo skupnega z dejanskim stanjem v bioloških sistemih, kjer največ škode povzročajo prosti kisikovi radikali in prosti kovinski ioni. Tu gre za merjenje sposobnosti oddajanja elektrona ali vodikovega protona pod pogoji, ki so zelo drugačni od tistih *in vivo* (Roginsky in Lissi, 2005). Kritiki opozarjajo na nerelevantnost rezultatov, saj procesi temeljijo zgolj na kemijskih reakcijah *in vitro*, prav tako se ne upošteva biodostopnosti teh snovi, stabilnosti *in vivo*, reaktivnosti *in situ* in zadrževalnega časa snovi v bioloških sistemih (Huang in sod., 2005). Študija, ki so jo izvedli Serrano in sod. (2007) celo predvideva, da meritve AOU v hrani pokažejo podcenjene vrednosti glede na resnično antioksidativno delovanje v bioloških sistemih. *In vitro* testi so lahko primerni za primerjavo različnih prehranskih izdelkov, toda izmerjena vrednost AOU hrane ni nujno primerljiva z aktivnostjo v biološkem sistemu (Mermelstein, 2008).

V telesu so prisotni tudi encimi, ki delujejo antioksidativno. Antioksidanti lahko delujejo tudi kot prooksidanti. Poleg tega je vprašanje, kakšna je biorazpoložljivost antioksidantov ob zaužitju, kot tudi, koliko jih sploh preživi prebavo. Telo je kompleksen sistem, kjer antioksidanti, ki vplivajo na zmanjševanje količine prostih radikalov, predstavljajo le del obrambnega sistema. Večina mehanizmov je med seboj povezanih, zato so pogosto prisotne sinergistične ali antagonistične povezave (Chaudiere in Ferrari-Iliou, 1999; Huang in sod., 2005; Mermelstein, 2008; Serrano in sod., 2007; Snell in sod., 2012). Upoštevati je potrebno tudi genetske vplive, vplive okolja in mikrobioto posameznika. Poleg tega še vedno ni povsem jasno, ali je oksidativni stres res primarni dejavnik pri razvoju bolezni (Cardona in sod., 2013; Mermelstein, 2008; Rahman, 2007).

Obstaja veliko število metod, rezultati med metodami in celo znotraj posamezne metode pa so si pogosto nasprotujoči. Veliko metod ima variabilno končno točko meritve in vsak posameznik uporablja različne kriterije za določitev te končne točke. Prav tako so metode premalo standardizirane, zato je med posameznimi laboratoriji pri uporabi različnih koncentracij in količin reaktantov prisotna velika variabilnost. Poleg tega so razlike tudi posledica uporabe različnih standardov za pripravo umeritvenih krivulj. Za primerjave rezultatov med laboratoriji bi bilo potrebno standardizirati potek izvedbe različnih metod in določiti metode, ki podajo najbolj relevantne rezultate. Korak v to smer je bil že storjen, saj so že leta 2004 v Orlandu, na prvem mednarodnem kongresu o metodah, ki določajo

vsebnost antioksidantov, razpravljali o tem, kaj je bilo na to temo že storjeno in kaj bi bilo v prihodnosti še potrebno storiti (Frankel in Meyer, 1941; Prior in sod., 2005; Roginsky in Lissi, 2005; Stratil in sod., 2006).

Najboljše raziskave preverjanja AOU so z uporabo živalskih modelov in na ljudeh, vendar so te vrste raziskav dolgotrajne, težavne in drage. Prihodnost je v ugotavljanju biološke dostopnosti in stabilnosti antioksidantov ter v preverjanju AOU s pomočjo celičnih kultur (Mermelstein, 2008). Večinoma se zaradi preprostosti in hitreje izvedbe celotnega poskusa vseeno uporablja posredne metode merjenja AOU, kar je tudi v interesu živilske in farmacevtske industrije.

Metoda ORAC je bila predlagana za metodo, ki bi omogočala rutinske analize AOU hrane in farmacevtskih proizvodov, saj preverja aktivnost lipofilnih in hidrofilnih antioksidantov. Temelji na ugotavljanju sposobnosti antioksidantov za preprečevanje oksidacije zaradi delovanja peroksilnih radikalov – najbolj pogostih radikalov v človeškem telesu (Awika in sod., 2003; Prior in sod., 2005; Sun in Tanumihardjo, 2007).

Leta 2007 je Ministrstvo za kmetijstvo Združenih držav (USDA) sprostilo prvo bazo podatkov o AOU izbranih prehranskih izdelkov. Zbirka je prikazovala vrednosti ORAC hidrofilnih in lipofilnih antioksidantov ter celokupno vrednost ORAC v enotah ekvivalentnih troloksu ($\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$). Prikazani so bili tudi podatki za skupno vsebnost fenolnih snovi, vendar v enotah ekvivalentnih galni kislini ($\text{mg GAE}/100\text{ g}$). Dopolnitev je zbirka doživela leta 2010 in vsebovala 326 različnih živil. Leta 2012 je USDA ukinila zbirko, saj še ni dovolj raziskav, ki bi uspešno dokazale povezavo med rezultati testov AOU in vplivom analiziranih živil na človekovo zdravje. Težava je v tem, da metoda ORAC preverja le sposobnost antioksidantov za zmanjševanje prostih radikalov, zato so bili objavljeni rezultati analiz s strani ljudi pogosto narobe interpretirani. Živilska in farmacevtska industrija sta podatke začeli izkoriščati za pospeševanje prodaje svojih izdelkov. Rezultati *in vitro* testov ne morejo biti preneseni na *in vivo* učinke, saj imajo antioksidanti v telesu številne vloge, veliko teh pa ni povezanih s sposobnostjo inhibicije prostih radikalov. Metabolične poti delovanja bioaktivnih sestavin v hrani še vedno niso popolnoma raziskane, prav tako tudi njihovo ne-antioksidativno delovanje. Bioaktivne sestavine v hrani imajo v organizmu številne mehanizme delovanja in le eden izmed njih je njihovo antioksidativno delovanje (Haytowitz in Bhagwat, 2010).

2.5.1.1 Metoda ABTS

Metoda temelji na ugotavljanju sposobnosti antioksidantov, da reagirajo s stabilnimi kationskimi radikali $\text{ABTS}^{+\cdot}$, ki jih ustvarimo z dodatkom različnih oksidantov, in jih nato pretvorijo nazaj v reducirano obliko. Ker je ABTS v reducirani obliki brezbarven, kot

radikal pa zeleno-modre barve, lahko spremembo razmerja med oksidiranim in reduciranim reagentom ABTS ter s tem spremembo barve reagenta spremljamo spektrofotometrično z merjenjem absorbance (A) (Miller in sod. 1996; Pennycooke in sod., 2005; Prior in sod., 2005; Re in sod, 1999; Roginsky in Lissi, 2005).

Antioksidanti imajo sposobnost lovljenja prostih radikalov. Pri metodi ABTS antioksidanti reagirajo s stabilnimi, intenzivno obarvanimi, kationskimi radikali $ABTS^{++}$ in jih reducirajo. Raztopina z radikali $ABTS^{++}$ se lahko pripravi z dodatkom različnih oksidantov, med katerimi so najpogostejši manganov dioksid (MnO_2), kalijev persulfat ($K_2S_2O_8$) in različni encimi (HRP) (Prior in sod., 2005). Absorpcijski maksimumi radikalov $ABTS^{++}$ so pri 415, 645, 734 in 815 nm. Za spremljanje reakcije med antioksidanti in radikali $ABTS^{++}$ se uporabljata valovni dolžini 415 in 734 nm (Cano in sod., 2000).

Radikali $ABTS^{++}$ po navadi v okviru 30 min reagirajo s prisotnimi antioksidanti (Prior in sod., 2005). Slabost te metode je, da so radikali $ABTS^{++}$ slabo selektivni pri reagiranju z molekulami, ki so donorji vodika. Radikali $ABTS^{++}$ reagirajo z vsemi hidroksilnimi aromatskimi obroči ne glede na njihovo antioksidativno sposobnost (Roginsky in Lissi, 2005). Metoda zato v resnici meri sposobnost spojin za reakcijo z radikali $ABTS^{++}$. Rezultati te metode se pogosto izražajo kot antioksidativna učinkovitost v ekvivalentih troloksa (TEAC) ali kot sposobnost lovljenja prostih radikalov, ki je izražena v % (Pennycooke in sod., 2005; Prior in sod., 2005; Re in sod, 1999; Roginsky in Lissi, 2005).

Pri merjenju absorbance (A) velja Lambert-Beerov zakon (Enačba 4), pri katerem je vrednost A odvisna od koncentracije raztopine in dolžine poti svetlobe, ki jo le-ta opravi pri prehodu skozi kiveto.

$$A = \epsilon \times c \times l \quad \dots (4)$$

Oznake ϵ = molarni absorpcijski koeficient ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), c = koncentracija raztopine (mol L^{-1}) in l = dolžina poti svetlobe (cm) (Tam in Zardecki, 1982).

2.5.1.2 Luminescenčna metoda

Pojem luminescenca (sinonim luminiscenca) opisuje sevanje za snovi značilne svetlobe brez oddajanja toplote. Poznanih je več različnih vrst luminescenc (bio-, foto-, radio- in kemiluminescenca). Kemiluminescenca je proces, ki se odvija pri pretvorbi kemične energije v svetlobno (Slovenski ..., 2012). Reakcija omogoča prenos elektronov v vzbujeno stanje, pri njihovem vračanju v osnovno stanje pa pride do oddajanja fotonov (Dodeigne in sod., 2000). Obstajajo različne luminescenčne metode, ki omogočajo merjenje AOU bioloških vzorcev. Razlikujejo se predvsem v uporabi različnih reagentov, ki

luminescirajo, in različnih oksidacijskih aktivatorjev (Jiménez in Navas, 2002; Navas in Jiménez, 2007; Roda in sod., 1998). Poleg luminola se pri luminescenčni metodi lahko uporabljajo tudi lucigenin in različni bioluminescenčni proteini. Luminol je sprejemljiv zgolj pri merjenju AOU z uporabo enega oksidanta. Intenzivnost emisije luminola je namreč odvisna od tipa uporabljenega oksidanta. Težavo glede relevantnosti rezultatov lahko predstavlja tudi to, da aktiviran produkt luminola že sam po sebi kaže redoks aktivnost (Prior in sod., 2005).

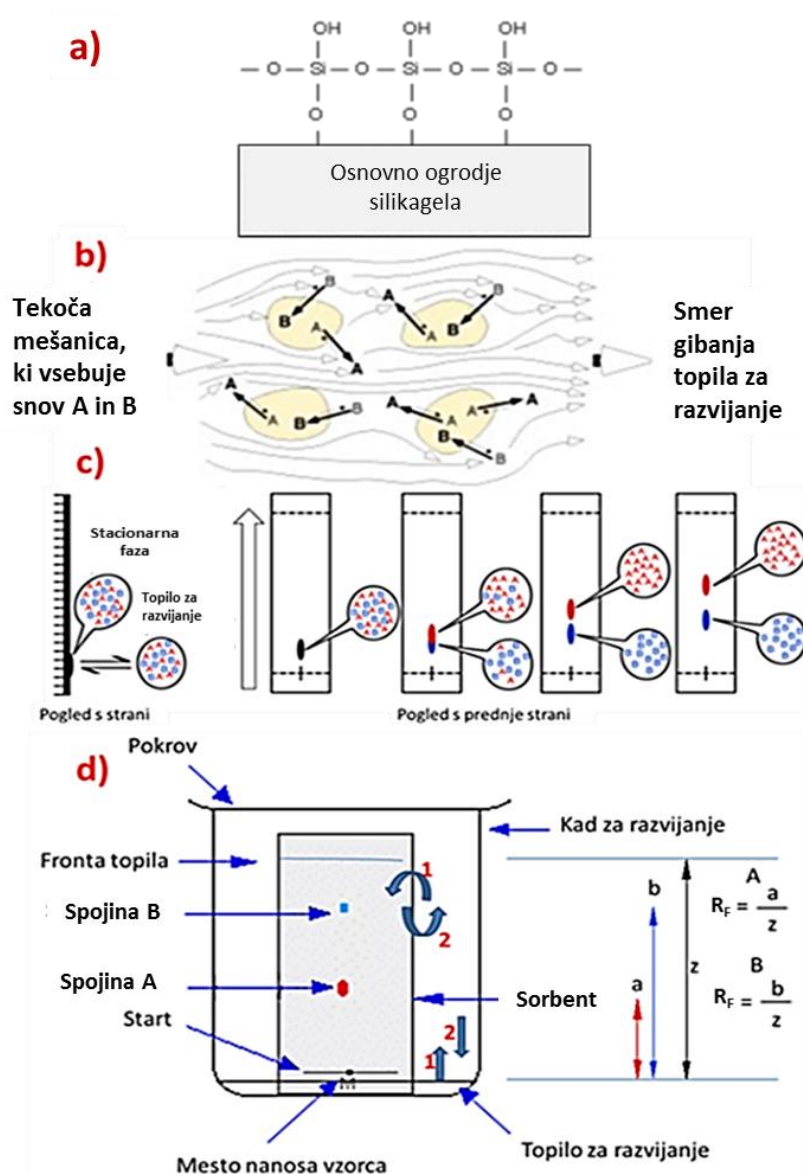
Kemiluminescenčno reakcijo z uporabo luminola je prvič opisal Albrecht leta 1928 (Albrecht, 1928). Luminol, ki ob prisotnosti oksidantov preide v vzbujeno stanje, ob vračanju nazaj v osnovno stanje oddaja modro svetlobo z vrhom pri valovni dolžini 425 nm (Girotti in sod., 2010). Vir radikalov, ki delujejo kot oksidanti, predstavlja H_2O_2 . Reakcijo katalizira dodana hrenova peroksidaza (HRP) (Girotti in sod., 2010). Superoksidni radikalski anioni oksidirajo luminol. Tvorijo se radikali luminola, ki nato vplivajo na nastanek endoperoksida. Ta se razgradi do elektronsko vzbujenega dianion 3-aminofthalata. Dianion 3-aminofthalat luminescira, ko se iz vzbujenega stanja vrača nazaj v osnovno stanje. Prisotni antioksidanti zavrejo to reakcijo, zato kemiluminescenčni signal, po dodatku dovolj velikega volumna vzorca z antioksidativno aktivnostjo, pade ali doseže vrednost 0, saj antioksidanti preprečijo nastajanje radikalov luminola. Po določenem času se signal zopet začne povečevati, saj ponovno začne prevladovati proces oksidacije luminola. Čez čas se v reakcijski mešanici vsi antioksidanti, prisotni v dodanem ekstraktu, porabijo, zato signal doseže ravnovesno vrednost, t. i. emisijski plato. Takrat je nastajanje oksidiranih luminolovih intermediatov konstantno. Z merjenjem časovne zakasnitve v luminescenci luminola lahko posredno ugotovljamo AOU dodanega ekstrakta (Dodeigene in sod., 2000; Girotti in sod., 2010; Jiménez in Navas, 2002; Pogačnik in Poklar Ulrih, 2012; Thorpe in Kricka, 1986). Izmerjen časovni zamik v luminescenci je sorazmeren z AOU vzorca (Whitehead in sod., 1992).

2.5.2 Tankoplastna kromatografija (TLC)

Tankoplastna kromatografija (TLC) je kromatografska tehnika, ki se zaradi svoje vsestranskosti, hitrosti izvedbe in cenovne ugodnosti, pogosto uporablja v biokemiji, molekularni biologiji in pri raziskovanju rastlin, za lokalizacijo ter analizo bioaktivnih sestavin. Pri fitokemijskih raziskavah je to običajno prva tehnika, ki nam poda osnovne informacije o rastlinskem vzorcu, saj omogoča ločevanje, določevanje, kvantifikacijo in izolacijo rastlinskih sestavin (Sherma, 2000; Thin-Layer ..., 2014; Waksmundzka-Hajnos in sod., 2008).

Pri TLC imamo poleg topila za razvijanje še trdno stacionarno fazo (sorbent). Silikagel (Sl. 8a) je najpogosteje uporabljen sorbent, ki vsebuje silicij z elektropozitivnim in kisik z

elektronegativnim značajem. Bolj polarne bodo molekule, ki jih bomo želeli ločiti, večja bo njihova afiniteta za adsorpcijo na sorbent (Thin-Layer ..., 2014). Sorbent je nanesen na različne nosilce, ki so lahko plastični, stekleni ali aluminijasti (Prošek in Pukl, 1991: 9; Thin-Layer ..., 2014).



Slika 8: Shematski prikaz ločbe s tankoplastno kromatografijo. a) Struktura silikagela. b) Dinamično ravnovesje med molekulami A in B nanesenega vzorca ter topilom za razvijanje in stacionarno fazo. c) Molekule A imajo glede na molekule B večjo afiniteto za vezavo na stacionarno fazo (sorbent). Zaradi razlik v hitrosti potovanja molekul A in B pride do ločbe molekul na kromatografski plošči, kar opazimo kot prisotnost lis na različnih delih kromatografske plošče. d) Proces razvijanja kromatografske plošče in izračun retencijskega faktorja (R_F) ločenih lis. Puščici označeni s številko 1 prikazujeta evaporacijo topila za razvijanje, puščici označeni s številko 2 prikazujeta kondenzacijo. Topilo za razvijanje se po sorbentu premika v smeri od starta proti vrhu kromatografske plošče (prirejeno po: Cai, 2014; Clark, 2007; Thin-Layer ..., 2014: 94)

Pravilen izbor stacionarne faze in topila za razvijanje je ključen za uspešno ločbo zelenih snovi. Upoštevati je potrebno tudi polarnost, topnost, ionizabilnost, molekulska maso in obliko ter velikost analitov (Wall, 2005).

Vzorci lahko na kromatografsko ploščo nanašamo v točko ali v črto. Nanosi vzorcev na kromatografske plošče se gibljejo med 5 in 50 μL . Vzorce se po navadi nanaša 1 cm od spodnjega roba plošče. Nanašanje v črto omogoča boljšo ločljivost sestavin vzorca (Prošek in Pukl, 1991: 40; Wall, 2005). Nanašanje je lahko ročno, polavtomatsko ali avtomatsko, z uporabo kapilare ali nanašalne igle. Ker želimo, da je nanos čimbolj ozek, se med nanašanjem za sušenje vzorca pogosto uporablja vir toplega ali hladnega zraka. Sušenje lahko poteka tudi z uporabo inertnega plina, kot je dušik. Pri polavtomatskem nanašanju vzorcev se vzorci nanašajo s pršenjem brez dotika mikroinjekcijske igle (Basic ..., 2012; Reich in Schibli, 2006: 10 in 11; Thin-Layer ..., 2014).

Nanašanju vzorcev na ploščo sledi njeno razvijanje (Sl. 8b, 8c in 8d) z uporabo ustreznega topila za razvijanje v kromatografski kadi. Uporabljajo se različne kromatografske kadi, v katerih so plošče med razvijanjem v horizontalni ali vertikalni legi. Pri razvijanju kromatograma ima pomembno vlogo tudi plinska faza, ki je prisotna v kadi za razvijanje. Zaželeno je, da je plinska faza nasičena s parami topila za razvijanje, kar dosežemo s tem, da stene kadi za razvijanje obložimo s filtrirnim papirjem, po katerem zaradi kapilarne vleka potuje topilo za razvijanje. V tem primeru govorimo o nasičeni kadi, sicer pa o nenasičeni kadi (Prošek in Pukl, 1991: 12; Thin-Layer ..., 2014; Willfor in sod., 2006).

Ločene sestavine lahko opazujemo pod vidno ali UV-svetlobo. Določene sestavine so lahko že naravno obarvane, druge fluorescirajo. Z uporabo različnih derivatizacijskih (detekcijskih) reagentov lahko ločene spojine derivatiziramo v spojine, ki fluorescirajo ali absorbirajo svetlobo v vidnem oz. UV delu svetlobnega spektra. Derivatizacijske reagente na ploščo nanese tako, da ploščo z njimi popršimo ali jo vanje potopimo. Temu procesu pogosto sledi še segrevanje pri izbrani temperaturi, s čimer vplivamo na derivatizacijo. Poznamo specifične reagente, med katere uvrščamo naturstoff reagent A (NST), ki omogoča detekcijo flavonoidov, in splošne, med katere spada na primer reagent žveplova kislina-metanol. Splošni detekcijski reagenti omogočajo detekcijo skoraj vseh vrst organskih sestavin, s selektivnimi detekcijskimi reagenti pa lahko delno določimo tudi posamezne znane sestavine (Prošek in Pukl, 1991: 13; Waksmondzka-Hajnos in sod., 2008).

Velikost lis, ki se po razvijanju pojavijo na plošči, je odvisna od množine ločenih sestavin vzorca (Prošek in Pukl, 1991: 13 in 15). Semikvantitativno vrednotenje pri TLC poteka s primerjavo lis, nastalih pri ločbi vzorca in lis standardov. Iz znanih koncentracij standardov lahko sklepamo na količino snovi v vzorcu (Basic ..., 2012; Gorenjak, 2010). Rastopine standardov so čiste spojine ali mešanice večjega števila različnih spojin, ki se uporabljajo

kot referenčne snovi za določanje neznanih snovi v kompleksnih vzorcih (Reference ..., 2013).

Posamezne sestavine vzorca se razvrstijo v območju med startom – nanosom vzorca in mestom, do koder je pripotovala fronta topila. Ker so sestavine različno oddaljene od starta, jih lahko opredelimo z izračunanim zadrževalnim faktorjem (R_F) (IUPAC, 1993).

R_F predstavlja razmerje med težiščem izbrane lise in razdaljo, ki jo je prepotovalo topilo za razvijanje, merjeno od mesta nanosa vzorca. Poleg lastnosti sestavin vzorca, imajo vpliv na R_F tudi različna ekstrakcijska topila in topila za razvijanje ter relativna vlaga, temperatura, stacionarna faza kromatografske plošče, dolžina razvijanja plošče, ... (Ismail in Nielsen, 2010).

2.6 SPLOŠEN PREGLED UPORABLJENIH EKSTRAKCIJSKIH TOPIL

Ekstrakcija z uporabo različnih ekstrakcijskih topil je najbolj pogost način za izolacijo različnih rastlinskih antioksidantov. Učinkovitost ekstrakcije je zaradi prisotnosti antioksidantov z različnimi kemijskimi karakteristikami in različnimi polaritetami, ki določajo, ali bo določen antioksidant v topilu topen ali ne, v veliki meri odvisna od uporabljenega ekstrakcijskega topila (Sultana in sod., 2009).

Poleg uporabljenega topila je pri ekstrakciji pomembno tudi razmerje med topilom in vzorcem, število ponovljenih ekstraktov na istem vzorcu, velikost delcev biološkega materiala in mešanje med ekstrakcijo. Na količino ekstrahirane snovi vpliva tudi porazdelitveni koeficient, ki določa uspešnost ekstrakcije. Z večstopenjskim načinom ekstrakcije in uporabo manjše količine topila izboljšamo učinkovitost ekstrakcije, saj je le-ta odvisna od porazdelitvenega koeficienta in relativnega volumna topila. K učinkovitosti ekstrakcije prispeva tudi čas ekstrakcije, ki vpliva na količino in kemijsko stabilnost ekstrahiranih snovi. Ekstrakcije po navadi potekajo od 1 min do 24 ur. Dolgotrajen ekstrakcijski proces in uporaba visoke temperature lahko do neke mere izboljšata učinkovitost ekstrakcije. Po drugi strani je potrebno upoštevati vpliv teh dveh dejavnikov na oksidacijske procese v ekstraktih. To še posebno velja pri izolaciji občutljivih sestavin iz bioloških vzorcev, saj lahko pride do razpada določenih zaželenih sestavin in posledično slabše kakovosti pridobljenih ekstraktov. Pri daljših ekstraktacijah se zato pogosto dodajajo antioksidativni reagenti, ki stabilizirajo ekstrahirane biološke sestavine (Castañeda-Ovando in sod., 2009; Jerković in Radonić, 2009; Kobe in Pollak, 1970; Naczk in sod., 1992; Naczk in Shahidi, 2006; Sultana in sod., 2009; Van der Sluis in sod., 2005).

Topila za ekstrakcijo se v osnovi delijo na polarna in nepolarna. Uspešnost ekstrakcije antioksidantov je odvisna od polarnosti ekstrakcijskega topila, ki vpliva tako na

kvalitativno kot tudi kvantitativno vrednost antioksidantov v ekstraktih (Castañeda-Ovando in sod., 2009). Za ekstrakcije se lahko uporablja le eno topilo ali kombinacijo različnih topil v različnih volumskih razmerjih. Ekstrakti, ki jih pridobimo z različnimi topili po kvalitativni sestavi niso primerljivi med seboj (Oven in Vek, 2011; Willför in sod., 2006).

Etanol in voda spadata med polarna protična topila, butanol pa zaradi prisotne hidroksilne skupine uvrščamo med manj-polarna protična topila. Protična topila so tista topila, ki reagentom lahko posredujejo protone. Dielektrična konstanta nam pove, kako polarno je neko topilo (Wrasiati in sod., 2011), in je za vodo 79, za etanol 24 in za *n*-butanol 17,8. Med navedenimi topili je torej voda najbolj polarno, etanol srednje polarno in butanol najmanj polarno topilo (Dielectric ..., 2014).

Etanol je topilo z dobro sposobnostjo ekstrakcije antioksidantov iz rastlinskih tkiv. Spada med varna topila, zato so njegovi ekstrakti primerni za nadaljnje raziskave na živih organizmih (Dai in Mumper, 2010). Za ekstrakcijo antioksidantov iz rastlinskih tkiv se lahko uporablja tudi *n*-butanol (Aliyu, 2013; Borar in sod., 2011; Kasote in sod., 2011), ki je bil uspešno uporabljen za ekstrakcijo fenolnih spojin (Tumbas in sod., 2004). Butanol je topilo, ki je slabo topno v vodi (9,1 %) in ima nepolaren značaj, čeprav spada med alkohole (Topnost, 2014; Wade, 2014).

Topila, kot so metanol, etanol in aceton, se v kombinaciji z vodo pogosto uporabljajo za ekstrakcijo rastlinskih fenolov, ki v veliko primerih prispevajo največji delež k AOU v rastlinskih ekstraktih oz. tkivih (Dai in Mumper, 2010). Voda izboljša vstop topila v tkivo, iz katerega ekstrahirano določene sestavine. Omogoča ekstrakcijo bolj polarnih snovi, na primer fenolnih glikozidov (Willför in sod., 2006).

Etanol in kisline imajo sposobnost, da poškodujejo celično steno rastlinskih celic in omogočijo boljšo ekstrakcijo bioaktivnih sestavin celic (Čufar in sod. 2011; Wrasiati in sod., 2011). Polarnim topilom je zato pogosto dodana očetna kislina (0,1–3 %), kar izboljša ekstrakcijsko sposobnost topila. Kisla polarna topila omogočajo uspešno ekstrakcijo taninov in antocianinov (Hagerman, 1988; Naczk in Shahidi, 2006). Nakisana ekstrakcijska topila omogočajo tudi dodatno stabilizacijo ekstrahiranih antioksidantov (Musulin in King, 1936). Očetna kislina lahko deluje v vlogi topila in zaradi svoje polarnosti prispeva k uspešnosti ekstrakcije antioksidantov s fenolnim značajem. Je šibka kislina, in ko disociira, pospešuje tvorbo vodikovih vezi. To je ključna lastnost pri ekstrakciji, saj tvorba vodikovih vezi s kisikom, prisotnim v funkcionalnem delu molekule fenolov, vodi do povečane interakcije med molekulami (Byers, 2003; Islas in sod., 2012). Fenolne spojine so sicer različno polarne. Manj polarne fenolne spojine, kot so flavanoni, izoflavoni in flavonoli, so bolje topne v kloroformu, etilacetatu in dietil etru, medtem ko so bolj polarni flavonoidni glikozidi in polarni aglikoni bolj topni v topilih, pripravljenih iz etanola in vode (Marston in Hostettmann, 2006: 2).

3 MATERIAL IN METODE

Začetni del laboratorijskih analiz, kjer smo raziskovali antioksidativno učinkovitost (AOU) pripravljenih ekstraktov, smo izvedli v letu 2013 na Oddelku za živilstvo Katedre za biokemijo in kemijo živil Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Drugi del raziskovalnega dela, analize s tankoplastno kromatografijo (TLC), smo opravili v letu 2014 v Laboratoriju za prehrabno kemijo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

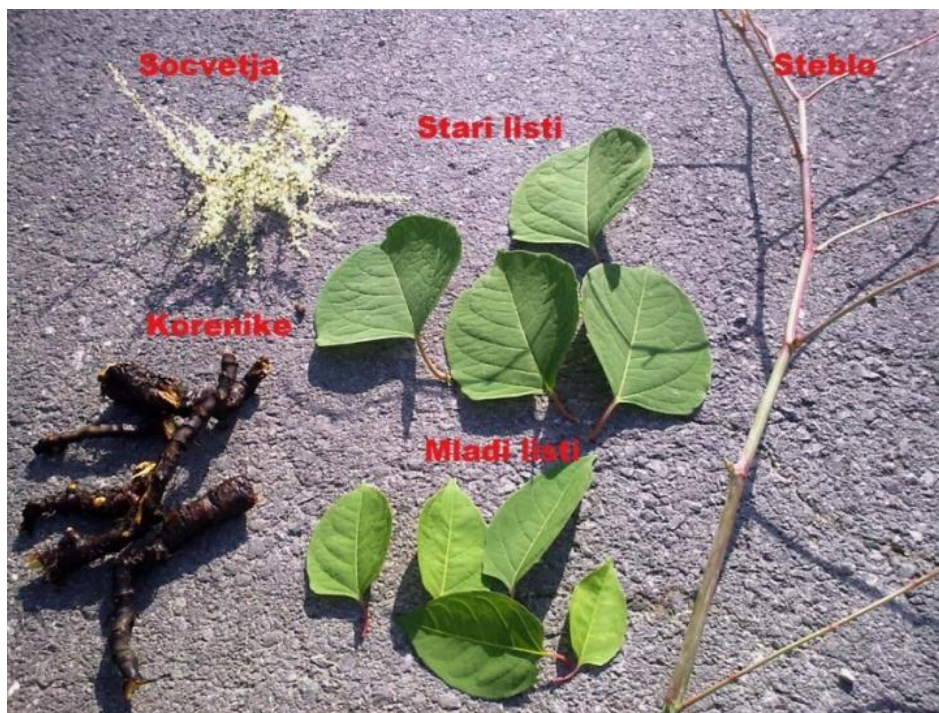
Rastlinski material japonskega, sahalinskega in češkega dresnika smo nabirali dvakrat v letu 2013, in sicer julija ter konec avgusta oz. v začetku septembra, na treh različnih lokalitetah po Sloveniji (Pril. A1). Lokalitete smo izbrali po posvetu z doc. dr. Simono Strgulc Krajšek z Oddelka za biologijo Katedre za botaniko in fiziologijo rastlin. Na lokacijah, kjer smo vzorčili, so potekale in potekajo različne raziskave v povezavi z dresniki, njihovo invazivnostjo, genetiko in diverzitetjo. Na teh lokacijah so sestoji rastlin obsežni, zato tudi ni možnosti, da bi vzorčili napačen takson dresnika.

Prvo vzorčenje je potekalo v sezoni pred cvetenjem in drugo v cvetni sezoni. Vsa vzorčenja so potekala pri približno enakih vremenskih razmerah, in sicer ob sončnem vremenu, pri 25 °C in ob 11. uri. Sestoji (Sl. 9) in vzorčeni material (Sl. 10) smo na vsaki lokaciji poslikali.



Slika 9: Sestoji dresnikov na vzorčnih lokacijah

Pri prvem vzorčenju smo nabrali štiri različne takiva – rastlinske organe: mlade liste, stare liste, stebila in korenike. Pri drugem vzorčenju smo poleg teh štirih tkiv nabrali še socvetja. Med mlade liste smo uvrstili prve tri liste od vrha poganjka proti njegovi bazi. Pri steblih smo izbirali tanjša stebelca s premerom do 5 mm.



Slika 10: Nabrana tkiva češkega dresnika, iz katerih smo pripravili različne ekstrakte

Na vzorčenje smo se predhodno ustrezno pripravili. Zagotoviti je bilo potrebno, da je bil nabrani material v najkrajšem času in v primernih razmerah prenesen v laboratorij. Material, potreben za uspešno vzorčenje na terenu, je obsegal: plastične vrečke za shranjevanje živil, naprava GPS, merilnik temperature, beležnica, pisalo, večje plastične vreče temne barve, vrtno škarje, vrtna motika in hladilna torba.

Ob prihodu na lokacijo vzorčenja smo si rastline najprej ogledali, zapisali koordinate vzorčnega mesta in izmerili temperaturo (Pril. A2). Material smo nabirali v vrečke za shranjevanje živil. Vsa nabrana tkiva smo nato prestavili v temno vrečo in jih prenesli do avtomobila, kjer smo jih shranili v hladilno torbo pri 10 °C. Material smo nato takoj prepeljali v laboratorij na Oddelku za živilstvo, Katedre za biokemijo in kemijo živil Biotehniške fakultete.

3.2 KEMIKALIJE

- etanol, 96 % (Merck, Darmstadt, Nemčija);
- *n*-butanol (Merck);
- vodikov peroksid, 30 % (Merck);
- DMSO – dimetilsulfoksid (Merck);
- natrijev hidroksid, 10 M (Merck);
- etil acetat (Merck);
- *n*-heksan (Merck);
- mravljinčna kislina, 98–100 % (Merck);
- klorovodikova kislina, 37 % (Merck);
- žveplova kislina, 95–97 % (Merck);
- ABTS – 2,2-azinobis(3-etil-benzotiazolin-6-sulfonska kislina) (Sigma, Steinheim, Nemčija);
- luminol – 2,2-azinobis(3-ethyl-benzotiazolin-6-sulfonska kislina) (Sigma);
- troloks – 6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kislina (Sigma);
- HEPES – 4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etansulfonska kislina (Sigma);
- hrenova peroksidaza – Peroxidase from Horseradish, Type VI, aktivnost: 250–300 enot/mg (Sigma);
- anisaldehyd (p-metoksibenzaldehid) (Sigma);
- metanol, HPLC grade (Sigma);
- naturstoff reagent A ali NST (Sigma);
- ledocetna kislina (Merck; Sigma);
- manganov dioksid (Kemika, Zagreb, Hrvaška);
- dinatrijev fosfat (Kemika);
- tekoči dušik (Messer Greisheim, Nemčija);
- mili-Q H₂O (Millipore Pack R1, Nemčija);
- destilirana H₂O (Purelab Classic, 18,2 Möhm × cm).

Standardi:

- trans-resveratrol (Sigma, St. Luis, Missouri, ZDA);
- (+)-katehin (Sigma);
- klorogenska kislina (Sigma);
- rutin (Fluka);
- ferulna kislina (Fluka);
- kavna kislina (Fluka);
- kvercetin (Kemika);
- *p*-kumarna kislina (Merck).

3.3 APARATURE

- naprava za zamrznjeno sušenje biološkega materiala (Liofilizer, CHRIST Alpha 1-2 LD plus);
- stresalnik z vodno kopeljo (Julabo SW-21C, Nemčija);
- spektrofotometer Agilent 89090A UV-VIS Spectrometer z računalniškim programom 845X UV-visible chemstation software;
- fluorimeter Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer VARIAN s programsko opremo Agilent Cary WinFLR;
- polavtomatski nanašalec Linomat 5 (Camag, Muttenz, Švica) s programsko opremo winCATS – Planar Chromatography Manager (verzija 1.4.1.8154);
- Digistore 2 documentation system z iluminacijsko enoto Reprostar 3 (Camag);
- naprava za potapljanje plošč TLC (Camag chromatogram immersion device III);
- sušilnik za lase (Compact pro 2000 W, Rowenta);
- grelna plošča (Camag TLC heater);
- pH-merilnik (Hanna instruments, ZDA);
- vrtinčnik – vorteks (IKA MS 3 basic, Nemčija);
- magnetni mešalec Rotamix S-10 (DOMEL, Slovenija);
- centrifuga Rotanta 460R (Hettich, Nemčija);
- centrifuga Centric 322B (Tehtnica, Slovenija);
- tehtnica Exacta 2200 EB (Slovenija);
- tehtnica Mettler Toledo AT 201;
- tehtnica Mettler Toledo (exelence PLUS) XP205.

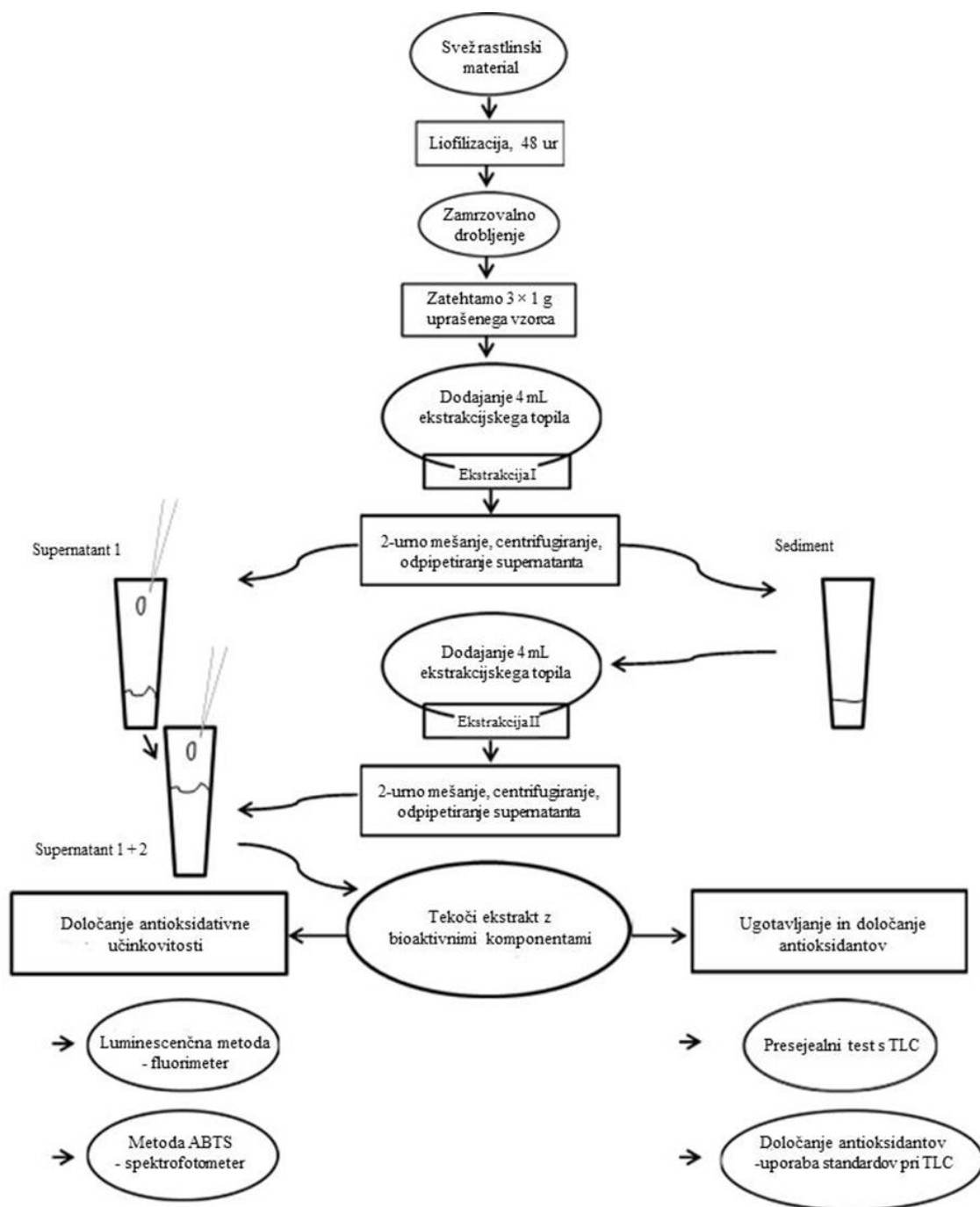
3.4 DRUGI MATERIAL IN PRIPOMOČKI

- keramična terilnica s pestilom (volumen 3 L);
- plošče HPTLC silikagel 60 s steklenim nosilcem, 20 cm × 10 cm (Merck);
- kad s prekatom (Camag) za razvijanje kromatografskih plošč dimenzij 20 cm × 10 cm.

3.5 PRIPRAVA VZORCEV IN EKSTRAKTOV

Sveže nabrani material smo najprej ustrezno obdelali. Na začetku smo korenike sprali pod tekočo vodo in jih osušili. Rastlinski material smo nato dehidrirali s pomočjo zamrznjenega sušenja z liofilizatorjem.

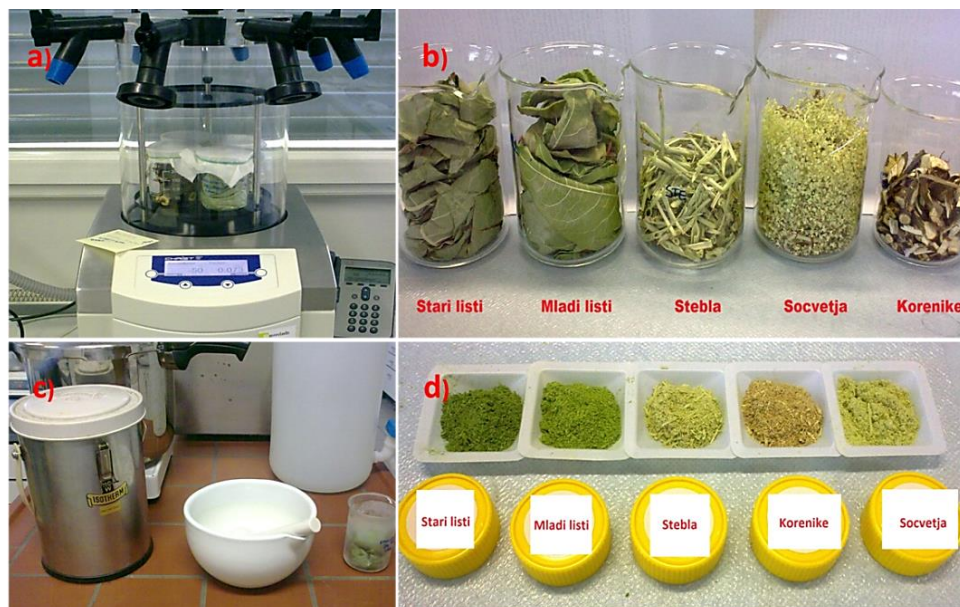
Slika 11 prikazuje ključne postopke dela, uporabljene v naši raziskavi.



Slika 11: Prikaz postopkov dela v naši raziskavi

150 mL steklene čaše smo napolnili s približno 40 g sveže nabranega materiala, pri čemer smo liste le rahlo zvili in jih položili v čašo, medtem ko smo korenike in stebela narezali na manjše koščke dolžine 1 cm. Čaše smo nato pokrili s celulozno vato, ki smo jo nanje pritrdili s pomočjo elastike. Čaše smo nato položili v liofilizator. Material, ki smo ga liofilizirali 48 ur pri $-51\text{ }^{\circ}\text{C}$ in pod nižanim tlakom 0,065 mbar, smo nato ločeno uprašili

v keramični terilnici, ki smo jo predhodno ohladili s tekočim dušikom (Sl. 12c in 12d). Med homogenizacijo smo po potrebi dodajali tekoči dušik, ki nam je omogočil lažje in hitrejše drobljenje materiala. Vse homogenate smo nato prestavili v plastične epruvete in jih shranili v zamrzovalnik pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Slika 12: Priprava nabranega rastlinskega materiala za ekstrakcijo. a) Zamrznjeno sušenje svežega rastlinskega materiala v liofilizatorju. b) Liofiliziran rastlinski material. c) Zamrzovalno drobljenje liofiliziranega materiala z uporabo terilnice in tekočega dušika. d) Uprašen biološki material

Ekstrakcijska topila:

1. Vodno ekstrakcijsko topilo (ekstrakcijsko topilo 1: voda-ocetna kislina, 49 : 1, v/v)

Najprej smo pripravili založno raztopino 4 % očetne kisline tako, da smo v 100 mL merilno bučko odmerili 4 mL ledocetne kisline ter nato do 100 mL oznake dopolnili z vodo. Nato smo v 50 mL bučko dodali 25 mL 4 % očetne kisline ter nato še 25 mL vode. Tako smo dobili 2 % očetno kislino v vodni raztopini.

2. *n*-butanol (ekstrakcijsko topilo 2)

3. Etanolno ekstrakcijsko topilo (48 % etanol, ekstrakcijsko topilo 3: 96 % etanol-voda-ocetna kislina, 25 : 24 : 1, v/v/v)

Za pripravo tretjega ekstrakcijskega topila smo od priprave vodnega ekstrakcijskega vzeli preostanek 4 % očetne kisline (25 mL) in k njej dodali 25 mL 96 % etanola.

Namen dodane očetne kisline v ekstrakcijskih topilih 1 in 3 je bil v bolj učinkoviti ekstrakciji in večji stabilizaciji ekstrahiranih antioksidantov.

Izvedba ekstrakcije:

V 15 mL plastične epruvete smo natehtali po 1 g homogeniziranega materiala posameznega tkiva (4 za prvo in 5 za drugo vzorčenje) vsakega taksona dresnika. V vsako epruveto smo dodali 4 mL ekstrakcijskega topila (I. faza ekstrakcije) in vsebino premešali s stekleno palčko ter epruveto dali še za 30 s na vrtničnik, da se je vsebina dobro premešala. Epruvete smo za 2 uri postavili v stresalnik z vodno kopeljo, termostatirano na 23 °C. Nato smo epruvete 10 min centrifugirali na 9000 obratih na minuto in supernatant prenesli v nove 15 mL plastične epruvete. Trdnemu preostanku (usedlini) smo dodali 4 mL ekstrakcijskega topila (II. faza ekstrakcije). Vsebinsko smo ponovno premešali s stekleno palčko in jo za 30 s prestavili na vrtničnik. Epruvete smo stresali 2 uri v vodni kopeli pri 23 °C in jih nato 10 min centrifugirali. Supernatant smo dodali v epruvete, ki so že vsebovale supernatant iz prve faze ekstrakcije. Na koncu smo dobili približno 8 mL ekstrakta. Za nadaljnje delo smo ekstrakte shranili v zamrzovalno skrinjo (–20 °C).

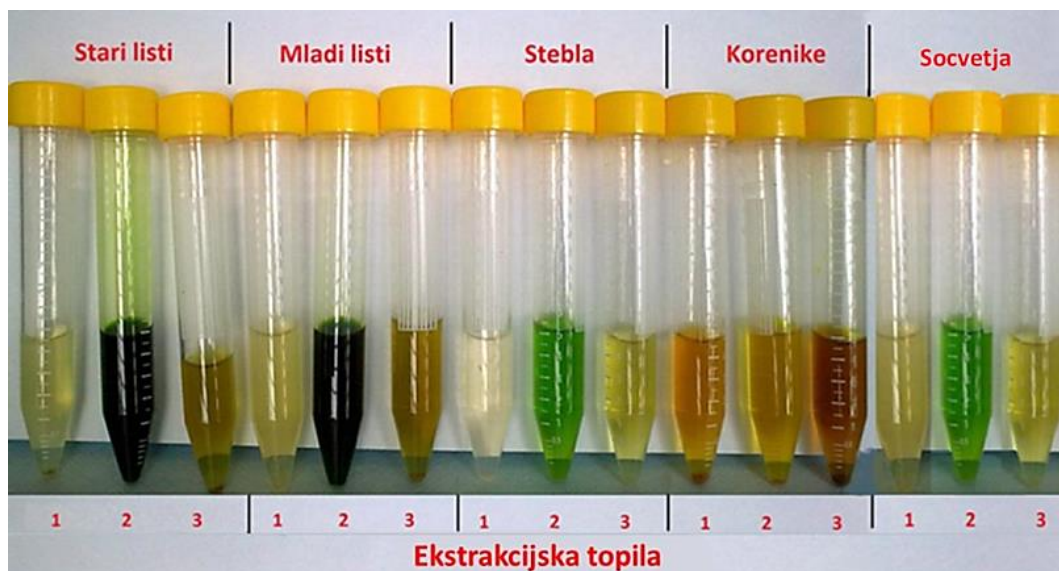
3.5.1 Ekstrakti

Ekstrakte smo označevali z okrajšavo za vrsto dresnika, okrajšavo za tkivo, številko vzorčenja in številko ekstrakcijskega topila. Podatki o označevanju ekstraktov so zbrani v preglednici 1.

Preglednica 1: Oznake pripravljenih rastlinskih ekstraktov

	Oznaka in pomen oznake
Takson dresnika	jap – japonski dresnik ces – češki dresnik sah – sahalinski dresnik
Rastlinsko tkivo	mll – mladi listi stl – stari listi ste – stebila kor – korenike cve – socvetja
Vzorčenje	1 – prvo vzorčenje 2 – drugo vzorčenje
Ekstrakcijsko topilo/ekstrakt	1 – voda/vodni ekstrakt 2 – <i>n</i> -butanol/butanolni ekstrakt 3 – 48 % etanol/etanolni ekstrakt
Primer označbe vzorca:	<u>jap 1, mll, 3</u> = japonski dresnik, prvo vzorčenje, mladi listi, etanolni ekstrakt

Za analize AOU in presejalne analize s TLC smo uporabili vse pripravljene ekstrakte. Za določanje fenolnih spojin v posameznih ekstraktih s pomočjo standardov pa smo glede na rezultate presejalnih testov izbrali 10 potencialno najbolj raznolikih vzorcev.



Slika 13: Ekstrakti različnih tkiv češkega dresnika, pridobljeni z različnimi ekstrakcijskimi topili. Oznake ekstrakcijskih topil: 1 = vodno ekstrakcijsko topilo, 2 = *n*-butanol in 3 = etanolno ekstrakcijsko topilo

Slika 13 prikazuje različne ekstrakte, ki smo jih pridobili iz tkiv češkega dresnika drugega vzorčenja. Razlike v barvi ekstraktov so prisotne tako med tkivi kot ekstrakcijskimi topili. Če primerjamo obarvanost ekstraktov v povezavi z ekstrakcijskim topilom, lahko ugotovimo, da se pri vodnih in etanolnih ekstraktih obarvanost giblje vse od brezbarvne (vodni ekstrakti stebel), rumeno-rjave do temnejše rjave barve (etanolni ekstrakti korenik). Etanolni ekstrakti so v primerjavi z vodnimi intenzivneje obarvani. Butanolni ekstrakti so obarvani zeleno, kar ne velja le v primeru ekstraktov korenik, ki so rjave barve. Najbolj intenzivne barve so butanolni ekstrakti listov, saj so temno zelene barve, sledi jim temno rjav etanolni ekstrakt korenik. Najsvetlejših barv so vsi ekstrakti stebel, podobne obarvanosti so tudi ekstrakti socvetij.

3.6 DOLOČANJE VSEBNOSTI VODE V TKIVIH

V 150 mL steklene čaše, ki smo jih predhodno stehali, smo dodali približno 40 g sveže nabranega in osušenega tkiva dresnika ter čaše skupaj s prisotnim biološkim materialom ponovno stehali. Biološki material smo liofilizirali 48 ur in ga nato ponovno stehali. Tehtali smo na $\pm 0,01$ g natančno. Vsako tehtanje smo ponovili trikrat in si zabeležili srednjo vrednost treh izmerjenih vrednosti.

3.7 DOLOČANJE AOU Z METODO ABTS

Priprava reakcijskih mešanic:

Založno raztopino z radikali ABTS^{•+} s koncentracijo 5 mM smo pripravili tako, da smo v 15 mL plastično epruveto natehtali 25,1 mg ABTS in dodali 10 mL vode. Tej raztopini smo dodali 50 mg MnO₂, ki deluje kot oksidant. Dobljeno raztopino smo 10 min mešali na vrtinčniku in jo nato za 24 ur shranili v hladilnik na 5 °C, da bi pridobili čim višjo koncentracijo radikalov ABTS^{•+} v raztopini. Ker je ABTS občutljiv na svetlobo, smo plastično epruveto ovili z aluminijasto folijo. Naslednji dan smo raztopino ponovno premešali na vrtinčniku in jo centrifugirali 5 min pri 3000 obratih na minuto. Raztopino smo nato preko 0,2 µm filtra PVDF prefiltrirali v novo 15 mL plastično epruveto in jo ovili z aluminijasto folijo. S filtriranjem smo odstranili prebitni MnO₂. Tako pripravljeno raztopino radikalov ABTS^{•+} smo shranjevali v hladilniku. Uporabna je bila nekaj tednov od začetka priprave.

Koncentracijo radikala v sveže pripravljene raztopini in raztopini, ki je bila že nekaj časa pripravljena, smo pred vsako analizo preverili z merjenjem absorbance (A). Odpipetirali smo 50 µL raztopine, ji dodali 950 µL pufra HEPES (10 mM, pH 7) in izmerili absorbanco pri 734 nm. V kolikor je bila vrednost izmerjene A višja od 0,6, smo raztopino uporabili pri analiziranju ekstraktov, v nasprotnem primeru smo pripravili svežo raztopino.

Priprava pufra HEPES (10 mM, pH 7): Najprej smo pripravili 1 L založne raztopine 1 M pufra HEPES s pH 7. V 800 mL vode smo raztopili 238,3 g HEPES-a. S pomočjo 10 M NaOH oz. 50 % očetne kisline smo uravnali pH na 7. Do oznake 1 L smo dopolnili z vodo. Iz založne raztopine smo nato 10 mL raztopine prestavili v novo merilno bučko in z vodo dopolnili do 1 L ter tako dobili 10 mM pufer HEPES.

Izvedba:

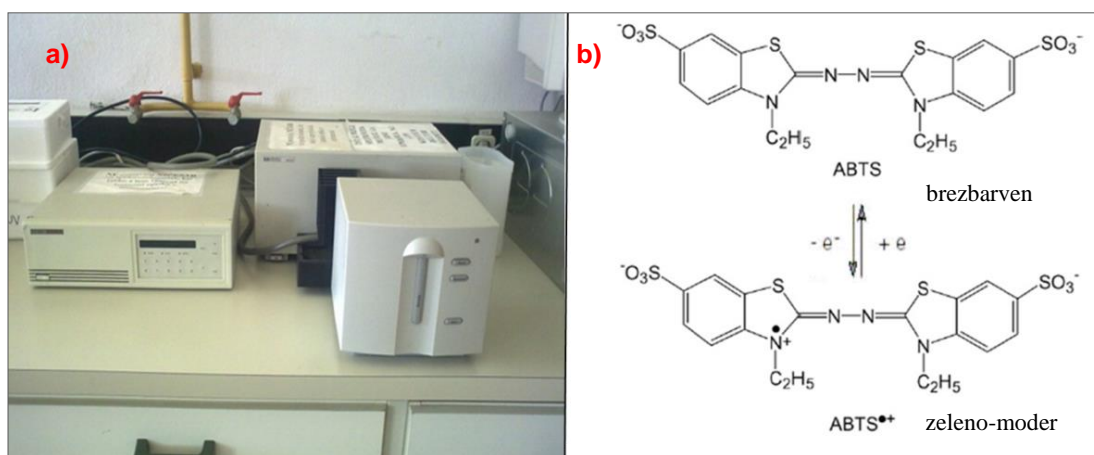
Pripravili smo 1,5 mL epice, v katere smo najprej odpipetirali primeren volumen pufra HEPES in raztopine z radikali ABTS^{•+}. Raztopine z radikali ABTS^{•+} smo dodali vedno 90 µL, volumen dodanega pufra HEPES pa je bil odvisen od volumna dodanega ekstrakta in je znašal toliko, da je bil končni volumen reakcijske mešanice v kivetu vedno 1 mL. Ko smo v epice dodali ustrezno količino pufra HEPES in raztopine z radikali ABTS^{•+}, smo s časovnim zamikom 1 min dodajali še primerne volumne čistega ali redčenega ekstrakta. Za redčitev vodnih in etanolnih ekstraktov smo uporabili 2 % očetno kislino (voda-očetna kislina, 49 : 1, v/v), za redčitev butanolnih ekstraktov pa 96 % etanol.

Ko smo v prvo epico dodali določen volumen ekstrakta, smo začeli meriti čas, saj smo 30 min po dodatku ekstrakta v epico, morali s spektrofotometrom izmeriti A pripravljene reakcijske mešanice (Sl. 14a). Ko smo napolnili vse epice, smo raztopine na vorteksu

dobro premešali. Tudi A smo na spektrofotometru merili v enominutnih presledkih in v enakem zaporedju, kot smo predhodno v epice dodajali ekstrakte.

Preden smo začeli z analizo naših ekstraktov, smo spektrofotometer umerili z 1 mL vode. Za pripravo treh slepih vzorcev smo v epice vedno dodali le 90 μL raztopine z radikali ABTS^{**} in 910 μL pufra HEPES. Vsak ekstrakt smo analizirali dvakrat.

V kolikor se je reakcijska mešanica ob dodatku čistega oz. redčenega ekstrakta takoj razbarvala, je to pomenilo, da je količina dodanega ekstrakta oz. vsebnost antioksidantov prevelika (Sl. 14b). V tem primeru smo se odločili za dodatno redčitev ekstrakta in za te vzorce ponovili celoten potek analize. Isto smo storili tudi v primeru, ko je bila izmerjena A reakcijske mešanice z dodanim ekstraktom nižja od 0,01 ali podobna A slepega vzorca.



Slika 14: Spektrofotometer, s katerim smo merili absorbanco reakcijske mešanice (a) ter prikaz molekule ABTS in njenega oksidacijskega produkta (b) (Sl. b, prirejeno po: Lee in Yoon, 2008: 233)

3.7.1 Priprava umeritvene krivulje za metodo ABTS

Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili troloks. Za umeritveno krivuljo smo v reakcijsko mešanico namesto ekstrakta dodajali različne volumne 1 mM troloksa. Delali smo v dveh paralelkah, zato smo za vsako koncentracijo dodanega troloksa dobili dve meritvi.

Pripravili smo dve umeritveni krivulji. Prva je bila umeritvena krivulja, ki nam je služila pri preračunavanju izmerjenih A pri dodanih vodnih in etanolnih ekstraktih. Druga je bila umeritvena krivulja, ki nam je služila pri preračunavanju izmerjenih A pri dodanih butanolnih ekstraktih. Reakcijski mešanici, ki smo ju uporabili pri pripravi obeh umeritvenih krivulj, sta prikazani v preglednicah 2 in 3.

Količino pufru HEPES smo prilagodili količini raztopine z radikali ABTS^{•+}, troloksa in, v primeru umeritvene krivulje za butanolne ekstrakte, še raztopini *n*-butanola in 96 % etanola (1 : 10; v/v). Ko smo imeli v epicah vse reagente razen troloksa, smo v epice začeli dodajati ustrezno količino troloksa (5, 10, 20, 30, 40 in 50 µL). Čas smo začeli meriti z začetkom dodajanja troloksa v epice. V vsako epico smo troloks dodali z enominutnim zamikom. Po 30 min smo izmerili A pripravljenih reakcijskih mešanic. Pred tem smo izmerili tudi vrednosti za tri slepe vzorce.

Preglednica 2: Reagenti in njihovi volumni, uporabljeni pri pripravi umeritvene krivulje za vodne in etanolne ekstrakte pri metodi ABTS

Reagent	V (µL)
ABTS ^{•+}	90
pufer HEPES (10 mM, pH 7)	860–905
troloks (1 mM)	5–50

Preglednica 3: Reagenti in njihovi volumni, uporabljeni pri pripravi umeritvene krivulje za butanolne ekstrakte pri metodi ABTS

Reagent	V (µL)
ABTS ^{•+}	90
<i>n</i> -butanol : 96 % etanol (1 : 10, v/v)	30
pufer HEPES (10 mM, pH 7)	830–875
troloks (1 mM)	5–50

Priprava reagentov:

1 mM troloks: Za pripravo 1 mM raztopine troloksa smo v 10 mL stekleno bučko natehtali 2,5 mg troloksa in do oznake dopolnil z vodo.

n-butanol : 96 % etanol (1 : 10, v/v): V 1,5 mL epici smo v razmerju 1 : 10 pripravili redčitev *n*-butanola in 96 % etanola. Odmerili smo 10 µL *n*-butanola in ga dodali k 990 µL 96 % etanola.

Izmerjene A za pripravo umeritvenih krivulj in umeritveni krivulji za vodne, etanolne in butanolne ekstrakte so prikazane v prilogi B.

Za analize smo uporabili vrednosti A, ki smo jih dobili tako, da smo A, izmerjene pri uporabi dodanih ekstraktov, odšteli od povprečja treh izmerjenih A slepih vzorcev. S tem smo dobili naraščajočo povezanost med količino antioksidantov v ekstraktu in A. Pri umeritveni krivulji pa naraščajočo povezanost med koncentracijo troloksa in A. Iz vrednosti A za pripravo umeritvene krivulje smo s pomočjo linearne regresije določili

koeficient determinacije (r^2) in smerni koeficient (k) regresijske premice. Enačba regresijske premice umeritvene krivulje vodnih in etanolnih ekstraktov je bila $y = 0,016 \times x$, z $r^2 = 0,997$. Enačba regresijske premice za umeritveno krivuljo butanolnih ekstraktov je bila $y = 0,015 \times x$, z $r^2 = 0,995$.

Iz A, izmerjenih v reakcijskih mešanicah z dodanimi ekstrakti, smo nato izračunali AOU ekstrakta, podano kot troloksu ekvivalentno antioksidativno učinkovitost na gram suhe snovi (TEAC/g s.s.). Izračun smo opravili postopoma in je opisan v prilogi D.

3.8 DOLOČANJE AOU Z LUMINESCENČNO METODO

Priprava reakcijskih mešanic:

Za pripravo 0,1 M fosfatnega puфра smo v 500 mL čašo natehtali 3,55 g Na_2HPO_4 in z vodo dopolnili skoraj do oznake 250 mL. S pH-metrom smo nato z uporabo 50 % očetne kisline ali 10 M NaOH uravnali pH na 7,4. Pripravljeno raztopino smo prelili v stekleno bučko in z vodo dopolnili do oznake 250 mL. Pripravljen pufer smo shranjevali v hladilniku.

Raztopino luminola smo pripravili tako, da smo v 1,5 mL epico natehtali 50 mg luminola in dodali 1,5 mL DMSO. Tako smo dobili raztopino luminola s 188 mM koncentracijo. Ker je luminol občutljiv na svetlobo, smo epico ovili z aluminijasto folijo in raztopino shranili v zamrzovalnik pri $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Delovni raztopini za reakcijsko mešanico smo si vsakič pripravljali sproti. Najprej smo v 25 mL bučko dali 125 μL pripravljene raztopine luminola in do 25 mL redčili s fosfatnim pufrom. Tako smo dobili delovno raztopino z 0,94 mM koncentracijo luminola. Nato smo pripravili še 80 mM raztopino H_2O_2 . V 10 mL bučko smo dodali 80 μL 30 % H_2O_2 in s fosfatnim pufrom redčili do 10 mL. Reakcijsko mešanico iz raztopine luminola in H_2O_2 smo pripravili tako, da smo v 50 mL plastično epruveto odpipetirali 22,5 mL delovne raztopine luminola in 2,5 mL raztopine H_2O_2 . Reakcijska mešanica je tako vsebovala 85 μM luminol in 0,8 mM H_2O_2 .

Hrenovo peroksidazo (HRP) smo pripravili pred začetkom analiz. Pri pripravi raztopine encima HRP smo upoštevali aktivnost encima, zapisano na embalaži. V epico smo natehtali 0,2 mg HRP in dodali 1,8 mL 0,1 M fosfatnega puфра ter dobro premešali. Tako smo dobili raztopino z aktivnostjo peroksidaze 25–30 enot/mL. Ker lahko aktivnost encima HRP v pripravljeni raztopini zelo niha, je bolj pomemben signal, ki ga izmerimo s fluorimetrom, po dodatku raztopine v kiveto. Zaželeno je, da se izmerjen signal giblje v območju 800–900 arbitrarnih enot (a. e.). To dosežemo z dodajanjem večjega oz. manjšega

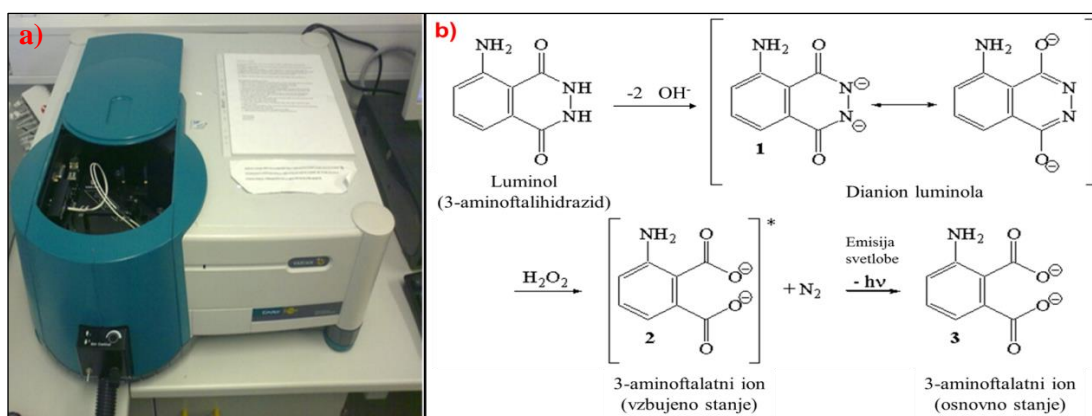
volumna raztopine z encimom HRP ali dodatnimi redčitvami pripravljene raztopine encima. Osnoven potek reakcij oksidacije luminola prikazuje slika 15b.

Osnovne nastavitve fluorimetra (Sl. 15a):

Zaznavanje signala je potekalo pri valovni dolžini 420 nm, premer emisijske reže smo imeli nastavljen na 20 nm in napetost pomnoževalke na 1000 V.

Izvedba:

Najprej smo program za beleženje kemiluminescence nastavili na začetno vrednost 0. Nato smo v fluorimeter vstavili kiveto, v katero smo dodali 160 μL fosfatnega pufra, 2 mL reakcijske mešanice luminola in H_2O_2 ter 7 μL raztopine z encimom HRP in začeli z beleženjem signala. Ko je signal padel na vrednost med 800 in 900 a. e., smo prekinili spremljanje signala in v kiveto dodali določen volumen ekstrakta ter vse skupaj dobro premešali. Ponovno smo začeli beležiti signal, ki se je zaradi dodatka ekstrakta znižal ali padel na vrednost 0. Po določenem času se je vrednost signala ponovno začela dvigovati. Ko je signal dosegel ravnovesno lego (plato), smo njegovo spremljanje prekinili. Ob dodatku ekstrakta v kiveto smo s štoparico začeli meriti čas, ki smo ga ustavili, ko smo ponovno začeli z beleženjem signala. Ta čas je v vseh primerih znašal 20 s in smo ga prišteli k času izmerjenega časovnega zamika v luminescenci (Δt). Vrednost Δt smo izračunali tako, da smo iz signala, ki smo ga zabeležili, odčitali t_1 in t_2 ter vrednost t_2 odšteli od t_1 . Vrednosti t_1 predstavljajo čase, ko smo ustavili spremljanje signala, vrednosti t_2 pa čase, ko se je signal po dodatku ekstrakta ponovno vrnil v ravnovesno stanje. Vsak ekstrakt smo analizirali dvakrat.



Slika 15: Fluorimeter, s katerim smo merili kemiluminescenco (a) in osnoven potek reakcij oksidacije luminola (b) (Sl. b, prirejeno po: Boudreaux, 2014)

3.8.1 Priprava umeritvene krivulje za luminescenčno metodo

Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili troloks. Za umeritveno krivuljo smo v reakcijsko mešanico namesto ekstrakta dodajali različne volumne 5 mM troloksa. Delali smo v dveh paralelkah, zato smo za vsako koncentracijo troloksa pridobili dve meritvi.

Pripravili smo dve umeritveni krivulji. Prva je bila umeritvena krivulja, ki nam je služila pri preračunavanju izmerjenih časovnih zakasnitev v luminescenci pri dodanih vodnih in etanolnih ekstraktih. Druga je bila umeritvena krivulja, ki nam je služila pri preračunavanju izmerjenih časovnih zakasnitev v luminescenci pri dodanih butanolnih ekstraktih. Reakcijski mešanici, ki smo ju uporabili pri pripravi obeh umeritvenih krivulj, sta prikazani v preglednicah 4 in 5.

Volumen reakcijske mešanice luminola in H_2O_2 , raztopine z encimom HRP, fosfatnega pufru in, v primeru umeritvene krivulje za butanolne ekstrakte, še raztopine *n*-butanola in 96 % etanola (1 : 10, v/v) je bil v kivetu v vseh primerih enak. Spreminjali smo samo volumen dodane raztopine 5 mM troloksa. Volumni, ki smo jih uporabili za pripravo umeritvene krivulje so znašali 5, 10, 20, 30, 40 in 50 μ L.

V kiveto smo najprej dodali reakcijsko mešanico luminola in H_2O_2 , fosfatnega pufru in raztopino z encimom HRP. Kiveto smo nato vstavili v fluorimeter. Začetni signal se je gibal med 800 in 900 a. e. Ko se je signal pričel gibati v območju okrog 850 a. e., smo beleženje signala zaustavili in s pipeto v reakcijsko mešanico dodali določen volumen raztopine troloksa. S pipeto smo vsebino v kivetu dobro premešali in ponovno začeli z beleženjem signala. Ob dodatku raztopine troloksa v kiveto smo s štoparico začeli meriti čas, ki smo ga ustavili, ko smo ponovno začeli z beleženjem signala. Ta čas je v vseh primerih znašal 20 s in smo ga prišteli k času izmerjenega časovnega zamika v luminescenci. Nastavitve fluorimerta so bile enake kot v primeru analize naših ekstraktov.

Preglednica 4: Reagenti in njihovi volumni, uporabljeni pri pripravi umeritvene krivulje za vodne in etanolne ekstrakte pri luminescenčni metodi

Reagent	V (μ L)
reakcijska mešanica (luminol + H_2O_2)	2000
fosfatni pufer (0,1 M, pH 7,4)	160
HRP (aktivnost: 30 enot/mL)	8

Preglednica 5: Reagenti in njihovi volumni, uporabljeni pri pripravi umeritvene krivulje za butanolne ekstrakte pri luminescenčni metodi

Reagent	V (μ L)
reakcijska mešanica (luminol + H ₂ O ₂)	2000
fosfatni pufer (0,1 M, pH 7,4)	135
<i>n</i> -butanol : 96 % etanol (1 : 10, v/v)	25
HRP (aktivnost: 30 enot/mL)	7

Priprava reagentov:

5 mM raztopina troloksa: Za pripravo 5 mM raztopine troloksa smo najprej pripravili 10 mM raztopino troloksa z 2,5 mg troloksa na 1 mL 0,1 M fosfatnega pufera. Nato smo v 2 mL epico odpipetirali 250 μ L 10 mM raztopine troloksa in dodali 250 μ L 0,1 M fosfatnega pufera.

n-butanol : 96 % etanol (1 : 10, v/v): V 1,5 mL epici smo pripravili redčitev *n*-butanola in 96 % etanola, v razmerju 1:10. Odmerili smo 10 μ L *n*-butanola in ga dodali 990 μ L 96 % etanola.

Raztopina z encimom HRP: Uporabili smo enako raztopino z encimom HRP kot za analize, opravljene na ekstraktih. Povprečna aktivnost encima v raztopini je znašala od 25 do 30 enot/mL.

Izmerjeni časovni zamiki v luminescenci za pripravo umeritvenih krivulj in umeritveni krivulji za vodne, etanolne in butanolne ekstrakte so prikazani v prilogi C.

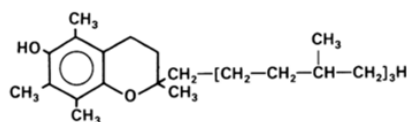
Iz vrednosti izmerjenih časovnih zamikov v luminescenci smo pripravili umeritveni krivulji in vsaki s pomočjo linearne regresije določili koeficient determinacije (r^2) ter smerni koeficient (k) regresijske premice. Enačba regresijske premice umeritvene krivulje vodnih in etanolnih ekstraktov je bila $y = 0,978 \times x$, z $r^2 = 0,989$. Enačba regresijske premice umeritvene krivulje butanolnih ekstraktov je bila $y = 1,177 \times x$, z $r^2 = 0,998$.

Iz vrednosti izmerjenih časovnih zamikov v luminescenci smo izračunali AOU ekstrakta in jo podali kot troloksu ekvivalentno antioksidativno učinkovitost na gram suhe snovi (TEAC/g s.s.). Izračun smo opravili postopoma in je opisan v prilogi D.

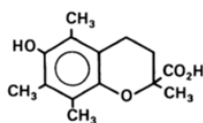
3.9 TROLOKS (VODOTOPNI ANALOG VITAMINA E)

Troloks je analog vitamina E. Zaradi odsotnosti hidrofobnega repa je topen v polarnih topilih (Sl. 16). Ker ima veliko sposobnost lovljenja prostih radikalov, se pri metodah za

merjenje AOU pogosto uporablja kot referenčni antioksidant za pripravo umeritvenih krivulj (Oehlke in sod., 2011).



Vitamin E (α -tokoferol)



Troloks

Slika 16: Molekula vitamina E (alfa tokoferola) in njegov vodotopni analog – troloks (prirejeno po: Davies in sod., 1988: 513)

Troloks smo v naši raziskavi uporabili kot antioksidativni standard za pripravo umeritvene krivulje. Rezultate meritev AOU ekstraktov različnih tkiv dresnikov smo pri obeh analiznih metodah, luminescenčni in metodi ABTS, izrazili v standardizirani obliki, tj. kot vrednosti, ki so troloksu ekvivalentne po antioksidativni učinkovitosti (TEAC) (Arts in sod., 2004).

3.10 PRIPRAVA TESTNIH RAZTOPIN ZA ANALIZE S TLC

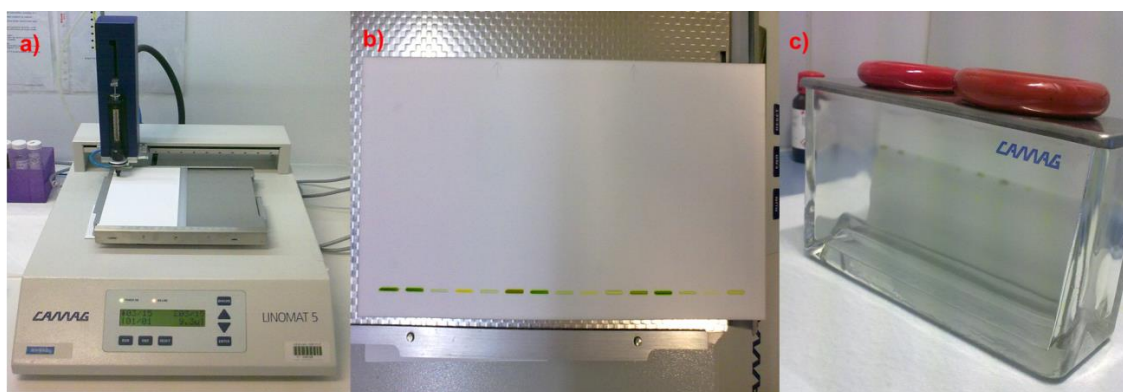
Ker smo na dnu testnih raztopin (ekstraktov) opazili usedlino, smo jih filtrirali skozi 0,45 μm filter PVDF. Največ usedline smo opazili pri vodnih in najmanj pri butanolnih testnih raztopinah. Del testnih raztopin (1 mL) smo prenesli v 2 mL GC-viale in jih za nadaljnje delo shranili v hladilniku (4 $^{\circ}\text{C}$). Kljub filtraciji smo opazili, da so bile vodne testne raztopine mladih listov še vedno rahlo motne. Vse vodne in etanolne testne raztopine smo zato filtrirali še skozi 0,20 μm filter PVDF.

3.11 PRVI PRESEJALNI TESTI S TLC

Za začetne presejalne teste smo vse testne raztopine analizirali na kromatografskih ploščah HPTLC silikagel 60 s steklenim nosilcem in velikostjo 20 cm \times 10 cm. Testne raztopine (10 μL) smo nanašali s polavtomatskim nanašalcem (LINOMAT 5) (Sl. 17a) v 8 mm črte, 8 mm od spodnjega roba plošče (Sl. 17b), s hitrostjo nanašanja 100 $\mu\text{L/s}$. Na isto

kromatografsko ploščo smo nanесли testne raztopine, ki so pripadale istemu vzorčenju (testne raztopine vseh štirih oz. petih tkiv, vseh treh taksonov dresnikov) in so bile pripravljene z enakim ekstrakcijskim topilom. Zaradi uporabe dveh različnih topil za razvijanje smo vedno pripravili po dve plošči z enakimi nanosi testnih raztopin. Plošče smo v nasičeni kromatografski kadi s prekatom razvijali do razdalje 8 cm, pri čemer smo v enega od prekatov, 10 min pred začetkom razvijanja kromatografske plošče, nalili 10 mL topila za razvijanje (Sl. 17c). Uporabili smo dve topila za razvijanje, in sicer etil acetat-voda-mravljinčna kislina, 85 : 15 : 10, v/v/v (topilo za razvijanje 1) ter *n*-heksan-etil acetat-mravljinčna kislina, 20 : 19 : 1, v/v/v (topilo za razvijanje 2) (Simonovska in sod., 2003). Razvito ploščo smo posušili s tokom toplega zraka. Plošče smo v topilu za razvijanje 1 razvijali 34 min, v topilu za razvijanje 2 pa 25 min. Ploščo z razvitimi vzorci smo nato poslikali s kamero (Camag) pri osvetlitvi z belo svetlobo in pri valovni dolžini 366 nm.

V nadaljevanju smo opravili še derivatizacijo, zato smo razvito kromatografsko ploščo za 3 min položili na grelno ploščo, ogreto na 110 °C. Še vročo kromatografsko ploščo smo z uporabo naprave za potapljanje kromatografskih plošč za 1 s potopili v derivatizacijski reagent NST, ki je bil pripravljen z dodatkom 200 mL etil acetata k 1 g 2-aminoetilnega estra difenilborične kisline (NST) (Jork in sod., 1989) in z aluminijasto folijo zaščiten pred svetlobo hranjen v hladilniku (4 °C). Nato smo ploščo 5 min sušili na zraku ter jo ponovno poslikali pri osvetlitvi z belo svetlobo in pri valovni dolžini 366 nm.



Slika 17: Polavtomatski nanašalec (Slika a), kromatografska plošča z nanesenimi testnimi raztopinami (Slika b) in razvijanje kromatografske plošče v kadi s prekatom (Slika c)

3.12 UPORABA STANDARDOV FENOLNIH SPOJIN PRI TLC

Z uporabo izbranih standardov fenolnih spojin smo v izbranih testnih raztopinah dresnikov določali prisotnost nekaterih fenolnih spojin. Na kromatografsko ploščo HPTLC silikagel 60 s steklenim nosilcem, velikosti 20 cm × 10 cm, smo s polavtomatskim nanašalcem

nesli različne volumne raztopin standardov in testnih raztopin. Natančni podatki o volumnih nanosov in koncentracijah so podani v preglednici 6, ostali pogoji nanašanja pa so bili enaki kot pri prvih presejalnih testih.

Najprej smo nanesli izbrane butanolne testne raztopine, nato vseh 8 standardov in za njimi še izbrane etanolne testne raztopine. V topilu za razvijanje toluen-etil acetat-mravljina kislina, 6 : 5 : 1, v/v/v (topilo za razvijanje 3) smo ploščo v nasičeni kadi s prekatom razvijali 22 min. Standarde trans-resveratrola, klorogenske kisline in (+)-katehina smo nanesli na isto mesto, saj se R_F teh treh spojin, pri uporabi topila za razvijanje 3, razlikujejo. Za pripravo raztopin standardov ($c = 0,1$ mg/mL) različnih fenolnih spojin smo najprej natehtali 1 mg standarda in ga prenesli v 10 mL merilno bučko ter z metanolom dopolnili do oznake.

Razvito ploščo smo posušili in jo poslikali. Nato smo jo za 2 s potopili v anisaldehydni derivatizacijski reagent, jo posušili z virom toplega zraka in za 2 min derivatizirali na gredni plošči pri 110 °C. Počakali smo 10 min, da se je ohladila in jo ponovno poslikali pri osvetlitvi z belo svetlobo in pri valovni dolžini 366 nm. Anisaldehydni reagent smo pripravili tako, da smo k 170 mL metanola in 20 mL očetne kisline dodali še 16 mL žveplove kisline. Na koncu smo dodali še 1 mL anisaldehyda (Jork in sod., 1989). Pripravljen reagent smo ovit v aluminijasto folijo shranjevali v hladilniku pri 4 °C.

Preglednica 6: Volumni (V) nanosov testnih raztopin vzorcev in standardov ter mase nanesenih standardov na ploščo (m)

Testne raztopine in standardi	V (μ L)	m (μ g)
Standard trans-resveratrola	5	0,5
Standard (+)-katehina	10	1,0
Standard kvercetina	8	0,8
Standard rutina	15	1,5
Standard klorogenske kisline	8	0,8
Standard ferulne kisline	5	0,5
Standard <i>p</i> -kumarne kisline	20	2,0
Standard kavne kisline	8	0,8
ces 2, mll, 2	10	
sah 2, stl, 2	10	
ces 2, ste, 2	10	
jap 2, kor, 2	10	
sah 2, cve, 2	10	
ces 2, mll, 3	10	
sah 2, stl, 3	10	
ces 2, ste, 3	10	
jap 2, kor, 3	10	
sah 2, cve, 3	10	

3.13 ANALIZA IN VREDNOTENJE REZULTATOV

3.13.1 Rezultati meritev AOU

Pri obeh analiznih metodah smo AOU posameznega ekstrakta merili dvakrat ($N = 2$). Takšno merjenje imenujemo tehnična ponovitev, saj gre za večkratno merjenje istega parametra na istem vzorcu. Reakcijsko mešanico za merjenje AOU smo za vsako meritev pripravili znova.

Za analizo korelacijske povezanosti obeh metod smo iz obeh meritev, ki sta bili opravljene na istem ekstraktu, izračunali povprečno vrednost. Vrednosti so prikazane v prilogi E1. Na grafih, ki prikazujejo korelacijsko povezanost med metodama (Sl. 26, 27a, 27b in 27c), smo zaradi lepše razvidnosti razpršenosti izmerjenih vrednosti, le-te prikazovali v logaritmirani obliki.

Za ostale analize rezultatov AOU različnih ekstraktov pa smo se odločili, da podatke obeh analiznih metod združimo. Pri posameznem ekstraktu smo tako imeli štiri izmerjene vrednosti, dve opravljene z luminescenčno metodo in dve z metodo ABTS. Iz teh štirih meritev smo izračunali povprečja (\bar{x}) in standardne napake (SN), ki so nam služile za oceno velikosti naključnih napak (natančnost opravljenih meritev). Vrednosti vseh meritev, opravljenih na posameznem ekstraktu, so prikazane v prilogi E2.

V prilogi E1 so podani tudi osnovni podatki in neposredne izmerjene vrednosti, iz katerih smo nato po postopku, ki je opisan v prilogi D, izračunali AOU posameznega ekstrakta.

Za združitev podatkov obeh metod smo se odločili, ker je bil namen naše analize prikazati razlike v AOU med različnimi ekstrakti. Rezultate smo prikazovali kot povprečje štirih meritev istega ekstrakta \pm SN. Združitev meritev obeh analiznih metod lahko upravičimo na sledeč način: 1. Zaradi velikega števila pripravljenih ekstraktov smo z vsako metodo, na posameznem ekstraktu, opravili le dve meritvi AOU. Številčnejše opravljanje meritev bi bilo časovno preveč obsežno. 2. Povprečen koeficient variacije (KV) obeh merilnih metod je znašal malo manj kot 10 %. Povprečen KV nam je povedal, kakšna je tehniška (merilna) napaka. Negotovost merskih rezultatov je bila tako pri obeh metodah približno enaka. Ker obe analizni metodi merita isto stvar – merjena spremenljivka je v obeh primerih AOU – smo se odločili, da združevanje ni težavno in nam omogoča realnejši prikaz razlik med ekstrakti.

Pri analizah vsebnosti vode v posameznem tkivu smo združili podatke meritev prvega in drugega vzorčenja ter posameznih taksonov dresnikov. Vrednosti smo prikazali kot povprečje \pm SN.

Rezultate smo zbrali in urejali v programu Microsoft Excel 2010. Statistično obdelavo podatkov smo opravili s programom Statistica (StatSoft Statistica v10.0., 2010) in spletnim orodjem za statistične analize VassarStats.

Rezultate smo ovrednotili z naslednjimi statističnimi parametri:

- povprečna vrednost (aritmetična sredina, \bar{x});
- standardna napaka (SN);
- koeficient determinacije (r^2);
- Pearsonov koeficient korelacije (r).

Pri izračunih umeritvenih krivulj smo uporabili linearno regresijo.

Parne primerjave vzorcev:

- t-test;
- z-test.

Primerjave več kot dveh vzorcev ene oz. večjega števila spremenljivk:

- analiza variance (ANOVA) – enosmerna;
- večfaktorska ANOVA;
- Duncanov post-hoc test.

3.13.2 Rezultati kromatografske analize

Rezultate presejalnih testov smo ovrednotili opisno. Med testnimi raztopinami smo analizirali razlike in podobnosti v prisotnosti fenolnih spojin in ostalih antioksidantov. Primerjali smo prisotnost, intenziteto in število lis na kromatografskih ploščah.

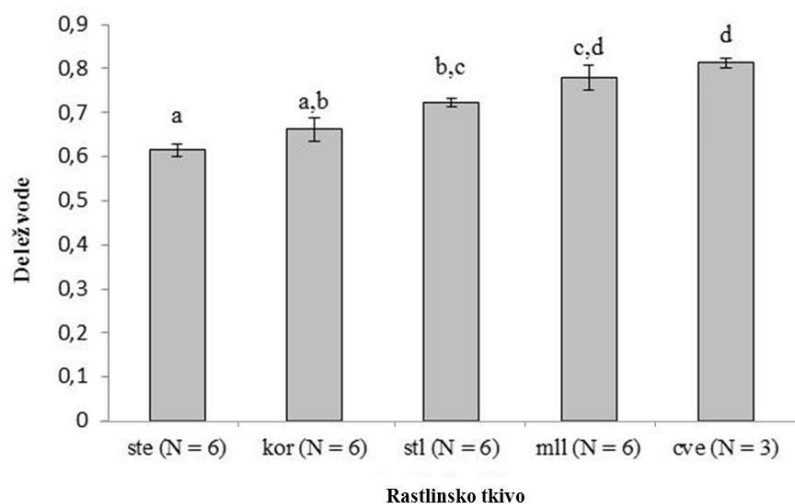
S pomočjo referenčnih standardov antioksidantov smo v izbranih testnih raztopinah ovrednotili prisotnost posameznih fenolnih spojin.

4 REZULTATI

4.1 VSEBNOST VODE V TKIVIH DRESNIKOV

Delež vode v tkivih smo prikazali kot povprečja meritev vseh treh taksonov dresnikov in obeh vzorčenj (Sl. 18). Natančnejši prikaz vseh izmerjenih vrednosti deleža vode v tkivih dresnikov so podani v preglednici F1 (Pril. F).

Ugotovili smo, da imajo najvišji delež vode socvetja, najmanj vode pa je v steblih.



Slika 18: Delež vode v različnih tkivih dresnikov. Prikazane so povprečne vrednosti izmerjenih vrednosti vseh taksonov dresnikov in obeh vzorčenj. Oznake: ste = stebila, kor = korenike, stl = stari listi, ml1 = mladi listi in cve = socvetja. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike med tkivi (enosmerna ANOVA, Duncanov post-hoc test, $p < 0,05$)

Rezultati faktorске analize variance so pokazali, da je vsebnost vode v rastlinskem tkivu odvisna od tipa rastlinskega tkiva (Pregl. 7). Ugotovili smo tudi razlike med taksoni dresnikov (Sl. F1, Pril. F), medtem ko čas vzorčenja, interakcija med tkivom in taksonom ter tkivom in časom vzorčenja niso imeli statistično značilnega vpliva na delež vode v tkivu (Pregl. 7). Pri faktorški analizi variance med tkivi in časom vzorčenja v analizo nismo vključili meritev za socvetja, saj so bila le-ta vzorčena le enkrat (vzorčenje 2).

Preglednica 7: Rezultati faktorjske analize variance glede vsebnosti vode v tkivih dresnikov pri različnih taksonih (Sl. a) in časih vzorčenja (Sl. b). V analizo pri preglednici b niso vključene meritve za socvetja, saj smo jih pri posameznem taksonu vzorčili le enkrat. Statistično značilni vplivi so prikazani z odebeljenimi črkami

a)	SS	Stopinje prostosti	MS	F	p
Tkivo	0,12936	4	0,03234	18,27	0,000
Takson	0,01499	2	0,0075	4,24	0,041
Tkivo*Takson	0,02837	8	0,00355	2,00	0,134
Napaka	0,02124	12	0,00177		

b)	SS	Stopinje prostosti	MS	F	p
Tkivo	0,09255	3	0,03085	8,31	0,002
Vzorčenje	0,00027	1	0,00027	0,07	0,792
Tkivo*Vzorčenje	0,00587	3	0,00196	0,53	0,670
Napaka	0,05942	16	0,00371		

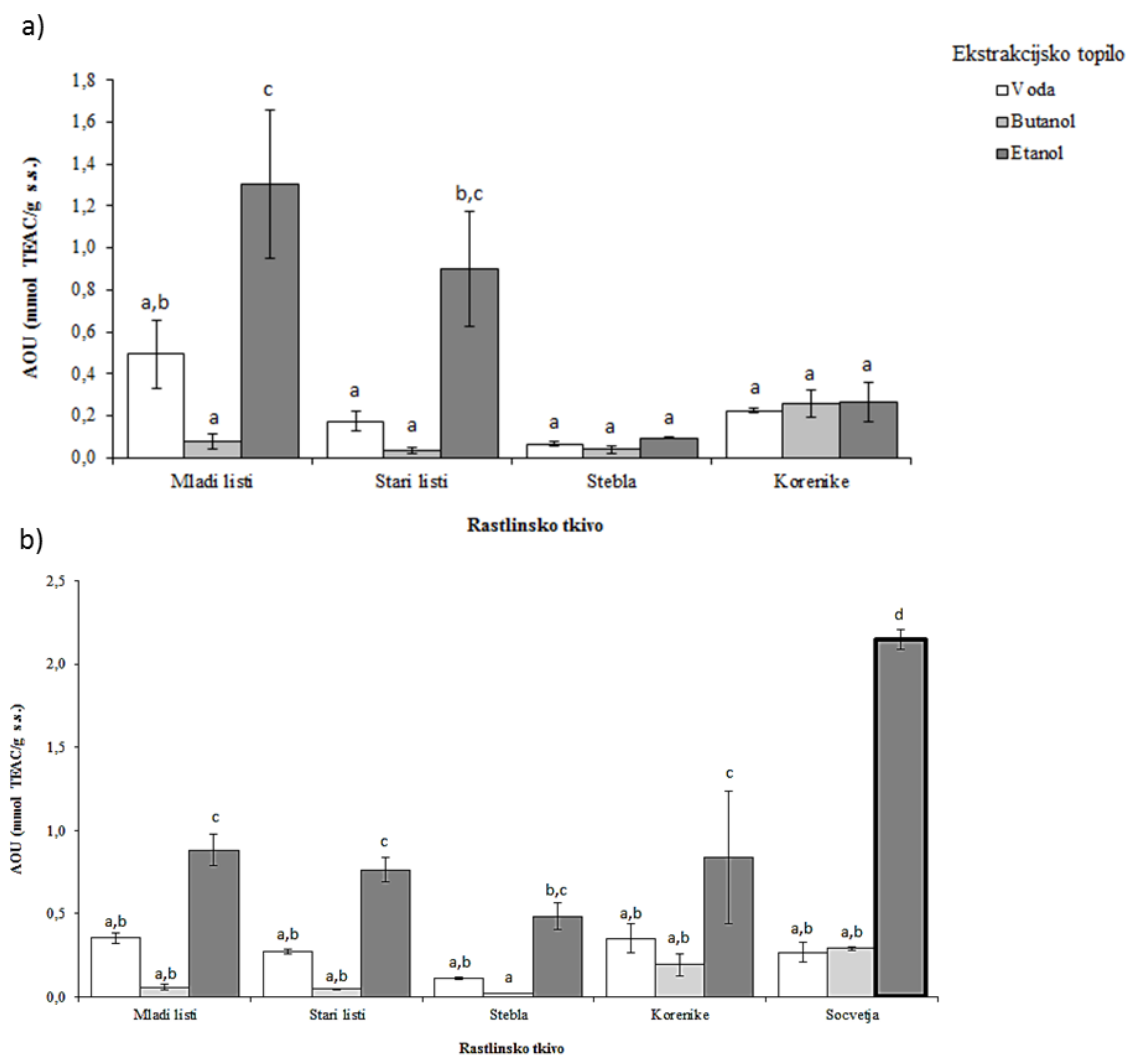
4.2 REZULTATI DOLOČANJA ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI (AOU) TKIV DRESNIKOV

AOU ekstraktov tkiv dresnikov smo določali z dvema različnima metodama, luminescenčno metodo in metodo ABTS. Podatke smo prikazali kot povprečja meritev, opravljenih z obema metodama (Pregl. E3, Pril. E2).

Zaradi nizkega števila opravljenih meritev s posamezno analizo metodo pri posameznem ekstraktu (N = 2) in velikega števila različnih ekstraktov smo sklenili, da bo tak način prikazovanja rezultatov najbolj razumljivo prikazal razlike v AOU med ekstrakti.

4.2.1 Primerjava vrednosti AOU med različnimi tkivi in ekstrakcijskimi topili

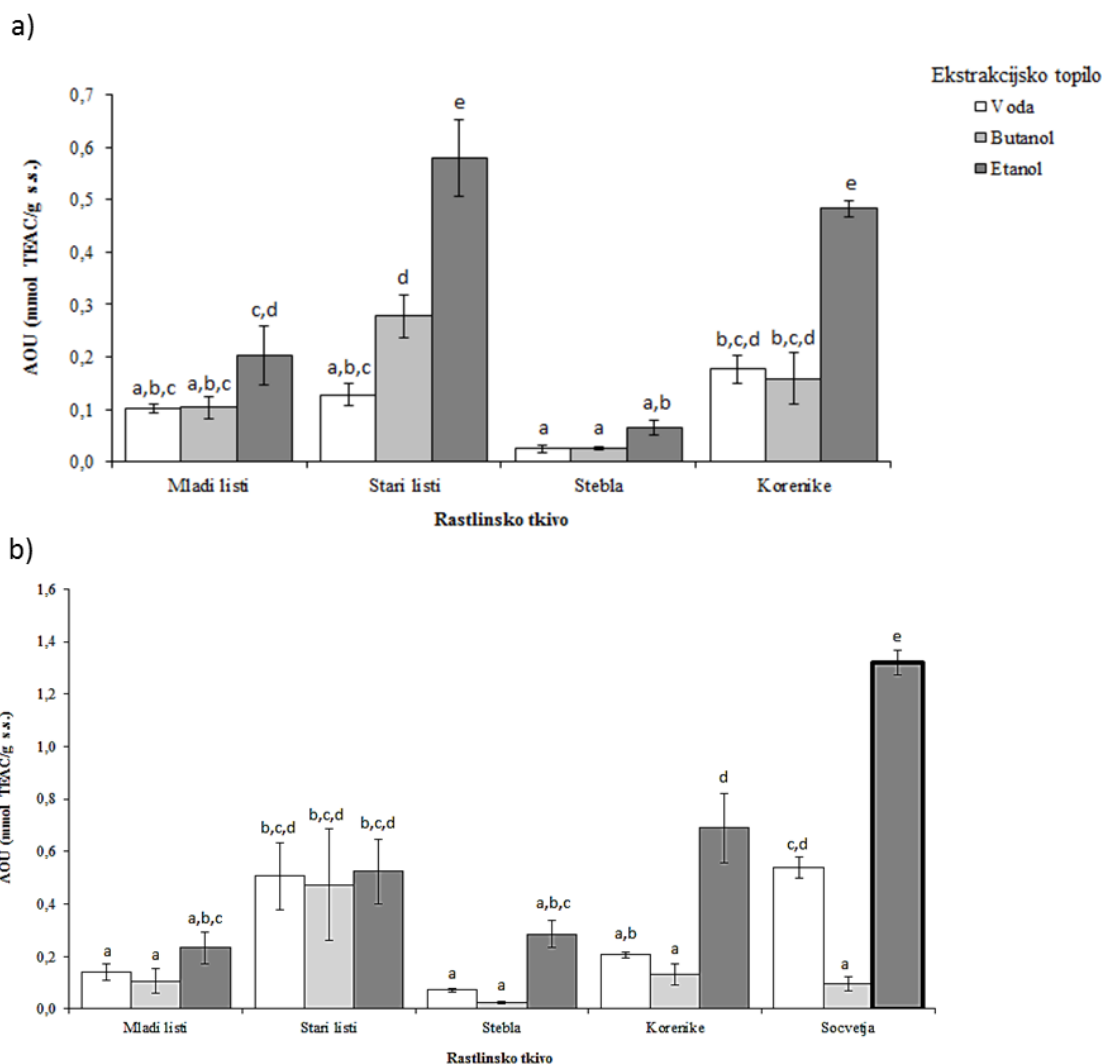
Z ugotavljanjem razlik med ekstrakti različnih tkiv, ki smo jih pripravili z različnimi ekstrakcijskimi topili, smo uspeli v odvisnosti od rastlinskega tkiva in ekstrakcijskega topila prepoznati ekstrakte z najvišjo antioksidativno aktivnostjo.



Slika 19: AOU ekstraktov različnih tkiv japonskega dresnika prvega (a) in drugega vzorčenja (b) (povprečje \pm SN, N = 4). Statistično značilne razlike med ekstrakti so prikazane z različnimi črkami nad stolpci (enosmerna ANOVA, Duncanov post-hoc test, $p < 0,05$)

Najvišjo povprečno vrednost AOU smo v ekstraktih japonskega dresnika prvega vzorčenja izmerili v etanolnih ekstraktih mladih in starih listov (1,3 mmol TEAC/g s.s. in 0,9 mmol TEAC/g s.s.). Ti dve vrednosti sta bili tudi edini, ki sta se kljub veliki variabilnosti podatkov pri obeh tkivih (SN = 0,4 in SN = 0,3), statistično značilno razlikovali od ostalih ekstraktov tkiv ($p < 0,05$) (Sl. 19a).

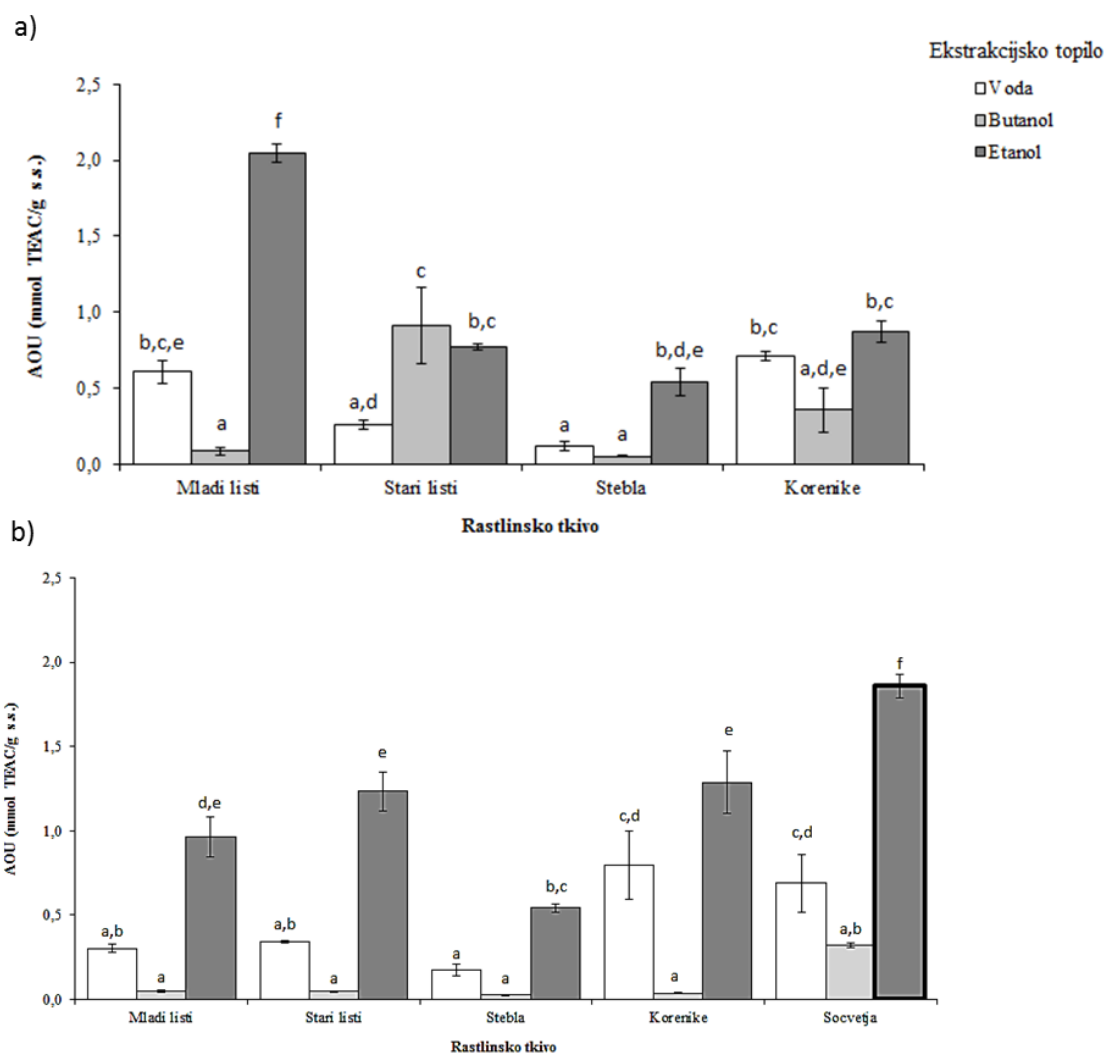
Najvišjo povprečno AOU smo pri japonskem dresniku drugega vzorčenja izmerili v etanolnih ekstraktih socvetij (2,15 \pm 0,06 mmol TEAC/g s.s.). Tudi etanolni ekstrakti mladih listov, korenin in starih listov so imeli v primerjavi z ostalimi ekstrakti značilno višje vrednosti AOU, a vseeno značilno nižje vrednosti kot etanolni ekstrakt socvetij ($p < 0,05$) (Sl. 19b).



Slika 20: AOU ekstraktov različnih tkiv češkega dresnika prvega (a) in drugega vzorčenja (b) (povprečje \pm SN, N = 4). Statistično značilne razlike med ekstrakti so prikazane z različnimi črkami nad stolpci (enosmerna ANOVA, Duncanov post-hoc test, $p < 0,05$)

Vsi etanolni ekstrakti češkega dresnika prvega vzorčenja so imeli v primerjavi z ostalima ekstrakcijskima topiloma znotraj enakih tkiv višjo povprečno vrednost AOU. Najvišjo AOU sta imela etanolna ekstrakta starih listov ($0,58 \pm 0,07$ mmol TEAC/g s.s.) in korenik ($0,48 \pm 0,02$ mmol TEAC/g s.s.), ki pa se nista značilno razlikovala ($p > 0,05$) (Sl. 20a).

Najvišjo povprečno vrednost AOU v ekstraktih češkega dresnika drugega vzorčenja smo izmerili v etanolnih ekstraktih socvetij ($1,32 \pm 0,05$ mmol TEAC/g s.s.). Ta vrednost se je značilno razlikovala od vrednosti ostalih ekstraktov ($p < 0,05$) (Sl 20b).



Slika 21: AOU ekstraktov različnih tkiv sahalinskega dresnika prvega (a) in drugega vzorčenja (b) (povprečje \pm SN, N = 4). Statistično značilne razlike med ekstrakti so prikazane z različnimi črkami nad stolpci (enosmerna ANOVA, Duncanov post-hoc test, $p < 0,05$)

Etanolni ekstrakt mladih listov sahalinskega dresnika prvega vzorčenja je v primerjavi z ostalimi ekstrakti statistično značilno izstopal po svoji AOU, in sicer z vrednostjo 2,05 mmol TEAC/g s.s. (SN = 0,06) ($p < 0,05$). To je bila tudi najvišja izmerjena vrednost med vsemi pripravljenimi ekstrakti prvega vzorčenja (Sl. 21a).

Tudi pri sahalinskem dresniku drugega vzorčenja je glede na ostale ekstrakte značilno izstopal etanolni ekstrakt socvetij, z vrednostjo 1,86 mmol TEAC/g s.s. (SN = 0,07) ($p < 0,05$) (Sl. 21b).

Od vseh pripravljenih ekstraktov so po svoji AOU najbolj izstopali etanolni ekstrakti socvetij. Najvišjo vrednost med vsemi pripravljenimi ekstrakti smo izmerili v etanolnem ekstraktu socvetij japonskega dresnika drugega vzorčenja ($2,15 \pm 0,06$ TEAC/g s.s.) in najnižjo pri butanolnem ekstraktu stebel enakega taksona dresnika ($0,018 \pm 0,002$ mmol TEAC/g s.s.).

Vsi vodni in butanolni ekstrakti so imeli, primerjalno znotraj enakih tkiv, nižjo AOU kot etanolni ekstrakti. Izjema je bil butanolni ekstrakt starih listov sahalinskega dresnika prvega vzorčenja, ki je imel višjo vrednost AOU kot njegov sorodni etanolni ekstrakt. Poudariti velja, da je bila variabilnost podatkov pri butanolnem ekstraktu precejšnja (SN = 0,25).

Rezultati faktorjske analize variance so pokazali, da tako pri prvem kot drugem vzorčenju na izmerjeno AOU vpliva vrsta tkiva, uporabljeno ekstrakcijsko topilo in interakcija med tkivom ter topilom (Pregl. 8 in 9). Opažena interakcija med tkivom in ekstrakcijskim topilom pomeni, da je vrednost AOU pri prvi neodvisni spremenljivki – tkivu, odvisna tudi od vrste/izbora/stopnje druge spremenljivke – ekstrakcijskega topila.

Preglednica 8: Rezultati faktorjske analize variance za AOU ekstraktov prvega vzorčenja pri japonskem (a), češkem (b) in sahalinskem (c) dresniku. Statistično značilni vplivi so prikazani z odebeljenimi črkami. Analize so bile opravljene s programom Statistica, faktorjska ANOVA

a)	SS	Stopinje prostosti	MS	F	p
Tkivo	1,976407	3	0,658802	6,05	0,002
Ekstr. topilo	2,503969	2	1,251984	11,49	0,000
Tkivo*Topilo	2,346527	6	0,391088	3,59	0,007
Napaka	3,922966	36	0,108971		

b)	SS	Stopinje prostosti	MS	F	p
Tkivo	0,621439	3	0,207146	31,41	0,000
Ekstr. topilo	0,469348	2	0,234674	35,59	0,000
Tkivo*Topilo	0,251937	6	0,041989	6,37	0,000
Napaka	0,237408	36	0,006595		

c)	SS	Stopinje prostosti	MS	F	p
Tkivo	2,79940	3	0,93313	19,37	0,000
Ekstr. topilo	4,81965	2	2,40983	50,02	0,000
Tkivo*Topilo	5,47571	6	0,91262	18,94	0,000
Napaka	1,73427	36	0,04817		

Preglednica 9: Rezultati faktorjske analize variance za AOU ekstraktov drugega vzorčenja pri japonskem (a), češkem (b) in sahalinskem (c) dresniku. Statistično značilni vplivi so prikazani z odebeljenimi črkami. Analize so bile opravljene s programom Statistica, faktorjska ANOVA

a)	SS	Stopinje prostosti	MS	F	p
Tkivo	3,24781	4	0,81195	6,05	0,000
Ekstr. topilo	9,36358	2	4,68179	65,80	0,000
Tkivo*Topilo	3,83705	8	0,47963	6,74	0,000
Napaka	3,20194	45	0,07115		

b)	SS	Stopinje prostosti	MS	F	p
Tkivo	2,392079	4	0,598020	15,36	0,000
Ekstr. topilo	2,094105	2	1,047052	26,89	0,000
Tkivo*Topilo	1,908969	8	0,238621	6,13	0,000
Napaka	1,752365	45	0,038941		

c)	SS	Stopinje prostosti	MS	F	p
Tkivo	3,49174	4	0,87293	17,32	0,000
Ekstr. topilo	12,12201	2	6,06101	120,26	0,000
Tkivo*Topilo	1,64125	8	0,205516	4,07	0,001
Napaka	2,26797	45	0,05040		

4.2.1.1 Primerjava AOU med različnimi tkivi

Faktorjska analiza variance je pokazala, da je vrednost AOU neodvisno od uporabe ekstrakcijskega topila najnižja pri steblih (Sl. H1a, H2a, H3a, Pril. H; Sl. I1a, I2a, I3a, Pril. I) in najvišja pri socvetjih (Sl. I1a, I2a, I3a, Pril. I). Pri ekstraktih prvega vzorčenja so imele korenike nižjo AOU kot listi, vendar vrednosti niso bile statistično značilne. Pri drugem vzorčenju je bila variabilnost večja, saj smo pri japonskem in sahalinskem dresniku opazili višjo AOU korenik v primerjavi z listi. Pri češkem dresniku je bila vrednost AOU korenik med meritvama pri starih in mladih listih. Kljub temu značilnih razlik v nobenem primeru nismo opazili (Pregl. 10).

Primerjava AOU med mladimi in starimi listi:

Pri japonskem dresniku so imeli mladi listi v primerjavi s starimi listi višjo AOU. Pri češkem dresniku je bilo ravno obratno. Statistično značilne razlike smo opazili le v primeru češkega dresnika. Višjo AOU so imeli tudi stari listi sahalinskega dresnika drugega vzorčenja, medtem ko so imeli pri prvem vzorčenju mladi listi višjo AOU. V obeh primerih med vrednostmi ni bilo značilnih razlik (Pregl. 10).

Preglednica 10: Statistično značilne razlike v AOU med tkivi dresnikov, izračunane neodvisno od uporabljenega ekstrakcijskega topila. Statistično značilne razlike med tkivi so prikazane z različnimi črkami (enosmerna ANOVA, Duncanov post-hoc test, $p < 0,05$). Oznake: mll = mladi listi, stl = stari listi, ste = stebila, kor = korenike, cve = socvetja, Jap. = japonski dresnik, Češ. = češki dresnik in Sah. = sahalinski dresnik

Tkivo	Vzorčenje 1 (N = 48)			Vzorčenje 2 (N = 60)		
	Jap.	Češ.	Sah.	Jap.	Češ.	Sah.
ste	a	a	a	a	a	a
mll	b	a	b	a	a	a
kor	a,b	b	a,b	a,b	a,b	a,b
stl	a,b	b	a,b	a	b,c	a,b
cve	/	/	/	b	c	b

4.2.1.2 Primerjava AOU pri uporabi različnih ekstrakcijskih topil

Pri analizi vpliva ekstrakcijskega topila na učinkovitost ekstrakcije antioksidantov neodvisno od rastlinskega tkiva smo ugotovili, da je bil pri vseh taksonih dresnikov, ne glede na čas vzorčenja, najbolj učinkovito ekstrakcijsko topilo etanol. To smo potrdili tudi s statističnim testom za ugotavljanje značilnih razlik med vzorci (Pregl. 11).

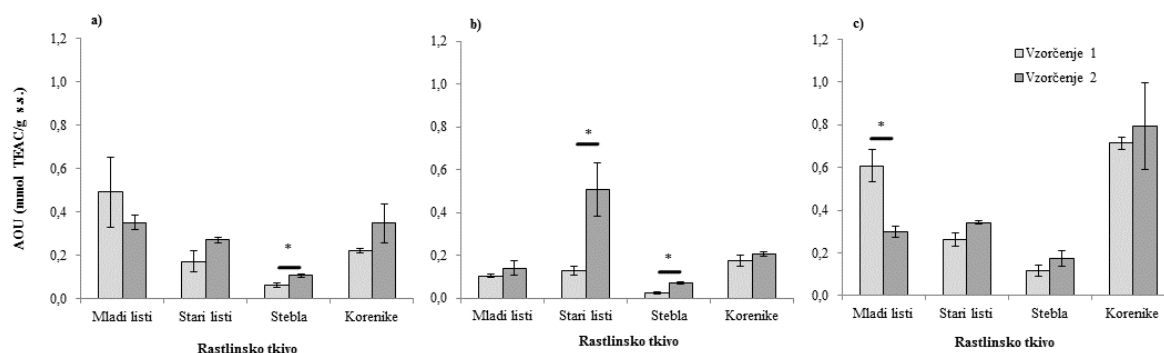
Vodno ekstrakcijsko topilo in *n*-butanol se po učinkovitosti večinoma nista statistično značilno razlikovali, z izjemo ekstraktov sahalinskega dresnika drugega vzorčenja (Sl. I3c, Pril. I). Voda v primerjavi z butanolom izkazuje boljše sposobnost ekstrakcije antioksidantov, saj je bila le v ekstraktih češkega dresnika prvega vzorčenja AOU vodnih ekstraktov, v povprečju, višja glede na butanolne (Sl. H2b; Pril. H).

Preglednica 11: Statistično značilne razlike v AOU v odvisnosti od uporabljenega ekstrakcijskega topila (vzorčenje 1, N = 4; vzorčenje 2, N = 5). Statistično značilne razlike med topili so prikazane z različnimi črkami (enosmerna ANOVA, Duncanov post-hoc test, $p < 0,05$). Oznake: Jap. = japonski dresnik, Češ. = češki dresnik in Sah. = sahalinski dresnik

Topilo	Vzorčenje 1 (N = 48)			Vzorčenje 2 (N = 60)		
	Jap.	Češ.	Sah.	Jap.	Češ.	Sah.
Voda	a	a	a	a	a	b
Butanol	a	a	a	a	a	a
Etanol	b	b	b	b	b	c

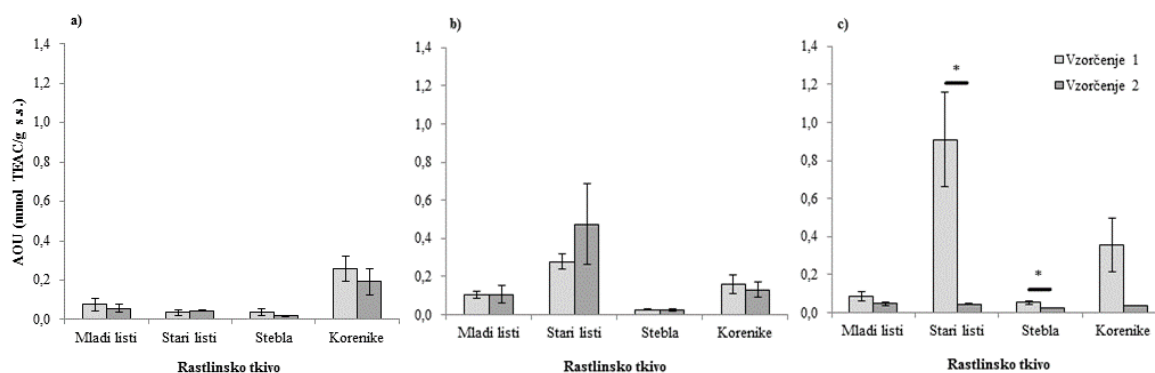
4.2.2 Primerjava AOU med ekstrakti prvega in drugega vzorčenja

Pri vodnih ekstraktih dresnikov smo med prvim in drugim vzorčenjem statistično značilne razlike ($p < 0,05$) v AOU določili pri steblih japonskega in češkega dresnika ter starih listih češkega dresnika. V vseh primerih je bila AOU višja pri drugem vzorčenju (Sl. 22). V ekstraktih mladih listov japonskega in sahalinskega dresnika prvega vzorčenja smo v primerjavi z ekstrakti drugega vzorčenja izmerili višjo AOU. Vrednosti sta se značilno razlikovali le pri mladih listih sahalinskega dresnika (Pregl. G1, Pril. G).



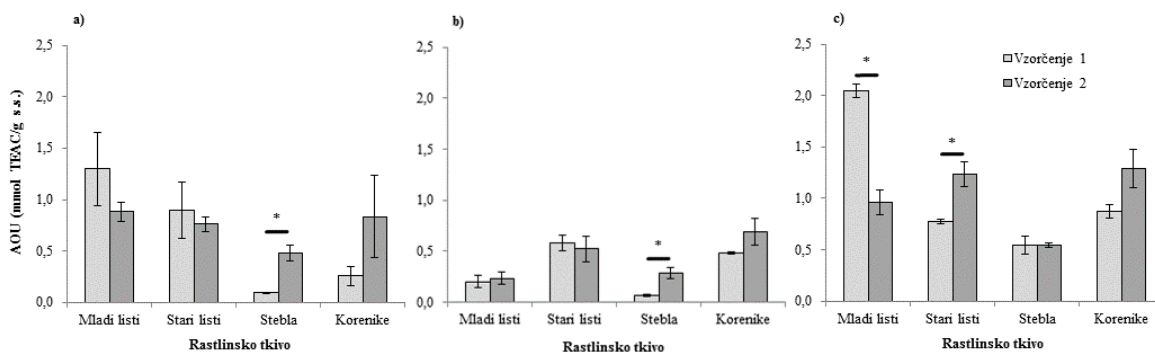
Slika 22: AOU vodnih ekstraktov prvega in drugega vzorčenja pri japonskem (a), češkem (b) in sahalinskem (c) dresniku (povprečje \pm SN; N = 4). Statistično značilne razlike so prikazane z zvezdico (*) (Studentov t-test, $p < 0,05$)

Pri butanolnih ekstraktih različnih tkiv dresnikov prvega vzorčenja je v primerjavi z ekstrakti drugega vzorčenja opaziti višje vrednosti AOU. Kljub temu smo značilne razlike določili le pri starih listih in steblih sahalinskega dresnika. Le v primeru starih listov japonskega in češkega dresnika smo v ekstraktih drugega vzorčenja izmerili višjo AOU, vendar statistično značilnih razlik nismo opazili (Sl. 23).



Slika 23: AOU butanolnih ekstraktov prvega in drugega vzorčenja pri japonskem (a), češkem (b) in sahalinskem (c) dresniku (povprečje \pm SN; N = 4). Statistično značilne razlike so prikazane z zvezdico (*) (Studentov t-test, $p < 0,05$)

Med prvim in drugim vzorčenjem so se vrednosti AOU etanolnih ekstraktov značilno razlikovale le pri ekstraktih stebel japonskega in češkega dresnika ter starih listov sahalinskega dresnika, z značilno višjimi vrednostmi pri ekstraktih drugega vzorčenja. Poleg tega so enako kot pri vodnih ekstraktih značilno izstopali mladi listi sahalinskega dresnika drugega vzorčenja (Sl. 24).



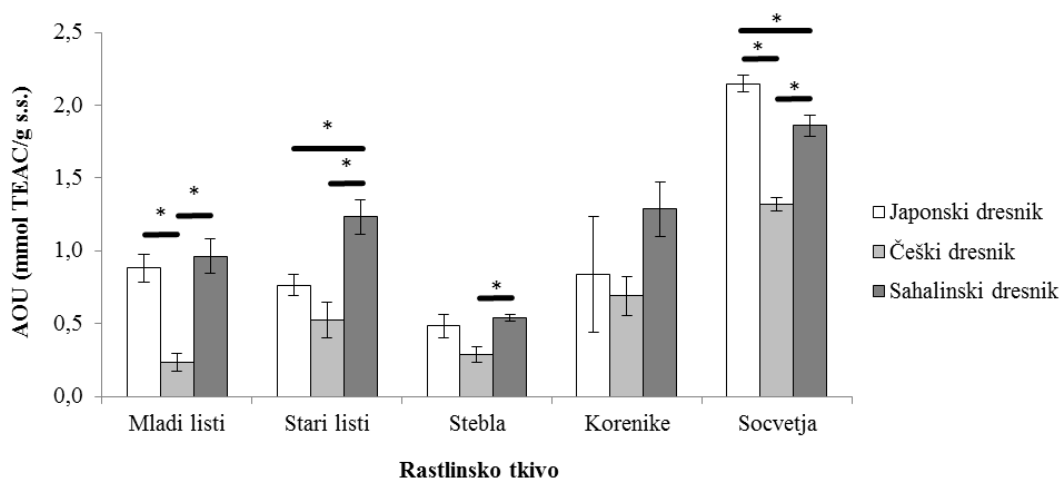
Slika 24: AOU etanolnih ekstraktov prvega in drugega vzorčenja pri japonskem (a), češkem (b) in sahalinskem (c) dresniku (povprečje \pm SN; N = 4). Statistično značilne razlike so prikazane z zvezdico (*) (Studentov t-test, $p < 0,05$)

4.2.3 Primerjava AOU med taksoni dresnikov

Splošen trend kaže, da smo najvišje vrednosti AOU izmerili v etanolnih ekstraktih (Pregl. E3, Pril. E2), zato smo se odločili, da primerjamo etanolne ekstrakte drugega vzorčenja.

AOU mladih listov japonskega in sahalinskega dresnika je bila značilno višja glede na vrednost pri češkem dresniku. Statistično značilno višjo vrednost smo v primerjavi s češkim dresnikom izmerili tudi pri starih listih in steblih sahalinskega dresnika. Stari listi sahalinskega dresnika imajo tudi v primerjavi s starimi listi japonskega dresnika značilno višjo AOU. Pri socvetjih japonskega in sahalinskega dresnika je bila vrednost AOU značilno višja od tiste pri češkem dresniku, vendar je bila tudi vrednost AOU japonskega dresnika značilno višja od vrednosti sahalinskega dresnika. Pri koreninah značilnih razlik v AOU med taksoni dresnikov nismo ugotovili (Sl. 25).

V vseh primerih je bila AOU etanolnih ekstraktov drugega vzorčenja najnižja pri tkivih češkega dresnika (Pregl. J1, Pril. J).



Slika 25: AOU etanolnih ekstraktov tkiv različnih taksonov dresnikov drugega vzorčenja (povprečje \pm SN; N = 4). Statistično značilne razlike so prikazane z zvezdico (*) (Studentov t-test, $p < 0,05$). Posamezne parne primerjave so prikazane z odebeljeno horizontalno črto

4.3 KORELACIJE

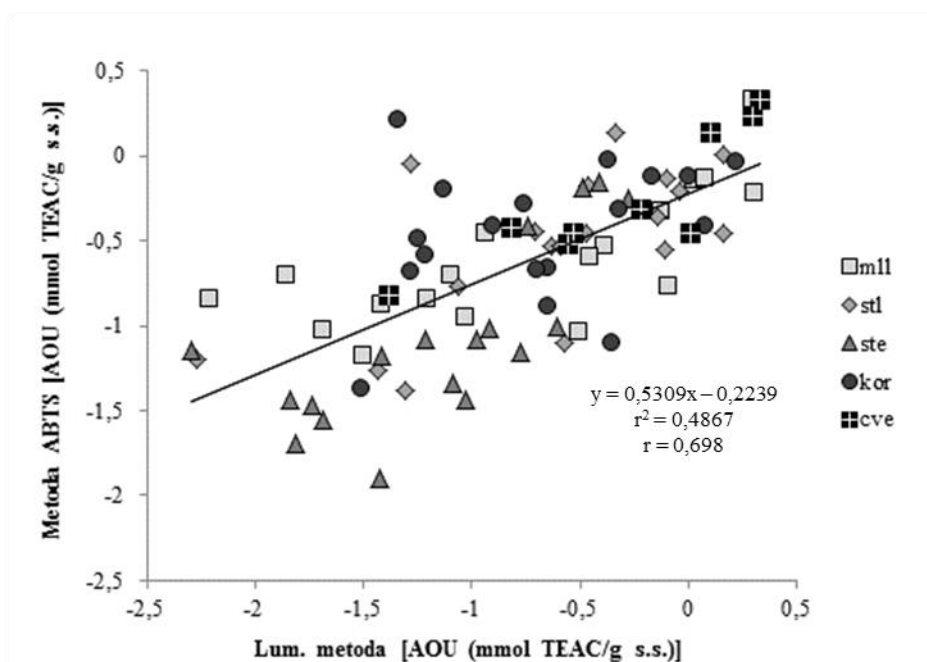
Natančnejši prikaz vseh meritev, ki smo jih uporabili za izračun korelacijskih povezav, je prikazan v preglednicah E1 in E2 (Pril. E1).

4.3.1 Korelacija med luminescenčno metodo in metodo ABTS

Luminescenčna metoda in metoda ABTS temeljita na različnih principih merjenja, zato nas je zanimalo, ali je mogoče primerjati rezultate teh dveh metod. Povezava med obema metodama je razvidna iz slike 26. Pearsonov korelacijski koeficient (r) je znašal 0,70 in

koeficient determinacije (r^2) 0,49. Za izračun koeficientov smo opravili 81 parnih primerjav med obema metodama. Vrednosti, izmerjene z luminescenčno metodo, lahko v približno polovici primerov (48,7 %) pojasnjujejo variabilnost vrednosti, izmerjenih z metodo ABTS.

Obe spremenljivki sta linearno povezani ($\alpha < 0,01$). Vrednost Pearsonovega koeficienta korelacije kaže na zmerno do močno povezanost med obema metodama.

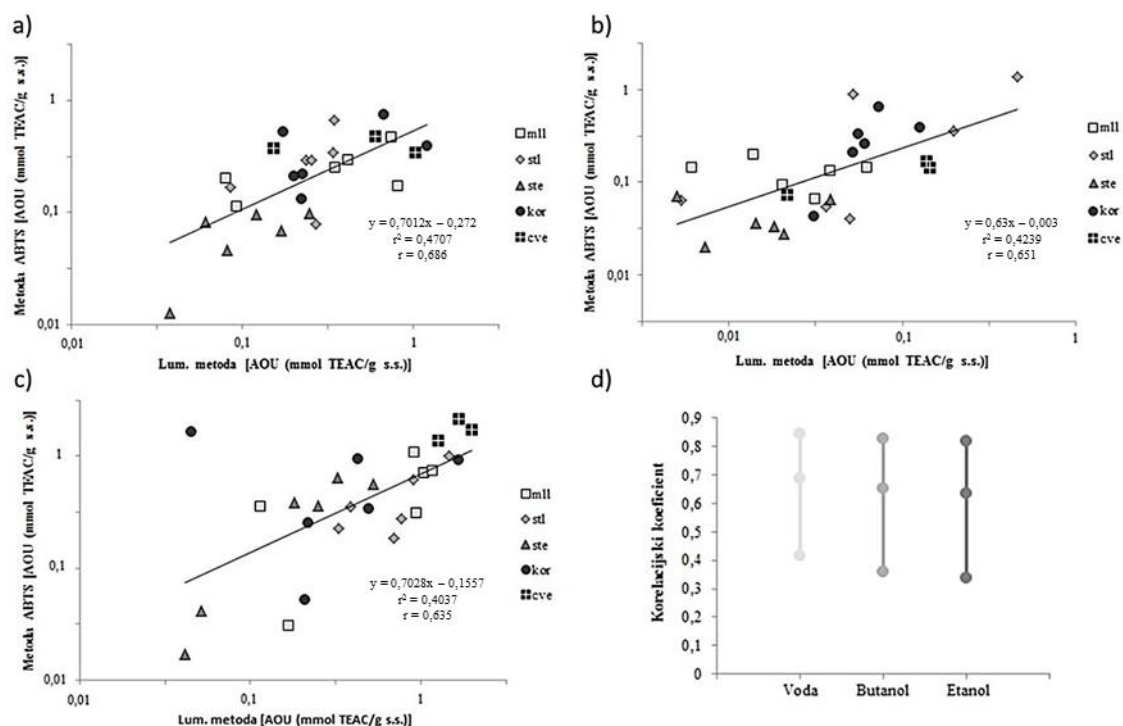


Slika 26: Povezava med AOU izmerjeno z luminescenčno metodo in metodo ABTS. Vrednosti so prikazane na logaritmski skali. Oznake: mll = mladi listi, stl = stari listi, ste = stebela, kor = korenike in cve = socvetja

4.3.2 Korelacija med luminescenčno metodo in metodo ABTS v odvisnosti od ekstrakcijskega topila

Zanimalo nas je tudi, kako na korelacijsko povezanost obeh metod za merjenje AOU vpliva vrsta uporabljenega ekstrakcijskega topila.

Iz dobljenih Pearsonovih korelacijskih koeficientov in števila parnih primerjav med obema metodama smo izračunali tudi 95 % intervale zaupanja (CI).



Slika 27: Povezava med AOU izmerjeno z luminescenčno metodo in metodo ABTS v odvisnosti od vodnega (a), butanolnega (b) in etanolnega (c) ekstrakcijskega topila. Vrednosti so prikazane na logaritmski skali. Slika d prikazuje korelacijske koeficiente (r) in njihove intervale zaupanja (0,95 CI) pri različnih ekstrakcijskih topilih. Ne glede na uporabljeno ekstrakcijsko topilo se korelacijski koeficienti med seboj niso značilno razlikovali. Oznake: mll = mladi listi, stl = stari listi, ste = stebila, kor = korenike in cve = socvetja

Korelacijska povezanost luminescenčne metode in metode ABTS je bila ne glede na uporabljeno ekstrakcijsko topilo prisotna ($\alpha < 0,01$) (Sl. 27a, 27b in 27c). Izračunani Pearsonovi korelacijski koeficienti so bili pri vseh treh ekstrakcijskih topilih podobni: za vodno ekstrakcijsko topilo $r = 0,686$, *n*-butanol $r = 0,651$ in etanolno ekstrakcijsko topilo $r = 0,635$. Obe metodi sta ne glede na ekstrakcijsko topilo medsebojno zmerno povezani. Zgornja meja zmernih korelacij je 0,69.

S parnimi primerjavami med korelacijskima koeficientoma dveh neodvisnih vzorcev smo nato preverili prisotnost značilnih razlik. Statistično značilnih razlik med koeficienti različnih ekstrakcijskih topil nismo ugotovili (z-test, $p > 0,05$) (Pregl. K2, Pril. K).

4.4 PRVI PRESEJALNI TESTI S TLC

Za presejalne analize, s katerimi smo določali razlike v številu in intenzivnosti lis med testnimi raztopinami različnih taksonov dresnikov, smo uporabili kromatografske plošče HPTLC silikagel 60 s steklenim nosilcem in dve topili za razvijanje: etil acetat-voda-mravljinčna kislina (85 : 15 : 10, v/v/v) in *n*-heksan-etil acetat-mravljinčna kislina (20 : 19 : 1, v/v/v). Kot detekcijski reagent smo uporabili NST, ki je namenjen karakterizaciji fenolnih spojin oz. flavonoidov. Kromatograme testnih raztopin različnih taksonov dresnikov smo poslikali pri osvetlitvi z belo svetlobo in pri valovni dolžini 366 nm.

Pregled kromatogramov testnih raztopin tkiv drugega vzorčenja je pokazal, da so si po legi in barvi lis med seboj podobni kromatogrami listov, stebel in socvetij. Najmanj intenzivne lise imajo stebela, nato sledijo stari listi. Največ fenolnih snovi je v socvetjih in mladih listih. Največje število lis kažejo mladi listi češkega in sahalinskega dresnika, najbolj intenzivne lise pa imajo socvetja, med katerimi izstopajo predvsem socvetja sahalinskega dresnika. Povsem druge sestavine vsebujejo korenike, pri katerih po količini prisotnih fenolnih spojin izstopajo korenike japonskega dresnika. Korenike sahalinskega dresnika vsebujejo malo fenolnih spojin. Testne raztopine korenik imajo glede na ostala tkiva manjše število lis. Pri korenikah izstopajo bolj temno modre, pri ostalih tkivih pa rumene in svetlo modre lise (Sl. 28).

Edine lise, ki prevladujejo pri vodnih in etanolnih testnih raztopinah starih listov so v primerjavi z mladimi listi prisotne pri R_F 0,30, 0,32 in 0,38 ter so modre barve (Sl. 28a in 28b).

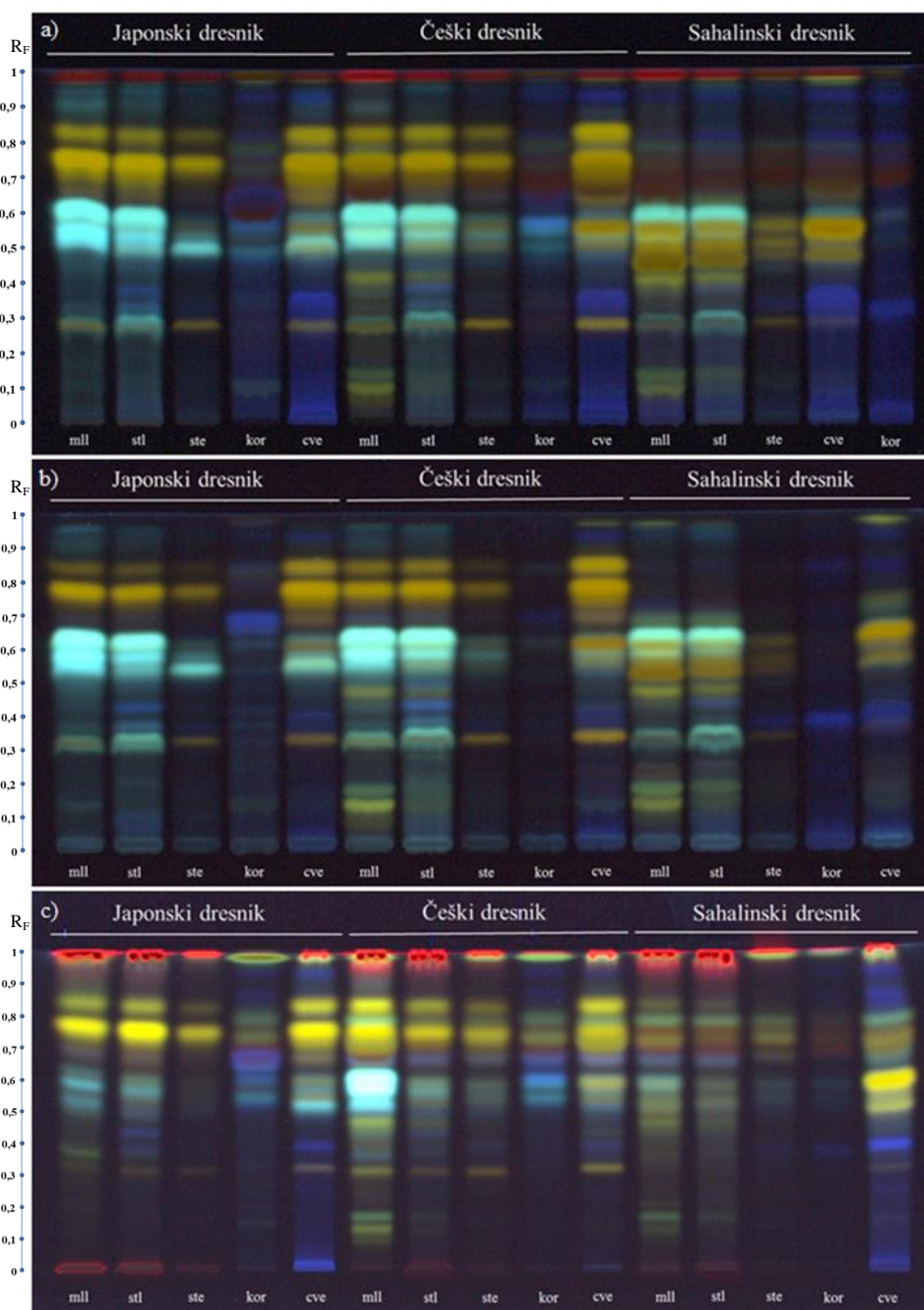
Primerjava ekstrakcijskih topil je pokazala, da je število lis podobno pri vseh topilih. Barva in lega lis vodnih testnih raztopin se od etanolnih bistveno ne razlikuje. Lise so pri etanolnih testnih raztopinah bolj intenzivne. V območju R_F med 0,62 in 0,68 je opaziti prisotnost rjave lise, ki je pri vodnih testnih raztopinah ni zaslediti. Pri etanolni testni raztopini korenik japonskega dresnika zelo izstopa rjava lisa ($R_F = 0,59$). Vodne testne raztopine nadzemnih tkiv pri R_F 0,98 nimajo rdeče lise (Sl. 28a in 28b).

Tudi butanolne testne raztopine so primerljive z etanolnimi in vodnimi, čeprav je opaziti tudi nekaj posebnosti. Pri listih češkega in sahalinskega dresnika se opazi predvsem prisotnost dodatnih zelenih lis ($R_F = 0,79$). Pri korenikah izstopa zelena lisa z R_F 0,98. Zanimivo je, da teh zelenih lis ni pri butanolnih testnih raztopinah japonskega dresnika (Sl. 28c).

Testne raztopine nadzemnih tkiv sahalinskega dresnika v primerjavi s testnimi raztopinami japonskega in češkega dresnika izstopajo po zastopanosti in jakosti nekaterih lis ter kažejo

nekaj več specifičnosti. Zelo izrazito se opazi odsotnost rumenih lis pri vodnih in etanolnih testnih raztopinah listov, stebel in socvetij sahalinskega dresnika ($R_F = 0,73$ in $0,81$). Pri butanolnih testnih raztopinah sahalinskega dresnika sta ti dve rumeni lisi zelo slabo zaznavni. Pri japonskem in češkem dresniku sta intenzivni. Vodna in etanolna testna raztopina socvetij češkega in sahalinskega dresnika imata izstopajočo temno rumeno liso pri $R_F 0,55$, medtem ko je ta lisa pri japonskem dresniku zelo neizrazita. Pri vseh testnih raztopinah listov, stebel in socvetij so na območju med $R_F 0,49$ in $0,62$ prisotne štiri izmenjujoče se rumene in modre lise. Pri japonskem dresniku v tem območju prevladujejo modre lise, rumene pa so skoraj neopazne. Po drugi strani pri sahalinskem dresniku prevladujejo rumene lise. Češki dresnik ima na tem območju večje število modrih lis, ki so po intenzivnosti podobne lisam japonskega dresnika. Prisotne ima tudi rumene lise, ki so bolj značilne za sahalinski dresnik. Svetlo modra lisa pri $R_F 0,49$ je izrazita pri nadzemnih tkivih japonskega dresnika, medtem ko je pri ostalih dveh taksonih dresnikov neizrazita.

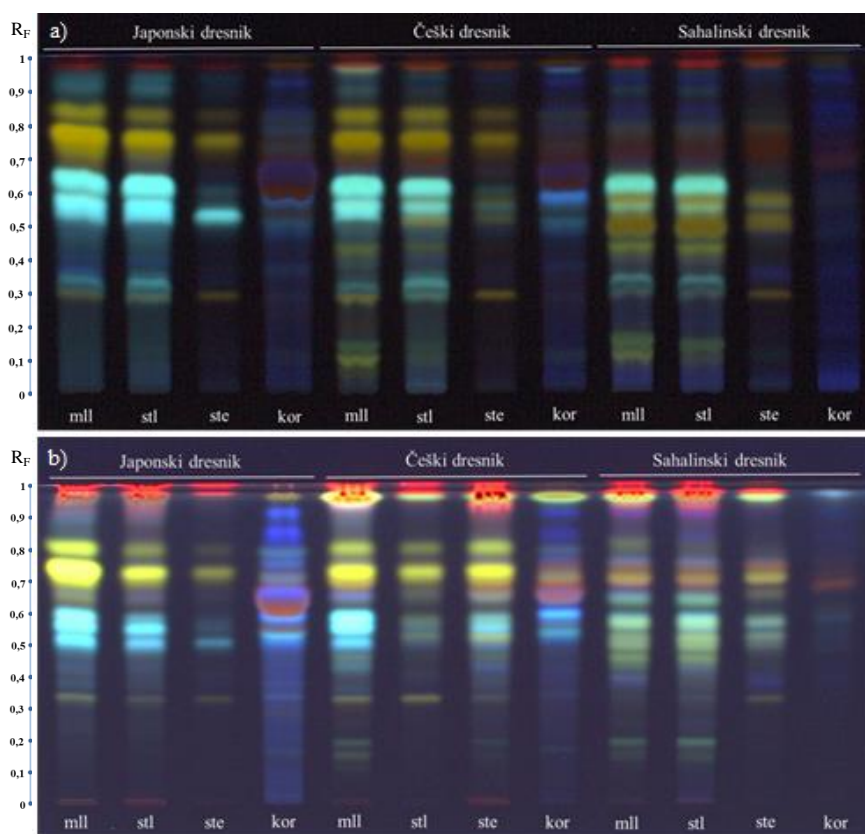
Etanolna in vodna testna raztopina listov sahalinskega dresnika imata specifično prisotno intenzivno temno rumeno liso pri $R_F 0,45$. Svetlo rumena lisa pri $R_F 0,40$ je značilna za liste češkega in sahalinskega dresnika.



Slika 28: Kromatografske plošče HPTLC silikagel 60 (20 cm × 10 cm) z nanesenimi etanolnimi (a), vodnimi (b) in butanolnimi (c) testnimi raztopinami drugega vzorčenja. Plošče so bile razvite v topilu etil acetat-voda-mravljinčna kislina (85 : 15 : 10, v/v/v) in po derivatizaciji z reagentom NST posnete pri 366 nm. Volumni vseh nanosov so bili 10 μ L. Oznake: mll = mladi listi, stl = stari listi, ste = stebla, kor = korenike in cve = socvetja

Primerjava testnih raztopin prvega in drugega vzorčenja je pokazala kvalitativno podobnost med testnimi raztopinami enakega tkiva in taksona dresnika. Tudi barva lis pri enakih R_F je bila enaka. Med sorodnimi kromatogrami je bilo vseeno opaziti razlike v

jakosti nekaterih lis. Etanolna testna raztopina mladih listov češkega dresnika drugega vzorčenja je imela pri R_F 0,68 poudarjeno rjavo liso. Poudarjeno liso enake barve je imela pri R_F 0,59 tudi testna raztopina korenin istega taksona dresnika prvega vzorčenja. Pri etanolni testni raztopini korenin sahalinskega dresnika drugega vzorčenja je v primerjavi s prvim vzorčenjem opaziti tudi poudarjeno modro liso ($R_F = 0,32$). Pri butanolnih testnih raztopinah je med prvim in drugim vzorčenjem opaziti večje število razlik. Po jakosti lis zelo izstopata testni raztopini mladih listov češkega dresnika drugega vzorčenja in korenin japonskega dresnika prvega vzorčenja. Slednja ima pri R_F 0,62 veliko rjavo liso. Pri testni raztopini listov japonskega dresnika prvega vzorčenja izstopajo modre lise na območju R_F med 0,49 in 0,62 (Sl. 29).



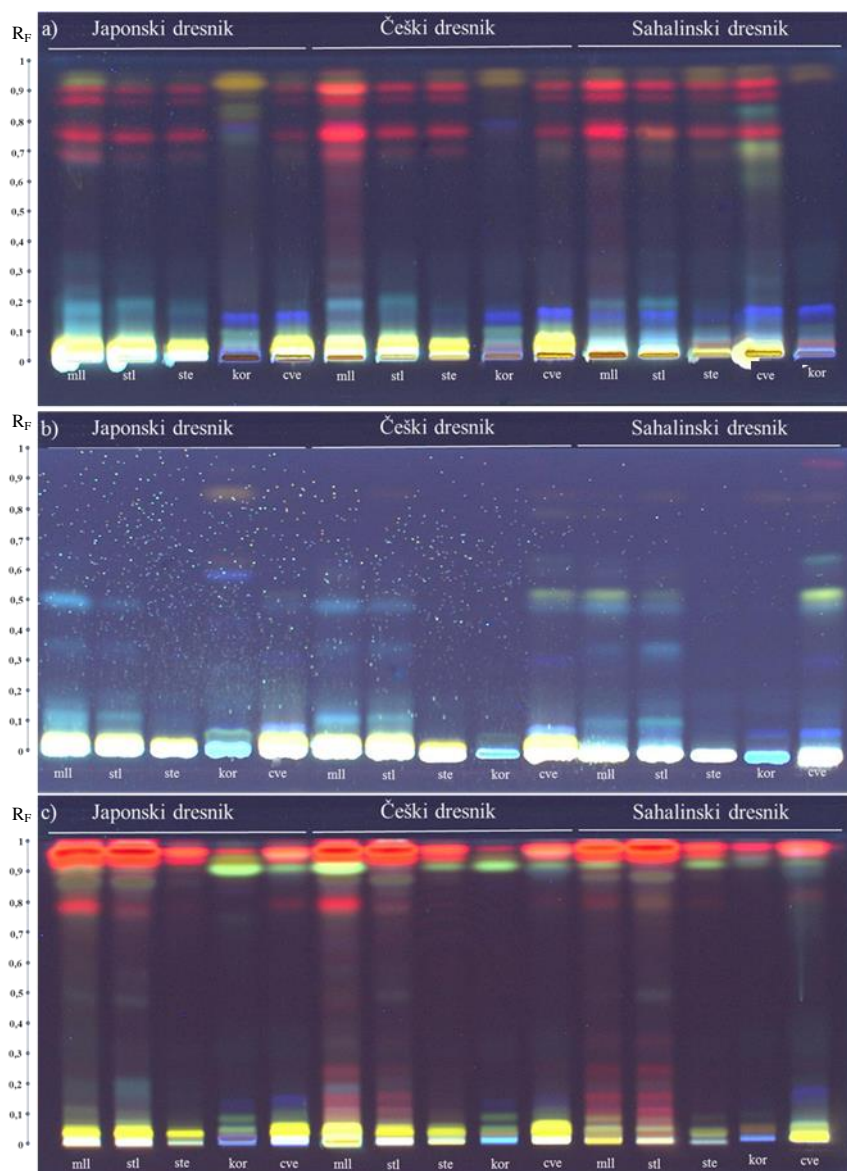
Slika 29: Kromatografski plošči HPTLC silikagel 60 (20 cm × 10 cm) z nanesenimi etanolnimi (a) in butanolnimi (b) testnimi raztopinami prvega vzorčenja. Plošči sta bili razviti v topilu etil acetat-voda-mravljinčna kislina (85 : 15 : 10, v/v/v) in po derivatizaciji z reagentom NST posneti pri 366 nm. Volumni vseh nanosov so bili 10 μ L. Oznake: mll = mladi listi, stl = stari listi, ste = stebla, kor = korenike in cve = socvetja

Kromatografske plošče, razvite v topilu *n*-heksan-etil acetat-mravljinčna kislina (20 : 19 : 1, v/v/v), po derivatizaciji z NST reagentom kažejo manjše število lis kot plošče razvite v topilu etil acetat-voda-mravljinčna kislina (85 : 15 : 10, v/v/v). Pri uporabi topila

za razvijanje etil acetat-voda-mravljinična kislina so najbolj intenzivne lise med R_F 0,40 in 0,85 (Sl. 28 in 30). Pri etanolnih in butanolnih testnih raztopinah, razvitih s topilom za razvijanje *n*-heksan-etil acetat-mravljinična kislina, so najbolj intenzivne lise nad R_F 0,68. Veliko sestavin je ostalo tudi v območju R_F blizu starta (nanosa testnih raztopin), kjer je prisotna velika količina rumeno in modro obarvanih sestavin.

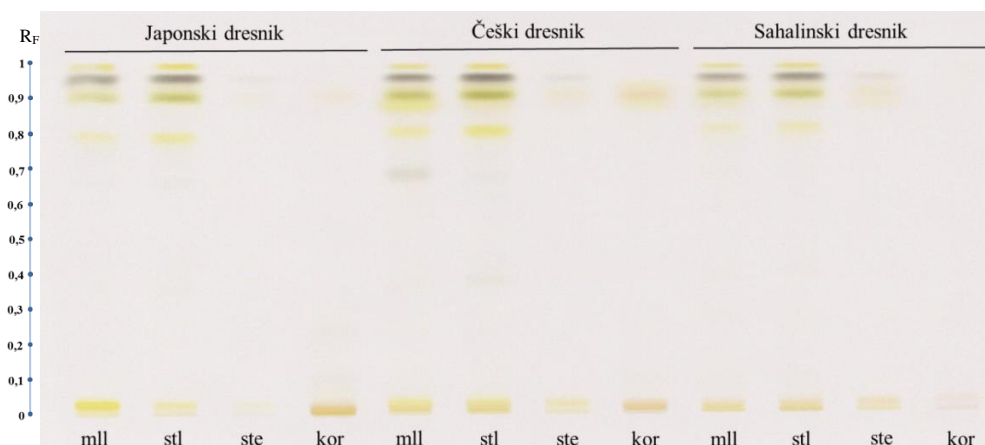
Pri listih, steblih in socvetjih nad R_F 0,68 izstopajo rdeče in pri korenikah modre, rumene ali zelene lise (Sl. 30a in 30c). Pri etanolnih testnih raztopinah nadzemnih tkiv vseh treh taksonov dresnikov so prisotne štiri značilne rdeče lise ($R_F = 0,68, 0,75, 0,87$ in $0,90$). Rdeče lise na tem območju so najmanj intenzivne pri japonskem dresniku, medtem ko so pri vseh korenikah odsotne. Pri korenikah izstopata dve rumeni lisi ($R_F = 0,93$ in $0,95$), ki sta prisotni tudi pri ostalih etanolnih testnih raztopinah. Korenike japonskega in češkega dresnika imajo pri R_F 0,78 specifično prisotno temno modro liso. Rumena lisa pri R_F 0,68 je specifična le za socvetja sahalinskega dresnika (Sl. 30b). Tudi v tem topilu za razvijanje med socvetji najbolj izstopajo testne raztopine sahalinskega dresnika.

Ponovno se je glede na vsebnost vrste fenolnih spojin pokazala podobnost med nadzemnimi tkivi. Drugačne sestavine so prisotne v korenikah. Po jakosti in številu lis izstopajo mladi listi češkega, socvetja sahalinskega in korenike japonskega dresnika. Med seboj so si bolj podobne korenike japonskega in češkega dresnika (Sl. 30).



Slika 30: Kromatografske plošče HPTLC silikagel 60 (20 cm × 10 cm) z nanesenimi etanolnimi (a), vodnimi (b) in butanolnimi (c) testnimi raztopinami drugega vzorčenja. Plošče so bile razvite v topilu *n*-heksan-etil acetat-mravljinčna kislina (20 : 19 : 1, v/v/v) in po derivatizaciji z reagentom NST posnete pri 366 nm. Volumni vseh nanosov so bili 10 μ L. Oznake: mll = mladi listi, stl = stari listi, ste = stebela, kor = korenike in cve = socvetja

Na kromatografski plošči z nanesenimi butanolnimi testnimi raztopinami prvega vzorčenja, razviti v topilu *n*-heksan-etil acetat-mravljinčna kislina in posneti pri uporabi bele svetlobe, pri listih izstopajo štiri lise. Rumene lise se pojavljajo pri R_F 0,80, 0,90 in 0,98. Pri R_F 0,90 je znotraj rumene lise opaziti še rahlo rjavo liso. Listi imajo pri R_F 0,95 tudi specifično temno sivo liso. Korenike češkega dresnika imajo pri R_F 0,90 prisotno rumeno-rjavo liso (Sl. 31). Pri vseh tkivih je veliko sestavin ostalo v območju R_F blizu nanosa testnih raztopin, kar smo opazili tudi na plošči slikani pri 366 nm (Sl. 30c).

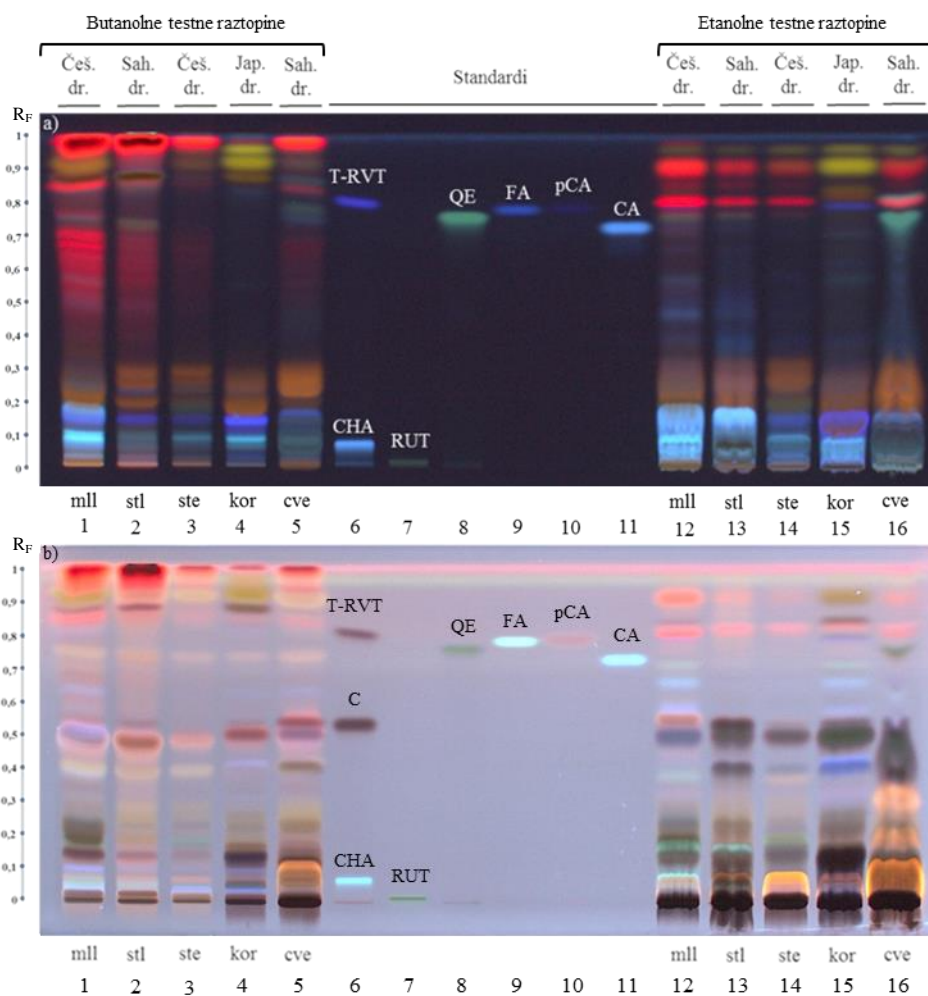


Slika 31: Kromatografska plošča HPTLC silikagel 60 (20 cm × 10 cm) z nanesenimi butanolnimi testnimi raztopinami drugega vzorčenja. Plošča je bila razvita v topilu *n*-heksan-etil acetat-mravljinčna kislina (20 : 19 : 1, v/v/v) in po derivatizaciji z reagentom NST posneta pri uporabi bele svetlobe. Volumni vseh nanosov so bili 10 µL. Oznake: mll = mladi listi, stl = stari listi, ste = stebla, kor = korenike in cve = socvetja

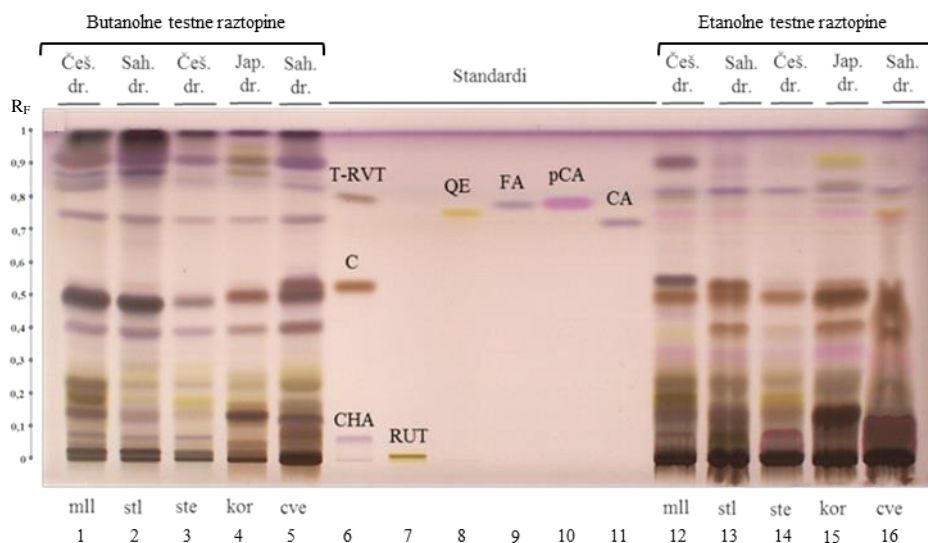
4.5 REZULTATI UPORABE STANDARDOV FENOLNIH SPOJIN PRI TLC

S TLC smo s komercialno dostopnimi standardi kvalitativno določili prisotnost fenolnih spojin v testnih raztopinah različnih tkiv dresnikov. Spojine smo med seboj ločili z uporabo topila za razvijanje toluen-etil acetat-mravljinčna kislina (6 : 5 : 1, v/v/v). Kot derivatizacijski reagent smo uporabili anisaldehyd.

Z analizo slik 32a, 32b in 33 smo določili prisotnost nekaterih fenolnih spojin v analiziranih testnih raztopinah. Pri vrednotenju rezultatov smo upoštevali barvo lis, intenzivnost lis in R_F (Pregl. 12).



Slika 32: Kromatografska plošča HPTLC silikagel 60 (20 cm × 10 cm), razvita v topilu toluen-etil acetat-mravljinčna kislina (6 : 5 : 1, v/v/v), slikana pri 366 nm, pred (a) in po (b) derivatizaciji z anisaldehydним derivatizacijskim reagentom. Nanosi (10 μL) 1–5 in 12–16: testne raztopine drugega vzorčenja, nanosi 6–11: trans-resveratrol (T-RVT, 0,5 μg), (+)-katehin (C, 1 μg), klorogenska kislina (CHA, 0,8 μg), rutin (RUT, 1,5 μg), kvercetin (QE, 0,8 μg), ferulna kislina (FA, 0,5 μg), *p*-kumarna kislina (pCA, 2 μg) in kavna kislina (CA, 0,8 μg). Označe: Jap. = japonski dresnik, Češ. = češki dresnik, Sah. = sahalinski dresnik, dr. = dresnik, mll = mladi listi, stl = stari listi, ste = stebila, kor = korenike in cve = socvetja



Slika 33: Kromatografska plošča HPTLC silikagel 60 (20 cm × 10 cm), razvita v topilu toluen-etil acetat-mravljinčna kislina (6 : 5 : 1, v/v/v), slikana pri uporabi bele svetlobe, po derivatizaciji z anisaldehydним derivatizacijskim reagentom. Nanosi (10 μ L) 1–5 in 12–16: testne raztopine drugega vzorčenja, nanosi 6–11: trans-resveratrol (T-RVT, 0,5 μ g), (+)-katehin (C, 1 μ g), klorogenska kislina (CHA, 0,8 μ g), rutin (RUT, 1,5 μ g), kvercetin (QE, 0,8 μ g), ferulna kislina (FA, 0,5 μ g), *p*-kumarna kislina (pCA, 2 μ g) in kavna kislina (CA, 0,8 μ g). Oznake: Jap. = japonski dresnik, Čes. = češki dresnik, Sah. = sahalinski dresnik, dr. = dresnik, mll = mladi listi, stl = stari listi, ste = stebila, kor = korenike in cve = socvetja

Preglednica 12: Retencijski faktorji (R_f) standardov fenolnih spojin in prisotnost spojin v različnih tkivih dresnikov. Oznake: T-RTV = trans-resveratrol, CHA = klorogenska kislina, C = (+)-katehin, RUT = rutin, QE = kvercetin, FA = ferulna kislina, pCA = *p*-kumarna kislina, CA = kavna kislina, jap = japonski dresnik, ces = češki dresnik, sah = sahalinski dresnik, mll = mladi listi, stl = stari listi, ste = stebila, kor = korenike in cve = socvetja. Simbol * = fenolna spojina je prisotna, ** = višja vsebnost fenolne spojine in (?) = ne moremo z gotovostjo trditi, da je fenolna spojina prisotna v analizirani testni raztopini

R_f /Testna r.	Standard							
	T-RVT	CHA	C	RUT	QE	FA	pCA	CA
ces 2, mll, 2		(?)	(?)					(?)
sah 2, stl, 2		(?)	(?)					(?)
ces 2, ste, 2		(?)	(?)					(?)
jap 2, kor, 2			*					(?)
sah 2, cve, 2			**					(?)
ces 2, mll, 3	*	**	**					
sah 2, stl, 3		(?)	**					
ces 2, ste, 3		(?)	*					
jap 2, kor, 3	**		**					
sah 2, cve, 3			**		**			

Z uporabo standardov nam je v etanolni testni raztopini korenik japonskega dresnika uspelo določiti prisotnost trans-resveratrola, ki smo ga opazili tudi v etanolni testni

raztopini mladih listov češkega dresnika. Klorogensko kislino smo določili v etanolni in butanolni testni raztopini mladih listov češkega dresnika, morda pa je prisotna tudi v testnih raztopinah starih listov in stebel. Katehin smo določili v vseh nanesenih etanolnih testnih raztopinah. Najmanj ga je bilo v steblih. Kvercetin smo določili v etanolni testni raztopini socvetij sahalinskega dresnika. Prisotnosti rutina nam ni uspelo določiti, saj je imel rutin zelo nizek R_F . V območju R_F blizu nanosa testnih raztopin, je ločljivost med lisami premajhna, da bi lise lahko ločevali med seboj. Prisotnosti ferulne in *p*-kumarne kisline v testnih raztopinah nismo uspeli potrditi.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V magistrskem delu smo analizirali antioksidativno učinkovitost (AOU) ekstraktov različnih tkiv dresnikov, ki uspevajo v Sloveniji. Poleg tega smo preverili korelacijsko povezanost med dvema metodama za merjenje AOU. V drugem delu raziskav smo z uporabo tankoplastne kromatografije (TLC) naredili analizo prisotnosti fenolnih spojin v tkivih dresnikov.

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Delež vode v tkivih dresnikov

Za ovrednotenje rezultatov meritev AOU ekstraktov tkiv dresnikov, pripravljenih s pomočjo različnih ekstrakcijskih topil, smo potrebovali razmerje med svežo in suho maso tkiva. Tkiva dresnikov smo tehtali pred in po liofilizaciji ter izračunali deleže vode v tkivih.

Izmerjene vrednosti so nam pokazale, da je najvišji delež vode prisoten v socvetjih (81 %) in najnižji v steblih (62 %) (Sl. 18).

Podatki iz literature navajajo, da voda predstavlja od 80 do 90 % mase rastlinskega tkiva. Olesenela rastlinska tkiva vsebujejo manj vode, okrog 45 do 50 %, tkiva zelnatih rastlin pa od 70 do 95 % vode (Why plants ..., 2014). Mlajša tkiva v primerjavi s starejšimi vsebujejo višji delež vode (Uddin in sod., 2012). Naše meritve so potrdile, da mehkejša zelnata tkiva (listi in socvetja) vsebujejo višji delež vode kot tkiva, ki so bolj lignificirana in otrdela (stebela in korenike).

Vsebnost vode v tkivu je lahko pokazatelj vodnega statusa v rastlini. Različni okoljski dejavniki, predvsem dostopnost vode v sistemu, vplivajo na hidracijo rastlinskih tkiv, njihovo maso, rast in razvoj. Ustrezna hidracija omogoča, da so rastlinske celice primerno turgidne. Ob nezadostni preskrbi rastlinskih tkiv z vodo, masa tkiv lahko upade (Díaz-Pérez in sod., 1995; Yamasaki in Dillenburg, 1999).

S faktorsko analizo variance smo ugotovili, da na delež vode v tkivu vpliva tudi takson dresnika (Sl. F1, Pril. F).

5.1.2 Primerjava AOU med različnimi tkivi, ekstrakcijskimi topili in taksoni dresnikov

Skupno AOU smo v pripravljenih ekstraktih merili z dvema analiznima metodama, luminescenčno metodo in metodo ABTS. Za merjenje AOU obstaja veliko število različnih metod. Zaradi variabilnosti v izmerjenih vrednostih AOU se na posameznem vzorcu priporoča opraviti meritve z najmanj dvema različnima metodama (Corral-Aguayo in sod., 2008).

Obe naši metodi AOU merita posredno, zato smo se odločili, da bomo meritve obeh metod, pri ugotavljanju razlik v AOU med ekstrakti, obravnavali skupaj. Tak način združevanja meritev dveh metod v enotno skupino med znanstveniki ni najbolj pogost, vendar smo se na osnovi podatkov iz literature, ki govorijo o tem, da so rezultati med metodami in celo znotraj metode pogosto zelo variabilni, celo nasprotujoči si, odločili, da bi bil v našem primeru tak prikaz najbolj informativen.

Na razlike v vsebnosti antioksidantov in izmerjeno AOU poleg uporabljene analize metode in načina ekstrakcije vplivajo tudi čas vzorčenja rastlinskega materiala, starost rastlinskega tkiva in abiotski ter biotski dejavniki, ki jim je bila rastlina izpostavljena tekom razvoja (Webster in sod., 2008).

Izmed vseh ekstraktov smo najvišje vrednosti AOU izmerili v etanolnih ekstraktih socvetij. Iz tabele E2a (Pril. E2) je razvidno, da so se vrednosti AOU v etanolnih ekstraktih socvetij gibale med 1,32 in 2,15 mmol TEAC/g s.s., slednjo smo izmerili v etanolnem ekstraktu socvetij japonskega dresnika. Tej vrednosti je sledila vrednost 2,05 mmol TEAC/g s.s. etanolnega ekstrakta mladih listov sahalinskega dresnika prvega vzorčenja. Med ekstrakti korenin smo najvišjo vrednost tako pri prvem kot drugem vzorčenju izmerili v ekstraktih sahalinskega dresnika. Pri prvem vzorčenju smo določili vrednost 0,87 mmol TEAC/g s.s., pri drugem pa 1,3 mmol TEAC/g s.s. Ugotovitev, da je imela korenika sahalinskega dresnika v primerjavi s koreniko japonskega dresnika višjo AOU, je dokaj presenetljiva, saj je za koreniko sahalinskega dresnika ugotovljeno, da vsebuje celo do 70-krat manj resveratrola kot korenika japonskega dresnika (Vrchtova in sod., 2005). Iz rezultatov lahko sklepamo, da največji delež k AOU korenin sahalinskega dresnika ne prispeva resveratrol, temveč preostali antioksidanti v njej.

Najnižji vrednosti AOU smo izmerili v butanolnih ekstraktih stebel japonskega in sahalinskega dresnika drugega vzorčenja, in sicer 0,018 mmol TEAC/g s.s. pri prvem in 0,024 mmol TEAC/g s.s. pri drugem omenjenem taksonu.

Zaključimo lahko, da smo najvišjo AOU določili v etanolnih ekstraktih socvetij in najnižjo v butanolnih ekstraktih stebel.

Faktorska analiza je pokazala, da je v vseh primerih vrednost izmerjene AOU odvisna od tipa tkiva, ekstrakcijskega topila in njune medsebojne interakcije.

Primerjave rezultatov AOU s predhodno opravljenimi raziskavami so težje izvedljive, saj se načini ekstrakcije, uporabljene analizne metode in variacije izvedbe metod lahko zelo razlikujejo.

Meritve AOU tkiv japonskega dresnika, ki so jih izvedli Huang in sod. (2008) so pokazale, da prav vsa tkiva kažejo velik potencial za lovljenje prostih radikalov. Ekstrakte so pripravili tako, da so svež rastlinski material liofilizirali, uprašili in nato 2 g prahu 24 ur ekstrahirali na stresalniku v 50 mL 80 % metanola. AOU so z metodo ABTS preverjali spektrofotometrično. Pri mešanem ekstraktu listov in stebel japonskega dresnika so izmerili AOU v vrednosti 0,56 mmol TEAC/g s.s. Za primerjavo so pripravili tudi mešan ekstrakt čebule, brokolija, pomaranče, korenja in ingverja, ki je imel veliko nižjo AOU (0,034 mmol TEAC/g s.s.). Študija Caia in sod. (2004) je v koreninah japonskega dresnika izmerila AOU v vrednosti 0,74 mmol TEAC/g s.s. (cit. po Huang in sod., 2008).

V nadaljevanju so predstavljeni natančnejši opisi opaženih razlik glede na tkivo, takson dresnika in uporabljeno ekstrakcijsko topilo.

5.1.2.1 Razlike v AOU med različnimi tkivi dresnikov

Neodvisno od uporabe ekstrakcijskega topila lahko trdimo, da imajo najvišjo AOU socvetja in najnižjo stebila vseh treh taksonov dresnikov. AOU listov in korenin se med seboj značilno ne razlikuje. Pri prvem vzorčenju smo opazili, da so imele korenike v primerjavi z listi večinoma rahlo nižjo AOU. Kljub temu so imele korenike drugega vzorčenja v primerjavi z listi večinoma višjo izmerjeno AOU (Sl. H1a, H2a, H3a, Pril. H; Sl. I1a, I2a, I3a, Pril. I).

Brisibe in sod. (2009) so preverjali AOU različnih tkiv enoletnega pelina (*Artemisia annua* L.). Pri svoji raziskavi so uporabili metodo ORAC. Najvišjo AOU so izmerili v ekstraktih cvetov, ki so jim sledili ekstrakti listov, stebel in korenin.

Raziskava Zielińske in sod. (2012) na ekstraktih navadne in tatarske ajde je pokazala, da najvišjo AOU kažejo cvetovi, ki jim sledijo listi in stebila. Meritve so izvedli z metodo DPPH in fotokemiluminescenčno metodo.

V našem primeru smo najnižjo AOU izmerili pri steblih, opornem tkivu s povečano olesenelostjo in trdnostjo, kar je posledica prisotnosti večje količine celuloze in lignina. Mladi poganjki dresnikov imajo v primerjavi z olesenelimi stebli višje vsebnosti

antioksidantov (Frantík in sod., 2013; Vrchotová in sod., 2007). Nekatere študije, ki so preverjale AOU v zelatih rastlinah, kot je na primer pajkasta lilija (*Hymenocallis littoralis*), so v steblih v primerjavi s koreninami in listi določile celo višjo AOU (Sundarasekar in sod., 2013).

5.1.2.2 Razlike v AOU med mladimi in starimi listi

Med seboj smo natančneje primerjali AOU mladih in starih listov. Primerjava je zanimiva, saj gre za isto vrsto tkiva, ki se razlikuje v starosti, velikosti in stopnji razvitosti. V našem raziskovalnem delu smo kot mlade liste obravnavali prve tri liste od vrha proti bazi poganjka.

Predhodne raziskave so odkrile, da mlajša rastlinska tkiva v primerjavi s starejšimi pogosto vsebujejo višje koncentracije antioksidantov. Z zrelostjo rastlinskih organov se vsebnost antioksidantov kvalitativno in kvantitativno spreminja (Chan in sod., 2007). Več raziskav je potrdilo, da mladi listi različnih rastlin v primerjavi s starimi listi kažejo višjo AOU (Nor Qhairul Izzreen in Mohd Fadzelly, 2013; Padda in Picha, 2007; Wang in Lin, 2000).

Burns in sod. (2002) so v mladih in starih listih japonskega dresnika analizirali vsebnost glukozidov resveratrola in ugotovili višje vsebnosti le-teh pri mladih listih. Enak trend so ugotovili tudi pri primerjavi mladih in starih stebel.

Naše ugotovitve se ne skladajo z ugotovitvami predhodnih raziskav. V nekaterih primerih smo določili višjo AOU pri mladih listih, vendar smo statistično značilne razlike opazili le pri češkem dresniku, pri katerem smo v ekstraktih starih listov v primerjavi z mladimi listi izmerili višjo AOU (Pregl. 10).

5.1.2.3 Razlike v AOU med ekstrakcijskimi topili

Pri našem delu smo uporabili ekstrakcijo trdno-tekoče, ki je odvisna od topnosti sestavin trdnega materiala v uporabljenem ekstrakcijskem topilu.

Pri ekstrakciji želimo doseči čim večjo selektivnost za ekstrahiranje zelenih sestavin. Splošni standardi, ki bi določali celoten potek ekstrakcije za ekstrahiranje različnih sestavin iz vzorca, ne obstajajo. Na kakovost pridobljenih ekstraktov in količino ekstrahiranih sestavin vplivajo velikost trdnih delcev, temperatura, čas ekstrakcije in polarnost topila, ki vpliva na tvorbo vezi s sestavinami biološkega materiala. Učinkovitost ekstrakcije najlažje določimo empirično. Najbolje je, da pri enakem biološkem materialu

uporabimo različna topila, saj na ta način uspemo ekstrahirati različne sestavine iz bioloških vzorcev (Dai in Mumper, 2010; Sultana in sod., 2009).

Za ekstrakcijo antioksidantov iz različnih tkiv dresnikov smo uporabili tri različna ekstrakcijska topila in pridobili vodne, butanolne in etanolne ekstrakte. Izbrali smo dvostopenjski način ekstrakcije in tako povečali izkoristek ekstrakcije.

Kot navajajo Webster in sod. (2008) lahko glede na biološko aktivnost različnih ekstraktov sklepamo na prisotnost aktivnih sestavin, ki jih vsebujejo. V primeru, da etanolni ekstrakti v primerjavi z vodnimi kažejo veliko višjo biološko aktivnost, lahko sklepamo, da so glavne aktivne sestavine tiste z manj polarnim značajem. V kolikor je aktivnost med ekstrakti podobna, potem so aktivne sestavine večinoma bolj polarne spojine. Apáti in sod. (2002) trdijo, da je vsebnost fenolnih spojin v vodnih ekstraktih odvisna predvsem od temperature in trajanja ekstrakcije, medtem ko ima pri alkoholnih ekstraktih glavno vlogo polarnost ekstrakcijskega topila in sestavin v biološkem vzorcu. Na splošno vodni ekstrakti v primerjavi s čistimi etanolnimi in metanolnimi ekstrakti vsebujejo manjše vsebnosti fenolnih spojin. Kombinacija organskega topila in vode v večini primerov učinkovitost ekstrakcije izboljša.

Fenolne spojine, ki so v večini primerov odgovorne za antioksidativno aktivnost rastlinskih tkiv, imajo polaren značaj in spadajo med hidrofилne antioksidante (Huang in sod., 2002). Topila z manj polarnim značajem kažejo manjšo učinkovitost za ekstrakcijo antioksidantov (Santas in sod., 2008). Kot učinkovito ekstrakcijsko topilo je prepoznana kombinacija vode in topila z nepolarnim ali polarnim značajem (Sultana in sod., 2009).

Voda in etanol sta zelo uporabni topila, saj imata status GRAS (ang. generally recognized as safe). To pomeni, da sta varni za uporabo na živih organizmih (Lozano-Sánchez in sod., 2014). Poleg tega sta v raziskavah AOU najpogosteje uporabljeni topila. Med topili s polarnim značajem se poleg vode in etanola pogosto uporablja tudi metanol. Vsa tri topila učinkovito ekstrahirajo fenolne spojine, ki imajo antioksidativen značaj. Topila z manj polarnim značajem (butanol) in nepolarna topila (kloroform, aceton) se uporabljajo za bolj specifične vrste ekstrakcij, zato je njihova uporaba redkejša (Alam in sod., 2013).

Raziskave, ki proučujejo vsebnost antioksidantov v dresnikih, za ekstrakcijo pogosto uporabljajo etanol ali metanol v kombinaciji z različnim deležem vode (Frantik in sod., 2013; Pan in sod., 2007; Vrchotová in sod., 2010).

Analiza razlik med ekstrakcijskimi topili nam je pokazala, da je najučinkovitejše topilo za ekstrakcijo najbolj aktivnih antioksidantov 48 % etanol, ki mu sledita voda in butanol (Pregl. 11). AOU vodnih in butanolnih ekstraktov je bila zelo podobna, čeprav je opaziti rahlo višjo antioksidativno aktivnost pri vodnih ekstraktih.

Zaradi podobnosti v AOU med butanolnimi in vodnimi ekstrakti ter višje AOU etanolnih ekstraktov lahko sklepamo, da so glavne aktivne sestavine v ekstraktih dresnikov tiste z bolj polarnim značajem. Etanol v kombinaciji z vodo je pri ekstrakciji teh spojin učinkovitejši od čiste vode.

5.1.3 Razlike v AOU med prvim in drugim vzorčenjem

V rastlinskih tkivih se tekom sezone spreminja vsebnost in vrsta sekundarnih metabolitov. Kvalitativne in kvantitativne razlike so prisotne med tkivi posamezne rastlinske vrste, znotraj kultivarjev rastlin in med različnimi, a sorodnimi vrstami. Sezonske spremembe so posledica abiotskega in biotskega stresa, ki mu je rastlina izpostavljena. Med razvojem rastlinskih organov se v tkivih spreminja tudi izražanje genetskega materiala (Ozeker in Kara, 1999).

Naše prvo vzorčenje je potekalo v sezoni pred cvetenjem, medtem ko smo drugo vzorčenje izvedli v sezoni cvetenja dresnikov. Primerjava AOU vodnih in etanolnih ekstraktov prvega in drugega vzorčenja je pokazala, da so vrednosti, ki so se med seboj značilno razlikovale večinoma višje pri drugem vzorčenju. Izjema so le mladi listi sahalinskega dresnika, kjer smo značilno višjo AOU izmerili pri prvem vzorčenju (Sl. 22 in 24).

Vodni in etanolni ekstrakti korenin drugega vzorčenja so imeli v primerjavi z ekstrakti korenin prvega vzorčenja višjo AOU, vendar značilnih razlik nismo opazili. Butanolni ekstrakti korenin prvega vzorčenja so v primerjavi z ekstrakti drugega vzorčenja kazali višjo AOU, vendar statistično značilnih razlik v nobenem primeru nismo ugotovili (Sl. 23). Ker smo glavne antioksidante ekstrahirali z uporabo etanola, lahko zaključimo, da je višja vsebnost le-teh v podzemnih organih prisotna v sezoni med cvetenjem, torej v jesenskem času. Do podobnih ugotovitev smo prišli tudi pri steblih. Večina naših meritev AOU mladih listov pa bi lahko kazala na možnost višje vsebnosti antioksidantov v najbolj sveže zraslem tkivu na rastlini v sezoni pred cvetenjem.

Do podobnih zaključkov so prišli Frantik in sod. (2013), ki so potrdili sezonske spremembe v količini glavnih antioksidantov v različnih tkivih dresnikov. Odkrili so, da je najvišja vsebnost resveratrola, resveratrolozida, piceida in emodina v nadzemnih pogojih prisotna v spomladanskem času, medtem ko je v podzemnih organih vrednost najvišja jeseni, ko začne rastlina kopičiti rezervne snovi za obdobje mirovanja.

Do drugačnih zaključkov glede antioksidantov v listih so prišle raziskave, opravljene na nekaterih drugih rastlinskih vrstah. Tako sta Gholivand in Piryael (2012) na rdečejagodastem blušču (*Bryonia dioica*), rastlini, ki se v Iranu tradicionalno uporablja v medicinske namene, preverjala AOU in vsebnost skupnih fenolnih spojin ter flavonoidov v

sezoni pred in med cvetenjem. Dokazala sta, da je AOU in vsebnost skupnih fenolnih spojin v listih in steblih višja v sezoni med cvetenjem. Podobno je potrdila raziskava istih raziskovalcev na kurdski kozji češnji (*Rhamnus kurdica*). V sezoni cvetenja sta glede na sezono pred cvetenjem v listih izmerila višjo vsebnost flavonoidov (Gholivand in Piryael, 2014).

Naghiloo in sod. (2012) so analize opravili na koreninah, listih in cvetovih grahovca (*Astragalus compactus*). Več fenolnih spojin so v primerjavi s stebli in koreninami določili v listih. Vsebnost fenolnih spojin v koreninah in listih je naraščala v sledečem zaporedju: sezona pred cvetenjem, cvetna sezona in sezona oblikovanja plodov. V enakem vrstnem redu so naraščale tudi vrednosti izmerjene AOU.

Pri butanolnih ekstraktih je bila večina naših vrednosti AOU višja pri ekstraktih prvega vzorčenja. Značilno razliko v AOU smo določili le pri starih listih in steblih sahalinskega dresnika. Vpliv na vsebnost in vrsto ekstrahiranih antioksidantov ima tako tudi sezona vzorčenja/nabiranja rastlin.

5.1.4 Razlike v AOU med taksoni dresnikov

S primerjavo razlik med etanolnimi ekstrakti drugega vzorčenja različnih tkiv dresnikov smo ovrednotili razlike med taksoni dresnikov (Sl. 25).

Naši rezultati kažejo, da imajo ekstrakti češkega dresnika v primerjavi z ekstrakti japonskega in sahalinskega dresnika nižjo AOU. Rezultati se ujemajo z ugotovitvami Vrchotove in sod. (2007), ki so v mladih poganjkih vseh treh taksonov dresnikov preverjali prisotnost stilbenov in katehinov. Odkrili so, da je vsebnost piceida, katehina in epikatehina najmanjša ravno pri češkem dresniku.

Največjo razliko v AOU smo določili pri mladih listih. Vrednost AOU mladih listov japonskega dresnika je bila za 3,8-krat in sahalinskega za 4,1-krat višja od vrednosti pri češkem dresniku. Frantik in sod. (2013) so s proučevanjem stilbenov odkrili, da jih je največ prisotnih v listih češkega dresnika in najmanj v listih sahalinskega. Kot kaže k AOU listov sahalinskega dresnika prispevajo nekatere druge sestavine, ki so v japonskem in češkem dresniku prisotne v manjši količini (Hromádková in sod., 2010).

Socvetja japonskega dresnika so v primerjavi s socvetji ostalih dveh taksonov kazala značilno višjo AOU. Najnižjo AOU so imela socvetja češkega dresnika. Do podobnih ugotovitev glede ekstraktov socvetij so prišli tudi Vrchotová in sod. (2010). Analizirali so prisotnost glavne fenolne spojine ekstraktov socvetij, kvercetina, in najnižjo vsebnost

določili ravno pri češkem dresniku. V socvetjih sahalinskega dresnika so v primerjavi z japonskim določili višjo vsebnost kvercetina.

Najvišjo vrednost AOU med koreniki smo izmerili pri sahalinskem dresniku, vendar značilnih razlik nismo ugotovili. Po podatkih iz literature je korenika japonskega dresnika najboljši vir stilbenov, njej sledi korenika češkega dresnika, najnižje vsebnosti pa so prisotne v koreniki sahalinskega dresnika (Frantik in sod., 2013). Glede na naše ugotovitve lahko sklepamo, da morda k AOU korenik sahalinskega dresnika prispevajo nekatere druge sestavine, ki so prisotne v njej (Fan in sod., 2009).

5.1.5 Korelacija med luminescenčno metodo in metodo ABTS

Luminescenčna metoda in metoda ABTS merita skupno AOU, zato smo med njima preverili korelacijsko povezanost. Številne predhodno objavljene raziskave so ugotovile korelacijsko povezanost med različnimi metodami za ugotavljanje AOU (Číž in sod., 2009; Zhou in sod., 2011). Nekatere raziskave so opazile razlike v moči korelacije med metodami. Razlike so bile odvisne od vrste analiziranih rastlin (Prior in sod., 2005) in uporabljenega ekstrakcijskega topila (Musa in sod., 2011).

Zvezo med uporabljenima metodama za določanje AOU smo ugotovili z izračunom Pearsonovega korelacijskega koeficienta, ki je znašal 0,70 (Sl. 26), kar kaže na visoko povezanost med obema metodama. Kljub temu je bil koeficient determinacije dokaj nizek in je znašal 0,49. To pomeni, da lahko le z okrog 50 % meritev luminescenčne metode pojasnimo variabilnost meritev metode ABTS. Težavo pri razlaganju rezultatov nam lahko predstavlja pomanjkanje števila meritev, saj smo na posameznem ekstraktu in s posamezno merilno metodo opravili le po dve meritvi. Raziskava Oliveire in sod. (2014) je sicer pokazala, da je luminescenčna metoda bolj občutljiva od metode ABTS, na kar pa imajo velik vpliv spojine v merjenih vzorcih.

Z našimi ugotovitvami se skladajo rezultati Girottija in sod. (2002), ki so prav tako odkrili korelacijsko povezanost med kemiluminescenčno metodo in dvema spektrofotometričnima metodama ($r^2 = 0,52$ in $0,71$).

Izračunali smo tudi koeficiente korelacije med obema metodama, v odvisnosti od uporabljenega ekstrakcijskega topila. Ugotovili smo, da topilo bistveno ne vpliva na korelacijsko povezanost med merilnima metodama (Sl. 27a, 27b in 27c). Koeficienti korelacije so se pri vseh treh topilih gibali med 0,60 in 0,70, kar pomeni zmerno do močno povezanost med merilnima metodama. Značilnih razlik med koeficienti v odvisnosti od uporabljenega ekstrakcijskega topila nismo ugotovili (Sl. 27d).

5.1.6 Prvi presejalni testi s TLC

Z izvedbo analiz s TLC smo želeli ovrednotiti prisotnost fenolnih spojin in ostalih antioksidantov v pripravljenih testnih raztopinah. Spojin v začetni fazi, fazi presejalnih testov, nismo določevali, vendar smo na osnovi barve in intenzivnosti lis na kromatografskih ploščah ter izračunanih R_F med seboj primerjali različne testne raztopine.

Za prve presejalne teste s TLC smo uporabili dve različni topili za razvijanje, ki so jih za ločevanje fenolnih spojin že uporabili nekateri drugi raziskovalci (Glavnik in sod., 2012; Simonovska in sod., 2003). Prvo topilo za razvijanje je bilo etil acetat-voda-mravljinična kislina (85 : 15 : 10, v/v/v) in drugo *n*-heksan-etil acetat-mravljinična kislina (20 : 19 : 1, v/v/v). Obe topili za razvijanje sta namenjeni ločevanju fenolnih spojin v testnih raztopinah. Kot derivatizacijski reagent smo uporabili naturstoff reagent A (NST), ki je namenjen karakterizaciji fenolnih spojin oz. flavonoidov.

Primerjave vsebnosti fenolnih spojin med različnimi taksoni dresnikov, ki smo jih analizirali v našem magistrskem delu, so še posebno zanimive zaradi ozke sorodstvene povezave vseh treh taksonov. Japonski in sahalinski dresnik sta materinski vrsti češkega dresnika. Genetske analize so pokazale največjo pestrost v genskem materialu češkega dresnika. Poleg tega je češki dresnik najbolj invaziven in uspešen pri svojem razširjanju. Predvidevamo lahko, da večja pestrost genoma vodi do večjega nabora sekundarnih metabolitov, zaščitnih faktorjev in ostalih selekcijskih prednosti, kar so potrdile tudi dosedanje raziskave (Bailey in sod., 2009; Balogh, 2011; Mandák in sod., 2004; Tiebre in sod., 2007).

Iz zaznanih lis na kromatografskih ploščah prvih presejalnih testov lahko trdimo, da ima češki dresnik tako lastnosti japonskega kot tudi sahalinskega dresnika. Količina in vrsta fenolnih spojin, ki smo jih zaznali v testnih raztopinah tkiv češkega dresnika se bolj ujema s tistimi pri japonskem dresniku. V češkem dresniku so prisotne tudi sestavine, ki so značilne za sahalinski dresnik. Po drugi strani testne raztopine sahalinskega dresnika lahko vsebujejo dodatne, specifične sestavine, ali pa imajo nekatere sestavine odsotne (Sl. 28 in 30).

Zaključimo lahko, da je češki dresnik prevzel več lastnosti po japonskem dresniku, vendar vsebuje tudi določene sestavine sahalinskega dresnika. To dokazujejo tudi razvite kromatografske plošče, saj v večini primerov testne raztopine češkega dresnika izkazujejo največje število zaznanih lis. Če pri testnih raztopinah nadzemnih tkiv primerjamo področje na kromatografski plošči med R_F 0,49 in 0,58, lahko ugotovimo, da pri japonskem dresniku zelo izstopajo modre lise, rumene pa so komaj zaznavne. Pri sahalinskem izstopajo rumene lise, medtem ko češki dresnik kaže kombinacijo značilnosti obeh starševskih vrst (Sl. 28a). Testne raztopine korenin češkega dresnika so po

intenzivnosti in številu zaznanih lis bolj podobne japonskemu dresniku. Do podobnega zaključka so prišli tudi francoski raziskovalci (Piola in sod., 2013).

Lise na kromatografskih ploščah so v primeru etanolnih testnih raztopin bolj intenzivne in številčnejše. Potrdimo lahko, da so etanolne testne raztopine glede na pripravljene vodne in butanolne testne raztopine kvantitativno in kvalitativno bolj bogate s fenolnimi spojinami (Sl. 28). S tem so se ujemale tudi rezultati meritev AOU. Vodne testne raztopine so v splošnem zelo podobne etanolnim, vendar imajo manj intenzivno obarvane lise, pri etanolnih testnih raztopinah pa so prisotne še nekatere dodatne lise. V našem primeru smo kot etanolno testno raztopino uporabili mešanico 96 % etanola, vode in očetne kisline v volumskih razmerjih 25 : 24 : 1 (v/v/v). Pri butanolnih testnih raztopinah je opaziti podobnost z ostalima dvema topiloma, vendar so določene lise specifične zgolj za to ekstrakcijsko topilo, kar je posledica drugačnih fizikalno-kemijskih lastnosti topila (Sl. 28c). Iz tega lahko zaključimo, da je kombinacija organskega topila in vode v primerjavi z uporabo čistega organskega topila ali vode učinkovitejše topilo za ekstrakcijo antioksidantov. Podobno so odkrili tudi Musa in sod. (2011), ki so zaključili, da je učinkovitost ekstrakcije nižja pri topilih brez dodane vode.

Testne raztopine korenin imajo glede na testne raztopine ostalih tkiv manjše število lis. To pomeni manjšo pestrost fenolnih spojin. Iz tega kljub temu ne moremo sklepati na manjšo biološko in antioksidativno aktivnost raztopin. To potrjujejo tudi izmerjene vrednosti AOU korenin sahalinskega dresnika. Analiza s TLC je tudi pokazala, da so testne raztopine korenin japonskega dresnika v primerjavi s testnimi raztopinami korenin ostalih dveh taksonov bolj bogate s fenolnimi spojinami, kar se ne ujema z našo izmerjeno AOU. Socvetja sahalinskega dresnika pri obeh uporabljenih topilih za razvijanje izstopajo glede na socvetja ostalih dveh taksonov, kar je tudi v skladu z izmerjeno AOU.

Na splošno bi lahko testne raztopine glede na tkivo razdelili v dve skupini. V prvo bi uvrstili testne raztopine listov, stebel in socvetij, ki se med seboj večinoma razlikujejo le kvantitativno. Lise pri mladih listih so v primerjavi s starimi listi bolj intenzivno obarvane. V testnih raztopinah socvetij so lise zelo intenzivne, vendar so lahko prisotne tudi določene specifične sestavine. Te ekstrakte bi zato lahko obravnavali tudi ločeno. Najmanj intenzivne lise imajo testne raztopine stebel, kar je tudi v skladu z meritvami AOU. V drugo skupino bi uvrstili testne raztopine korenin, saj večinoma vsebujejo drugačne fenolne spojine kot ostala tkiva (Sl. 28 in 30).

Plošče, ki so bile razvite v topilu *n*-heksan-etil acetat-mravljinčna kislina (20 : 19 : 1, v/v/v) so kazale večjo variabilnost. Veliko sestavin je ostalo v območju blizu nanosa testnih raztopin, zato topilo etil acetat-voda-mravljinčna kislina (85 : 15 : 10, v/v/v) bolj učinkovito ločuje sestavine, ki so bile ekstrahirane iz tkiv dresnikov. Testne raztopine vseh treh ekstrakcijskih topil so se pri uporabi topila *n*-heksan-etil acetat-mravljinčna

kislina (20 : 19 : 1, v/v/v) med seboj razlikovale v barvi, intenzivnosti in legi lis (Sl. 30). Iz tega bi lahko sklepali, da smo z uporabo različnih ekstrakcijskih topil uspeli ekstrahirati različne tipe fenolnih spojin.

K razlikam v vsebnosti fenolnih spojin med prvim in drugim vzorčenjem bi lahko prispeval čas vzorčenja rastlin (Sl. 28 in 29). Čeprav je med prvim in drugim vzorčenjem minilo manj kot dva meseca, je prvo vzorčenje potekalo v sezoni pred cvetenjem in drugo v cvetni sezoni.

Butanolne testne raztopine so bile pri listih, steblih in socvetjih obarvane zeleno. Najbolj intenzivno zeleno obarvane so bile butanolne raztopine listov, kar lahko pripišemo veliki količini klorofilov in karotenoidov. Klorofil je ključna molekula v procesih fotosinteze, saj omogoča absorpcijo svetlobne energije. Je lipofilen, v človeški prehrani pa ga ne prištevamo med antioksidante. Kljub temu so raziskave pokazale, da klorofil prispeva k AOU rastlinskega tkiva (Fleischer, 1935; Hsu in sod., 2007; Hunter in Fletcher, 2002; Tracewell in sod., 2001).

Slika 31 prikazuje kromatografsko ploščo z nanesenimi butanolnimi testnimi raztopinami, ki je bila slikana pri uporabi bele svetlobe. Lise, ki smo jih zaznali, so najintenzivnejše pri listih, komaj zaznavne pri steblih, medtem ko jih pri koreninah ni opaziti. Primerno topilo za ekstrakcijo napolarnih molekul je tudi butanol (Nwabueze in Okocha, 2008), zato bi lahko analizirane testne raztopine vsebovale klorofile in druga v maščobah topna barvila. Karotenoidi so na kromatografskih ploščah opazni kot lise rumene barve, medtem ko so lise klorofilov zelene barve. Feofitin a in b sta kemijsko podobna klorofilu a in b, le-da imata magnezijev ion zamenjan z dvema vodikovima atomoma. Na kromatografskih ploščah sta njuni lisi sive barve. Literatura tudi navaja, da je zaradi obdelave rastlinskega tkiva mogoča popolna pretvorba klorofilov v feofitine (King, 2014; Shewfelt in Dennison, 1959). Glede na podatke iz literature sklepamo, da bi bile lise na območju R_F od 0,78 do 0,98 lahko posledica prisotnosti rastlinskih barvil (Slika 31).

TLC presejalni testi na prisotnost fenolnih spojin in ostalih antioksidantov so pokazali številne lise ter semikvalitativne razlike med ekstrakti. Določene lise so značilne le za določen takson, tkivo in uporabljeno ekstrakcijsko topilo.

5.1.7 Uporaba standardov fenolnih spojin pri TLC

Z uporabo standardov testnih raztopin smo ovrednotili prisotnost nekaterih fenolnih spojin v analiziranih testnih raztopinah dresnikov. Zaradi velikega števila sestavin v analiziranih testnih raztopinah je bilo v nekaterih primerih vrednotenje dobljenih rezultatov oteženo oz. nemogoče.

Dobljene rezultate smo primerjali s tistimi iz literature. Ker je zaznava snovi v analiziranih testnih raztopinah, odvisna tudi od občutljivosti uporabljene analizne metode, se v nekaterih primerih rezultati različnih znanstvenih člankov med seboj razlikujejo. V večini primerov so se naši rezultati skladali z navedbami preteklih raziskav.

Hsu in sod. (2007) so odkrili, da imajo testne raztopine korenin japonskega dresnika antioksidativno aktivnost, ki jo lahko v veliki meri pripišemo prisotnosti fenolnih spojin v tkivu. Vrchotová in sod. (2007) navajajo, da so korenike dresnikov dober vir stilbenov, medtem ko nadzemni deli vsebujejo največ flavonolov. V vsebnosti stilbenov, predvsem resveratrola, najbolj izstopa korenika japonskega dresnika (Frantik in sod., 2013). To so potrdile tudi naše analize, saj smo trans-resveratrol določili v etanolni testni raztopini japonskega dresnika. Glede na raziskave naj bi korenike vsebovale celo do 10-krat več piceida, glukozida resveratrola (Benova in sod., 2008; Frantik in sod., 2013), katerega prisotnosti v naši raziskavi nismo preverjali. Najmanj stilbenov je prisotnih v korenikah sahalinskega dresnika. Pri njih prevladujejo fenilpropanoidni glukozidi. Piola in sod. (2013) tudi navajajo, da so korenike japonskega in češkega dresnika bogat vir antrakinonov, na primer emodina.

Kinoni in stilbeni so glede na podatke iz literature prisotni tudi v nadzemnih delih rastline, vendar v 3- do 20-krat nižjih koncentracijah. V nadzemnih poganjkih je največ stilbenov prisotnih pri češkem dresniku (Frantik in sod., 2013). S tem se skladajo tudi naše ugotovitve, saj smo prisotnost trans-resveratrola določili v mladih listih češkega dresnika. Vaher in Koel (2003) sta prisotnost resveratrola dokazala v steblih, listih in celo socvetjih. Njegova vsebnost v rastlini je narasla jeseni. Raziskava Vrchotove in sod. (2010) resveratrola v socvetjih ni ugotovila. Burns in sod. (2002) ter Kirino in sod. (2012) v listih in steblih japonskega dresnika resveratrola niso zaznali. Burns in sod. (2002) so v omenjenih tkivih določili le prisotnost njegovega glukozida.

Najučinkovitejše ekstrakcijsko topilo za izolacijo resveratrola in njegovih glukozidov je 60 % etanol (Frantik in sod., 2013). Da je vodna raztopina etanola bolj učinkovita od čiste vode in *n*-butanola, se je pokazalo tudi v naši raziskavi, v kateri smo uporabili 48 % etanol.

Listi, stebila in socvetja vsebujejo predvsem kvercetin, ki ga je lahko v socvetjih 4-krat več kot v listih (Vrchotová in sod., 2004). Največ kvercetina so raziskovalci določili v socvetjih sahalinskega dresnika in najmanj v listih, steblih ter socvetjih češkega dresnika (Vrchotová in sod., 2010). Članek Vrchotove in sod. iz leta 2005 sicer navaja, da so najvišjo vsebnost kvercetina izmerili v socvetjih češkega dresnika, sledila so socvetja sahalinskega in japonskega dresnika. Listi in stebila dresnikov vsebujejo tudi veliko flavanolov (Piola in sod., 2013; Vrchotová in sod., 2005). V našem primeru smo kvercetin uspeli določiti v socvetjih sahalinskega dresnika, medtem ko smo prisotnost katehina

določili v vseh analiziranih etanolnih tesnih raztopinah. To pomeni, da so kathini prisotni v vseh tkivih dresnikov (Pregl. 12).

Med fenolnimi kislinami smo v mladih listih češkega dresnika uspeli določiti prisotnost klorogenske kisline. Le-ta je najverjetneje prisotna tudi v starih listih in steblih, kar potrjuje tudi študija Kirina in sod. (2012). Vrchotová in sod. (2005) tudi navajajo, da so v nadzemnih delih dresnikov med bolj prepoznavnimi ravno derivati kavne kisline. V vseh butanolnih testnih raztopinah je zato najverjetneje prisotna tudi kavna kislina, ki prevladuje predvsem v listih in socvetjih. Kljub temu se na sliki 32b barva lise standarda ne ujema z barvo lise pri testnih raztopinah, kar je lahko posledica prisotnosti še najmanj ene ali večih spojin na istem mestu.

Kljub pestrosti fenolnih spojin v steblih (Fan in sod., 2010; Vrchotova in sod., 2010), smo v naši raziskavi v njih dokazali najnižjo vsebnost fenolnih spojin in izmerili najnižjo AOU, kar pomeni, da so v steblih antioksidanti prisotni v zelo nizkih koncentracijah.

5.2 PREDLOGI ZA NADALJNJE RAZISKAVE

Dresniki vsebujejo številne funkcionalne sestavine, zato je pričakovati, da se bo te rastline v prihodnosti začelo uporabljati za razvoj novih funkcionalnih živil in izolacijo novih živilskih ter farmacevtskih sestavin (Benová in sod., 2008; Qian in sod., 2006).

Na osnovi naših in preteklih analiz, v katerih je bila ugotovljena velika pestrost flavonoidov in fenolnih kislin ter izmerjena visoka AOU njihovih ekstraktov, bo nadaljnje raziskovanje dresnikov in njihovih ekstraktov gotovo velik izziv in motivacija za v prihodnje. Pomembno bi bilo natančneje določiti in kvantitativno ovrednotiti posamezne sestavine različnih tkiv, kar bi lahko storili z uporabo visokoločljivostne tekočinske (HPLC) ali plinske (GC) kromatografije v kombinaciji z masnim spektrometrom (MS).

Zaenkrat so se raziskave pri proučevanju sekundarnih metabolitov najbolj osredotočale na japonski dresnik in njegovo koreniko, zaradi visoke vsebnosti stilbenov oz. resveratrola. V prihodnosti bi bilo smiselno natančneje analizirati tudi sestavine v nadzemnih delih te invazivne rastline in pozornost posvetiti tudi sahalinskemu ter češkemu dresniku. Na ta način bi lahko pridobili pomembne informacije o vzrokih širjenja dresnikov v novem okolju in poiskali koristne sestavine v tkivih teh invazivnih rastlin, ki bi bile uporabne v živilski in farmacevtski industriji ter kmetijstvu.

5.3 SKLEPI

Glede na namen magistrskega dela in postavljene cilje lahko podamo naslednje sklepe:

- Prisotnost antioksidantov in izmerjena AOU je odvisna od tkiva dresnika, taksona dresnika, časa vzorčenja in uporabljenega ekstrakcijskega topila.
- Najvišjo AOU smo določili v socvetjih in najnižjo v steblih dresnikov. Splošen trend kaže, da so imele korenike prvega vzorčenja v primerjavi z listi rahlo nižjo AOU, medtem ko so bile pri drugem vzorčenju vrednosti AOU korenik v primerjavi z listi v večini primerov višje. Vrednosti AOU med mladimi in starimi listi so variabilne. Pri tem imajo lahko stari listi v primerjavi z mladimi listi višjo AOU.
- AOU tkiv dresnikov in vsebnost antioksidantov v tkivih se med sezono spreminja.
- AOU ekstraktov, določena z luminescenčno metodo in metodo ABTS, je pri češkem dresniku v primerjavi z japonskim in sahalinskim dresnikom nižja.
- Učinkovitost topil za ekstrakcijo najbolj aktivnih antioksidantov iz tkiv dresnikov je padala v sledečem zaporedju: 48 % etanol > voda > butanol.
- Korelacija med luminescenčno metodo in metodo ABTS je visoka ($r = 0,70$). Uporabljeno ekstrakcijsko topilo bistveno ne vpliva na korelacijsko povezanost med obema analiznima metodama.
- Presejalni testi s TLC so pokazali veliko pestrost in kvalitativne ter kvantitativne razlike med pripravljenimi testnimi raztopinami. Češki dresnik vsebuje kombinacijo fenolnih spojin obeh starševskih vrst. Njegov fenolni profil je sicer bolj podoben japonskemu dresniku. Sahalinski dresnik lahko vsebuje nekatere specifične sestavine, ki jih pri ostalih dveh taksonih ni opaziti.
- Listi, stebela in socvetja imajo v primerjavi s korenikami bolj podoben nabor fenolnih spojin. Vsebnost fenolnih spojin se med vsemi tremi tkivi kvantitativno razlikuje. Največjo pestrost in količino fenolnih spojin smo ugotovili v testnih raztopinah socvetij in mladih listov.
- V ekstraktih smo določili trans-resveratrol, klorogensko kislino, (+)-katehin in kvercetin. Prisotnost (+)-katehina smo določili v vseh tkivih dresnikov. Največ ga je v socvetjih in korenikah.

- Potrdimo lahko, da je korenika japonskega dresnika najboljši vir resveratrola. Dokazali smo, da resveratrol lahko vsebujejo tudi nadzemna tkiva, saj smo njegovo prisotnost določili v mladih listih češkega dresnika.
- Socvetja imajo med vsemi tkivi najvišji delež vode.

6 POVZETEK

Rastline proizvajajo različne sekundarne metabolite, med katere sodijo terpenoidi, fenolne spojine, alkaloidi, polisaharidi in peptidi. Mnogi izmed njih imajo antioksidativno delovanje. Zaradi njihove biološke aktivnosti lahko koristno delujejo na človeško zdravje (Wills in sod., 2000). Antioksidanti preprečujejo oksidacijo ostalih molekul in ščitijo celice pred poškodbami, ki jih lahko povzročijo prosti radikali (Ames in sod., 1993).

V rastlinah je prisotno veliko različnih antioksidantov z različno kemijsko strukturo, biološko aktivnostjo in mehanizmi delovanja. Z merjenjem skupne antioksidativne učinkovitosti posameznih rastlinskih tkiv lahko na najboljši način ocenimo potencial nekega tkiva za nevtralizacijo oksidantov (Gupta in Sharma, 2006).

V magistrskem delu smo želeli ugotoviti antioksidativno učinkovitost (AOU) in ovrednotiti prisotnost fenolnih spojin (tehnika TLC) v različnih tkivih oz. organih dresnikov – mladi listi, stari listi, stebila, korenike in socvetja. Rastlinski material smo vzorčili leta 2013, in sicer v sezoni pred cvetenjem in v sezoni cvetenja dresnikov ter ga liofilizirali. S tehtanjem mase rastlinskega materiala pred in po postopku liofilizacije smo ugotovili, da je najvišji delež vode prisoten v socvetjih, medtem ko največ suhe snovi vsebujejo stebila. Liofilizirani material smo strli in pripravili 48 % etanolne, butanolne in vodne ekstrakte vseh treh taksonov dresnikov (japonski, sahalinski in češki dresnik), ki uspevajo v Sloveniji. V raziskavo smo vključili 81 različnih ekstraktov.

Pripravljenim ekstraktom smo z dvema metodama, luminescenčno metodo in metodo ABTS, izmerili AOU. Naši rezultati so pokazali veliko variabilnost med pripravljenimi ekstrakti. V splošnem smo najvišje vrednosti AOU izmerili v socvetjih in najnižje v steblih. 48 % etanol se je v primerjavi z butanolom in vodo izkazal kot najbolj učinkovito ekstrakcijsko topilo. Najvišjo AOU smo opazili v etanolnih ekstraktih socvetij japonskega dresnika (2,15 mmol TEAC/g s.s.). Potrdimo lahko tudi, da obstajajo razlike med mladimi in starimi listi, in da je AOU starih listov glede na AOU mladih listov lahko višja. AOU mladih listov je v nekaterih primerih podobna kot pri socvetjih, saj smo pri mladih listih sahalinskega dresnika prvega vzorčenja izmerili vrednost 2,05 mmol TEAC/g s.s. Najvišjo AOU smo med ekstrakti korenin dokazali pri sahalinskem dresniku (prvo vzorčenje: 0,87 mmol TEAC/g s.s.; drugo vzorčenje: 1,3 mmol TEAC/g s.s.).

Ekstrakti češkega dresnika imajo v primerjavi z ekstrakti japonskega in sahalinskega dresnika nižjo AOU. Poleg tkiva in taksona dresnika ima na izmerjeno AOU vpliv tudi čas vzorčenja in uporabljeno ekstrakcijsko topilo.

S statistično analizo smo ugotovili visoko povezanost med obema metodama za merjenje AOU, saj je Pearsonov korelacijski koeficient znašal 0,70. Glede na uporabljeno ekstrakcijsko topilo se vrednosti korelacijskih koeficientov med seboj niso značilno razlikovale.

V nadaljevanju smo s pomočjo tankoplastne kromatografije (TLC) izvedli presejalne analize vsebnosti fenolnih spojin v različnih ekstraktih/testnih raztopinah. Z uporabo izbranih standardov smo v testnih raztopinah preverili prisotnost nekaterih izbranih fenolnih spojin.

Glede na to, da je češki dresnik križanec med japonskim in sahalinskim dresnikom, je iz slik kromatografskih plošč razvidno, da je fenolni profil češkega dresnika kombinacija obeh starševskih vrst. Kljub temu je fenolni profil češkega dresnika bolj podoben japonskemu dresniku. Pri sahalinskem dresniku smo v tkivih ugotovili prisotnost določenih specifičnih sestavin.

Najbolj intenzivno obarvane in najštevilčnejše kromatografske lise smo določili pri mladih listih in socvetjih. Listi, stebela in socvetja imajo kvalitativno podoben fenolni profil, medtem ko korenike vsebujejo drugačne sestavine.

V tkivih smo določili prisotnost trans-resveratrola, klorogenske kisline, (+)-katehina in kvercetina. Prisotnost (+)-katehina smo določili v vseh tkivih dresnikov. Največ ga je prisotnega v socvetjih in korenikah.

Potrdimo lahko, da je korenika japonskega dresnika najboljši vir resveratrola. Resveratrol smo določili tudi v mladih listih češkega dresnika.

Rezultati naše raziskave so pokazali, da imajo ekstrakti listov, stebel, korenik in socvetij vseh treh taksonov dresnikov, ki uspevajo v Sloveniji, prisotno antioksidativno delovanje in vsebujejo pester nabor različnih fenolnih spojin.

7 VIRI

- Agati G., Azzarello E., Pollastri S., Tattini M. 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*, 196: 67–76
- Aggarwal B.B., Bhardwaj A., Aggarwal R.S., Seeram N.P., Shishodia S., Takada Y. 2004. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical studies. *Anticancer Research*, 24, 5A: 2783–2840
- Aherne S.A., O'Brien N.M. 2002. Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 18, 1: 75–81
- Alam M.N., Bristi N.J., Rafiquzzaman M. 2013. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21, 2: 143–152
- Alberternst B., Böhmer H.J. 2011. Invasive alien species fact sheet. *Fallopia japonica*. Online database of the European network on invasive alien species. NOBANIS. http://www.nobanis.org/files/factsheets/Fallopia_japonica.pdf (december 2014)
- Albrecht H.O. 1928. Über die chemiluminescenz des aminophthalsäurehydrazids. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 136: 321–330
- Aliyu A.B., Ibrahim M.A., Musa A.M., Musa A.O., Kiplimo J.J., Oyewale A.O. 2013. Free radical scavenging and total antioxidant capacity of root extracts of *Anchomanes difformis* Engl. (*Araceae*). *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 70, 1: 115–121
- American Herbal Products Association. 2007. Herbal FAQs. http://www.herbday.org/resources/documents/HD_Herbal_FAQ.pdf (december 2014)
- Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 17: 7915–7922
- Angier B. 1974. Field guide to edible wild plants. USA, Stackpole Books: 256 str.
- Apak R., Gorinstein S., Böhm V., Schaich K.M., Özyürek M., Güçlü K. 2013. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 85, 5: 957–998
- Apáti P., Szentmihályi K., Balázs A., Baumann D., Hamburger M., Kristó T.Sz., Szöke É., Kéry Á. 2002. HPLC analysis of the flavonoids in pharmaceutical preparations from Canadian goldenrod (*Solidago canadensis*). *Chromatographia Supplement*, 56, 1: 65–68
- Arab L. 2000. Medicinal herbs: Naturally safe? *Nutrition Society. Public Health Nutrition*, 3, 2: 111
- Arts M.J., Haenen G.R., Voss H.P., Bast A. 2004. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 1: 45–49

- Asensi M., Medina I., Ortega A., Carretero J., Baño M.C., Obrador E., Estrela J.M. 2002. Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Radical Biology & Medicine*, 33, 3: 387–398
- Awika J.M., Rooney L.W., Wu X., Prior R.L., Cisneros-Zevallos L. 2003. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 23: 6657–6662
- Bailey J.P. 1994. The reproductive biology and fertility of *Fallopia japonica* (Japanese knotweed) and its hybrids in the British Isles. V: Ecology and management of invasive riverside plants. De Waal L.C., Child L.E., Wade P.M., Brock J.H. (eds.). New York, John Wiley & Sons: 141–158
- Bailey J.P. 2001. *Fallopia x conollyana* the railway-yard knotweed. *Watsonia* 23: 539–541
- Bailey J.P., Bímová K., Mandák B. 2007. The potential role of polyploidy and hybridisation in the further evolution of the highly invasive *Fallopia* taxa in Europe. *Ecological Research*, 22, 6: 920–928
- Bailey J.P., Bimova K., Mandák B. 2009. Asexual spread versus sexual reproduction and evolution in *Japanese knotweed s.l.* sets the stage for the »Battle of the clones«. *Biological Invasions*, 11, 5: 1189–1203
- Bailey J.P., Child L.E., Conolly A.P. 1996. A survey of the distribution of *Fallopia x bohemica* (Chrtek & Chrtkova) J. Bailey (*Polygonaceae*) in the British Isles. *Watsonia*, 21: 187–198
- Bailey J.P., Conolly A.P. 2000. Prize-winners to pariahs – A history of Japanese knotweed *s.l.* (*Polygonaceae*) in the British Isles. *Watsonia*, 23: 93–110
- Balogh L. 2011. Plant invasions typical to Western Hungary – a cross-section in VasCounty. Excursion guide. 11th International Conference on the Ecology and management of Alien Plant Invasions (EMAPI 11), Szombathely, University of West Hungary: 1–26
- Basic principles of TLC. 2012. Thin Layer Chromatography. Columns and supplies catalog. Chromatography. Germany, Macherey-nagel: 268–273.
http://www.watex.cz/watex/cz/dwn_ds.php?id=MACHEREY_NAGEL_TLC.pdf
(december 2014)
- Basnou C., Vilà M. 2006. *Ailanthus altissima*. DAISIE. Delivering alien invasive species inventories for Europe.
http://www.europe-aliens.org/pdf/Ailanthus_altissima.pdf (december 2014)
- Baur J.A., Pearson K.J., Price N.L., Jamieson H.A., Lerin C., Kalra A., Prabhu V.V., Allard J.S., Lopez-Lluch G., Lewis K., Pistell P.J., Poosala S., Becker K.G., Boss O., Gwinn D., Wang M., Ramaswamy S., Fishbein K.W., Spencer R.G., Lakatta E.G., Le C.D., Shaw R.J., Navas P., Puigserver P., Ingram D.K., De Cabo R., Sinclair D.A. 2006.

- Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444, 7117: 337–342
- Baur J.A., Sinclair D.A. 2006. Therapeutic potential of resveratrol: The *in vivo* evidence. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 6: 493–506
- Becker P.G. 2007. The mission sustainability on the Japanese knotweed problemacy. Bionic knotweed control. Wiesbaden, NewTritonInk.
<http://www.newtritionink.de/shop/pdf/english.pdf> (december 2014)
- Becker P.G. 2013. Knöterich manufaktur. Willkommen in der Knöterich manufaktur.
<http://www.newtritionink.de/knoeterich/> (december 2014)
- Beerling D.J., Bailey J.P., Conolly A.P. 1994. *Fallopia japonica* (Houtt.) Ronse Decraene (*Reynoutria Japonica* Houtt; *Polygonum Cuspidatum* Sieb. and Zucc.). *Journal of Ecology*, 82, 4: 959–979
- Bennick A. 2002. Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13, 2: 184–196
- Benová B., Adam M., Onderková K., Královský J., Krajíček M. 2008. Analysis of selected stilbenes in *Polygonum cuspidatum* by HPLC coupled with CoulArray detection. *Journal of Separation Science*, 31, 13: 2404–2409
- Bergström T., Ersson C., Bergman J., Möller L. 2012. Vitamins at physiological levels cause oxidation to the DNA nucleoside deoxyguanosine and to DNA alone or in synergism with metals. *Mutagenesis*, 27, 4: 511–517
- Bhattacharya A., Sood P., Citovsky V. 2010. The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. *Molecular Plant Pathology*, 11, 5: 705–719
- Bímová K., Mandák B., Kašparová I. 2004. How does *Reynoutria* invasion fit the various theories of invasibility? *Journal of Vegetation Science*, 15, 4: 495–504
- Bímová K., Mandák B., Pyšek P. 2003. Experimental study of vegetative regeneration in four invasive *Reynoutria* taxa (*Polygonaceae*). *Plant Ecology*, 166, 1: 1–11
- Bímová K., Mandák B., Pyšek P. 2001. Experimental control of *Reynoutria* congeners: A comparative study of a hybrid and its parents. V: *Plant invasions: Species ecology and ecosystem management*. Brundu G., Brock J., Camarda I., Child L., Wade M. (eds.). Leiden, Backhuys Publisher: 283–290
- Bjelakovic G., Nikolova D., Glud C. 2014. Antioxidant supplements and mortality. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 17, 1: 40–44
- Borar S., Punia P., Kalia A.N. 2011. Antioxidant potential of n-butanol fraction from extract of *Jasminum mesnyi* Hance leaves. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 49, 1: 39–43

- Bouayed J., Bohn T. 2010. Exogenous antioxidants – double-edged swords in cellular redox state. Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3, 4: 228–237
- Boudreaux K.A. 2014. Luminol: A Glow in the dark reaction. Angelo State University. Department of Chemistry. San Angelo, Texas.
<http://www.angelo.edu/faculty/kboudrea/demos/luminol/luminol.htm> (december 2014)
- Bravo L. 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56, 11: 317–333
- Breen A.P., Murphy J.A. 1995. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radical Biology & Medicine*, 18: 1033–1077
- Brill S. 2008. Shoots and greens of early spring in Northeastern North America. New York: Wildman Steve Brill, 2008.
<http://www.wildmanstevebrill.com/Plants.Folder/Knotweed.html> (december 2014)
- Brill S. 2010. The Wild vegan cookbook: A forager's culinary guide (in the field or in the supermarket) to preparing and savoring wild (and not so wild) natural foods. Early spring wild foods. Boston, Harvard Common Press: 528 str.
- Brisdelli F., D'Andrea G., Bozzi A. 2009. Resveratrol: A natural polyphenol with multiple chemopreventive properties. *Current Drug Metabolism*, 10, 6: 530–546
- Brisibe E.A., Umoren E., Brisibe F., Magalhães P.M., Ferreira J.F.S., Luthria D., Wu X., Prior R.L. 2009. Nutritional characterisation and antioxidant capacity of different tissues of *Artemisia annua* L. *Food Chemistry*, 115: 1240–1246
- Bruneton J. 1999. Pharmacognosy: Phytochemistry medicinal plants. 2nd ed. Hampshire Spio Iyg, Lavoisier Publishing: 1136 str.
- Brunetti C., Di Ferdinando M., Fini A., Pollastri S., Tattini M. 2013. Flavonoids as antioxidants and developmental regulators: Relative significance in plants and humans. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 2: 3540–3555
- Buhner S.H. 2013. Buhner healing lyme. The protocols.
<http://buhnerhealinglyme.com/the-protocols/> (december 2014)
- Burkon A., Somoza V. 2008. Quantification of free and protein-bound trans-resveratrol metabolites and identification of trans-resveratrol-C/O-conjugated diglucuronides. Two novel resveratrol metabolites in human plasma. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52, 5: 549–557
- Burns J., Gardner P.T., O'Neil J., Crawford S., Morecroft I., McPhail D.B., Lister C., Matthews D., MacLean M.R., Lean M.E.J., Duthie G.G., Crozier A. 2000. Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2: 220–230

- Burns J., Yokota T., Ashihara H., Lean M.E.J., Crozier A. 2002. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 11: 3337–3340
- Buttriss J.L., Hughes J., Kelly C.N.M., Stanner S. 2002. Antioxidants in food: A summary of the review conducted for the Food Standards Agency. *Nutrition Bulletin*, 27, 4: 227–236
- Byers J.A. 2003. Solvent polarity and miscibility data. Phenomenex catalog.
<http://www.chemical-ecology.net/java/solvents.htm> (december 2014)
- Cadenas S., Barja G. 1999. Resveratrol, melatonin, vitamin E, and PBN protect against renal oxidative DNA damage induced by the kidney carcinogen KBrO₃. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 11–12: 1531–1537
- Cai L. 2014. UNIT 6.3 Thin Layer Chromatography. V: Current protocols essential laboratory techniques. Gallagher S.R., Wiley E.A. (eds.). US, Wiley: 6.3.1–6.3.18
- Cai Y., Luo Q., Sun M., Corke H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74, 17: 2157–2184
- Calamini B., Ratia K., Malkowski M., Cuendet M., Pezzuto J., Santarsiero B., Mesecar A. 2010. Pleiotropic mechanisms facilitated by resveratrol and its metabolites. *Biochemical Journal*, 429, 2: 273–282
- Cano A., Acosta M., Arnao M.B. 2000. A method to measure antioxidant activity in organic media: Application to lipophilic vitamins. *Redox Report*, 5, 6: 365–370
- Cardona F., Andrés-Lacueva C., Tulipani S., Tinahones F.J., Queipo-Ortuño M.I. 2013. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24, 8: 1415–1422
- Carlsen M.H., Halvorsen B.L., Holte K., Bøhn S.K., Dragland S., Sampson L., Willey C., Senoo H., Umezono Y., Sanada C., Barikmo I., Berhe N., Willett W.C., Phillips K.M., Jacobs D.R. Jr, Blomhoff R. 2010. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutrition Journal*, 9: 3
- Castañeda-Ovando A., Pacheco-Hernández M.L., Páez-Hernández M.E., Rodríguez J.A., Galán-Vidal C.A. 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, 4: 859–871
- Cécile A.E., Lepoivre P., de Bellaire L.L., Lassois L. 2012. Involvement of phenolic compounds in the susceptibility of bananas to crown rot. A review. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 16, 3: 393–404
- Chachay V.S., Kirkpatrick C.M., Hickman I.J., Ferguson M., Prins J.B., Martin J.H. 2011. Resveratrol, pills to replace a healthy diet? *British Journal of Clinical Pharmacology*, 72, 1: 27–38

- Chan E.W.C., Lim Y.Y., Chew Y.L. 2007. Antioxidant activity of *Camellia sinensis* leaves and tea from a lowland plantation in Malaysia. *Food Chemistry*, 102, 4: 1214–1222
- Chapple I.L.C., Matthews J.B. 2000. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontology*, 43: 160–232
- Chaudiere J., Ferrari-Iliou R. 1999. Intracellular antioxidants: From chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 9–10: 949–962
- Cheeseman K.H., Slater T.F. 1993. An introduction to free radicals chemistry. *British Medical Bulletin*, 49, 3: 481–493
- Chen B.Y., Kuo C.H., Liu Y.C., Ye L.Y., Chen J.H., Shieh C.J. 2012. Ultrasonic-assisted extraction of the botanical dietary supplement resveratrol and other constituents of *Polygonum cuspidatum*. *Journal of Natural Products*, 75, 10: 1810–1813
- Choi J., Conrad C.C., Malakowsky C.A., Talent J.M., Yuan C.S., Gracy R.W. 2002. Flavones from *Scutellaria baicalensis* Georgi attenuate apoptosis and protein oxidation in neuronal cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1571, 3: 201–210
- Chrtek J., Chrtkova A. 1983. *Reynoutria x bohemica*, nový krinzinec z celedi rdesnovitych. *Casopis narodního musea. Oddíl Prirodovedny*, 152: 120
- Chung J.H., Manganiello V., Dyck J.R. 2012. Resveratrol as a calorie restriction mimetic: Therapeutic implications. *Trends in Cell Biology*, 22, 10: 546–554
- Clarck J. 2007. Thin Layer Chromatography.
<http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/thinlayer.html> (december 2014)
- Colman R.J., Beasley T.M., Kemnitz J.W., Johnson S.C., Weindruch R., Anderson R.M. 2014. Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys. *Nature Communications*, 5: 3557
- Conte A., Pellegrini S., Tagliacruzchi D. 2003. Synergistic protection of PC12 cells from beta-amyloid toxicity by resveratrol and catechin. *Brain Research Bulletin*, 62, 1: 29–38
- Corral-Aguayo R.D., Yahia E.M., Carrillo-Lopez A., González-Aguilar G. 2008. Correlation between some nutritional components and the total antioxidant capacity measured with six different assays in eight horticultural crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 22: 10498–10504
- Cotelle N. 2001. Role of flavonoids in oxidative stress. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 1, 6: 569–590
- Counet C., Callemien D., Collin S. 2006. Chocolate and cocoa: New sources of trans-resveratrol and trans-piceid. *Food Chemistry*, 98, 4: 649–657
- Criqui M.H., Ringel B.L. 1994. Does diet or alcohol explain the French paradox? *The Lancet*, 344, 8939–8940: 1719–1723

- Crozier A., Jagannath I.B., Clifford M.N. 2006. Phenols, polyphenols and tannins: An overview. V: Plant secondary metabolites: Occurrence, structure and role in the human diet. Crozier A., Clifford M.N., Ashihara H. (eds.). Oxford, Blackwell Publishing Limited: 1–14
- Cuzzocrea S., Riley D.P., Caputi A.P., Salvemini D. 2001. Antioxidant therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation and ischaemia/reperfusion injury. *Pharmacological Review*, 53, 1: 135–159
- Číž M., Číž H., Denev P., Kratchanova M., Slavov A., Lojek A. 2010. Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. *Food Control*, 21, 4: 518–523
- Čufar K., Tišler V., Zule J. 2011. Ekstraktivi v tkivih evropskega macesna (*Larix decidua* mill.). Ljubljana, Zveza društev inženirjev in tehnikov gozdarstva in lesarstva Slovenije, 63, 5: 170–175
- Dai J., Mumper R.J. 2010. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15, 10: 7313–7352
- D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C., Masella R. 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 43, 4: 348–361
- Davies M.J., Forni L.G., Willson R.L. 1988. Vitamin E analogue Trolox C. E.s.r. and pulse-radiolysis studies of free-radical reactions. *Biochemical Journal*, 255, 2: 513–522
- Day A.J., DuPont M.S., Ridley S., Rhodes M., Rhodes M.J., Morgan M.R., Williamson G. 1998. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver aglucosidase activity. *FEBS Letters*, 436, 1: 71–75
- De Groot H., Rauen U. 1998. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 12: 249–55
- De Santi C., Pietrabissa A., Spisni R., Mosca F., Pacifici G.M. 2000. Sulfation of resveratrol, a natural compound present in wine, and its inhibition by natural flavonoids. *Xenobiotica*, 30, 9: 857–866
- Devasagayam T.P., Tilak J.C., Boloor K.K., Sane K.S., Ghaskadbi S.S., Lele R.D. 2004. Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. *Journal of the Association of Physicians of India*, 52: 794–804
- Diaz-Pérez J.C., Shackel K.A., Sutter E.G. 1995. Relative water content and water potential of tissue 1. *Journal of Experimental Botany*, 46, 1: 111–118
- Dielectric Constant of some common Liquids. 2014. The Engineering Toolbox. http://www.engineeringtoolbox.com/liquid-dielectric-constants-d_1263.html (december 2014)

- Dixon R.A. 2004. Phytoestrogens. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 225–261
- Dodeigene C., Thunus L., Lejeune R. 2000. Chemiluminescence as a diagnostic tool. A review. *Talanta*, 51, 3: 415–439
- Durrani A.I., Schwartz H., Nagl M., Sontag G. 2010. Determination of free [alpha]-lipoic acid in foodstuffs by HPLC coupled with CEAD and ESI-MS. *Food Chemistry*, 120, 4: 38329–38336
- Ewane C.A., Lepoivre P., de Bellaire L.L., Lassois L. 2012. Involvement of phenolic compounds in the susceptibility of bananas to crown rot. A review. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 16, 3: 393–404
- Fan P., Hay A.E., Marston A., Lou H., Hostettmann K. 2009. Chemical variability of the invasive neophytes *Polygonum cuspidatum* Sieb. and Zucc. and *Polygonum sachalinensis* F. Schmidt ex Maxim. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37, 1: 24–34
- Fan P., Hostettmann K., Lou H. 2010. Allelochemicals of the invasive neophyte *Polygonum cuspidatum* Sieb. & Zucc. (*Polygonaceae*). *Chemoecology*, 20, 3: 223–227
- Farina A., Ferranti C., Marra C. 2006. An improved synthesis of resveratrol. *Natural Product Research*, 20, 3: 247–52
- Ferreres F., Figueiredo R., Bettencourt S., Carqueijeiro I., Oliveira J., Gil-Izquierdo A., Pereira D.M., Valentão P., Andrade P.B., Duarte P., Barceló A.R., Sottomayor M. 2011. Identification of phenolic compounds in isolated vacuoles of the medicinal plant *Catharanthus roseus* and their interaction with vacuolar class III peroxidases: an H₂O₂ affair? *Journal of Experimental Botany*, 62, 8: 2841–2854
- Fleischer W.E. 1935. The relation between chlorophyll content and rate of photosynthesis. *The Journal of General Physiology*, 18, 4: 573–597
- Foti M., Daquino C., Geraci C. 2004. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solutions. *The Journal of Organic Chemistry*, 69, 7: 2309–2314
- Frajman B. 2008. Japonski dresnik *Fallopia japonica*. Informativni list 1, Projekt Thuja. <http://www.tujerodne-vrste.info/informativni-listi/INF1-japonski-dresnik.pdf> (december 2014)
- Frajman B. 2009. Japonski dresnik, *Fallopia japonica*. V: *Tujerodne vrste, Informativni listi izbranih vrst*. Jogan N. (ur.). Grahovo, Zavod Symbiosis: 27–30
- Frankel E.N., Meyer A.S. 1941. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 13: 1925–1941
- Frantík T., Kovářová M., Koblihová H., Bartůňková K., Nývltová Z., Vosátka M. 2013.

- Production of medically valuable stilbenes and emodin in knotweed. *Industrial Crops and Products*, 50: 237–243
- Fuentes N., Marticorena A., Saldaña A. 2011. *Fallopia sachalinensis* (F.Schmidt) Ronse Decr. (*Polygonaceae*): A new record for the alien flora of Chile. *Gayana Botánica*, 68, 2: 338–340
- Fuiyoshi M., Masuzawa T., Kagawa A., Nakatsubo T. 2005. Successional changes in mycorrhizal type in the pioneer plant communities of a subalpine volcanic desert on Mt. Fuji, Japan. *Polar BioScience*, 18: 60–72
- Galati G., O'Brien P.J. 2004. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology & Medicine*, 37, 3: 287–303
- Geissler C., Powers H. 2009. *Fundamentals of human nutrition: For students and practitioners in health science*. Edinburgh, Churchill Livingstone: 294 str.
- Genestra M. 2007. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. Review. *Cell Signal*, 19, 9: 1807–1819
- Geopedia. 2014. Geopedia.si Portal. Zemljevidi, ortofoto. Ljubljana, Sinergise.
http://www.geopedia.si/lite.jsp#T105_x499072_y112072_s9_b4 (december 2014)
- Gescher A.J., Steward W.P. 2003. Relationship between mechanisms, bioavailability, and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol: A conundrum. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 12, 10: 953–957
- Ghiselli A., Serafini M., Natella F., Scaccini C. 2000. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data. *Free Radical Biology & Medicine*, 29, 11: 1106–1114
- Gholivand M.B., Piryaei M. 2012. The antioxidant activity, total phenolics and total flavonoids content of *Bryonia dioica* Jacq. *Biologija*, 58, 3: 99–105
- Gholivand M.B., Piryaei M. 2014. Total phenols, flavonoids, anthocyanins, ascorbic acid contents and antioxidant activity of *Rhamnus kurdica* Boiss for flower and leaves in flowering and pre-flowering stages. *African Journal of Biotechnology*, 13, 10: 1131–1135
- Gilgun-Sherki Y., Melamed E., Offen D. 2001. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: The need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, 40, 8: 959–975
- Girotti S., Ferri E., Maccagnani L., Budini R., Bianchi G. 2002. Plasma antioxidant capacity determination: Comparative evaluation of chemiluminescent and spectrophotometric assays. *Talanta*, 56, 3: 407–414
- Girotti S., Ferri E.N., Bolelli L., Arfelli G., Bendini A., Cerretani L. 2010. Luminescence-

- based assays to evaluate the total antioxidant capacity of foods. *Ovidius University Annals of Chemistry*, 21, 2: 129–138
- Glavnik V., Simonovska B., Albrecht A., Vovk I. 2012. TLC and HPLC screening of p-coumaric acid, trans-resveratrol, and pterostilbene in bacterial cultures, food supplements, and wine. *Journal of Planar Chromatography*, 25, 3: 251–258
- Glavnik V., Simonovska B., Vovk I. 2009. Densitometric determination of (+)-catechin and (–)-epicatechin by 4-dimethylaminocinnamaldehyde reagent. *Journal of Chromatography A*, 1216, 20: 4485–4491
- Goldberg D.M., Yan J., Soleas G.J. 2003. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clinical Biochemistry*, 36, 1: 79–87
- Gorenjak A.H. 2010. Živilska kemija z analizo živil (2. del) in analiza živil. Gradivo za 1. in 2. letnik. Ljubljana, Zavod IRC: 58 str.
- Gupta V.K., Sharma S.K. 2006. Plants as natural antioxidants. *Natural Product Radiance*, 5, 4: 326–334
- Hagemann W. 1995. Wuchsform und individuelle bekaempfung des japanknoeterichs durch herbizidinjektionen: Ein vorlaeufige bericht. V: Gebietsfremde pflanzenarten: Auswirkungen auf einheimische arten, lebensgemeinschaften und biotope. Kontrollmöglichkeiten und management. Böcker R., Gebhardt H., Konold W., Schmidt-Fischer S. (eds.). Landsberg, Ecomed: 179–194
- Hagerman A.E. 1988. Extraction of tannin from fresh and preserved leaves. *Journal of Chemical Ecology*, 14, 2: 453–461
- Halliwell B. 1995. Antioxidant characterization. *Biochemical Pharmacology*, 49, 10: 1341–1348
- Halliwell B. 1996. Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 16: 33–50
- Hammerschmidt R. 1999. Phytoalexins: What have we learned after 60 years? *Annual Review of Phytopathology*, 37: 285–306
- Harley J.L., Harley E.L. 1987. A checklist of mycorrhiza in the British flora – addenda, errata and index. *New Phytologist*, 107, 4: 741–749
- Hattori R., Otani H., Maulik N., Das D.K. 2002. Pharmacological preconditioning with resveratrol: Role of nitric oxide. *Heart and Circulatory Physiology*, 282, 6: 1988–1995
- Havsteen B.H. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96, 2–3: 67–202
- Hawrył M.A., Waksmundzka-Hajnos M. 2013. Micro 2D-TLC of selected plant extracts in screening of their composition and antioxidative properties. *Chromatographia*, 76, 19–20: 1347–1352

- Haytowitz D.B., Bhagwat S. 2010. USDA database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of selected foods, release 2. Beltsville, Maryland, U.S. Department of Agriculture: 1–46
http://www.orac-info-portal.de/download/ORAC_R2.pdf (december 2014)
- Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. 2002. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure – activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 10: 572–584
- Horigome T., Kumar R., Okamoto K. 1988. Effects of condensed tannins prepared from leaves of fodder plants on digestive enzymes *in vitro* and in the intestine of rats. *British Journal of Nutrition*, 60, 2: 275–285
- Hoshino J., Park E., Kondratyuk T., Marler L., Pezzuto J., van Breemen R., Mo S., Li Y., Cushman M. 2010. Selective synthesis and biological evaluation of sulfate-conjugated resveratrol metabolites. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53, 13: 5033–5043
- Howitz K.T., Bitterman K.J., Cohen H.Y., Lamming D.W., Lavu S., Wood J.G., Zipkin R.E., Chung P., Kisielewski A., Zhang L.L., Scherer B., Sinclair D.A. 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425, 6954: 191–196
- Hromádková Z., Hirsch J., Ebringerová A. 2010. Chemical evaluation of *Fallopia* species leaves and antioxidant properties of their non-cellulosic polysaccharides. *Chemical Papers*, 64, 5: 663–672
- Hsu C., Chao P., Hu S., Yang C. 2013. The antioxidant and free radical scavenging activities of chlorophylls and pheophytins. *Food and Nutrition Sciences*, 4, 8A: 1–8
- Hsu C.Y., Chan Y.P., Chang J. 2007. Antioxidant activity of extract from *Polygonum cuspidatum*. *Biological Research*, 40, 1: 13–21
- Huang D., Ou B., Hampsch-Woodill M., Flanagan J.A., Deemer E.K. 2002. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated beta-cyclodextrin as the solubility enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1815–1821
- Huang D., Ou B., Prior R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6: 1841–1856
- Huang W.Y., Cai Y.Z., Xing J., Corke H., Sun M. 2008. Comparative analysis of bioactivities of four *Polygonum* species. *Planta Medica*, 74, 1: 43–49
- Hunter K.J., Fletcher J.M. 2002. The antioxidant activity and composition of fresh, frozen, jarred and canned vegetables. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3, 4: 399–406
- Hurst W.J., Glinski J.A., Miller K.B., Apgar J., Davey M.H., Stuart D.A. 2008. Survey of

- the trans-resveratrol and trans-piceid content of cocoa-containing and chocolate products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 18: 8374–8378
- Inoue M., Nishimura H., Li H.H., Mizutani J. 1992. Allelochemicals from *Polygonum sachalinense* (*Polygonaceae*). *Journal of Chemical Ecology*, 18, 10: 1833–1840
- Islas J.F., Dávalos-Balderas A.J., Arroyo-Currás N., Cano B.G., Galindo-Jacobo P., Guajardo-Salinas G., Gaytan-Ramos A., Moreno-Cuevas J.E. 2012. Comparative evaluation of a modified acetic method for extraction of antioxidant compounds from black beans (*Phaseolus vulgaris*). *Food and Nutrition Sciences*, 3, 3: 348–353
- Ismail B., Nielsen S.S. 2010. Basic principles of chromatography. V: Food analysis. 4th ed. Nielsen S.S. (ed.). New York, Springer: 473–498
- Ito K., Colley T., Mercado N. 2012. Geroprotectors as a novel therapeutic strategy for COPD, an accelerating aging disease. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 7: 641–652
- IUPAC. 1993. Nomenclature for Chromatography. *Pure and Applied Chemistry*, 65: 819–872
- Jałosińska M., Wilczak J. 2009. Influence of plant extracts on the microbiological shelf life of meat products. *Polish Journal Of Food And Nutrition Sciences*, 59, 4: 303–308
- Jang M., Cai L., Udeani G.O., Slowing K.V., Thomas C.F., Beecher C.W., Fong H.H., Farnsworth N.R., Kinghorn A.D., Mehta R.G., Moon R.C., Pezzuto J.M. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275, 5297: 218–220
- Jensen J.S., Wertz C.F., O'Neill V.A. 2010. Preformulation stability of trans-resveratrol and trans-resveratrol glucoside (Piceid). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3: 1685–1690
- Jerković I., Radonić A. 2009. Praktikum iz organske kemije. Za preddiplomski studij kemije i kemijske tehnologije. Split, Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu: 32–33
http://www.ktf-split.hr/bib/praktikum_ok.pdf (januar 2015)
- Jiménez A.M., Navas M.J. 2002. Chemiluminescence methods (present and future). *Grasas y Aceites*, 53, 1: 64–75
- Jogan N. 2006. Japonski dresnik (*Fallopia japonica*) – rastlina leta 2006. *Proteus*, 68, 9–10: 437–440
- Jork H., Funk W., Fischer W., Wimmer H. 1989. Dunnschicht-Chromatographie: Reagenzien und Nachweismethoden, Band 1a. Weinheim, VCH: 149 str.
- Jurecek L., Nosalova G., Hromadkova Z., Kostalova Z. 2012. Antitussive activity of extracts from *Fallopia sachalinensis*. *Acta Medica Martiniana*, 12, 1: 24–30

- Kabat T.J., Stewart G.B., Pullin A.S. 2006. Are Japanese knotweed (*Fallopia japonica*) control and eradication interventions effective? Birmingham, Centre for Evidence-Based Conservation: 3–34
<http://www.nonnativespecies.org/downloadDocument.cfm?id=1051> (december 2014)
- Kasote D.M., Hegde M.V., Deshmukh K.K. 2011. Antioxidant activity of phenolic components from n-butanol fraction (PC-BF) of defatted flaxseed meal. *American Journal of Food Technology*, 6: 604–612
- Kim M.H., Park J.H., Park C.V. 2000. Flavonoid chemistry of *Fallopia* section *Fallopia* (*Polygonaceae*). *Biochemical Systematics and Ecology*, 28, 5: 433–441
- King C. 2014. Dr. Christopher King. My course pages.
<http://christopherking.name/Organic%20I%20Labs/Plant%20pigments%20by%20TLC.htm> (januar 2015)
- Kirino A., Takasuka Y., Nishi A., Kawabe S., Yamashita H., Kimoto M., Ito H., Tsuji H. 2012. Analysis and functionality of major polyphenolic components of *Polygonum cuspidatum* (Itadori). *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 58, 4: 278–286
- Kobe J., Pollak A. 1970. Navodila za praktikum iz organske kemije. Ljubljana, Fakulteta za naravoslovje in tehnologijo: 66–67
- Kočevar Glavač N. 2013. Antioksidanti. V: *Sodobna fitoterapija, z dokazi podprta uporaba zdravilnih rastlin*. Kreft S., Kočevar Glavač N. (ur.). Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 511–535
- Konstantinidou-Doltsinis S., Schmit S. 1998. Impact of treatment with plant extracts from *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai on intensity of powdery mildew severity and yield in cucumber under high disease pressure. *Crop Protection*, 17, 8: 649–656
- Kovářová M., Bartůnková K., Frantík T., Koblihová H., Prchalová K., Vosátka M. 2010. Factors influencing the production of stilbenes by the knotweed, *Reynoutria x bohemica*. *BMC Plant Biology*, 10: 19
- Kristinová V. 2008. Evaluation of antioxidant effect using different analytical methods. Diploma thesis. Faculty of Chemistry Institute of Food Science and Biotechnology. Brno, University of Technology: 22–39
- Kumar S. 2011. Free radicals and antioxidants: Human and food system. *Advances in Applied Science Research*, 2, 1: 129–135
- Lalitha Eswari M., Vijaya Bharathi R., Jayshree N. 2013. Preliminary phytochemical screening and heavy metal analysis of leaf extracts of *Ziziphus oenoplia* (L) Mill. *Gard. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 5, 1: 38–40
- Lambert J.D., Elias R.J. 2010. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. *Archives of Biochemistry and Biophysics*,

501, 1: 65–72

- Langcake P., Pryce R.J. 1976. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the *Vitaceae* as a response to infection or injury. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 9, 1: 77–86
- Laznik Ž., Trdan S. 2012. Japonski dresnik (*Fallopia japonica* Houtt. Ronse Decraene) in njegovo zatiranje z bolšico *Aphalara itadori* Shinji. *Acta agriculturae Slovenica*, 99, 1: 93–98
- Lee C., Yoon J. 2008. UV direct photolysis of 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) in aqueous solution: Kinetics and mechanism. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 197, 2–3: 232–238
- Lee C.E. 2002. Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology & Evolution*, 98, 10: 5446–5451
- Leffmann Henry M.D. 1919. Death from rhubarb leaves due to oxalic acid poisoning. *JAMA*, 73, 12: 928–929
- Lewis W.H., Elvin-Lewis M.P.F. 1977. *Medical Botany*. New York, John Wiley & Sons: 534 str.
- Li H., Guo A., Wang H. 2008. Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry*, 8, 1: 1–13
- Li Z.H., Wang Q., Ruan X., Pan C.D., Jiang D.A. 2010. Phenolics and plant allelopathy. *Molecules*, 15, 12: 8933–8952
- Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4, 8: 118–126
- Lozano-Sánchez J., Castro-Puyana M., Mendiola J.A., Segura-Carretero A., Cifuentes A., Ibáñez E. 2014. Recovering bioactive compounds from olive oil filter cake by advanced extraction techniques. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 9: 16270–16283
- Luque G.M., Bellard C., Bertelsmeier C., Bonnaud E., Genovesi P., Simberloff D., Courchamp F. 2013. Alien species: Monster fern makes IUCN invader list. *Nature*, 498, 7452: 37
- Lyons M.M., Yu C., Toma R.B., Cho S.Y., Reiboldt W., Lee J., van Breemen R.B. 2003. Resveratrol in raw and baked blueberries and bilberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 20: 5867–5870
- Mabberley D.J. 1997. *The plant book. A portable dictionary of the vascular plants*. 2nd ed. Cambridge, Cambridge University Press: 1040 str.
- Maier-Salamon A., Böhmendorfer M., Riha J., Thalhammer T., Szekeres T., Jaeger W. 2013. Interplay between metabolism and transport of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1290: 98–106

- Malele R.S., Zvikomborero M.C. 2014. Estimation of trans-resveratrol in grape berry skin extract by High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC). *International Journal of Health Sciences and Research*, 2, 1: 213–223
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. 2004. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 5: 727–747
- Mandák B., Pyšek P., Bímová K. 2004. History of the invasion and distribution of *Reynoutria* taxa in the Czech Republic: A hybrid spreading faster than its parents. *Preslica*, 76: 15–64
- Mangold J., Parkinson H. 2010. Biology, ecology and management of the knotweed complex (*Polygonum* spp.). EB0196. Bozeman, Montana State University Extension: 1–18
<http://store.msuxextension.org/publications/AgandNaturalResources/EB0196.pdf>
(december 2014)
- Marier J.F., Vachon P., Gritsas A., Zhang J., Moreau J.P., Ducharme M.P. 2002. Metabolism and disposition of resveratrol in rats: Extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302, 1: 369–373
- Marston A., Hostettmann K. 2006. Separation and quantification of flavonoids. V: *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications*. Andersen Ø.M., Markham K.R. (eds.). Abingdon, Taylor & Francis Group: 1–37
- Martinez J., Moreno J.J. 2000. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochemical Pharmacology*, 59, 7: 865–70
- Matsuda H., Morikawa T., Toguchida I., Park J.Y., Harima S., Yoshikawa M. 2001. Antioxidant constituents from rhubarb: Structural requirements of stilbenes for the activity and structures of two new anthraquinone glucosides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 9, 1: 41–50
- Mattila P., Kumpulainen J. 2002. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 13: 3660–3667
- Maxwell S.R.J. 1995. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*, 49, 3: 345–361
- McClements D.J., Decker E.A. 2008. Lipids. V: *Fennema's food chemistry*. Damodaran S., Parkin K.L., Fennema O.R. (eds.). 4th ed. Boca Raton, Taylor & Francis Group: 156–212
- Mermelstein N.H. 2008. Determining antioxidant activity. *Food Technology*, 11: 63–66
- Mertens-Talcott S.U., Percival S.S. 2005. Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in

- human leukemia cells. *Cancer Letters*, 218, 2: 141–151
- Metcalf R.L. 1987. Plant volatiles as insect attractants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 5, 3: 251–301
- Miles B. 2003. The Electron transport chain.
<https://www.tamu.edu/faculty/bmiles/lectures/electrontrans.pdf> (december 2014)
- Miller D.M., Buettner G.R., Aust S.D. 1990. Transition metals as catalysts of »autoxidation« reactions. *Free Radical Biology & Medicine*, 8, 1: 95–108
- Miller N.J., Sampson J., Candeias L.P., Bramley P.M., Rice-Evans C.A. 1996. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, 384, 3: 240–242
- Mobh S. 1938. Research for vitamin P. *The Journal of Biochemistry*, 29, 3: 487–501
- Moravcová L., Pyšek P., Jarošík V., Zákavský P. 2011. Potential phytotoxic and shading effects of invasive *Fallopia* (*Polygonaceae*) taxa on the germination of native dominant species. *NeoBiota*, 9: 31–47
- Murrell C., Gerber E., Krebs C., Parepa M., Schaffner U., Bossdorf O. 2011. Invasive knotweed affects native plants through allelopathy. *American Journal of Botany*, 98, 1: 38–43
- Musa K.H., Abdullah A., Jusoh K., Subramaniam V. 2011. Antioxidant activity of pink-flesh guava (*Psidium guajava* L.): Effect of extraction techniques and solvents. *Food Analytical Methods*, 4, 1: 100–107
- Musulín R.R., King C.G. 1936. Metaphosphoric acid in the extraction and titration of vitamin C. *The Journal of Biological Chemistry*, 116: 409–413
- Nacz M., Shahidi F. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 5: 1523–1542
- Nacz M., Shahidi F., Sullivan A. 1992. Recovery of rapeseed tannins by various solvent systems. *Food Chemistry*, 45, 1: 51–54
- Naghiloo S., Movafeghi A., Delazar A., Nazemiyeh H., Asnaashari S., Dadpour M.R. 2012. Total phenolics and antioxidant activity in roots, leaves and flowers of *Astragalus compactus* Lam. (*Fabaceae*). *Bioimpacts*, 2, 2: 105–109
- Navas M.J., Jiménez A.M. 2007. Chemiluminescent methods in olive oil analysis. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84, 5: 405–411
- Nawar W.W. 1985. Lipids. V: Food Chemistry. Fennema I.O.R. (ed.). 2nd ed. New York, Marcel Dekker: 991 str.
- Negi P.S. 2012. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*, 156, 1:

7–17

- Newman D.J., Cragg G.M. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, 70, 3: 461–477
- Nice G. 2007. Japanese knotweed (*Polygonum cuspidatum*). Purdue extension weed science. West Lafayette, Purdue university: 1–3
<https://ag.purdue.edu/btny/weedscience/documents/japaneseknotweed07.pdf>
(december 2014)
- Nijveldt R.J., van Nood E., van Hoorn D.E., Boelens P.G., van Norren K., van Leeuwen P.A. 2001. Flavonoids: A review of probable mechanisms of actions and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 4: 418–425
- Nikolova V. 2007. Resveratrol: A crossroad of enology and biomedicine. *Biomedical Reviews*, 18: 89–101
- Nonomura S., Kanagawa H., Makimoto A. 1963. Chemical constituents of polygonaceous plants. I. Studies on the components of Ko-Jo-Kon. (*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.). *Yakugaku Zasshi*, 83: 988–990
- Nor Qhairul Izzreen M.N., Mohd Fadzelly A.B. 2013. Phytochemicals and antioxidant properties of different parts of *Camellia sinensis* leaves from Sabah tea plantation in Sabah, Malaysia. *International Food Research Journal*, 20, 1: 307–312
- Nwabueze T.U., Okocha K.S. 2008. Extraction performances of polar and non-polar solvents on the physical and chemical indices of African breadfruit (*Treculia africana*) seed oil. *African Journal of Food Science*, 2: 119–125
- Oehlke K., Heins A., Stöckmann H., Sönnichsen F., Schwarz K. 2011. New insights into the antioxidant activity of Trolox in o/w emulsions. *Food Chemistry*, 124, 3: 781–787
- Ogwuru N., Adamzenski M. 2000. Bioactive natural products derived from Polygonum species of plants: Their structure and mechanisms of action. *Studies in Natural Products Chemistry*, 22, part C: 607–642
- Oliveira S., Souza G.A., Eckert C.R., Silva T.A., Sobral E.S., Fávero O.A., Ferreira M.J.P., Romoff P., Baader W.J. 2014. Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Química Nova*, 37, 3: 497–503
- Oven P., Vek V. 2011. Vpliv različnih polarnih topil na delež celokupnih fenolov v lesnih ekstraktih. Ljubljana, Zveza društev inženirjev in tehnikov gozdarstva in lesarstva Slovenije, 63, 3: 45–48
- Ozeker E., Kara S. 1999. Identification of phenolic substances and their seasonal changes in Sultana and Perlette grape cultivars. *American Journal Of Enology & Viticulture*, 50, 3: 378

- Padda M.S., Picha D.H. 2007. Antioxidant activity and phenolic composition in »Beauregard« sweetpotato are affected by root size and leaf age. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132, 4: 447–451
- Pan Y., Zhang X., Wanga H., Liang Y., Zhu J., Li H., Zhang Z., Wu Q. 2007. Antioxidant potential of ethanolic extract of *Polygonum cuspidatum* and application in peanut oil. *Food Chemistry*, 105, 4: 1518–1524
- Pandey K.B., Rizvi S.I. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2, 5: 270–278
- Pandey P., Mehta R., Upadhyay R. 2013. Physico-chemical and preliminary phytochemical screening of *Psoralea corylifolia*. *Archives of Applied Science Research*, 5, 2: 261–265
- Parr A.J., Bolwell G.P. 2000. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 7: 985–1012
- Patel K., Brown V., Jones D., Britton R., Hemingway D., Miller A., West K., Booth T., Perloff M., Crowell J. 2010. Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. *Cancer Research*, 70, 19: 7392–7399
- Peng W., Qin R., Li X., Zhou H. 2013. Botany, phytochemistry, pharmacology, and potential application of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 148, 3: 729–745
- Pennycooke J.C., Cox S., Stushnoff C. 2005. Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in petunia (*Petunia × hybrida*). *Environmental and Experimental Botany*, 53, 2: 225–232
- Peterson J.J., Beecher G.R., Bhagwat S.A., Dwyer J.T., Gebhardt S.E., Haytowitz D.B. 2006. Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 74–80
- Pham-Huy L.A., He H., Pham-Huy C. 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*, 4, 2: 89–96
- Pietta P.G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 7: 1035–1042
- Pintó-Marijuan M., Munné-Bosch S. 2013. Ecophysiology of invasive plants: Osmotic adjustment and antioxidants. *Trends in Plant Science*, 18, 12: 660–666
- Piola F., Bellvert F., Meiffren G., Rouifed S., Walker V., Comte G., Bertrand C. 2013. Invasive *Fallopia x bohemica* interspecific hybrids display different patterns in secondary metabolites. *Ecoscience*, 20, 3: 230–239

- Pitchaon M. 2006. Use of plant phenolic compounds as antioxidants. *Din Daeng, University of the Thai Chamber of Commerce*, 26, 3: 222–238
http://www.utcc.ac.th/public_content/files/001/P131_1.pdf (december 2014)
- Pogačnik L., Poklar Ulrih N. 2012. Application of optimized chemiluminescence assay for determination of the antioxidant capacity of herbal extracts. *Luminescence*, 27, 6: 505–510
- Prather T.S., Miller T.W., Robins S.S. 2009. Knotweed shrubs: Identification, biology, and management. Pacific Northwest Extension publications, PNW610: 1–7
www.cals.uidaho.edu/edComm/pdf/PNW/PNW0610.pdf (december 2014)
- Pravst I., Zmitek K., Zmitek J. 2010. Coenzyme Q10 contents in foods and fortification strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50, 4: 269–80
- Prior R.L., Cao G. 1999. *In vivo* total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology & Medicine*, 27, 11–12: 1173–1181
- Prior R.L., Wu X., Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 10: 4290–4302
- Prošek M., Pukl M. 1991. Kvantitativna planarna kromatografija. Kemijski inštitut Boris Kidrič. Ljubljana, Zavod Republike Slovenije za šolstvo in šport: 184 str.
- Qian G., Leung S.Y., Lu G., Leung K.S. 2006. Differentiation of rhizoma et radix *Polygoni cuspidati* from closely related herbs by HPLC fingerprinting. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 54, 8: 1179–1186
- Rahman K. 2007. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Journal of Clinical Interventions in Aging*, 2, 2: 219–236
- Ralston L., Subramanian S., Matsuno M., Yu O. 2005. Partial reconstruction of flavonoid and isoflavonoid biosynthesis in yeast using soybean type I and type II chalcone isomerases. *Plant Physiology*, 137, 4: 1375–1388
- Ramarathnam N., Osawa T., Ochi H., Kawakishi S. 1995. The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 3: 75–82
- Raza H., John A. 2005. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates oxidative stress in PC12 cell compartments. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207, 3: 212–220
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 9–10: 1231–1237
- Reference standards. 2013. UK, The British Pharmacopoeia.
<https://www.pharmacopoeia.gov.uk/reference-standards.php> (december 2014)

- Regev-Shoshani G., Shoseyov O., Bilkis I., Kerem Z. 2003. Glycosylation of resveratrol protects it from enzymic oxidation. *Biochemical Journal*, 374, 1: 157–163
- Reich E., Schibli A. 2006. High-performance Thin Layer Chromatography for the analysis of medicinal plants. 1st ed. New York, Thieme Medical Publishers: 280 str.
- Reische D.W., Lillard D.A., Eitenmiller R.R. 2002. Antioxidants. V: Food lipids – chemistry, nutrition and biotechnology. Akoh C.C., Min D.B. (eds.). 2nd ed. New York, Marcel Dekker: 489–516
- Renaud S., de Lorgeril M. 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 339, 8808: 1523–1526
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 7: 933–956
- Richardson D.M., Pyšek P., Rejmánek M., Barbour M.G., Panetta F.D., West C.J. 2000. Naturalization and invasion of alien plants: Concepts and definitions. *Diversity and Distributions*, 6, 2: 93–107
- Robbins R.J., Bean S.R. 2004. Development of a quantitative high-performance liquid chromatography-photodiode array detection measurement system for phenolic acids. *Journal of Chromatography A*, 1038, 1–2: 97–105
- Roda A., Russo C., Pasini P., Piazza F., Feroci G., Kricka L.J., Baraldini M. 1998. Antioxidant properties of bile salt micelles evaluated with different chemiluminescent assays: A possible physiological role. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, 13, 6: 327–337
- Roginsky V., Lissi E.A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92, 2: 235–254
- Romero-Perez A.I., Ibern-Gomez M., Lamuela-Raventos R.M., de La Torre-Boronat M.C. 1999. Piceid, the major resveratrol derivative in grape juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4: 1533–1536
- Sagdic O., Ozturk I., Yilmaz M.T., Yetim H. 2011. Effect of grape pomace extracts obtained from different grape varieties on microbial quality of beef patty. *Journal of Food Science*, 76, 7: 515–521
- Santas J., Carbó R., Gordon M.H., Almajano M.P. 2008. Comparison of the antioxidant activity of two Spanish onion varieties. *Food Chemistry*, 107: 1210–1216
- Sarma A.D., Mallick A.R., Ghosh A.K. 2010. Free radicals and their role in different clinical conditions: An overview. *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)*, 1, 3: 185–192
- Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C. 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 45, 4: 287–306

- Scalbert A., Williamson G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, 130, 8: 2073–2085
- Schroeder F.G. 2000. Die anökophyten und das system der floristischen statuskategorien. V: *Botanische jahrbücher für systematik, pflanzengeschichte und pflanzen geographie*. Stuttgart, Schweizerbart science publisher, 122: 431–437
- Schuster B., Hemann K. 1985. Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid derivatives in soft fruits. *Phytochemistry*, 24, 11: 2761–2764
- Serrano J., Goñi I., Saura-Calixto F. 2007. Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity. *Food Research international*, 40, 1: 15–21
- Shahidi F., Janitha P.K., Wanasundara P.D. 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, 1: 67–103
- Shaw R.H., Bryner S., Tanner R. 2009. The life history and host range of the *Japanese knotweed* psyllid, *Aphalara itadori* Shinji: Potentially the first classical biological weed control agent for the European Union. *Biological Control*, 49, 2: 105–113
- Sherma J.J. 2000. Thin-Layer Chromatography in food and agricultural analysis. *Journal of Chromatography A*, 880, 1–2: 129–147
- Shewfelt A.L., Dennison R.A. 1959. Measurement of color changes in green beans. *Florida State Horticultural Society*, 72: 276–280
- Siemann E.H., Creasey L.L. 1992. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43, 1: 49–52
- Sies H., Stahl W., Sevanian A. 2005. Nutritional, dietary and post-prandial oxidative stress. *Journal of Nutrition*, 135, 5: 969–972
- Simonovska B., Vovk I., Andrensek S., Valentová K., Ulrichová J. 2003. Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. *Journal of Chromatography A*, 1016, 1: 89–98
- Slovenski medicinski slovar. 2012. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta. <http://lsm1.amebis.si/lsmeds/lokvir.aspx> (december 2014)
- Smith M., Skjøth C.A., Myszkowska D., Uruska A., Puc M., Stach A., Balwerz Z., Chlopek K., Piotrowska K., Kasprzyk I., Brant J. 2008. Long-range transport of Ambrosia pollen in Poland. *Agricultural and Forest Meteorology*, 148, 10: 1402–1411
- Snell T.W., Fields A.M., Johnston R.K. 2012. Antioxidants can extend lifespan of *Brachionus manjavacas* (Rotifera), but only in a few combinations. *Biogerontology*, 13, 3: 261–275
- Soetan K.O., Aiyelaagbe O.O. 2009. The need for bioactivity-safety evaluation and conservation of medicinal plants. A review. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3, 5:

324–328

- Soleas G.J., Diamandis E.P., Goldberg D.M. 1997. Resveratrol: A molecule whose time has come? And gone? *Clinical Biochemistry*, 30, 2: 91–113
- Soltysiak J., Brej T. 2014. Invasion of *Fallopia* genus plants in urban environment. *Polish Journal of Environmental Studies*, 23, 2: 449–458
- Solvents. 2014. Chemistry 251/253.
http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/library/newton/Chy251_253/Lectures/Solvents/SolventsFS.html
(december 2014)
- Spainhour J. 1997. Medical attributes of *Polygonum cuspidatum* – Japanese knotweed. Wilkes-Barre, Wilkes University.
<http://klemow.wilkes.edu/Polygonum.html> (december 2014)
- Sreeramulu D., Reddy C.V., Raghunath M. 2009. Antioxidant activity of commonly consumed cereals, millets, pulses and legumes in India. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 46, 1: 112–115
- St Leger A.S., Cochrane A.L., Moore F. 1979. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *The Lancet*, 1, 8124: 1017–1020
- Stojanovic S., Sprinz H., Brede O. 2001. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 391, 1: 79–89
- Stratil P., Klejdus B., Kuban V. 2006. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables – Evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3: 607–616
- Strgar V. 1981. Genus *Reynoutria* v adventivni flori Slovenije. *Biološki vestnik*, 29, 2: 121–136
- Strgar V. 1982. Genus *Reynoutria* v adventivni flori Slovenije. *Biološki vestnik*, 30, 2: 151–154
- Strgulc Krajšek S., Jogan N. 2011. The genus *Fallopia* Adans. in Slovenia. *Hladnikia*, 28: 17–40
- Su D., Cheng Y., Liu M., Liu D., Cui H., Zhang B., Zhou S., Yang T., Mei Q. 2013. Comparison of piceid and resveratrol in antioxidation and antiproliferation activities *in vitro*. *PLoS ONE*, 8, 1: e54505
- Suda J., Trávníček P., Mandák B., Berchová-Bímová K. 2010. Genome size as a marker for identifying the invasive alien taxa in *Fallopia* section *Reynoutria*. *Preslica*, 82: 97–

- Sukopp H., Starfinger U. 1995. *Reynoutria sachalinensis* in Europe and in the Far East: A comparison of the species ecology in its native and adventive distribution range. V: Plant invasions, general aspects and social problems. Pyšek P., Prach K., Rejmanek M., Wade M. (eds.). Amsterdam, SPB Academic Publishing: 151–159
- Sultana B., Anwar F., Ashraf M. 2009. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*, 14, 6: 2167–2180
- Sun T., Tanumihardjo S.A. 2007. An integrated approach to evaluate food antioxidant capacity. *Journal of Food Science*, 72, 9: 159–165
- Sundarasekar J., Sahgal G., Mubbarakh S.A., Subramaniam S. 2013. Potential antioxidant activities of methanolic extracts of Spider lily (*Hymenocallis littoralis*). *Australian Journal of Crop Science*, 7, 5: 625–631
- Sutton H.C., Winterbourne C.C. 1989. On the participation of higher oxygenation states of iron and copper in Fenton reactions. *Free Radical Biology & Medicine*, 6, 1: 53–60
- Šegedin P. 1994. O natančnosti pri (kemijskem) računanju. V: Kemija v šoli. Zakrajšek S. (ur.). Ljubljana, Raziskovalna enota Gimnazije Bežigrad Ljubljana, 6, 4: 2–9
- Takaoka M.J. 1940. Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.). *Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University*, 4, 3: 1–16
- Tam W.G., Zardecki A. 1982. Multiple scattering corrections to the Beer-Lambert law. 1: Open detector. *Applied Optics*, 21, 13: 2405–2412
- Tavčar Benković E., Žigon D., Friedrich M., Plavec J., Kreft S. 2014. Isolation, analysis and structures of phototoxic fagopyrins from buckwheat. *Food Chemistry*, 143: 432–439
- Thannickal V.J., Fanburg B.L. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology*, 279, 6: 1005–1028
- Thermo Scientific. 2012. Pharmaceutical applications notebook. Determination of anthraquinones and stilbenes in Giant knotweed rhizome by HPLC with UV Detection. Dionex. Application Note 232: 43–49
http://apps.thermoscientific.com/media/cmd/Chromatography/AppLibrary/CMD_Pharmaceuticals_OverCounter.pdf (december 2014)
- Thin-Layer Chromatography. 2014. 7. Thin-Layer Chromatography. Pennsylvania, Pennsylvania State University: 93–104.
http://courses.chem.psu.edu/chem36/Experiments/PDF's_for_techniques/TLC.pdf (december 2014)
- Thompson J.L., Manore M.M., Vaughan L.A. 2008. The science of nutrition. San Francisco, Pearson Benjamin Cummings: 863 str.

- Thorpe G.H., Kricka L.J. 1986. Enhanced chemiluminescent reaction catalyzed by horseradish peroxidase. *Methods in Enzymology*, 133: 331–353
- Tiébré M.S., Vanderhoeven S., Saad L., Mahy G. 2007. Hybridization and sexual reproduction in the invasive alien *Fallopia (Polygonaceae)* complex in Belgium. *Annals of Botany*, 99, 1: 193–203
- Tohge T., Watanabe M., Hoefgen R., Fernie A.R. 2013. Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage. *Frontiers in Plant Science*, 4: 62
- Topnost. 2014. Oddelek za kemijsko izobraževanje in informatiko. Ljubljana, Naravoslovnotehniška fakulteta.
<http://www.kii.ntf.uni-lj.si/keminform/proj/ro03m/topnostspl.htm> (december 2014)
- Tracewell C.A., Vrettos J.S., Bautista J.A., Frank H.A., Brudvig G.W. 2001. Carotenoid photooxidation in photosystem II. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385, 1: 61–69
- Trantas E., Panopoulos N., Ververidis F. 2009. Metabolic engineering of the complete pathway leading to heterologous biosynthesis of various flavonoids and stilbenoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 11, 6: 355–66
- Tumbas V.T., Mandić A.I., Četković G.S., Đilas S.M., Čanadanović-Brunet J.M. 2004. HPLC analysis of phenolic acids in mountain germander (*Teucrium montanum* L.) extracts. *Acta Periodica Technologica*, 35: 1–280
- Uddin M.K., Juraimi A.S., Ali M.E., Ismail M.R. 2012. Evaluation of antioxidant properties and mineral composition of purslane (*Portulaca oleracea* L.) at different growth stages. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 8: 10257–10267
- Urbančič-Zemljič M., Škerlavaj V. 1999. Postaja japonski dresnik (*Reynoutria japonica* Houtt.) v Sloveniji problem? Portorož, Zbornik predavanj in referatov s 4. Slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin: 85–90
- Uttara B., Singh A.V., Zamboni P., Mahajan R.T. 2009. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, 7, 1: 65–74
- Vaher M., Koel M. 2003. Separation of polyphenolic compounds extracted from plant matrices using capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 990: 225–230
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 1: 44–84
- Van der Sluis A.A., Dekker M., Boekel M.A.J.S. 2005. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 3. stability during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4: 1073–1080

- Van Remmen H., Hamilton M.L., Richardson A. 2003. Oxidative damage to DNA and aging. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 31, 3: 149–153
- Vastano B.C., Chen Y., Zhu N., Ho C.T., Zhou Z., Rosen R.T. 2000. Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2: 253–256
- Veenvliet J.K. 2014. Je japonski dresnik že na vašem vrtu? Ljubljana, Zavod Symbiosis. <http://www.ljubljana.si/file/1396989/japonski-dresnik.pdf> (december 2014)
- Vercesi A.E., Kowaltowski A.J., Grijalba M.T., Meinicke A.R., Castilho R.F. 1997. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Bioscience Reports*, 17, 1: 43–52
- Vrchotová N., Šerá B., Tríska J., Dadáková E., Kuzel S. 2004. Phenolic compounds in the leaves of *Reynoutria* Houtt. genus. V: Polyphenols communications 2004, XXII. Hoikkala A., Soidinsalo O. (eds.). International Conference on Polyphenols, 25–28 August 2004, Helsinki, Finland: 811–812
- Vrchotová N., Šerá B., Dadáková E. 2010. HPLC and CE analysis of catechins, stilbens and quercetin in flowers and stems of *Polygonum cuspidatum*, *P. sachalinense* and *P. x bohemicum*. *Journal of Indian Chemical Society*, 87: 1267–1272
- Vrchotová N., Šerá B., Tríska J. 2007. The stilbene and catechin content of the spring sprouts of *Reynoutria* species. *Acta Chromatographica*, 19: 21–28
- Vrchotová N., Šerá B., Tríska J., Dadáková E., Kužel S. 2005. Biologically active compounds as a possible cause of invasibility of knotweeds (*Reynoutria* spp.) from Eastern Asia. V: Plant protection and plant health in Europe: Introduction and spread of invasive species. Alford D.V., Backhaus G.F. (eds.). Berlin, Humboldt University: 289–290
- Vreš B. 2007. *Fallopia* Adanson (incl. *Reynoutria* Houtt.) – dresnik, slakovec. V: Mala flora Slovenije. 4. izdaja. Martinčič A. in sod. (ur.). Ljubljana, Tehniška založba Slovenije, Ljubljana: 205–218
- Wade L.G. 2014. Alcohol. *Encyclopedia Britannica*. <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/13366/alcohol> (december 2014)
- Wahle K.W., Brown I., Rotondo D., Heys S.D. 2010. Plant phenolics in the prevention and treatment of cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 698: 36–51
- Waksmundzka-Hajnos M., Sherma J., Kowalska T. 2008. Overview of the field of TLC in phytochemistry and the structure of the book. V: Thin Layer Chromatography in phytochemistry, chromatographic science series. Cazes J. (ed.). Boca Raton, Taylor & Francis Group, 99: 5–8
- Wall P.E. 2005. Detection and visualisation. V: RSC Chromatography monographs. Thin-

- Layer Chromatography, A moder practical approach. Smith R.M. (ed.). Cambridge. The Royal Society of Chemistry, 1–9: 134–153
- Walle T. 2011. Bioavailability of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1215: 9–15
- Walle T., Hsieh F., DeLegge M.H., Oatis J.E. Jr, Walle U.K. 2004. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metabolism and Disposition*, 32, 12: 1377–1382
- Wanasundara P., Shaidi F. 2005. Antioxidants: Science, technology and applications. V: Bailey's industrial oil and fat products. 6th ed. Shahidi F. (ed.). Baltimore, Wiley-Interscience: 431–484
- Wang D.G., Liu W.Y., Chen G.T. 2013. A simple method for the isolation and purification of resveratrol from *Polygonum cuspidatum*. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 3, 4: 241–247
- Wang H., Liu L., Guo Y.X., Dong Y.S., Zhang D.J., Xiu Z.L. 2007. Biotransformation of piceid in *Polygonum cuspidatum* to resveratrol by *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75, 4: 763–768
- Wang S.Y., Lin H.S. 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 140–146
- Wätjen W., Michels G., Steffan B., Niering P., Chovolou Y., Kampkötter A., Tran-Thi Q.H., Proksch P., Kahl R. 2005. Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. *Journal of Nutrition*, 135, 3: 525–531
- Webster D., Taschereau P., Belland R.J., Sand C., Rennie R.P. 2008. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 115: 140–146
- Wenzel E., Somoza V. 2005. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49, 5: 472–481
- Weston L.A., Barney J.N., Ditommaso A. 2005. A review of the biology and ecology of three invasive perennials in New York state: Japanese knotweed, Mugwort, and Pale swallow-wort. *Plant and Soil*, 277, 1–2: 54–58
- Whitehead T.P., Thorpe G.H.G., Maxwell S.R.J. 1992. An enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids. *Analytica Chimica Acta*, 266, 2: 265–277
- Why plants need water. 2014. Clemson University Cooperative Extension. http://www.clemson.edu/extension/horticulture/nursery/irrigation/why_plants_need_water.html (januar 2015)

- Willför S.M., Smeds A.I., Holmbom B.R. 2006. Chromatographic analysis of lignans. *Journal of Chromatography A*, 1112, 1–2: 64–77
- Wills R.B., Bone K., Morgan M. 2000. Herbal products: Active constituents, modes of action and quality control. *Nutrition Research Reviews*, 13, 1: 47–77
- Woo J., Tang J.L. 2004. Healthy ageing – is there a role for Traditional Chinese Medicine (TCM)? *Journal of the Hong Kong Geriatrics Society*, 21, 1: 31–35
- Wood J.G., Rogina B., Lavu S., Howitz K., Helfand S.L., Tatar M., Sinclair D. 2004. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*, 430, 7000: 686–689
- Wrasiati L.P., Wirawan I.G.P., Bagiada N.A., Astawa I.N.M. 2011. Antioxidant capacity of frangipani (*Plumeria alba*) powder extract. *Indonesian Journal Of Biomedical Sciences*, 5, 2: 1–11
- Wright J.S., Johnosn E.R., Di Labio G.A. 2001. Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 123, 6: 1173–1183
- Yamasaki S., Dillenburg L.R. 1999. Measurements of leaf relative water content in *Araucaria angustifolia*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 11, 2: 69–75
- Yang C.W., Peng C.L., Duan J., Lin G.Z., Chen Y.Z. 2002. Responses of chlorophyll fluorescence and carotenoids biosynthesis to high light stress in rice seedling leaves at different leaf position. *Acta Botanica Sinica*, 44, 11: 1303–1308
- Yi T., Leung K.S.Y., Lu G.H., Zhang H., Chan K. 2007. Identification and determination of the major constituents in traditional Chinese medicinal plant *Polygonum multiflorum* Thunb by HPLC coupled with PDA and ESI/MS. *Phytochemical Analysis*, 18, 3: 181–187
- Yordi E.G., Pérez E.M., Matos M.J., Villares E.U. 2012. Antioxidant and pro-oxidant effects of polyphenolic compounds and structure-activity relationship evidence. V: Nutrition, well-being and health. Bouayed J., Bohn T. (eds.). Rijeka, InTech: 23–48
- Yuji Kawai Y., Sawan R., Kumagai H., Yamazaki K., Suzuki H., Tedzuka M., Inoue N. 2004. Antimicrobial activity of extracts from giant knotweed *Polygonum sachalinense* against animal pathogenic bacteria. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, 55, 3: 139–144
- Zhang H., Li C., Kwok S.T., Zhang Q.W., Chan S.W. 2013. A review of the pharmacological effects of the dried root of *Polygonum cuspidatum* (Hu Zhang) and its constituents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013: 1–13
- Zhang L., Ravipati A.S., Koyyalamudi S.R., Jeong S.C., Reddy N., Bartlett J., Smith P.T., de la Cruz M., Monteiro M.C., Melguizo A., Jiménez E., Vicente F. 2013. Anti-fungal

and anti-bacterial activities of ethanol extracts of selected traditional Chinese medicinal herbs. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6, 9: 673–681

Zhou C., Sun C., Chen K., Li X. 2011. Flavonoids, phenolics, and antioxidant capacity in the flower of *Eriobotrya japonica* Lindl. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 5: 2935–2945

ZAHVALA

V prvi vrsti bi se rad zahvalil moji mentorici doc. dr. Lei Pogačnik za vse nasvete, spodbude in podana znanja ter izkušnje. Najlepša hvala za veliko mero zaupanja in vaš čas, kadarkoli sem vas potreboval. Z obiskom mednarodnega simpozija v Romuniji in s soavtorstvom pri vašem vabljenem predavanju ter znanstvenem članku, ste mi omogočili vstop v svet raziskovalnega dela. Ob tem sem uspel pridobiti pomembne življenjske izkušnje in nova znanja. Zahvaljujem se tudi somentorici dr. Ireni Vovk za ves njen čas, trud, podana znanja in izkušnje ter zaupanje v moje znanje in sposobnosti, postati raziskovalec. V vašem laboratoriju sem pridobil veliko novih izkušenj in spoznal prijetno delovno okolje, ki je ključno pri uspešnem raziskovanju. Zelo sem hvaležen obema, da sem lahko delal pod vajinim vodstvom. Zahvaljujem se vama za temeljit pregled magistrskega dela.

Za vso tehnično in strokovno pomoč pri laboratorijskem delu ter spodbude, se zahvaljujem osebju laboratorija Katedre za biokemijo in kemijo živil, Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete v Ljubljani in osebju Laboratorija za prehrabeno kemijo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Za kakovosten pregled, predloge in popravke se zahvaljujem tudi recenzentki doc. dr. Jasni Dolenc Koce. Vaši popravki so uspešno prispevali k dvigu kakovosti končnega dela.

Hvala doc. dr. Simoni Strgulc Krajšek za natančno podane informacije o nahajališčih dresnikov. Za nasvete pri statistični obdelavi podatkov se zahvaljujem prof. dr. Andreju Blejcu, doc. dr. Katarini Vogel Mikuš in doc. dr. Petri Golja.

Zahvala gre tudi vsem pedagoškim delavcem, ki so si vzeli čas za moja vprašanja in vsem, ki so kakorkoli prispevali k nastajanju magistrskega dela. Posebno bi se zahvalil svojim najbližjim, ki so mi ves čas študija stali ob strani in me spodbujali – brez vas mi ne bi uspelo.

PRILOGE

PRILOGA A1

Ortofoto slika Slovenije in prikazane lokacije vzorčenja



Slika A1a: Ortofoto slika Slovenije s prikazanimi vzorčnimi mesti. Ljubljana, Rožna dolina = oznaka rumene barve; Ljubljana, Vrhovci = oznaka modre barve in Ig pri Ljubljani = oznaka zelene barve (prirejeno po: Geopedia, 2014)



Slika A1b: Lokacije vzorčenja japonskega (a), češkega (b) in sahalinskega (c) dresnika (prirejeno po: Geopedia, 2014)

PRILOGA A2

Opis lokacij vzorčenja dresnikov

Preglednica A1: Opis lokacij vzorčenja in druge informacije o vzorčenju

Takson dresnika	Japonski dresnik (<i>Fallopia japonica</i>)		Češki dresnik (<i>Fallopia × bohémica</i>)		Sahalinski dresnik (<i>Fallopia sachalinensis</i>)	
Lokacija vzorčenja	Slovenija, Ljubljana, Vrhovci; levi breg Malega Grabna, ob mostu čez Mali Graben.		Slovenija, Ljubljana, Rožna dolina, cesta XV; nasproti Oddelka za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire (Večna pot 83).		Slovenija, Ig pri Ljubljani; Zavod za prestanje kazni zapora Ig, Na Grad 25.	
Opis dostopa	Če se peljemo po cesti Pod jezom, ob vključitvi na Cesto Dolomitskega odreda, zavijemo desno in po približno 80 m, pred mostom čez Mali Graben, zavijemo levo.		Iz smeri živalskega vrta se peljemo po Večni poti in zavijemo desno na cesto XV (Rožna dolina). Po 70 m zavijemo levo.		Pripeljemo se na lokacijo ženskega zapora (ižanski grad). Nato do večjega travnika pešačimo skozi gozd – 500 m v smeri proti JV.	
Koordinate	46°2'33,73" N 14°27'1,07" E		46°3'1,31" N 14°28'44,34" E		45°57'24,51" N 14°31'25,94" E	
Številka vzorčenja	1	2	1	2	1	2
Datum vzorčenja	15.7.2013	27.8.2013	23.7.2013	2.9.2013	18.7.2013	6.9.2013
Vzorčena tkiva	Mladi listi Stari listi Stebila Korenike	Mladi listi Stari listi Stebila Korenike Socvetja	Mladi listi Stari listi Stebila Korenike	Mladi listi Stari listi Stebila Korenike Socvetja	Mladi listi Stari listi Stebila Korenike	Mladi listi Stari listi Stebila Korenike Socvetja
Opombe	Sezona pred cvetenjem, 11 h, 27 °C, jasno vreme	Cvetna sezona, 11 h, 26 °C, jasno vreme	Sezona pred cvetenjem, 11 h, 24 °C, jasno vreme	Cvetna sezona, 11 h, 24 °C, jasno vreme	Sezona pred cvetenjem, 11 h, 28 °C, jasno vreme	Cvetna sezona, 11 h, 26 °C, jasno vreme

PRILOGA B

Z metodo ABTS izmerjene absorbance za pripravo umeritvenih krivulj in umeritveni krivulji za pripravljene ekstrakte

Umeritvena krivulja za vodne in etanolne ekstrakte

Preglednica B1: Prikaz količine dodanega troloksa in njegova masna koncentracija v reakcijski mešanici ter vrednosti izmerjenih absorbcanc pri 734 nm

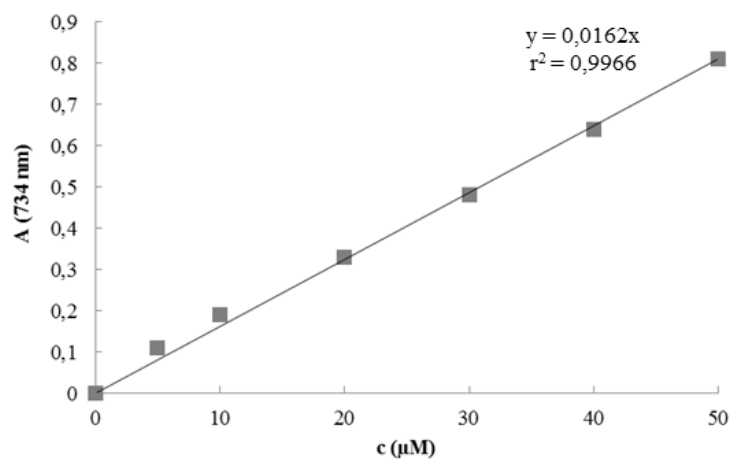
1 mM troloks [μL]	c [μM]	\bar{A} (734 nm)	A – $\bar{A}\text{S}$
5	5	1,03	0,11
10	10	0,95	0,19
20	20	0,81	0,33
30	30	0,66	0,48
40	40	0,50	0,64
50	50	0,33	0,81

$\bar{A}\text{S} = 1,14; N = 3$

\bar{A} – povprečje dveh izmerjenih absorbcanc ($N = 2$);

$\bar{A}\text{S}$ – povprečna absorbanca treh meritev slepih vzorcev (90 μL raztopine z radikali ABTS^{++} in 910 μL pufra HEPES);

c – molarna koncentracija.



Slika B1: Umeritvena krivulja za vodne in etanolne ekstrakte pri metodi ABTS. Oznaki: A = absorbanca in c = molarna koncentracija troloksa

Umeritvena krivulja za butanolne ekstrakte

Preglednica B2: Prikaz količine dodanega troloksa in njegova masna koncentracija v reakcijski mešanici ter vrednosti izmerjenih absorbcanc pri 734 nm

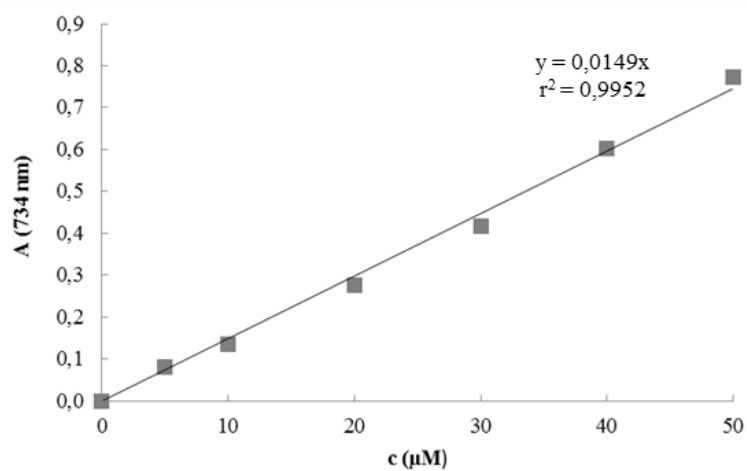
1 mM troloks [μL]	c [μM]	\bar{A} (734 nm)	$\bar{A} - \bar{A}\text{S}$
5	5	0,00	0,08
10	10	0,95	0,14
20	20	0,89	0,28
30	30	0,75	0,42
40	40	0,61	0,60
50	50	0,43	0,77

$\bar{A}\text{S} = 1,027$; N = 3

\bar{A} – povprečje dveh izmerjenih absorbcanc (N = 2);

$\bar{A}\text{S}$ – povprečna absorbanca treh meritev slepih vzorcev (90 μL raztopine z radikali ABTS^{•+} in 910 μL pufra HEPES);

c – molarna koncentracija.



Slika B2: Umeritvena krivulja za butanolne ekstrakte pri metodi ABTS. Oznaki: A = absorbanca in c = molarna koncentracija troloksa

PRILOGA C

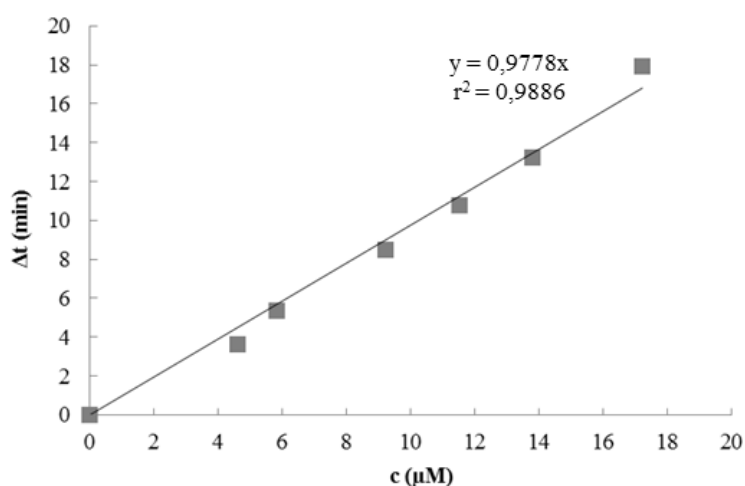
Z luminescenčno metodo izmerjeni časovni zamiki za pripravo umeritvenih krivulj in umeritveni krivulji za pripravljene ekstrakte

Umeritvena krivulja za vodne in etanolne ekstrakte

Preglednica C1: Prikaz količine dodanega troloksa in njegova masna koncentracija v reakcijski mešanici ter vrednosti izmerjenih časovnih zamikov (Δt)

5 mM troloks (μL)	c [μM]	Δt (min)
0	0	0
2	4,6	3,65
2,5	5,8	5,38
4	9,2	8,51
5	11,5	10,80
6	13,8	13,22

Δt – razlika med časom t_1 in t_2 . Vrednost t_1 predstavlja čas, ko smo ustavili spremljanje signala, vrednost t_2 pa čas, ko se je signal po dodatku raztopine troloksa ponovno vrnil v ravnovesno stanje. K temu času je prištet še čas, ki je potekel med dodajanjem troloksa v kiveto ter ponovnim začetkom spremljanja signala in je znašal 0,33 min. Prikazano je povprečje dveh izmerjenih časovnih zamikov v luminescenci ($N = 2$);
c – molarna koncentracija.



Slika C1: Umeritvena krivulja za vodne in etanolne ekstrakte pri luminescenčni metodi. Oznaki: Δt = razlika dveh meritev časa in c = molarna koncentracija troloksa

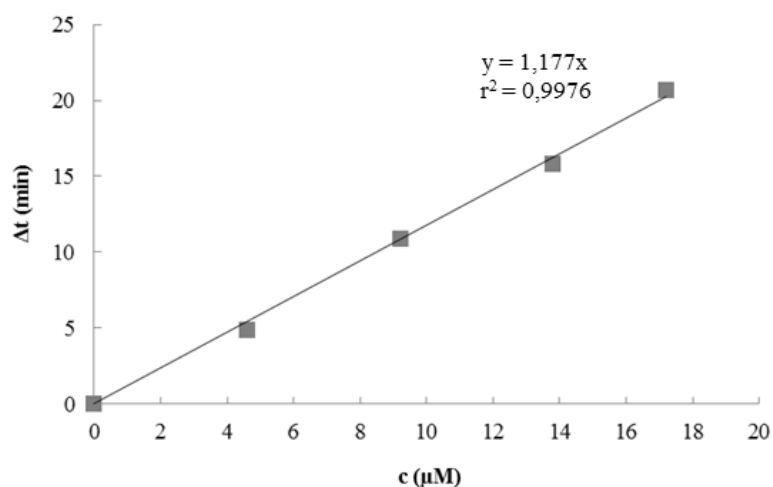
Umeritvena krivulja za butanolne ekstrakte

Preglednica C2: Prikaz količine dodanega troloksa in njegova masna koncentracija v reakcijski mešanici ter vrednosti izmerjenih časovnih zamikov (Δt)

5 mM troloks (μL)	c [μM]	Δt (min)
0	0	0
2	4,6	4,89
4	9,2	10,87
6	13,8	15,83
7,5	17,2	20,70

Δt – razlika med časom t_1 in t_2 . Vrednost t_1 predstavlja čas, ko smo ustavili spremljanje signala, vrednost t_2 pa čas, ko se je signal po dodatku raztopine troloksa ponovno vrnil v ravnovesno stanje. K temu času je prištet še čas, ki je potekel med dodajanjem troloksa v kiveto ter ponovnim začetkom spremljanja signala in je znašal 0,33 min. Prikazano je povprečje dveh izmerjenih časovnih zamikov v luminescenci ($N = 2$);

c – molarna koncentracija.



Slika C2: Umeritvena krivulja za butanolne ekstrakte pri luminescenčni metodi. Oznaki: Δt = razlika dveh meritev časa in c = molarna koncentracija troloksa

PRILOGA D

Prikaz postopnega izračuna AOU

Opisan je postopek za izračun AOU pri metodi ABTS. Na enak način smo izračun opravili pri luminescenčni metodi, le-da smo pri drugem koraku simbol y nadomestili s simbolom Δt .

1. korak: Potrebovali smo informacije o skupnem volumnu reakcijske mešanice v kivetu (1 mL), informacije o volumnu dodanega ekstrakta v kiveto, redčitvi ekstrakta, volumnu ekstrakta, ki smo ga pridobili med ekstrakcijo (8 mL), razmerju med svežo in suho maso vzorčenega tkiva in informacijo o izračunanih absorbancah (A) za posamezen ekstrakt (izmerjena A – povprečje A treh slepih vzorcev).
2. korak: Potrebovali smo tudi enačbo regresijske premice iz pripravljene umeritvene krivulje. Enačba $y = k \times x$. Simbol k predstavlja smerni koeficient. Simbol x smo v enačbi zamenjali s simbolom c in simbol y s simbolom A . Tako smo dobili enačbo $A = k \times c_1$. Iz enačbe smo izrazili c_1 in dobili $c_1 = A/k$. Simbol c_1 je predstavljal molarno koncentracijo ekstrakta v kivetu glede na umeritveno krivuljo, simbol A pa izračunano absorbanco posamezne meritve.
3. korak: Pri izračunu smo morali upoštevati volumen ekstrakta, ki smo ga dodali v kiveto in redčitev ekstrakta. Iz formule $c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$ smo najprej izrazili c_2 . Simbol V_2 je predstavljal volumen ekstrakta, ki smo ga dodali v kiveto, c_1 molarno koncentracijo ekstrakta glede na umeritveno krivuljo in simbol V_1 skupni volumen reakcijske mešanice v kivetu. Vrednost pod simbolom c_2 smo nato pomnožili s faktorjem redčitve ekstrakta in dobili c_3 .
4. korak: Iz enačbe za molarno koncentracijo $c_3 = n/V$ smo izrazili simbol n (množina snovi). Simbol V je predstavljal volumen ekstrakta, ki smo ga dobili pri ekstrakciji 1 g liofiliziranega in uprašnega rastlinskega materiala. Na ta način smo tudi izračunali AOU ekstrakta, podano kot TEAC/g s.s (troloksu ekvivalentna antioksidativna učinkovitost na gram suhe mase rastlinskega materiala).
5. korak: S pomočjo razmerja med svežo in suho maso bi lahko izračunali tudi AOU ekstrakta kot troloksu ekvivalentno antioksidativno učinkovitost na gram sveže mase rastlinskega materiala (TEAC/g m.s.).

PRILOGA E1

Podatki, ki smo jih uporabili pri analizi korelacijske povezanosti med obema metodama za merjenje AOU in ostali podatki potrebni za izračun AOU

Podatki so prikazani po pravilih o natančnosti pri kemijskem računanju (Šegedin, 1994).

Preglednica E1: Podatki potrebni za izračun AOU in izmerjene vrednosti pri luminescenčni metodi

Št.	Oznaka ekstrakta	Redčitveni faktor	V ekstrakta (μL)	k umeritvene krivulje	Razmerje ($m_{m.s.}/m_{s.s.}$)	Meritev (min)		AOU 1	AOU 2	povp. AOU*
						Δt_1	Δt_2			
1	jap 1, mll, 1	100	10	0,9778	3,342	4,93	4,22	0,878	0,752	0,815
2	jap 1, stl, 1	100	50	0,9778	4,168	7,32	7,46	0,266	0,271	0,268
3	jap 1, kor, 1	100	30	0,9778	2,668	4,33	3,19	0,259	0,191	0,225
4	jap 1, ste, 1	10	5	0,9778	2,334	2,19	2,42	0,078	0,086	0,082
5	jap 1, mll, 2	10	50	1,1770	3,342	2,04	2,04	0,006	0,006	0,006
6	jap 1, stl, 2	10	50	1,1770	4,168	1,54	2,00	0,005	0,006	0,006
7	jap 1, kor, 2	10	20	1,1770	2,668	17,28	16,73	0,128	0,124	0,126
8	jap 1, ste, 2	10	50	1,1770	2,334	1,61	1,73	0,005	0,005	0,005
9	jap 1, mll, 3	100	5	0,9778	3,342	5,31	6,00	1,887	2,132	2,010
10	jap 1, stl, 3	100	5	0,9778	4,168	3,94	4,19	1,400	1,489	1,445
11	jap 1, kor, 3	100	10	0,9778	2,668	2,34	2,66	0,417	0,474	0,446
12	jap 1, ste, 3	10	10	0,9778	2,334	5,75	6,07	0,102	0,108	0,105

»se nadaljuje«

»nadaljevanje preglednice E1. Podatki potrebni za izračun AOU in izmerjene vrednosti pri luminescenčni metodi«

Št.	Oznaka ekstrakta	Redčitveni faktor	V ekstrakta (μL)	k umeritvene krivulje	Razmerje (m _{m.s.} /m _{s.s.})	Meritev (min)		AOU 1	AOU 2	povp. AOU*
						Δt ₁	Δt ₂			
13	jap 2, mll, 1	100	10	0,9778	5,989	2,18	2,46	0,388	0,438	0,413
14	jap 2, stl, 1	100	50	0,9778	3,850	6,89	7,17	0,250	0,260	0,255
15	jap 2, kor, 1	100	30	0,9778	2,316	2,90	2,90	0,174	0,174	0,174
16	jap 2, ste, 1	10	5	0,9778	2,413	3,18	3,61	0,113	0,128	0,121
17	jap 2, cve, 1	100	30	0,9778	4,693	2,47	2,60	0,148	0,156	0,152
18	jap 2, mll, 2	10	30	1,1770	5,989	3,74	4,45	0,019	0,022	0,021
19	jap 2, stl, 2	10	20	1,1770	3,850	6,61	6,75	0,049	0,050	0,050
20	jap 2, kor, 2	10	5	1,1770	2,316	2,04	1,75	0,060	0,052	0,056
21	jap 2, ste, 2	10	30	1,1770	2,413	3,09	3,07	0,015	0,015	0,015
22	jap 2, cve, 2	10	2	1,1770	4,693	3,90	3,61	0,287	0,266	0,277
23	jap 2, mll, 3	100	5	0,9778	5,989	2,61	3,32	0,928	1,180	1,054
24	jap 2, stl, 3	100	5	0,9778	3,850	2,62	2,47	0,931	0,878	0,905
25	jap 2, kor, 3	10	10	0,9778	2,316	2,61	2,47	0,046	0,044	0,045
26	jap 2, ste, 3	10	5	0,9778	2,413	9,67	8,62	0,344	0,306	0,325
27	jap 2, cve, 3	100	5	0,9778	4,693	5,58	6,51	1,983	2,314	2,149
28	ces 1, mll, 1	10	2	0,9778	6,661	1,19	0,90	0,106	0,080	0,093
29	ces 1, stl, 1	10	10	0,9778	3,371	4,60	5,03	0,082	0,090	0,086
30	ces 1, kor, 1	100	10	0,9778	3,422	1,18	1,32	0,210	0,235	0,223
31	ces 1, ste, 1	10	10	0,9778	3,034	2,19	2,04	0,039	0,036	0,038
32	ces 1, mll, 2	10	10	1,1770	6,661	4,18	4,30	0,062	0,064	0,063

»se nadaljuje«

»nadaljevanje preglednice E1. Podatki potrebni za izračun AOU in izmerjene vrednosti pri luminescenčni metodi«

Št.	Oznaka ekstrakta	Redčitveni faktor	V ekstrakta (μL)	k umeritvene krivulje	Razmerje (m _{m.s.} /m _{s.s.})	Meritev (min)		AOU 1	AOU 2	povp. AOU*
						Δt ₁	Δt ₂			
33	ces 1, stl, 2	100	10	1,1770	3,371	1,49	1,18	0,220	0,175	0,198
34	ces 1, kor, 2	100	30	1,1770	3,422	1,26	1,18	0,063	0,059	0,061
35	ces 1, ste, 2	10	10	1,1770	3,034	1,24	1,23	0,018	0,018	0,018
36	ces 1, mll, 3	100	10	0,9778	6,661	1,89	1,61	0,337	0,287	0,312
37	ces 1, stl, 3	100	5	0,9778	3,371	1,87	2,19	0,665	0,778	0,722
38	ces 1, kor, 3	100	10	0,9778	3,422	2,47	2,90	0,440	0,517	0,479
39	ces 1, ste, 3	10	5	0,9778	3,034	2,33	2,89	0,083	0,103	0,093
40	ces 2, mll, 1	10	5	0,9778	7,184	2,47	2,03	0,088	0,072	0,080
41	ces 2, stl, 1	10	2	0,9778	3,254	3,47	4,31	0,308	0,382	0,345
42	ces 2, kor, 1	10	2	0,9778	3,924	2,07	2,47	0,184	0,219	0,202
43	ces 2, ste, 1	10	10	0,9778	2,674	3,47	3,33	0,062	0,059	0,061
44	ces 2, cve, 1	100	5	0,9778	6,088	1,62	1,76	0,576	0,626	0,601
45	ces 2, mll, 2	10	10	1,1770	7,184	1,04	0,83	0,015	0,012	0,014
46	ces 2, stl, 2	100	30	1,1770	3,254	0,90	1,19	0,045	0,059	0,052
47	ces 2, kor, 2	100	30	1,1770	3,924	1,19	0,91	0,059	0,045	0,052
48	ces 2, ste, 2	10	10	1,1770	2,674	1,04	0,90	0,015	0,013	0,014
49	ces 2, cve, 2	10	5	1,1770	6,088	1,47	1,32	0,043	0,039	0,041
50	ces 2, mll, 3	10	5	0,9778	7,184	3,15	3,33	0,112	0,118	0,115
51	ces 2, stl, 3	100	10	0,9778	3,254	4,48	4,18	0,798	0,745	0,772
52	ces 2, kor, 3	100	10	0,9778	3,924	2,61	2,19	0,465	0,390	0,428

»se nadaljuje«

»nadaljevanje preglednice E1. Podatki potrebni za izračun AOU in izmerjene vrednosti pri luminescenčni metodi«

Št.	Oznaka ekstrakta	Redčitveni faktor	V ekstrakta (µL)	k umeritvene krivulje	Razmerje (m _{m.s.} /m _{s.s.})	Meritev (min)		AOU 1	AOU 2	povp. AOU*
						Δt ₁	Δt ₂			
53	ces 2, ste, 3	10	5	0,9778	2,674	4,90	5,32	0,174	0,189	0,182
54	ces 2, cve, 3	100	5	0,9778	6,088	3,61	3,47	1,283	1,233	1,258
55	sah 1, mll, 1	100	10	0,9778	3,611	3,87	4,46	0,689	0,794	0,742
56	sah 1, stl, 1	100	50	0,9778	3,699	7,46	5,48	0,271	0,199	0,235
57	sah 1, kor, 1	100	10	0,9778	2,546	4,13	3,47	0,736	0,618	0,677
58	sah 1, ste, 1	10	5	0,9778	2,871	5,33	4,18	0,189	0,149	0,169
59	sah 1, mll, 2	10	10	1,1770	3,611	2,47	2,75	0,037	0,041	0,039
60	sah 1, stl, 2	100	10	1,1770	3,699	2,99	3,18	0,442	0,471	0,457
61	sah 1, kor, 2	100	30	1,1770	2,546	1,19	1,76	0,059	0,088	0,074
62	sah 1, ste, 2	10	10	1,1770	2,871	2,75	2,47	0,041	0,037	0,039
63	sah 1, mll, 3	100	5	0,9778	3,611	5,17	5,91	1,837	2,100	1,969
64	sah 1, stl, 3	100	5	0,9778	3,699	2,18	2,32	0,775	0,825	0,800
65	sah 1, kor, 3	100	10	0,9778	2,546	5,60	5,61	0,997	0,999	0,998
66	sah 1, ste, 3	10	2	0,9778	2,871	5,61	3,04	0,498	0,270	0,384
67	sah 2, mll, 1	100	10	0,9778	3,438	2,04	1,89	0,363	0,337	0,350
68	sah 2, stl, 1	100	30	0,9778	3,531	5,60	5,75	0,336	0,345	0,341
69	sah 2, kor, 1	100	10	0,9778	3,575	6,61	6,89	1,177	1,227	1,202
70	sah 2, ste, 1	10	5	0,9778	2,416	6,75	7,03	0,240	0,250	0,245
71	sah 2, cve, 1	100	5	0,9778	5,427	2,76	3,04	0,981	1,080	1,031
72	sah 2, mll, 2	10	10	1,1770	3,438	2,04	2,19	0,030	0,032	0,031

»se nadaljuje«

»nadaljevanje preglednice E1. Podatki potrebni za izračun AOU in izmerjene vrednosti pri luminescenčni metodi«

Št.	Oznaka ekstrakta	Redčitveni faktor	V ekstrakta (μL)	k umeritvene krivulje	Razmerje (m _{m.s.} /m _{s.s.})	Meritev (min)		AOU 1	AOU 2	povp. AOU*
						Δt ₁	Δt ₂			
73	sah 2, stl, 2	10	10	1,1770	3,531	2,46	2,47	0,036	0,037	0,037
74	sah 2, kor, 2	10	30	1,1770	3,575	6,32	6,19	0,031	0,031	0,031
75	sah 2, ste, 2	10	10	1,1770	2,416	1,61	1,19	0,024	0,018	0,021
76	sah 2, cve, 2	10	2	1,1770	5,427	3,73	4,19	0,275	0,309	0,292
77	sah 2, mll, 3	100	5	0,9778	3,438	3,48	3,19	1,237	1,134	1,186
78	sah 2, stl, 3	100	5	0,9778	3,531	4,33	3,90	1,539	1,386	1,463
79	sah 2, kor, 3	100	5	0,9778	3,575	4,61	4,74	1,638	1,685	1,662
80	sah 2, ste, 3	10	2	0,9778	2,416	6,32	5,47	0,561	0,485	0,523
81	sah 2, cve, 3	100	5	0,9778	5,427	5,46	5,75	1,941	2,044	1,993

Št.: zaporedna številka ekstrakta, jap: japonski dresnik, ces: češki dresnik, sah: sahalinski dresnik, mll: mladi listi, stl: stari listi, ste: stebila, kor: korenike, cve: socvetja, t: izmerjen čas, AOU: antioksidativna učinkovitost, TEAC/g s.s.: troloksu ekvivalentna antioksidativna učinkovitost na gram suhe snovi, m_{s.s.}: masa suhe snovi, m_{m.s.}: masa sveže snovi in *: N = 2. Oznaka pripravljenih rastlinskih ekstraktov: Takson-vzorčenje, tkivo, ekstrakcijsko topilo (1-voda, 2-butanol in 3-48 % etanol).

Preglednica E2: Podatki potrebni za izračun AOU in izmerjene vrednosti pri metodi ABTS

Št.	Oznaka ekstrakta	Redčitveni faktor	V ekstrakta (μL)	k umeritvene krivulje	Razmerje (m _{m,s.} /m _{s,s.})	Meritev		AOU 1	AOU 2	povp. AOU*
						A ₁	A ₂			
1	jap 1, mll, 1	10	10	0,0162	3,342	0,345	0,345	0,170	0,170	0,170
2	jap 1, stl, 1	10	10	0,0162	4,168	0,145	0,175	0,072	0,086	0,079
3	jap 1, kor, 1	10	10	0,0162	2,668	0,445	0,445	0,220	0,220	0,220
4	jap 1, ste, 1	10	30	0,0162	2,334	0,265	0,295	0,044	0,049	0,047
5	jap 1, mll, 2	10	30	0,0149	3,342	0,790	0,820	0,141	0,147	0,144
6	jap 1, stl, 2	10	30	0,0149	4,168	0,365	0,345	0,065	0,062	0,064
7	jap 1, kor, 2	10	5	0,0149	2,668	0,345	0,375	0,370	0,403	0,387
8	jap 1, ste, 2	10	20	0,0149	2,334	0,235	0,295	0,063	0,079	0,071
9	jap 1, mll, 3	100	50	0,0162	3,342	0,625	0,585	0,617	0,578	0,598
10	jap 1, stl, 3	100	50	0,0162	4,168	0,375	0,335	0,370	0,331	0,351
11	jap 1, kor, 3	100	50	0,0162	2,668	0,105	0,055	0,104	0,054	0,079
12	jap 1, ste, 3	10	15	0,0162	2,334	0,255	0,245	0,084	0,081	0,083
13	jap 2, mll, 1	100	50	0,0162	5,989	0,280	0,310	0,277	0,306	0,292
14	jap 2, stl, 1	100	50	0,0162	3,850	0,270	0,320	0,267	0,316	0,292
15	jap 2, kor, 1	100	50	0,0162	2,316	0,530	0,530	0,523	0,523	0,523
16	jap 2, ste, 1	10	30	0,0162	2,413	0,620	0,540	0,102	0,089	0,096
17	jap 2, cve, 1	100	30	0,0162	4,693	0,200	0,260	0,329	0,428	0,379
18	jap 2, mll, 2	10	30	0,0149	5,989	0,520	0,520	0,093	0,093	0,093
19	jap 2, stl, 2	1	10	0,0149	3,850	0,800	0,730	0,043	0,039	0,041
20	jap 2, kor, 2	10	10	0,0149	2,316	0,640	0,580	0,344	0,311	0,328

»se nadaljuje«

»nadaljevanje preglednice E2. Podatki potrebni za izračun AOU in izmerjene vrednosti pri metodi ABTS«

Št.	Oznaka ekstrakta	Redčitveni faktor	V ekstrakta (μL)	k umeritvene krivulje	Razmerje (m _{m.s.} /m _{s.s.})	Meritev		AOU 1	AOU 2	povp. AOU*
						A ₁	A ₂			
								(mmol TEAC/g s.s.)		
21	jap 2, ste, 2	1	10	0,0149	2,413	0,420	0,340	0,023	0,018	0,021
22	jap 2, cve, 2	10	10	0,0149	4,693	0,540	0,590	0,290	0,317	0,304
23	jap 2, mll, 3	100	50	0,0162	5,989	0,730	0,710	0,721	0,701	0,711
24	jap 2, stl, 3	100	50	0,0162	3,850	0,670	0,590	0,662	0,583	0,623
25	jap 2, kor, 3	100	10	0,0162	2,316	0,310	0,350	1,531	1,728	1,630
26	jap 2, ste, 3	10	5	0,0162	2,413	0,690	0,610	0,681	0,602	0,642
27	jap 2, cve, 3	100	10	0,0162	4,693	0,430	0,440	2,123	2,173	2,148
28	ces 1, mll, 1	10	20	0,0162	6,661	0,515	0,400	0,127	0,099	0,113
29	ces 1, stl, 1	10	10	0,0162	3,371	0,365	0,320	0,180	0,158	0,169
30	ces 1, kor, 1	100	50	0,0162	3,422	0,165	0,100	0,163	0,099	0,131
31	ces 1, ste, 1	10	30	0,0162	3,034	0,095	0,060	0,016	0,010	0,013
32	ces 1, mll, 2	10	10	0,0149	6,661	0,255	0,285	0,137	0,153	0,145
33	ces 1, stl, 2	100	30	0,0149	3,371	0,200	0,200	0,358	0,358	0,358
34	ces 1, kor, 2	100	50	0,0149	3,422	0,255	0,225	0,274	0,242	0,258
35	ces 1, ste, 2	10	50	0,0149	3,034	0,320	0,310	0,034	0,033	0,034
36	ces 1, mll, 3	100	20	0,0162	6,661	0,025	0,050	0,062	0,123	0,093
37	ces 1, stl, 3	100	50	0,0162	3,371	0,455	0,435	0,449	0,430	0,440
38	ces 1, kor, 3	100	20	0,0162	3,422	0,205	0,190	0,506	0,469	0,488
39	ces 1, ste, 3	10	5	0,0162	3,034	0,035	0,040	0,035	0,040	0,038
40	ces 2, mll, 1	10	10	0,0162	7,184	0,470	0,340	0,232	0,168	0,200

»se nadaljuje«

»nadaljevanje preglednice E2. Podatki potrebni za izračun AOU in izmerjene vrednosti pri metodi ABTS«

Št.	Oznaka ekstrakta	Redčitveni faktor	V ekstrakta (µL)	k umeritvene krivulje	Razmerje (m _{m.s.} /m _{s.s.})	Meritev		AOU 1	AOU 2	povp. AOU*
						A ₁	A ₂			
41	ces 2, stl, 1	10	2	0,0162	3,254	0,380	0,160	0,938	0,395	0,667
42	ces 2, kor, 1	10	5	0,0162	3,924	0,190	0,240	0,188	0,237	0,213
43	ces 2, ste, 1	10	30	0,0162	2,674	0,470	0,540	0,077	0,089	0,083
44	ces 2, cve, 1	100	30	0,0162	6,088	0,250	0,330	0,412	0,543	0,478
45	ces 2, mll, 2	10	10	0,0149	7,184	0,390	0,350	0,209	0,188	0,199
46	ces 2, stl, 2	100	30	0,0149	3,254	0,520	0,480	0,931	0,859	0,895
47	ces 2, kor, 2	100	50	0,0149	3,924	0,180	0,210	0,193	0,226	0,210
48	ces 2, ste, 2	10	50	0,0149	2,674	0,350	0,330	0,038	0,035	0,037
49	ces 2, cve, 2	10	10	0,0149	6,088	0,270	0,290	0,145	0,156	0,151
50	ces 2, mll, 3	10	5	0,0162	7,184	0,390	0,320	0,385	0,316	0,351
51	ces 2, stl, 3	100	100	0,0162	3,254	0,570	0,550	0,281	0,272	0,277
52	ces 2, kor, 3	100	20	0,0162	3,924	0,410	0,360	1,012	0,889	0,951
53	ces 2, ste, 3	10	5	0,0162	2,674	0,370	0,420	0,365	0,415	0,390
54	ces 2, cve, 3	100	10	0,0162	6,088	0,300	0,260	1,481	1,284	1,383
55	sah 1, mll, 1	100	50	0,0162	3,611	0,555	0,405	0,548	0,400	0,474
56	sah 1, stl, 1	100	50	0,0162	3,699	0,225	0,365	0,222	0,360	0,291
57	sah 1, kor, 1	100	50	0,0162	2,546	0,770	0,750	0,760	0,741	0,751
58	sah 1, ste, 1	10	30	0,0162	2,871	0,405	0,435	0,067	0,072	0,070
59	sah 1, mll, 2	10	30	0,0149	3,611	0,735	0,760	0,132	0,136	0,134
60	sah 1, stl, 2	100	30	0,0149	3,699	0,595	0,930	1,065	1,664	1,365

»se nadaljuje«

»nadaljevanje preglednice E2. Podatki potrebni za izračun AOU in izmerjene vrednosti pri metodi ABTS«

Št.	Oznaka ekstrakta	Redčitveni faktor	V ekstrakta (μL)	k umeritvene krivulje	Razmerje (m _{m.s.} /m _{s.s.})	Meritev		AOU 1	AOU 2	povp. AOU*
						A ₁	A ₂			
61	sah 1, kor, 2	100	50	0,0149	2,546	0,615	0,575	0,660	0,617	0,639
62	sah 1, ste, 2	10	50	0,0149	2,871	0,555	0,680	0,060	0,073	0,067
63	sah 1, mll, 3	100	10	0,0162	3,611	0,440	0,420	2,173	2,074	2,124
64	sah 1, stl, 3	100	50	0,0162	3,699	0,715	0,785	0,706	0,775	0,741
65	sah 1, kor, 3	100	50	0,0162	2,546	0,685	0,825	0,677	0,815	0,746
66	sah 1, ste, 3	10	5	0,0162	2,871	0,730	0,690	0,721	0,681	0,701
67	sah 2, mll, 1	100	50	0,0162	3,438	0,270	0,240	0,267	0,237	0,252
68	sah 2, stl, 1	100	50	0,0162	3,531	0,370	0,330	0,365	0,326	0,346
69	sah 2, kor, 1	100	50	0,0162	3,575	0,400	0,390	0,395	0,385	0,390
70	sah 2, ste, 1	10	30	0,0162	2,416	0,590	0,620	0,097	0,102	0,100
71	sah 2, cve, 1	100	30	0,0162	5,427	0,220	0,200	0,362	0,329	0,346
72	sah 2, mll, 2	10	30	0,0149	3,438	0,370	0,365	0,066	0,065	0,066
73	sah 2, stl, 2	10	30	0,0149	3,531	0,330	0,275	0,059	0,049	0,054
74	sah 2, kor, 2	10	50	0,0149	3,575	0,390	0,405	0,042	0,043	0,043
75	sah 2, ste, 2	10	50	0,0149	2,416	0,250	0,265	0,027	0,028	0,028
76	sah 2, cve, 2	10	5	0,0149	5,427	0,310	0,335	0,333	0,360	0,347
77	sah 2, mll, 3	100	10	0,0162	3,438	0,170	0,130	0,840	0,642	0,741
78	sah 2, stl, 3	100	30	0,0162	3,531	0,600	0,620	0,988	1,021	1,004
79	sah 2, kor, 3	100	30	0,0162	3,575	0,540	0,570	0,889	0,938	0,914

»se nadaljuje«

»nadaljevanje preglednice E2. Podatki potrebni za izračun AOU in izmerjene vrednosti pri metodi ABTS«

Št.	Oznaka ekstrakta	Redčitveni faktor	V ekstrakta (μL)	k umeritvene krivulje	Razmerje (m _{m.s.} /m _{s.s.})	Meritev		AOU 1	AOU 2	povp. AOU*
						A ₁	A ₂			
80	sah 2, ste, 3	10	5	0,0162	2,416	0,610	0,520	0,602	0,514	0,558
81	sah 2, cve, 3	100	10	0,0162	5,427	0,360	0,340	1,778	1,679	1,729

Št.: zaporedna številka ekstrakta, jap: japonski dresnik, ces: češki dresnik, sah: sahalinski dresnik, mll: mladi listi, stl: stari listi, ste: stebila, kor: korenike, cve: socvetja, A: absorbanca, AOU: antioksidativna učinkovitost, TEAC/g s.s.: troloksu ekvivalentna antioksidativna učinkovitost na gram suhe snovi, m_{s.s.}: masa suhe snovi, m_{m.s.}: masa sveže snovi in *: N = 2. Oznaka pripravljenih rastlinskih ekstraktov: Takson-vzorčenje, tkivo, ekstrakcijsko topilo (1-voda, 2-butanol in 3-48 % etanol).

PRILOGA E2

Združeni podatki obeh metod za merjenje AOU, ki smo jih uporabili pri statističnih analizah

Podatki so prikazani po pravilih o natančnosti pri kemijskem računanju (Šegedin, 1994).

Preglednica E3: Združeni podatki meritev obeh metod za merjenje AOU

Št.	Oznaka ekstrakta	AOU (mmol TEAC/g m.s.)				Povprečje**
		Lum. metoda*		Metoda ABTS*		AOU ± SN (mmol TEAC/g m.s.)
		1	2	1	2	
1	jap 1, mll, 1	0,878	0,752	0,170	0,170	0,5 ± 0,2
2	jap 1, stl, 1	0,266	0,271	0,072	0,086	0,17 ± 0,05
3	jap 1, kor, 1	0,259	0,191	0,220	0,220	0,22 ± 0,01
4	jap 1, ste, 1	0,078	0,086	0,044	0,049	0,064 ± 0,009
5	jap 1, mll, 2	0,006	0,006	0,141	0,147	0,08 ± 0,03
6	jap 1, stl, 2	0,005	0,006	0,065	0,062	0,03 ± 0,02
7	jap 1, kor, 2	0,128	0,124	0,370	0,403	0,26 ± 0,07
8	jap 1, ste, 2	0,005	0,005	0,063	0,079	0,04 ± 0,02
9	jap 1, mll, 3	1,887	2,132	0,617	0,578	1,3 ± 0,4
10	jap 1, stl, 3	1,400	1,489	0,370	0,331	0,9 ± 0,3
11	jap 1, kor, 3	0,417	0,474	0,104	0,054	0,26 ± 0,09
12	jap 1, ste, 3	0,102	0,108	0,084	0,081	0,094 ± 0,006
13	jap 2, mll, 1	0,388	0,438	0,277	0,306	0,35 ± 0,03
14	jap 2, stl, 1	0,250	0,260	0,267	0,316	0,27 ± 0,01
15	jap 2, kor, 1	0,174	0,174	0,523	0,523	0,35 ± 0,09
16	jap 2, ste, 1	0,113	0,128	0,102	0,089	0,108 ± 0,007
17	jap 2, cve, 1	0,148	0,156	0,329	0,428	0,27 ± 0,06
18	jap 2, mll, 2	0,019	0,022	0,093	0,093	0,06 ± 0,02
19	jap 2, stl, 2	0,049	0,050	0,043	0,039	0,045 ± 0,002
20	jap 2, kor, 2	0,060	0,052	0,344	0,311	0,19 ± 0,07
21	jap 2, ste, 2	0,015	0,015	0,023	0,018	0,018 ± 0,002
22	jap 2, cve, 2	0,287	0,266	0,290	0,317	0,290 ± 0,009
23	jap 2, mll, 3	0,928	1,180	0,721	0,701	0,88 ± 0,10
24	jap 2, stl, 3	0,931	0,878	0,662	0,583	0,76 ± 0,07
25	jap 2, kor, 3	0,046	0,044	1,531	1,728	0,8 ± 0,4
26	jap 2, ste, 3	0,344	0,306	0,681	0,602	0,48 ± 0,08
27	jap 2, cve, 3	1,983	2,314	2,123	2,173	2,15 ± 0,06
28	ces 1, mll, 1	0,106	0,080	0,127	0,099	0,103 ± 0,009

»se nadaljuje«

»nadaljevanje preglednice E3. Združeni podatki meritev obeh metod za merjenje AOU«

Št.	Oznaka ekstrakta	AOU (mmol TEAC/g m.s.)				Povprečje**
		Lum. metoda*		Metoda ABTS*		AOU ± SN (mmol TEAC/g m.s.)
		1	2	1	2	
29	ces 1, stl, 1	0,082	0,090	0,180	0,158	0,13 ± 0,02
30	ces 1, kor, 1	0,210	0,235	0,163	0,099	0,18 ± 0,03
31	ces 1, ste, 1	0,039	0,036	0,016	0,010	0,025 ± 0,006
32	ces 1, mll, 2	0,062	0,064	0,137	0,153	0,10 ± 0,02
33	ces 1, stl, 2	0,220	0,175	0,358	0,358	0,28 ± 0,04
34	ces 1, kor, 2	0,063	0,059	0,274	0,242	0,16 ± 0,05
35	ces 1, ste, 2	0,018	0,018	0,034	0,033	0,026 ± 0,004
36	ces 1, mll, 3	0,337	0,287	0,062	0,123	0,20 ± 0,06
37	ces 1, stl, 3	0,665	0,778	0,449	0,430	0,58 ± 0,07
38	ces 1, kor, 3	0,440	0,517	0,506	0,469	0,48 ± 0,02
39	ces 1, ste, 3	0,083	0,103	0,035	0,040	0,07 ± 0,01
40	ces 2, mll, 1	0,088	0,072	0,232	0,168	0,14 ± 0,03
41	ces 2, stl, 1	0,308	0,382	0,938	0,395	0,51 ± 0,13
42	ces 2, kor, 1	0,184	0,219	0,188	0,237	0,21 ± 0,01
43	ces 2, ste, 1	0,062	0,059	0,077	0,089	0,072 ± 0,006
44	ces 2, cve, 1	0,576	0,626	0,412	0,543	0,54 ± 0,04
45	ces 2, mll, 2	0,015	0,012	0,209	0,188	0,11 ± 0,05
46	ces 2, stl, 2	0,045	0,059	0,931	0,859	0,5 ± 0,2
47	ces 2, kor, 2	0,059	0,045	0,193	0,226	0,13 ± 0,04
48	ces 2, ste, 2	0,015	0,013	0,038	0,035	0,025 ± 0,006
49	ces 2, cve, 2	0,043	0,039	0,145	0,156	0,10 ± 0,03
50	ces 2, mll, 3	0,112	0,118	0,385	0,316	0,23 ± 0,06
51	ces 2, stl, 3	0,798	0,745	0,281	0,272	0,5 ± 0,1
52	ces 2, kor, 3	0,465	0,39	1,012	0,889	0,69 ± 0,13
53	ces 2, ste, 3	0,174	0,189	0,365	0,415	0,29 ± 0,05
54	ces 2, cve, 3	1,283	1,233	1,481	1,284	1,32 ± 0,05
55	sah 1, mll, 1	0,689	0,794	0,548	0,400	0,61 ± 0,07
56	sah 1, stl, 1	0,271	0,199	0,222	0,360	0,26 ± 0,03
57	sah 1, kor, 1	0,736	0,618	0,760	0,741	0,71 ± 0,03
58	sah 1, ste, 1	0,189	0,149	0,067	0,072	0,12 ± 0,03
59	sah 1, mll, 2	0,037	0,041	0,132	0,136	0,09 ± 0,02
60	sah 1, stl, 2	0,442	0,471	1,065	1,664	0,91 ± 0,25
61	sah 1, kor, 2	0,059	0,088	0,660	0,617	0,4 ± 0,1
62	sah 1, ste, 2	0,041	0,037	0,060	0,073	0,053 ± 0,007

»se nadaljuje«

»nadaljevanje preglednice E3. Združeni podatki meritev obeh metod za merjenje AOU«

Št.	Oznaka ekstrakta	AOU (mmol TEAC/g m.s.)				Povprečje**
		Lum. metoda*		Metoda ABTS*		AOU ± SN (mmol TEAC/g m.s.)
		1	2	1	2	
63	sah 1, mll, 3	1,837	2,100	2,173	2,074	2,05 ± 0,06
64	sah 1, stl, 3	0,775	0,825	0,706	0,775	0,77 ± 0,02
65	sah 1, kor, 3	0,997	0,999	0,677	0,815	0,87 ± 0,07
66	sah 1, ste, 3	0,498	0,270	0,721	0,681	0,54 ± 0,09
67	sah 2, mll, 1	0,363	0,337	0,267	0,237	0,30 ± 0,03
68	sah 2, stl, 1	0,336	0,345	0,365	0,326	0,343 ± 0,007
69	sah 2, kor, 1	1,177	1,227	0,395	0,385	0,8 ± 0,2
70	sah 2, ste, 1	0,240	0,250	0,097	0,102	0,17 ± 0,04
71	sah 2, cve, 1	0,981	1,080	0,362	0,329	0,7 ± 0,2
72	sah 2, mll, 2	0,030	0,032	0,066	0,065	0,049 ± 0,009
73	sah 2, stl, 2	0,036	0,037	0,059	0,049	0,045 ± 0,005
74	sah 2, kor, 2	0,031	0,031	0,042	0,043	0,037 ± 0,003
75	sah 2, ste, 2	0,024	0,018	0,027	0,028	0,024 ± 0,002
76	sah 2, cve, 2	0,275	0,309	0,333	0,360	0,32 ± 0,02
77	sah 2, mll, 3	1,237	1,134	0,840	0,642	1,0 ± 0,1
78	sah 2, stl, 3	1,539	1,386	0,988	1,021	1,2 ± 0,1
79	sah 2, kor, 3	1,638	1,685	0,889	0,938	1,3 ± 0,2
80	sah 2, ste, 3	0,561	0,485	0,602	0,514	0,54 ± 0,02
81	sah 2, cve, 3	1,941	2,044	1,778	1,679	1,86 ± 0,07

Št.: zaporedna številka ekstrakta, mll: mladi listi, stl: stari listi, ste: stebila, kor: korenike, cve: socvetja, jap: japonski dresnik, ces: češki dresnik, sah: sahalinski dresnik, AOU: antioksidativna učinkovitost, TEAC/g s.s.: troloksu ekvivalentna antioksidativna učinkovitost na gram suhe snovi in SN: standardna napaka. * = tehniška ponovitev: Meritve ponovljene na enakem biološkem vzorcu. Meritve so podane kot AOU (mmol TEAC/g s.s.). ** = skupno povprečje štirih meritev AOU opravljenih na enakem ekstraktu. Od tega sta prvi dve vrednosti izmerjeni z luminescenčno metodo, drugi dve pa z metodo ABTS. Oznaka pripravljenih rastlinskih ekstraktov: Takson-vzorčenje, tkivo, ekstrakcijsko topilo (1-voda, 2-butanol in 3-48 % etanol).

PRILOGA F

Podatki o deležu vode v različnih tkivih dresnikov

Preglednica F1: Vsebnost vode v tkivih pri japonskem dresniku. Oznake: mll = mladi listi, stl = stari listi, ste = stebila, kor = korenike, cve = socvetja, vzo. = vzorčenje, povp. = povprečje, SD = standardni odklon in SN = standardna napaka

Takson	Japonski dresnik				
	mll	stl	ste	kor	cve
Rastlinsko tkivo					
vzo. 1 – delež vode	0,85	0,70	0,67	0,71	/
vzo. 2 – delež vode	0,86	0,69	0,63	0,75	0,84
povp. delež vode	0,86	0,70	0,65	0,73	0,84
povp. vsebnost vode (%)	85,50	69,80	64,80	72,60	83,60
SD (±)	0,01	0,01	0,03	0,03	/
SN (±)	0,01	0,01	0,02	0,02	/

Preglednica F2: Vsebnost vode v tkivih pri češkem dresniku. Oznake: mll = mladi listi, stl = stari listi, ste = stebila, kor = korenike, cve = socvetja, vzo. = vzorčenje, povp. = povprečje, SD = standardni odklon in SN = standardna napaka

Takson	Češki dresnik				
	mll	stl	ste	kor	cve
Rastlinsko tkivo					
vzo. 1 – delež vode	0,70	0,76	0,57	0,63	/
vzo. 2 – delež vode	0,83	0,74	0,59	0,57	0,79
povp. delež vode	0,77	0,75	0,58	0,60	0,79
povp. vsebnost vode (%)	76,70	75,00	57,90	59,70	78,70
SD (±)	0,09	0,01	0,01	0,04	/
SN (±)	0,07	0,01	0,01	0,03	/

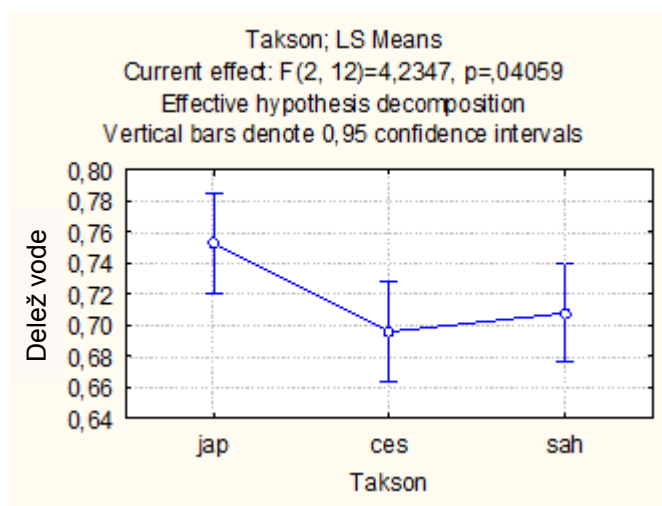
Preglednica F3: Vsebnost vode v tkivih pri sahalinskem dresniku. Oznake: mll = mladi listi, stl = stari listi, ste = stebila, kor = korenike, cve = socvetja, vzo. = vzorčenje, povp. = povprečje, SD = standardni odklon in SN = standardna napaka

Takson	Sahalinski dresnik				
	mll	stl	ste	kor	cve
Rastlinsko tkivo					
vzo. 1 – delež vode	0,723	0,733	0,65	0,61	/
vzo. 2 – delež vode	0,709	0,717	0,59	0,72	0,82
povp. delež vode	0,716	0,725	0,62	0,66	0,82
povp. vsebnost vode (%)	71,60	72,50	61,90	66,40	81,60
SD (±)	0,01	0,01	0,05	0,08	/
SN (±)	0,007	0,008	0,03	0,06	/

Rezultate izmerjenih vrednosti smo na sliki 18 (poglavje 4.1 Rezultati določanja deleža vode v tkivih dresnikov) prikazali kot razlike med različnimi tkivi dresnikov. Izračunali smo skupne povprečne vrednosti za vse tri taksone dresnikov in obe vzorčenji.

Preglednica F4: Podatki o vsebnosti vode v tkivih dresnikov, ki jih prikazuje slika 18 v poglavju 4.1 Rezultati določanja deleža vode v tkivih dresnikov. Oznake: mll = mladi listi, stl = stari listi, ste = stebila, kor = korenike, cve = socvetja, vzo. = vzorčenje, povp. = povprečje in SN = standardna napaka

Rastlinsko tkivo	Dresniki	
	povp. delež vode	SN (\pm)
mll (N = 6)	0,78	0,03
stl (N = 6)	0,724	0,009
ste (N = 6)	0,62	0,02
kor (N = 6)	0,66	0,03
cve (N = 3)	0,81	0,01



Slika F1: Vpliv taksona dresnika na delež vode v tkivu (N = 9, $p < 0,05$). Oznake: jap = japonski dresnik, ces = češki dresnik in sah = sahalinski dresnik

PRILOGA G

Primerjava AOU ekstraktov prvega in drugega vzorčenja

Preglednica G1: Rezultati t-testa parnih primerjav med vrednostmi prvega in drugega vzorčenja za ekstrakte pripravljene v vodnem ekstrakcijskem topilu. Statistično značilne razlike ($p < 0,05$) so poudarjene in označene z *

Rastlinsko tkivo	Takson		
	Japonski dr.	Češki dr.	Sahalinski dr.
Mladi listi	p = 0,491	p = 0,371	p = 0,015*
Stari listi	p = 0,129	p = 0,043*	p = 0,073
Stebila	p = 0,017*	p = 0,004*	p = 0,343
Korenike	p = 0,262	p = 0,391	p = 0,740

Preglednica G2: Rezultati t-testa parnih primerjav med vrednostmi prvega in drugega vzorčenja za ekstrakte pripravljene v butanolnem ekstrakcijskem topilu. Statistično značilne razlike ($p < 0,05$) poudarjene in označene z *

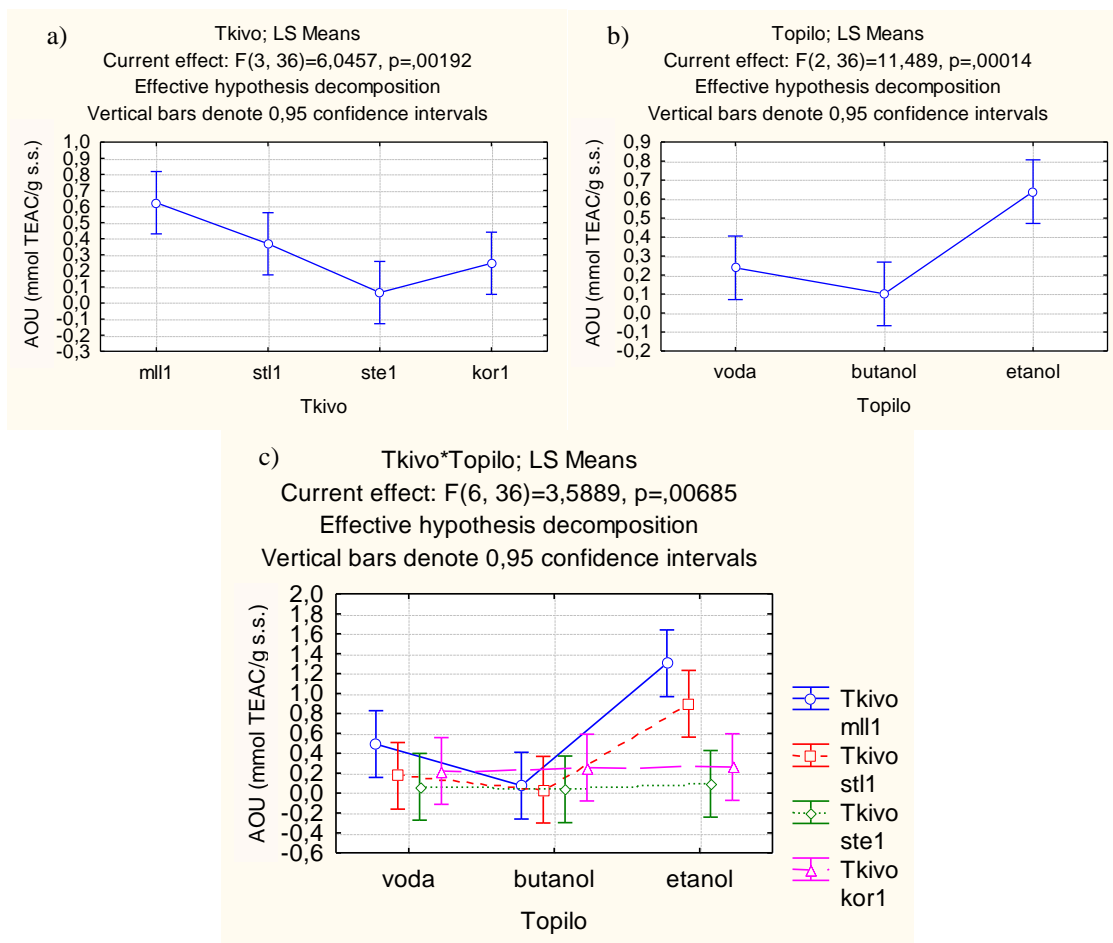
Rastlinsko tkivo	Takson		
	Japonski dr.	Češki dr.	Sahalinski dr.
Mladi listi	p = 0,697	p = 0,969	p = 0,245
Stari listi	p = 0,545	p = 0,461	p = 0,024*
Stebila	p = 0,338	p = 0,940	p = 0,018*
Korenike	p = 0,574	p = 0,712	p = 0,099

Preglednica G3: Rezultati t-testa parnih primerjav med vrednostmi prvega in drugega vzorčenja za ekstrakte pripravljene v etanolnem ekstrakcijskem topilu. Statistično značilne razlike ($p < 0,05$) so poudarjene in označene z *

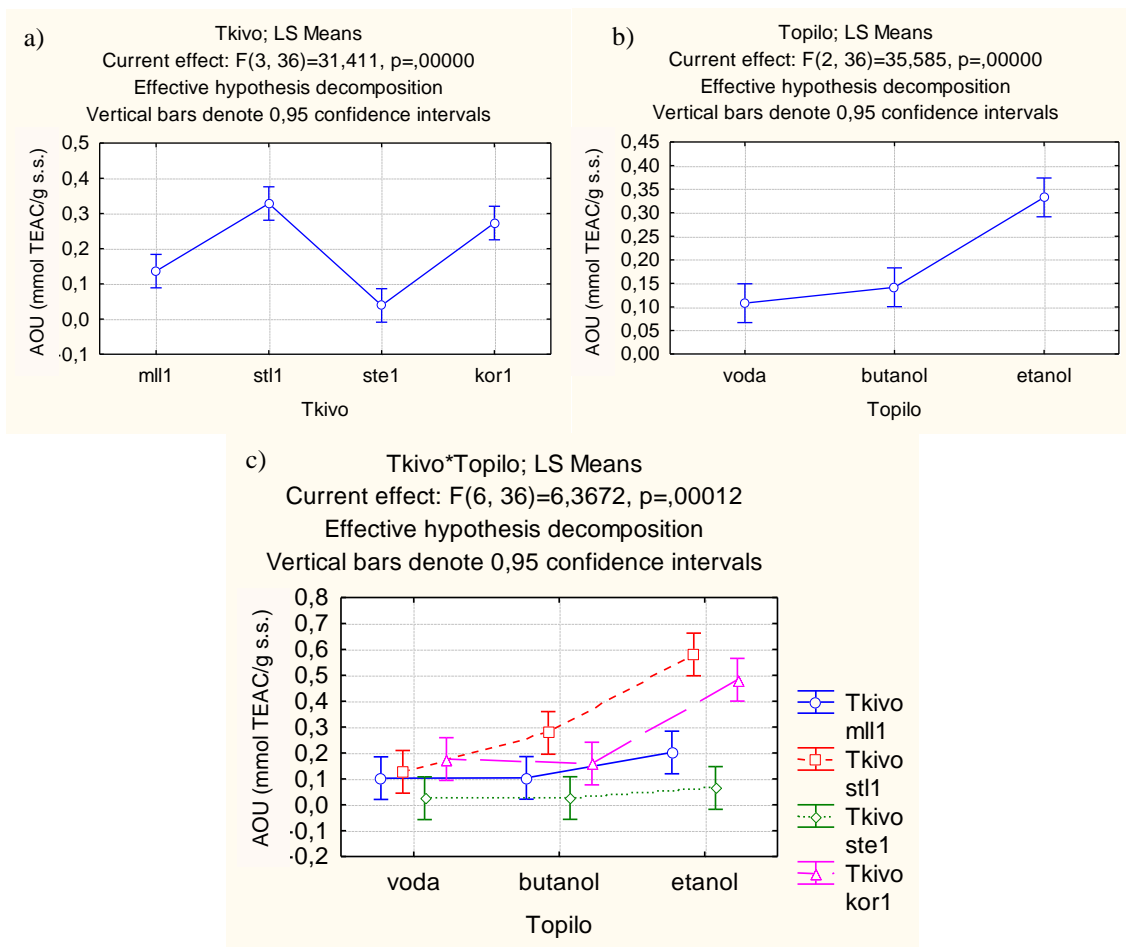
Rastlinsko tkivo	Takson		
	Japonski dr.	Češki dr.	Sahalinski dr.
Mladi listi	p = 0,361	p = 0,758	p = 0,000*
Stari listi	p = 0,696	p = 0,745	p = 0,015*
Stebila	p = 0,006*	p = 0,013*	p = 0,986
Korenike	p = 0,268	p = 0,232	p = 0,121

PRILOGA H

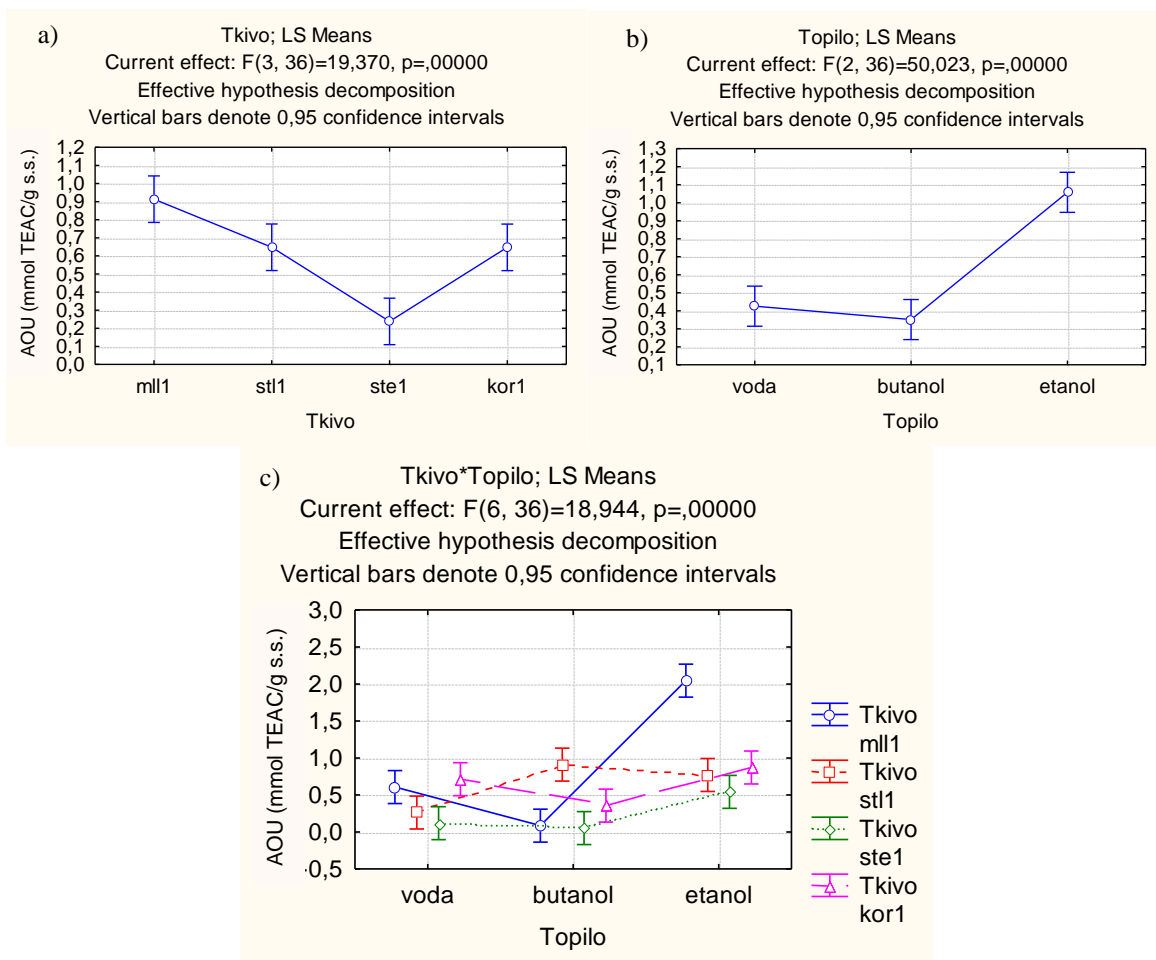
Vpliv rastlinskega tkiva in uporabljenega ekstrakcijskega topila na izmerjeno AOU ekstraktov prvega vzorčenja



Slika H1: Vpliv rastlinskega tkiva (a), ekstrakcijskega topila (b) ter interakcije med tkivom in topilom (c) na izmerjeno AOU ekstraktov japonskega dresnika prvega vzorčenja ($N = 4$, $p < 0,05$). Oznake: ml1 = mladi listi, st1 = stari listi, ste1 = stebela in kor1 = korenike



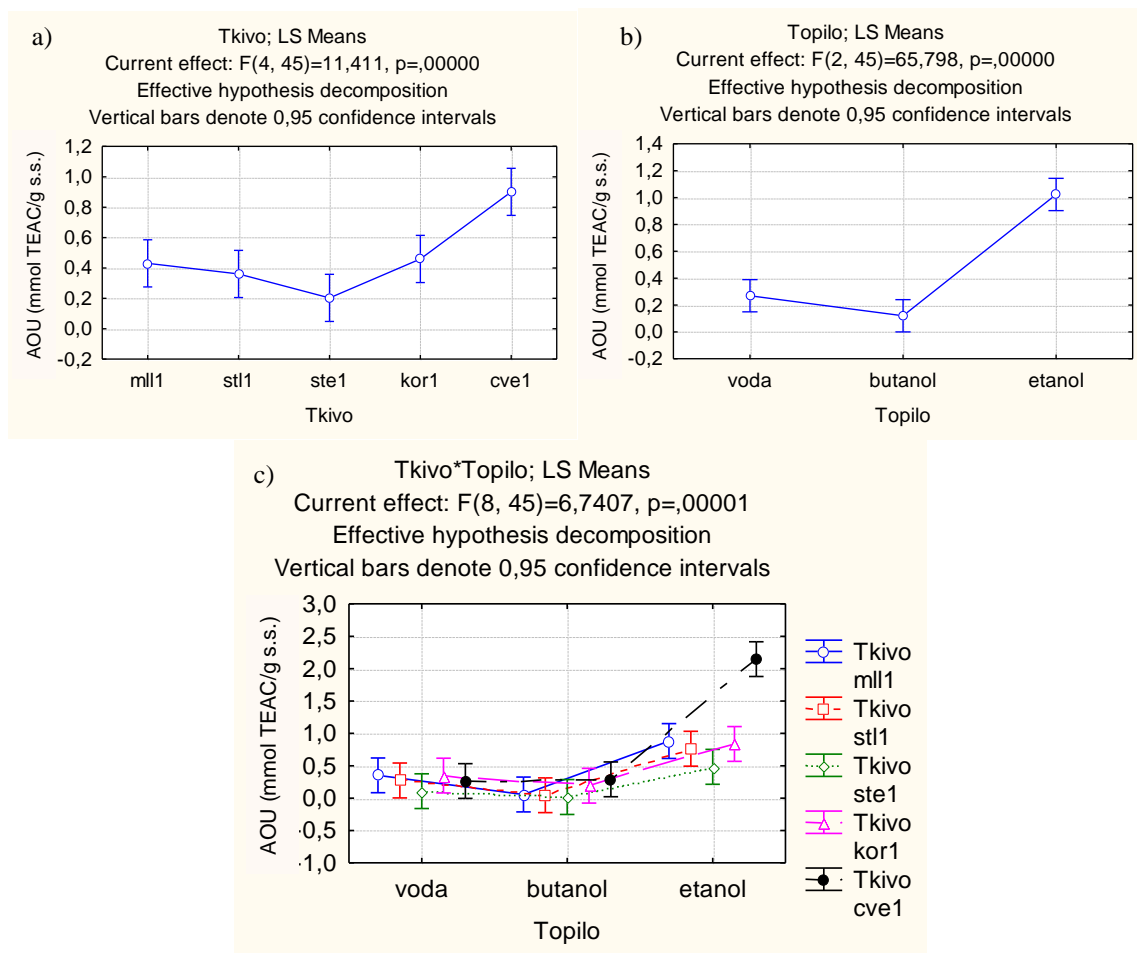
Slika H2: Vpliv rastlinskega tkiva (a), ekstrakcijskega topila (b) ter interakcije med tkivom in topilom (c) na izmerjeno AOU ekstraktov češkega dresnika prvega vzorčenja ($N = 4$, $p < 0,05$). Oznake: mll1 = mladi listi, stl1 = stari listi, ste1 = stebela in kor1 = korenike



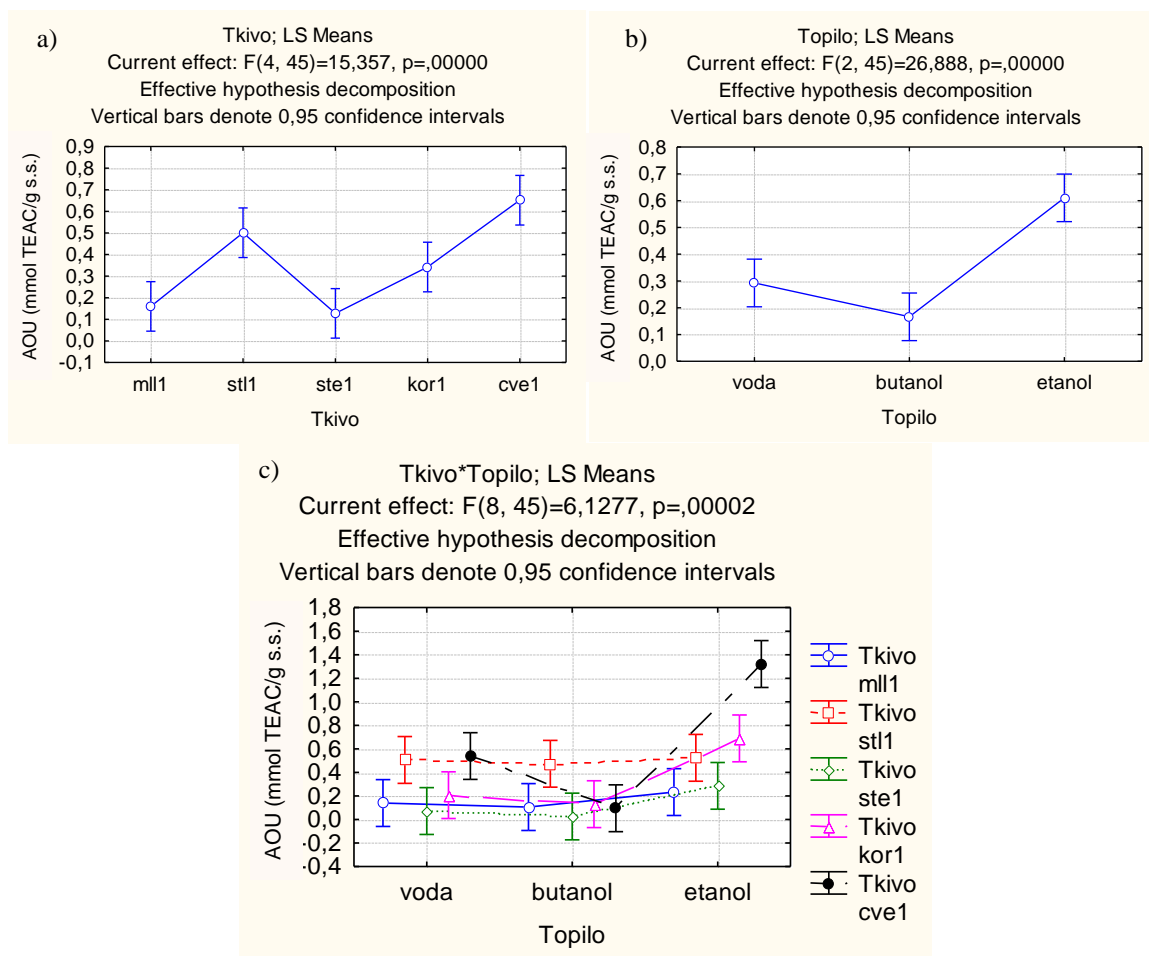
Slika H3: Vpliv rastlinskega tkiva (a), ekstrakcijskega topila (b) ter interakcije med tkivom in topilom (c) na izmerjeno AOU ekstraktov sahalinskega dresnika prvega vzorčenja ($N = 4$, $p < 0,05$). Oznake: ml1 = mladi listi, st1 = stari listi, ste1 = stebila in kor1 = korenike

PRILOGA I

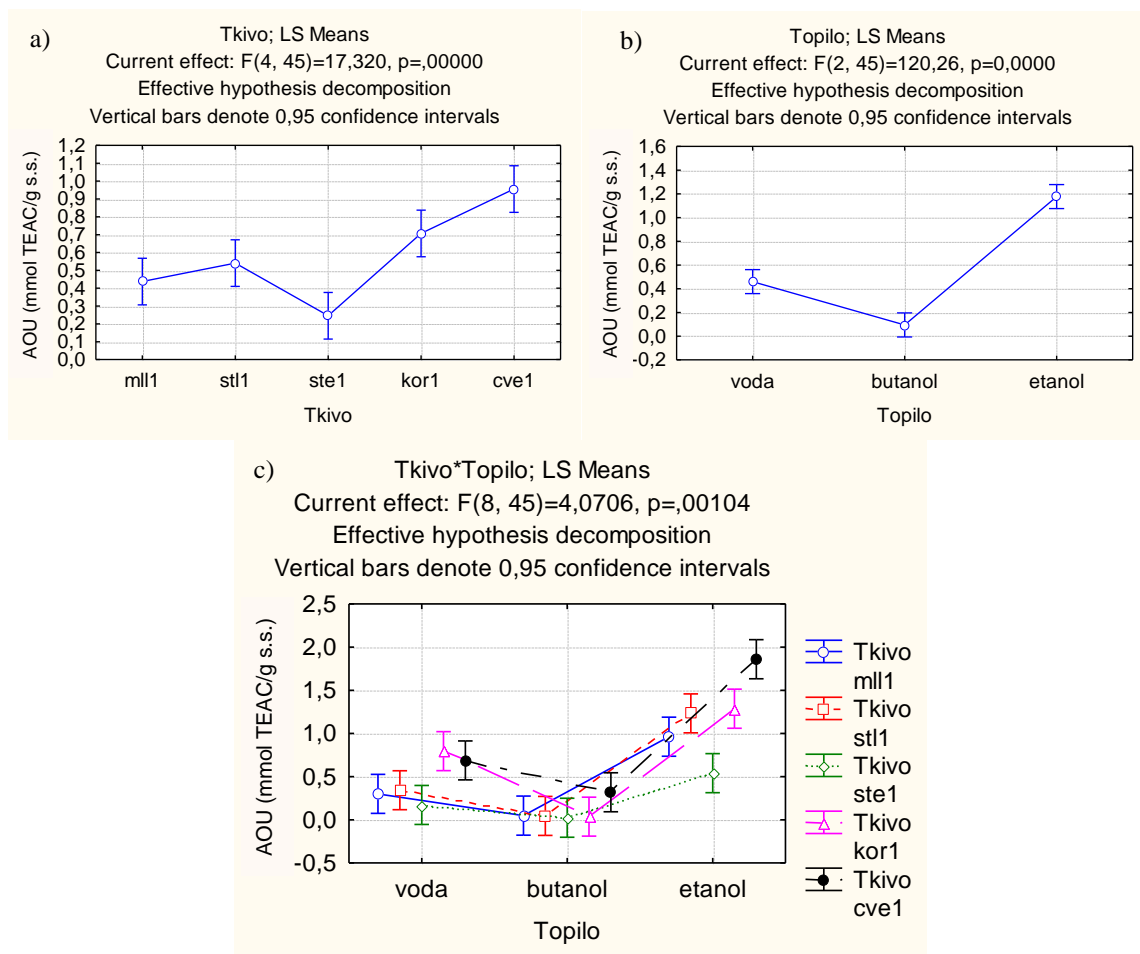
Vpliv rastlinskega tkiva in uporabljenega ekstrakcijskega topila na izmerjeno AOU ekstraktov drugega vzorčenja



Slika I1: Vpliv rastlinskega tkiva (a), ekstrakcijskega topila (b) ter interakcije med tkivom in topilom (c) na izmerjeno AOU ekstraktov japonskega dresnika drugega vzorčenja ($N = 4, p < 0,05$). Oznake: mll1 = mladi listi, stl1 = stari listi, ste1 = stebela, kor1 = korenike in cve1 = socvetja



Slika I2: Vpliv rastlinskega tkiva (a), ekstrakcijskega topila (b) ter interakcije med tkivom in topilom (c) na izmerjeno AOU ekstraktov češkega dresnika drugega vzorčenja ($N = 4, p < 0,05$). Oznake: mll1 = mladi listi, stl1 = stari listi, ste1 = stebela, kor1 = korenike in cve1 = socvetja



Slika I3: Vpliv rastlinskega tkiva (a), ekstrakcijskega topila (b) ter interakcije med tkivom in topilom (c) na izmerjeno AOU ekstraktov sahalinskega dresnika drugega vzorčenja ($N = 4$, $p < 0,05$). Oznake: mll1 = mladi listi, stl1 = stari listi, ste1 = stebla, kor1 = korenike in cve1 = socvetja

PRILOGA J

Primerjava vrednosti AOU med različnimi taksoni dresnikov

Preglednica J1: Rezultati t-testa parnih primerjav med AOU etanolnih ekstraktov različnih taksonov dresnikov drugega vzorčenja. Statistično značilne razlike so poudarjene in označene z * ($p < 0,05$). Oznake: jap = japonski dresnik, češ = češki dresnik in sah = sahalinski dresnik

Rastlinsko tkivo	Parna primerjava taksonov dresnikov		
	jap-češ	jap-sah	češ-sah
Mladi listi	p = 0,003*	p = 0,663	p = 0,003*
Stari listi	p = 0,199	p = 0,026*	p = 0,012*
Stebila	p = 0,127	p = 0,577	p = 0,009*
Korenike	p = 0,409	p = 0,409	p = 0,065*
Socvetja	p = 0,000*	p = 0,035*	p = 0,001*

PRILOGA K

Izračuni korelacij med luminescenčno metodo in metodo ABTS

Preglednica K1: Koeficienti determinacije (r^2) in koeficient korelacije (r) za zvezo med AOU izmerjeno z luminescenčno metodo in metodo ABTS. Prikazano je tudi število parnih primerjav med obema metodama (N) in 95 % intervali zaupanja (0,95 CI) za vrednosti r . Analize so bile opravljene s programom VassarStats (online)

Oznaka	Ekstrakcijsko topilo		
	Voda	Butanol	Etanol
r^2	0,471	0,424	0,404
r	0,686	0,651	0,635
N	27	27	27
0,95 CI	0,415-0,845	0,361-0,826	0,337-0,817

Preglednica K2: Iz korelacijskih koeficientov izračunane z-vrednosti (Fisherjeva transformacija) in rezultati z-testa parnih primerjav med z-vrednostmi. Statistično značilnih razlik med korelacijskimi koeficienti nismo opazili ($p > 0,05$). Analize so bile opravljene s programom VassarStats (online)

	Parna primerjava dveh ekstrakcijskih topil		
	Voda-Butanol	Voda-Etanol	Etanol-Butanol
z-vrednost	0,22	0,31	0,09
p-vrednost	0,826	0,757	0,928