

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Laura BERTALANIČ

**VPLIV TOPILA NA DOLOČENO ANTOOKSIDATIVNO AKTIVNOST VIN IN
MODELNIH ANTOOKSIDANTOV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE INFLUENCE OF SOLVENT ON THE DETERMINED ANTIOXIDANT
ACTIVITY OF WINES AND MODEL ANTIOXIDANTS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Laboratorijsko delo je bilo v celoti opravljeno na Katedri za tehnologije, prehrano in vino ter na Katedri za biokemijo in kemijo živil Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorja diplomskega dela je imenovan doc. dr. Blaž Cigić, za somentorico prof. dr. Tatjana Košmerl in za recenzentko doc. dr. Helena Abramovič.

Mentor: doc. dr. Blaž CIGIĆ

Somentorica: prof. dr. Tatjana KOŠMERL

Recenzentka: doc. dr. Helena ABRAMOVIČ

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik komisije:

Član komisije:

Član komisije:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v popolnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Laura Bertalanič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 577.1: 547.56+663.253(043)=163.6
KG antioksidanti/modelni antioksidanti/modelne raztopine/vina/fenolne spojine/polifenoli/antioksidativna aktivnost/DPPH'/Folin-Ciocalteu

AV BERTALANIČ, Laura
SA CIGIĆ, Blaž (mentor) / KOŠMERL, Tatjana (somentorica) / ABRAMOVIČ, Helena (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2011
IN VPLIV TOPILA NA DOLOČENO ANTIOKSIDATIVNO AKTIVNOST VIN IN MODELNIH ANTIOKSIDANTOV
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XIII, 81 str., 28 sl., 17 pregl., 10 pril., 87 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Antioksidanti zmanjšujejo tveganje za nastanek kroničnih bolezni, kot so rak, bolezni srca in ožilja. Ena izmed najbolj pogosto uporabljenih metod za določanje antioksidativnega potenciala (AOP) vin in tudi drugih živilih je DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) metoda. Metoda temelji na redukciji radikala DPPH' s prisotnimi antioksidanti v stabilen produkt DPPH₂ (difenilpikrilhidrazin). Redukcijo radikala DPPH' z modelnimi antioksidanti (MAO) in polifenoli, prisotnimi v vinih, smo določali v mešanici metanola s 50 % vsebnostjo acetatnega pufra pH 5,25 in v mešanici metanola s 5 % vsebnostjo vode. Ugotovili smo, da je reakcija večine MAO in vin z DPPH' potekla hitreje pri inkubaciji v acetatu pH 5,25 kot pri inkubaciji v metanolu. Določen AOP katehina, ki je eden izmed najbolj zastopanih polifenolov v vinu rdečih sort, je odvisen od deleža vode in acetatnega pufra v reakcijski zmesi. Katehinu smo določili skoraj dvakrat večjo spremembo absorbance pri 520 nm (dA_{520}) in žveplovem dioksidu skoraj trikrat večjo dA_{520} v mešanici metanola z acetatom pH 5,25 kot v mešanici metanola s 5 % vode po 60 minutah inkubacije. Tudi vzorcem vin smo določili večje vrednosti AOP v acetatu pH 5,25 kot v metanolu. Pri vinih smo vsebnost antioksidantov izrazili kot milimolarni ekvivalent troloxa (TE). Ugotovili smo, da je bil ta vsaj 1,5-krat večji v acetatu pH 5,25 kot v metanolu. Prav tako je iz naših rezultatov razvidno, da ima pH topila velik vpliv na določen AOP večine modelnih antioksidantov in vin, in sicer smo ugotovili, da se določen AOP veča z naraščajočim pH.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dn
DC UDC 577.1: 547.56+663.253(043)=163.6
CX antioxidants/model antioxidants/model solutions/wines/phenolic compounds/polyphenols/antioxidant activity/DPPH[•]/Folin-Ciocalteu

AU BERTALANIČ, Laura
AA CIGIĆ, Blaž (supervisor) / KOŠMERL, Tatjana (co-advisor) / ABRAMOVIČ, Helena (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2011
TI THE INFLUENCE OF SOLVENT ON THE DETERMINED ANTIOXIDANT ACTIVITY OF WINES AND MODEL ANTIOXIDANTS
DT Graduation thesis (University studies)
NO XIII, 81 p., 28 fig., 17 tab., 10 ann., 87 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Antioxidants reduce the risk of developing chronic diseases such as cancer and cardiovascular disease. One of the most commonly used methods for determining the antioxidant potential (AOP) of wine and other foods, is the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method. The method is based on the reduction of radical DPPH[•] by antioxidants into the stable product DPPH₂ (diphenylpicrilhydrazine). Reduction of DPPH[•] radicals with model antioxidants (MAO) and polyphenols present in wine was determined in a mixture of methanol containing 50 % of acetate buffer pH 5,25 and in a mixture of methanol containing 5 % of water. We found that the reaction of the majority of MAO and wines with DPPH[•] incubated in the buffered methanol was faster than those incubated in non-buffered methanol. Determined AOP of catechin, which is present at high concentration in the red wines, depends on the proportion of water and acetate buffer in the reaction mixture. For catechin we determined almost twofold higher difference in absorbance at 520 nm (dA_{520}) and for sulfur dioxide almost threefold higher dA_{520} in methanol solution containing 50 % acetate buffer pH 5,25 than in methanol solution with 5 % water after 60 minutes incubation. Higher AOP of all wine samples was determined in acetate pH 5,25 than in methanol. Antioxidant content of wine was expressed as trolox equivalent (TE). Determined AOP was at least 1,5 fold higher in acetate pH 5,25 than in methanol. We have also shown that the pH of the solvent has a large influence on determined AOP of most model antioxidants and wines, moreover it was observed that determined AOP increases with increasing pH.

KAZALO VSEBINE

| | |
|---------------------------------------------------------------------|-------------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA | III |
| KAZALO VSEBINE | V |
| KAZALO PREGLEDNIC | IX |
| KAZALO SLIK | X |
| KAZALO PRILOG | XII |
| OKRAJŠAVE IN SIMBOLI | XIII |
| 1 UVOD | 1 |
| 1.1 CILJ DELA | 2 |
| 1.2 DELOVNE HIPOTEZE | 2 |
| 2 PREGLED OBJAV | 3 |
| 2.1 ANTIOKSIDANTI | 3 |
| 2.2 ANTIOKSIDANTI V VINU | 5 |
| 2.2.1 Flavonoidi..... | 7 |
| 2.2.1.1 Katehin | 8 |
| 2.2.2 Neflavonoidi..... | 9 |
| 2.2.2.1 Hidroksicimetne kisline | 9 |
| 2.2.2.1.1 Kavna kislina | 9 |
| 2.2.2.1.2 Kaftarna kislina | 10 |
| 2.2.2.2 Hidroksibenzojske kisline | 10 |
| 2.2.2.2.1 Galna kislina | 10 |
| 2.2.2.3 Stilbeni (skupina resveratrola)..... | 11 |
| 2.2.3 Žveplov dioksid..... | 11 |
| 2.2.4 Vitamin C (L-askorbinska kislina) | 13 |
| 2.2.5 Oksidacija in antioksidativna sposobnost fenolov | 14 |
| 2.2.6 Določanje antioksidantov v vinih..... | 15 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.6.1 Določanje skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu reagentom | 15 |
| 2.2.6.2 Določanje skupnih fenolnih spojin v UV spektru | 16 |
| 2.2.6.3 Določanje antioksidativnega potenciala z ABTS ⁺ radikalom | 16 |
| 2.2.6.4 Določanje antioksidantov s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) | 17 |
| 2.2.6.5 Določanje antioksidativnega potenciala z DPPH [•] radikalom | 18 |
| 2.2.6.5.1 Kinetični vpliv na merjenje antioksidativnega potenciala z radikalom DPPH [•] | 21 |
| 2.3 POMEMBNE SORTNE ZNAČILNOSTI IZBRANIH VZORCEV VIN..... | 23 |
| 2.3.1 Malvazija | 23 |
| 2.3.2 Laški rizling | 23 |
| 2.3.3 Rumeni muškat | 24 |
| 2.3.4 Modra frankinja | 24 |
| 2.3.5 Modri pinot | 24 |
| 2.3.6 Refošk | 25 |
| 3 MATERIALI IN METODE | 26 |
| 3.1 MATERIALI | 26 |
| 3.1.1 Vzorci | 26 |
| 3.1.2 Laboratorijska oprema | 27 |
| 3.1.3 Reagenti | 27 |
| 3.2 METODE DELA | 29 |
| 3.2.1 Določanje vsebnosti SO₂ v žvepolovi(IV) kislini | 29 |
| 3.2.2 Karakterizacija vin | 29 |
| 3.2.2.1 Določanje žveplovega dioksida v vinih po Ripperju..... | 29 |
| 3.2.2.2 Določanje barvnih parametrov | 30 |
| 3.2.3 Karakterizacija topil | 31 |
| 3.2.3.1 Določanje vpliva topila na absorbanco radikala DPPH [•] pri 520 nm | 31 |
| 3.2.3.2 Določanje vpliva topila na absorbanco DPPH ₂ pri 520 nm v odvisnosti od pH medija | 31 |
| 3.2.3.3 Določanje vpliva vrste in pH topila na stabilnost radikala DPPH [•] | 31 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.4 Vpliv medija in pH medija na kinetiko reakcije modelnih antioksidantov in vin z radikalom DPPH[·] | 32 |
| 3.2.5 Vpliv koncentracije antioksidantov v testu in razredčitve vin na določeno antioksidativno aktivnost | 34 |
| 3.2.6 Vpliv deleža vode in pufra v mešanici z metanolom na določeno antioksidativno aktivnost katehina | 36 |
| 3.2.7 Določanje koncentracije skupnih fenolnih spojin v vinih | 37 |
| 3.2.7.1 Določanje skupnih fenolnih spojin v vinih s Folin-Ciocalteu reagentom | 37 |
| 3.2.7.2 Določanje skupnih fenolnih spojin v vinih s spektrofotometričnim merjenjem v UV spektru | 39 |
| 4 REZULTATI | 40 |
| 4.1 KARAKTERIZACIJA VIN | 40 |
| 4.1.1 Razultati določanja žveplovega dioksida | 40 |
| 4.1.1.1 Rezultati določanja vsebnosti SO ₂ v žveplovi(IV) kislini | 40 |
| 4.1.1.2 Rezultati določanja žveplovega dioksida v vinih po Ripperju | 40 |
| 4.1.2 Rezultati določanja barvnih parametrov | 41 |
| 4.1.3 Rezultati določanja pH vin | 42 |
| 4.2 KARAKTERIZACIJA TOPIL | 43 |
| 4.2.1 Rezultati vpliva topila na absorbenco radikala DPPH[·] pri 520 nm | 43 |
| 4.2.2 Rezultati stabilnosti radikala DPPH[·] kot funkcije vrste in pH medija | 44 |
| 4.2.3 Absorbanca DPPH₂ pri 520 nm v odvisnosti od pH medija | 45 |
| 4.3 VPLIV MEDIJA IN pH MEDIJA NA KINETIKO REAKCIJE RADIKALA DPPH[·] IN VIN TER MODELNIH ANTIOKSIDANTOV | 46 |
| 4.4 VPLIV KONCENTRACIJE ANTIOKSIDANTOV IN RAZREDČITVE VIN V TESTU NA DOLOČENO ANTIOKSIDATIVNO AKTIVNOST VZORCEV | 51 |
| 4.5 VPLIV DELEŽA VODE IN PUFRA V MEŠANICI Z METANOLOM NA DOLOČENO ANTIOKSIDATIVNO UČINKOVITOST KATEHINA | 60 |
| 4.6 DOLOČANJE KONCENTRACIJE SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN V VINIH | 61 |
| 4.6.1 Določanje skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu reagentom | 61 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.6.2 Določanje skupnih fenolnih spojin v vinih z merjenjem absorbance v UV delu spektra..... | 65 |
| 5 RAZPRAVA IN SKLEPI..... | 67 |
| 5.1 RAZPRAVA | 67 |
| 5.2 SKLEPI | 71 |
| 6 POVZETEK..... | 72 |
| 7 VIRI..... | 74 |
| ZAHVALA | |
| PRILOGE | |

KAZALO PREGLEDNIC

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Preglednica 1: Koncentracije fenolnih kislin in flavonoidov v vinih (De Beer in sod., 2002) | 6 |
| Preglednica 2: Razdelitev fenolnih spojin (Vrhovšek, 1996) | 7 |
| Preglednica 3: Priprava modelnih antioksidantov za določanje vpliva topila in pH na kinetiko reakcije antioksidantov z radikalom DPPH [•] | 33 |
| Preglednica 4: Končni razredčitveni faktorji pri določanju vpliva topila in pH na kinetiko reakcije vin z radikalom DPPH [•] | 34 |
| Preglednica 5: Priprava modelnih antioksidantov za določanje vpliva koncentracije antioksidantov v testu na določeno antioksidativno aktivnost vzorcev z radikalom DPPH [•] | 35 |
| Preglednica 6: Priprava razredčitev posameznih vin za določanje vpliva razredčitve vin na določeno antioksidativno aktivnost vzorcev z radikalom DPPH [•] | 36 |
| Preglednica 7: Standardi za pripravo umeritvenih krivulj za določanje skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu reagentom | 38 |
| Preglednica 8: Razredčitve posameznih vin za pripravo umeritvenih krivulj za določanje skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu reagentom | 39 |
| Preglednica 9: Koncentracije (mg/L) skupnega, prostega in vezanega SO ₂ v izbranih sortah vin, določene po Ripperjevi metodi..... | 40 |
| Preglednica 10: Vrednosti barvnih parametrov izbranih sort vin | 41 |
| Preglednica 11: Vrednosti pH izbranih sort vin | 42 |
| Preglednica 12: Vpliv topila na dA ₅₂₀ pri reakciji modelnih antioksidantov z radikalom DPPH [•] v odvisnosti od časa. | 48 |
| Preglednica 13: Vpliv topila na dA ₅₂₀ pri reakciji polifenolov v vzorcih vin z radikalom DPPH [•] v odvisnosti od časa. | 50 |
| Preglednica 14: Vpliv topila na določeno molsko razmerje med radikalom DPPH [•] in modelnimi antioksidanti pri EC ₅₀ po 60 min inkubacije pri 25 °C..... | 58 |
| Preglednica 15: Vpliv topila na določeno molsko razmerje med radikalom DPPH [•] in antioksidanti v vinih..... | 59 |
| Preglednica 16: Koncentracija skupnih fenolnih spojin v izbranih vzorcih vin določena s Folin-Ciocalteu metodo in izražena kot ekvivalenti galne kisline (GAE, mmol/L) in ekvivalenti troloxa (TE, mmol/L)..... | 64 |
| Preglednica 17: Vrednosti absorbance izmerjene pri 280 nm in izražene v absorbančnih enotah (AU)... | 66 |

KAZALO SLIK

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 1: Osnovna struktura formula flavonoidov (De Beer in sod., 2002; Abram, 2000: 24) | 7 |
| Slika 2: Struktura formula katehina (De Beer in sod., 2002; Vrhovšek, 1996: 230)..... | 8 |
| Slika 3: Strukturni formuli hidroksicimetnih kislin grozdja in vina: levo: (R=OH kaftarna kislina, R=H kutarna kislina, R=OCH ₃ fertarna kislina); desno: (R=OH kavna kislina, R=H p-kumarna kislina, R=OCH ₃ ferulna kislina) (Vrhovšek, 1996: 128) | 9 |
| Slika 4: Strukturne formule hidroksibenzojskih kislin v grozdju in vinu: A (galna kislina), B (vanilinska kislina), C (siringična kislina) (Vrhovšek, 1996: 129)..... | 11 |
| Slika 5: Struktura L-askorbinske kisline (Rudan-Tasič, 2000: 40) | 1 |
| Slika 6: Strukturne značilnosti flavonoidov, ki vplivajo na maksimalno antioksidativno aktivnost (1: hidroksilni skupini na B-obroču; 2: dvoja vez konjugirana s 4-okso skupino v C-obroču; 3: hidroksilni skupini na C- in A-obroču v kombinaciji s 4-okso skupino v C-obroču) (De Beer in sod., 2002: 54)..... | 15 |
| Slika 7: Struktura formula difenilpikrilhidrazila (DPPH [•]) (levo) in struktura formula difenilpikrilhidrazina (DPPH ₂ , reducirana oblika) (desno) (Molyneux, 2004: 212) | 19 |
| Slika 8: Grafični prikaz absorbance izbranih vin v vidnem delu spektra za določanje barve vin..... | 42 |
| Slika 9: Grafični prikaz vpliva topila na absorbanco 100 µM radikala DPPH [•] izmerjeno po 15 min inkubacije pri 25 °C pri valovni dolžini 520 nm | 43 |
| Slika 10: Grafični prikaz vpliva pH na absorbanco radikala DPPH [•] pri inkubaciji v acetatnem pufru in metanolu pri 25 °C v odvisnosti od časa | 44 |
| Slika 11: Grafični prikaz absorbance DPPH ₂ izražene v odstotkih absorbance DPPH [•] pri 520 nm in 25 °C v odvisnosti od pH topila | 45 |
| Slika 12: Grafični prikaz vpliva pH topila na dA ₅₂₀ izmerjeno po 60 min inkubacije pri 25 °C za različne modelne antioksidante..... | 46 |
| Slika 13: Grafični prikaz vpliva pH topila na dA ₅₂₀ izmerjeno po 60 min inkubacije pri 25 °C za izbrana vina..... | 47 |
| Slika 14: Grafični prikaz vpliva topila in koncentracije troloxa v testu na redukcijo radikala DPPH [•] , izmerjeno kot zmanjšanje absorbance pri 520 nm po 60 min inkubacije pri 25 °C | 51 |
| Slika 15: Grafični prikaz vpliva topila in koncentracije katehina v testu na redukcijo radikala DPPH [•] , izmerjeno kot zmanjšanje absorbance pri 520 nm po 60 min inkubacije pri 25 °C..... | 52 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 16: Grafični prikaz vpliva topila in koncentracije kaftarne kisline v testu na redukcijo radikala DPPH [•] , izmerjeno kot zmanjšanje absorbance pri 520 nm po 60 min inkubacije pri 25 °C..... | 53 |
| Slika 17: Grafični prikaz vpliva topila in koncentracije žveplovega dioksida v testu na redukcijo radikala DPPH [•] , izmerjeno kot zmanjšanje absorbance pri 520 nm po 60 min inkubacije pri 25 °C..... | 53 |
| Slika 18: Grafični prikaz vpliva topila in razredčitve vina malvazija v testu na redukcijo radikala DPPH [•] , izmerjeno kot zmanjšanje absorbance pri 520 nm po 60 min inkubacije pri 25 °C..... | 54 |
| Slika 19: Grafični prikaz vpliva topila in razredčitve vina laški rizling v testu na redukcijo radikala DPPH [•] , izmerjeno kot zmanjšanje absorbance pri 520 nm po 60 min inkubacije pri 25 °C..... | 55 |
| Slika 20: Grafični prikaz vpliva topila in razredčitve vina rumeni muškat v testu na redukcijo radikala DPPH [•] , izmerjeno kot zmanjšanje absorbance pri 520 nm po 60 min inkubacije pri 25 °C..... | 55 |
| Slika 21: Grafični prikaz vpliva topila in razredčitve vina refošk v testu na redukcijo radikala DPPH [•] , izmerjeno kot zmanjšanje absorbance pri 520 nm po 60 min inkubacije pri 25 °C..... | 56 |
| Slika 22: Grafični prikaz vpliva topila in razredčitve vina modri pinot v testu na redukcijo radikala DPPH [•] , izmerjeno kot zmanjšanje absorbance pri 520 nm po 60 min inkubacije pri 25 °C..... | 56 |
| Slika 23: Grafični prikaz vpliva topila in razredčitve vina modra frankinja v testu na redukcijo radikala DPPH [•] , izmerjeno kot zmanjšanje absorbance pri 520 nm po 60 min inkubacije pri 25 °C..... | 57 |
| Slika 24: Grafični prikaz vpliva topila na določeno molsko razmerje med radikalom DPPH [•] in katehinom z merjenjem absorbance pri 520 nm po 60 min inkubacije pri 25 °C..... | 60 |
| Slika 25: Grafični prikaz umeritvenih krivulj za modelne antioksidante po metodi za določanje koncentracije skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu reagentom..... | 61 |
| Slika 26: Grafični prikaz umeritvene krivulje za žveplov dioksid po metodi za določanje koncentracije skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu reagentom | 62 |
| Slika 27: Grafični prikaz umeritvenih krivulj za izbrana vina po metodi za določanje koncentracije skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu reagentom | 63 |
| Slika 28: Grafični prikaz absorpcijskih spektrov izbranih vin v UV delu spektru za določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin v vinih | 65 |

KAZALO PRILOG

Priloga A 1: Maksimalne vrednosti kemijskih parametrov, ki so zahtevane pri posameznih kakovostnih razredih vin, ki so pridelana ali se tržijo na ozemlju Republike Slovenije, ki jih predpisuje veljavni Pravilnik (Pravilnik o pogojih... Košmerl in Kač, 2010).

Priloga A 2: Grafični prikaz vpliva topila in majhne koncenracije SO₂ v testu na redukcijo DPPH[•], izmerjeno kot zmanjšanje absorbance pri 520 nm po 60 min inkubacije pri 25 °C.

Priloga B 1: Grafični prikaz vpliva topila in koncentracije galne kisline v testu na redukcijo radikala DPPH[•], izmerjeno kot zmanjšanje absorbance pri 520 nm po 60 min inkubacije pri 25 °C

Priloga B 2: Grafični prikaz vpliva topila in koncentracije askorbinske kisline v testu na redukcijo radikala DPPH[•], izmerjeno kot zmanjšanje absorbance pri 520 nm po 60 min inkubacije pri 25 °C

Priloga B 3: Grafični prikaz vpliva topila in koncentracije kavne kisline v testu na redukcijo radikala DPPH[•], izmerjeno kot zmanjšanje absorbance pri 520 nm po 60 min inkubacije pri 25 °C

Priloga C 1: Vpliv topila na molsko razmerje med radikalom DPPH[•] in katehinom pri določeni koncentraciji katehina (µmol/L) po 60 min inkubacije v acetatnem pufru pH 5,25 in v metanolu pri 25 °C

Priloga C 2: Vpliv topila na molsko razmerje med radikalom DPPH[•] in žveplovim dioksidom pri določeni koncentraciji SO₂ (µmol/L) po 60 min inkubacije v acetatnem pufru pH 5,25 in v metanolu pri 25 °C

Priloga D 1: Valovne dolžine absorpcijskih maksimumov nekaterih posameznih polifenolov (Phenolic Standards, 2011)

Priloga E 1: Primerjava antioksidativnega delovanja polifenolov, prisotnih v izbranih vinih, določenega z DPPH metodo, enkrat v acetatu pH 5,25 in drugič v metanolu ter s Folin-Ciocalteu metodo. Rezultati so normalizirani na trolox in izraženi kot TE v mmol/L

Priloga E 2: Primerjava antioksidativnega delovanja polifenolov prisotnih v izbranih vinih, določenega z DPPH metodo, enkrat v acetatu pH 5,25 in drugič v metanolu ter s Folin Ciocalteu-jevo metodo. Rezultati so normalizirani na galno kislino in podani v mmol/L

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| | |
|-------------------------|---------------------------------------------------------|
| A | absorbanca |
| ABTS | 2,2'-azobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina |
| AK | askorbinska kislina |
| AO | antioksidant |
| AOP | antioksidacijski potencial |
| dA₅₂₀ | sprememba absorbance pri valovni dolžini 520 nm |
| DPPH[·] | 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal |
| DPPH₂ | difenilpikrilhidrazin |
| ET | electron transfer |
| FC | Folin-Ciocalteu reagent |
| GAE | ekvivalent galne kisline (angl. gallic acid equivalent) |
| HAT | hydrogen atom transfer |
| HPLC | tekočinska kromatografija visoke ločljivosti |
| MOD | modelni antioksidanti |
| PE | prenos elektrona |
| PHA | prenos vodikovega atoma |
| PTP | priznano tradicionalno poimenovanje |
| R | razredčitveni faktor |
| ROI | reaktivni kisikovi intermediati |
| TE | troloksni ekvivalent (angl. trolox equivalent) |
| ZGP | zaščiteno geografsko poreklo |

1 UVOD

V današnjem času vse več pozornosti posvečamo zdravemu načinu življenja in zmanjšanju pojavnosti raznovrstnih bolezni, kot so rak in kardiovaskularne bolezni ter druge. Antioksidanti lahko na različne načine preprečujejo tvorbo prostih radikalov, jih pretvarjajo v nereaktivne molekule oziroma omogočajo popravljanje oksidativno poškodovanih biomolekul. Nekatere antioksidante sintetizira telo samo, druge pa dobimo s hrano (Korošec, 2000). Naravni antioksidanti so predvsem polifenolne spojine, ki nastajajo v rastlinah in v mikroorganizmih, v človeškem organizmu pa ne (Abram in sod., 2010; Abram in Simčič, 1997). Nahajajo se predvsem v sadju in zelenjavi ter pijačah, kot so sokovi, čaji, vino itd. V vinu imajo pomembno vlogo, saj mu dajejo barvo, vplivajo na vonj in okus, so osnova za staranje vina, delujejo kot antioksidanti in konzervansi ter izkazujejo protimikrobnou aktivnost. Zaradi vseh teh lastnosti jih pospešeno proučujejo mnoge mednarodne raziskovalne skupine, tudi zaradi že znanega pozitivnega vpliva na zdravje ljudi (Bavčar, 2006). Za določanje antioksidantov in fenolnih spojin ter njihove antioksidativne aktivnosti v vinih in ostalih živilih se uporablja vrsta različnih metod. Nobena metoda pa ne da celovitega odgovora o antioksidativni učinkovitosti fenolnih spojin. Na njihovo antioksidativno učinkovitost vpliva tudi vrsta reaktanta, na katerega antioksidant deluje, in izbira matriksa, v katerem antioksidant učinkuje (Abram in sod., 2010). Ena izmed najpogosteje uporabljenih indirektnih spektrofotometričnih metod za določanje antioksidativnega potenciala živil je tudi metoda DPPH. Temelji na merjenju spremembe absorbance, ki nastane pri redukciji radikala $DPPH^{\bullet}$ z antioksidantom. Na metodo DPPH vplivajo predvsem topilo, pH, koncentracija vzorca in inkubacijski čas (Noipa in sod., 2011). Iz literature je razvidno, da se uporablja različen inkubacijski čas, in sicer največkrat od 1 do 60 min (Terpinc in Abramovič, 2010; Katalinic in sod., 2006; Scalzo, 2008; Siddhuaju, 2006), nekateri tudi do 24 h (Thaipong in sod., 2006). Mnogi opozarjajo tudi na različno kinetiko antioksidantov (Brand-Williams in sod., 1995; Bondet in sod., 1997; Košmerl in Cigić, 2008; Dawidowicz in sod., 2012; Noipa in sod., 2011), zato je pogostokrat inkubacijski čas prekratek, da bi reakcija dosegla neko ravnotežno stanje (Dawidowicz in sod., 2012). Na podlagi ugotovitve, da je kinetika reakcije $DPPH^{\bullet}$ /antioksidant odvisna od vrste topila (Dawidowicz in sod., 2012), vedno več študij posveča pozornost uporabi ustreznega topila, ki bi morda pospešil hitrost reakcije antioksidantov z radikalom $DPPH^{\bullet}$ in pripomogel k ustreznnejši določitvi antioksidativnega potenciala.

1.1 CILJ DELA

Namen diplomske naloge je bil analizirati potek reakcije med prostim radikalom DPPH[•] in standardnimi antioksidanti (catehin, askorbinska kislina, galna kislina, trolox, kavna kislina, kaftarna kislina in SO₂) ter z antioksidanti, prisotnimi v izbranih rdečih (refošk, modri pinot, modra frankinja) in belih vinih (malvazija, laški rizling, rumeni muškat). Potek reakcije smo spremeljali v metanolu in acetatnem pufru z različnimi pH. Določili smo hitrost reakcije v ustrezni mešanici, kakor tudi vpliv topila na določeno vsebnost antioksidantov. Za primerjavo rezultatov smo v vinih določili vsebnost fenolnih spojin tudi s Folin-Ciocalteujevo metodo ter jim izmerili barvne parametre.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevali smo, da bosta prisotnost vode v reakcijskem mediju kakor tudi pH reakcijskega medija vplivala na hitrost reakcije ter na določeno vsebnost antioksidantov v vinih in nekaterih modelnih antioksidantih s prostim radikalom DPPH[•]. Predvidevali smo tudi, da se bodo pojavile razlike med belimi in rdečimi vini, saj so rdeča vina bogatejša po vsebnosti fenolnih spojin kot bela vina.

2 PREGLED OBJAV

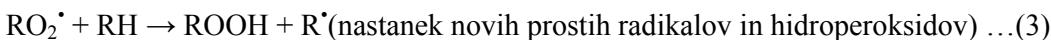
2.1 ANTIOKSIDANTI

Antioksidant je snov, ki prepreči oksidacijo neke druge snovi tudi takrat, ko je koncentracija le-te precej večja od koncentracije antioksidanta (Halliwell in Gutteridge, 1989). Druga razloga bi lahko bila, da so antioksidanti spojine, ki preprečujejo oksidativni stres z lovljenjem prostih radikalov, s keliranjem kovinskih ionov, z odstranjevanjem in/ali popravilom oksidativno poškodovanih biomolekul (Korošec, 2000). Do oksidativnega stresa pride, ko je v telesu več prostih radikalov kot antioksidantov (Wagner, 2001).

Prosti radikali so atomi, ioni, molekule ali deli molekul, ki imajo v svoji strukturi vsaj en nesparjen elektron (March, 1992; Halliwell in Gutteridge, 2000). So intermediati pri redoks, fotokemičnih in radikalnih reakcijah, ki se pojavljajo pri vrsti biokemijskih procesov. Nastajajo predvsem pri redoks in encimskih reakcijah, kjer prihaja do prenosa elektrona (Halliwell in Gutteridge, 2000), lahko pa jih povzročajo tudi različna sevanja, ki privedejo do homolitske cepitve kovalentne vezi (npr. radioliza vode) (Cigić in Rudan Tasić, 2006). Imunski sistem jih uporablja za uničevanje tujih in rakavih celic, srečamo jih v procesih presnove, so mediatorji in imajo pomembno vlogo pri številnih patofizioloških procesih in procesih staranja (Kreft in Pečar, 1998). Najpomembnejši kisikovi prosti radikali so superoksidni anion (O_2^-), tripletni kisik (3O_2), singletni kisik (1O_2), hidroksilni radikal (HO^\cdot), vodikov peroksid (H_2O_2), radikal dušikovega oksida (NO^\cdot) in peroksilni radikal (ROO^\cdot) (Korošec, 2000). Vse te oblike kisika oz. njegove spojine so reaktivni kisikovi intermediati (ROI), kateri so odgovorni za celične poškodbe, ki so lahko vzrok vnetni reakciji, maligni transformaciji ali smrti celice (Cigić in Rudan Tasić, 2006). Dejstvo, da so prosti radikali zelo reaktivni, pomeni, da imajo majhno kemijsko specifičnost, tj. da lahko reagirajo z večino molekul v svoji bližini, kar vključuje proteine, lipide, ogljikove hidrate in DNA. Kadar radikal reagira z neradikalom, nastane nov prosti radikal, ki reagira naprej v verižni radikalski reakciji (npr. lipidna peroksidacija), medtem ko prvotni izgubi radikalne lastnosti (Cigić in Rudan Tasić, 2006).

Antioksidanti lahko zavirajo oksidacijo na dva načina:

a.) Potek avtooksidacije maščob prikazujejo sledeče enačbe:



Ko nastane prosti radikal R^\bullet , reakciji 2 in 3 tvorita verižno reakcijo, pri čemer se številne molekule maščobnih kislin ($R-H$) pretvorijo v lipidne hidroperokside $ROOH$, kar v nadaljevanju vodi v oksidacijo in žarkost maščob.

Najpogosteje antioksidant poseže v reakcijo tako, da hitro odda vodikov atom radikalu, ki bi sicer povzročil tvorbo peroksidnih radikalov ali hidroperoksidov, sam pa preide v bolj stabilen prost radikal:



b.) Prenos elektronov je naslednji mehanizem, s katerim lahko antioksidant stabilizira prosti radikal. Na ta način reagirajo mnogi fenolni antioksidanti. Najprej nastane kation radikal, temu pa sledi hitra in reverzibilna deprotonacija, z radikalom pa lahko reagira tudi anionska oblika radikala, kot je prikazano v naslednjih reakcijah:



Oba mehanizma, prenos vodikovega atoma in prenos posameznega elektrona, vedno potekata vzporedno, a z različno hitrostjo (Musialik in sod., 2008; Prior in sod., 2005).

Antioksidanti se razlikujejo tako po kemijski strukturi kakor tudi po mehanizmu delovanja. Iz tega izhaja več možnih načinov razdelitve antioksidantov (Cigić in Rudan Tasič, 2006). Enega izmed načinov je predstavil Korošec (2000), in sicer je antioksidante razvrstil v tri skupine. V prvi so pravi antioksidanti, ki vežejo proste radikale in predstavljajo glavno znotrajcelično antioksidantno obrambo (SOD, katalaza, glutation, peroksidaza). V drugi skupini so reducenti, to so neencimski proteinski antioksidanti v plazmi (transferin, hemoglobin, albumin). V tretjo skupino pa spadajo antioksidantni sinergisti, ti povečujejo učinkovanje antioksidantov prve skupine in so neencimski antioksidanti, ki se nahajajo v plazmi, v celicah in v celičnih membranah (vitamin C, GSH, sečna kislina, vitamin E, betakaroten). Po kemijski zgradbi so vodotopni (askorbinska kislina, glutation, flavonoidi) in topni v maščobah (ubikinon, vitamin E, kurkumin, karotenoidi in retinoidi) (Korošec, 2000). Kot pri sami definiciji pojma, tudi pri razvrstitvi antioksidantov ne obstaja najboljša možna razdelitev. Pogostokrat se antioksidante deli po naslednjih kriterijih: izvor (naraven, sintetičen, endogen, eksogen), način delovanja (encimski, neencimski), fizikalono kemijske lastnosti (polaren, nepolaren), struktura (polifenoli, tioli,...), mehanizem delovanja (lovilec prostih radikalov, preprečevanje tvorbe prostih radikalov,...) (Cigić in Rudan Tasič, 2006).

Strukturno različni antioksidanti imajo lahko enak mehanizem delovanja in obratno. Velja pa tudi, da imajo nekateri antioksidanti več možnih mehanizmov delovanja. Nekatere snovi imajo lahko poleg antioksidativnega tudi prooksidativen učinek, kot so npr. askorbinska kislina, tokoferoli, karotenoidi in različni polifenoli. V najširšem smislu lahko med prooksidante uvrščamo snovi, ki dejansko povzročajo oksidativne poškodbe, kakor tudi vse ostale snovi in dejavnike, ki te poškodbe pospešijo. Obstajajo tudi spojine, ki niso direktni antioksidanti, ampak na posreden način povečujejo učinek antioksidantov. Te spojine lahko vplivajo na regulacijo biosinteze in regeneracijo encimskih antioksidantov, nizkomolekularnih antioksidantov in proteinov, ki vežejo prooksidativne ione; takšne spojine lahko uvrstimo med pro-antioksidante (Cigić in Rudan Tasič, 2006). Nekatere antioksidante sintetizira telo samo (glutation, sečno kislino, ubikinon), druge pa dobimo s hrano (antioksidantni vitamini, kovine v sledovih) (Korošec, 2000).

2.2 ANTIOKSIDANTI V VINU

V vinu so najpomemnejši antioksidanti polifenoli. Znanih je že več kot 4000, poleg vina pa se nahajajo v številnih vrstah sadja, zelenjave, raznih čajih in sadnih sokovih. Pri grozdju jih najdemo v jagodni kožici, pečkah in grozdnih pečljih. Delujejo kot odlična obramba pred škodljivci, plesnimi in kvasovkami. Če je grozdje okuženo ali mehanično poškodovano (toča, zmrzal), se vsebnost polifenolov v jagodah poveča (Wagner, 2001). Fenolne spojine imenujemo vse tiste spojine, ki imajo najmanj en aromatski obroč in najmanj eno ali več –OH skupin direktno vezanih na aromatski obroč (Abram, 2000). V naravi so običajne spojine z več –OH skupinami in zato se je zanje uveljavilo tudi drugo ime – polifenol (Abram in Simčič, 1997). Polifenolne spojine imajo prvenstveno vlogo pri senzorični kakovosti, saj vplivajo na trpkost, grenkobo, vonj in okus živil s tvorbo kompleksov s proteini človeške slino, dodatno pa vplivajo na barvo in antioksidativne lastnosti, zdravstvene učinke in prehransko vrednost končnega produkta (Košmerl in sod., 2006). V rdečih vinih so glavni vir grenkobe in trpkosti predvsem katehini in proantocianidini. Za barvo rdečih vin so odgovorni antociiani, ki pa v belem grozdju niso prisotni. Na barvo belih vin vplivajo neflavonoidni fenoli, kot so hidroksicimetne kislina (kaftarna, p-kumarna in fertarna kislina (Bavčar, 2006). S kemijskega stališča fenolne spojine zaradi svoje strukture (ene ali več hidroksilnih skupin) vplivajo na procese oksidacije in številne druge kemijske reakcije v moštu in vinu (Košmerl in sod., 2006). Za mnoge polifenolne spojine rastlinskega izvora so bila dokazana antikancerogena, antimutagena in tudi ostala svojstva, ki preprečujejo karcinogenezo v različnih stadijih razvoja rakavih bolezni (Košmerl in sod., 2006). Prav tako pa znanstveniki predvidevajo, da polifenoli delujejo preventivno tudi na nastanek srčno žilnih bolezni in srčne kapi (Middleton in sod., 2000).

Vsebnost fenolnih spojin je sortna lastnost vin in je v dobrni korelaciji z antioksidativnim potencialom. V povezavi z večjo vsebnostjo skupnih fenolov je značilno večji tudi antioksidativni potencial (Košmerl in sod., 2005).

Preglednica 1: Koncentracije fenolnih kislin in flavonoidov v vinih (De Beer in sod., 2002)

| Fenolne spojine | Koncentracija (mg/L) | |
|----------------------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| | Rdeče vino | Belo vino |
| NEFLAVONOIDI | 240-500 | 160-260 |
| Hidroksibenzojske kisline | 0-260 | 0-100 |
| <i>p</i> -hidroksibenzojska kislina | 20,0 ^b | - ^c |
| Galna kislina | 63,8 (3,1-320) | 6,4 (2,8-11) |
| Skupni galati | 49,0 (38,6-58,7) | 6,9 (6,8; 7) |
| Siringičnakislina | 11,5 (4,9; 18) | - ^c |
| Protokatehajska kislina | 88,0 ^b | - ^c |
| Hidroksicimetne kisline | 143,1 (74,1-226) | 130-154 |
| <i>p</i> -kutarna kislina | 52,2 (21-137) | 1,8 ^b |
| Kaftarna kislina | 80,9 (13,4-178) | 5 (3;7) |
| Kavna kislina | 8,7 (4,7-18) | 3,17 (1,5-5,2) |
| <i>p</i> -kumarna kislina | 4,7 (0,9-22) | 2,2 (1-3,2) |
| Ferulna kislina | 10,9 (2,9-19) | - ^c |
| Stilbeni | 11,1 (4-19) | 1,8 (0,04-3,5) |
| Resveratrol | 1,2 (0,09-3,2) | 0,04 (0-0,1) |
| FLAVONOIDI | 750-1060 | 25-30 |
| Flavonoli | 127,8 (65,3-238,3) | Sledovi |
| Kvercetin | 11,5 (0,5-28,5) | 0,55 (0-1,2) |
| Miricetin | 12,3 (0-64,5) | 0,1 (0-0,3) |
| Kamferol | 1,0 (0,1-6) | 0,1 ^b |
| Rutin | 7,4 (0-31,7) | 0,3 (0-0,9) |
| Flavan-3-oli | 208,8 (27,3-557) | 11,5 (2-29) |
| Katehin | 94,0 (15,3-390) | 15,4 (1,5-46) |
| Epikatehin | 44,3 (9,2-62) | 8,7 (0,5-60) |
| Proantocianidini | 215,0 (30,9-367,1) | 0 |
| Antocianini | 270,9 (39,4-469) | 0 |
| Delfnidin-3-glukozid | 10,9 (2,3-22) | 0 |
| Cianidin-3-glukozid | 38,0 ^b | 0 |
| Petunidin-3-glukozid | 21 (18; 24) | 0 |
| Peonidin-3-glukozid | 19 (6; 32) | 0 |
| Malvidin-3-glukozid | 46,7 (0-206) | 0 |
| Malvidin-3-glukozid-acetat | 38,2 (13,2-129) | 0 |
| Malvidin-3-glukozid- <i>p</i> -kumarat | 15,1 (8,3-44) | 0 |
| Skupni polifenoli | 1686,4 (700-4059) | 177,6 (96-331) |

b označa pomeni, da je bila le ena vrednost navedena v literaturi, c označa pa, da v literaturi ni bilo podatka. Vrednosti so povzete po Arts in sod., 2000; Carando in sod., 1999; Ricardo de Silvia in sod., 1990; Fogliano in sod., 1999; Frankel in sod., 1995; German in Walzem, 2000; Ghiselli in sod., 1998; Goldberg in sod., 1998; Lamuela-Reventós in Waterhouse, 1993; Mazza, 1995; Mazza in sod., 1999; Pellegrini in sod., 2000; Ritchey in Waterhouse, 1999; Simonetti in sod., 1997; Soleas in sod., 1997 in cit. po De Beer in sod., 2002.

Nekatere novejše študije so pokazale, da predvsem bela vina vsebujejo precej več kaftarne kisline, ki je koncentracijsko najpomembnejši antioksidant, kot v preglednici 1. Vrhovšek (1998) je določila v belem vinu šestih slovenskih sort od 177 do 369,5 mg/L kaftarne

kisline, Singleton in sodelavci (1986) so jo določili od 16 do 295 mg/L, Mozetič in sod. (2006) pa so v vinu sorte rebula z vsebnostjo skupnih polifenolov 118,6 mg/L določili 83,8 mg/L kaftarne kisline (v obliki *trans*-kaftarne kisline). V rdečih vinih so določili bistveno manjše koncentracije kaftarne kisline kot v belih, in sicer so Gutiérrez in sod. (2005) določili od 27,1 do 34,2 mg/L, Gambelli in Santaroni (2004) sta določila od 4,9 do 37,7 mg/L, medtem ko so Cerezo in sodelavci (2010) v vinu sorte cabernet sauvignon določili 149,2 mg/L kaftarne kisline.

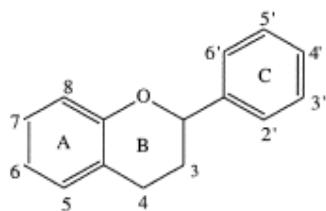
Fenolne spojine delimo na dve osnovni skupini, flavonoide in neflavonoide (Vrhovšek, 1996):

Preglednica 2: Razdelitev fenolnih spojin (Vrhovšek, 1996)

| FLAVONOIDI | NEFLAVONOIDI |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> • flavan-3-oli (catehin, epikatehin) • proantocianidini (dimeri in trimeri katehina in epikatehina) • antocianidini (cianidin, peonidin, delfnidin, petunidin, malvidin) • flavonoli (kamferol, kvercetin, miricetin, izoramnetin) | <ul style="list-style-type: none"> • hidroksicimetne kisline (kaftarna, kutarna, fertarna, kavna, <i>p</i>-kumarna, ferulna) • hidroksibenzojske kisline (galna, vanilinska, siringična) • stilbeni (resveratrol) |

2.2.1 Flavonoidi

Flavonoidi so fenolne spojine, zgrajene iz 15 C-atomov, osnovno spojino flavon sestavljajo strukture, ki jih označimo s C₆C₃C₆ (Abram, 2000).



Slika 1: Osnovna struktura formula flavonoidov (Abram, 2000: 24)

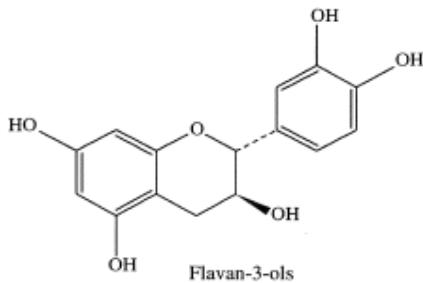
Flavonoidi so značilne spojine rdečih vin in zavzemajo do 85 % vseh prisotnih fenolov, v belih pa le 20 % (Stratil in sod., 2008; Bavčar, 2006). Najbolj pogosti flavonoidi v vinu so: antociani (monoglukozidi malvidina, cianidina, delfnidina, petunidina in peonidina ter njihovi pripadajoči estri, kjer je glukoza zaestrena z ocetno ali *p*-kumarno kislino), flavonoli (kvercetin, miricetin, kamferol), flavan-3-oli (catehin, epikatehin) in

proantocianidini. Flavonoidi lahko obstajajo v prosti obliki, vezani na druge flavonoide, neflavonoide in sladkorje kot glikozidi ali pa kot kombinacija naštetih oblik (Bavčar, 2006).

Monomerne in oligomerne oblike flavan-3-olov so najvažnejši fenoli v rdečih vinih (Vrhovšek, 1996). Nahajajo se v pečkah in pecljevini ter v kožici grozdne jagode. Proantocianidini ali kondenzirani tanini pa so prevladujoča oblika flavan-3-olov in se nahajajo predvsem v pečkah in manj v kožici ter pecljevini (Bavčar, 2006). Visoke antioksidativne značilnosti te skupine so dokazane že dlje časa in zaradi njihove velike vsebnosti predvsem v rdečih vinih so to spojine, ki so zelo pomembne za antioksidativne značilnosti vina (Vrhovšek, 1996; Frankel in sod., 1993). Flavonoli in antociani pa se nahajajo v kožici grozdne jagode (Bavčar, 2006).

2.2.1.1 Katehin

Katehin uvrščamo v skupino flavan-3-olov in je triciklična molekula s hidroksilnimi skupinami. Ločimo katehin (*trans*-oblika), epikatehin (*cis*-oblika), galokatehin, epigalokatehin in oksianidin. Rdeči mošti in vina vsebujejo tudi 3- do 6-monomerne katehine-flavane, ki so predhodniki katehinov. So neobarvani in učinkujejo grenko. V grozdju se nahajajo večinoma v kožicah in pečkah. Reagirajo z vanilinom ali drugimi aldehydi, nastanejo obarvani produkti (Plahuta, 2004). Koncentracije katehina v rdečih vinih variirajo med 130 do 400 mg/L, medtem ko se v belih vinih gibljejo med 20 in 50 mg/L (Vrhovšek, 1996).



Slika 2: Strukturna formula katehina (Vrhovšek, 1996: 230)

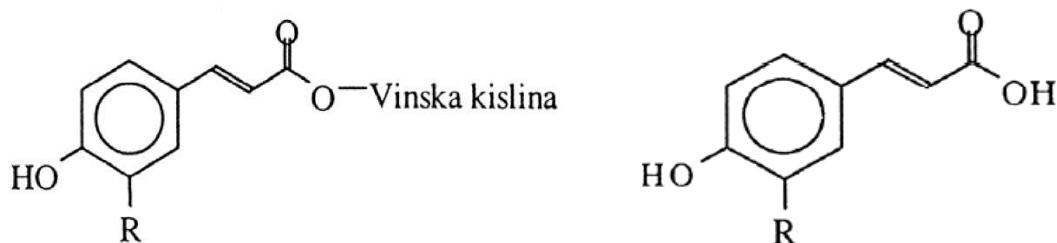
Katehin ima pomembno antioksidativno vlogo v vinu in ima pomemben zdravstveni učinek, saj zavira zlepjanje krvnih ploščic in tako preprečuje nastajanje krvnih strdkov v žilah, s čimer se poveča pretočnost žil. Zavira nastajanje tumorjev, pomaga varovati jetra, ker deluje protibakterijsko pa preprečuje vnetja (Wagner, 2001).

2.2.2 Neflavonoidi

Neflavonoidi predstavljajo večino fenolnih snovi v belih vinih. Nahajajo se predvsem v celičnih vakuolah kožice grozdne jagode. Najbolj zastopani in poznani so derivati hidroksicimetnih kislin, ki so vezani oziroma zaestreni na sladkorje, alkohole in kisline. Med njimi je največ estrov vinske kisline s kavno, *p*-kumarno in ferulno kislino, to so kaftarna, kutarna in fertarna kislina. V največji koncentraciji je prisotna kaftarna kislina kot ester kavne in vinske kisline (približno 75 %). Drugi vir neflavonoidov je ekstrakcija iz lesa. Glavna sestavina je elagična kislina, ki izhaja iz hidrolizabilnih taninov lesa, to je polimerov elagične in galne kisline z glukozo. Z razgradnjo lignina se v vino izločajo tudi drugi neflavonoidi, na primer benzaldehidi in aldehydi cimetne kisline (Bavčar, 2006).

2.2.2.1 Hidroksicimetne kisline

Med hidroksicimetne kisline uvrščamo kavno, kaftarno, kutarno, fertarno, *p*-kumarno in ferulno kislino. Hidroksicimetne kisline so najpomembnejša skupina neflavonoidov tako v rdečih kot tudi v belih vinih. Medtem ko so v rdečih vinih najpomembnejši fenoli flavonoidi, so hidroksicimetne kisline najpomembnejši fenoli belih vin (Vrhovšek, 1996).



Slika 3: Strukturni formuli hidroksicimetnih kislin grozja in vina: levo: (R=OH kaftarna kislina, R=H kutarna kislina, R=OCH₃ fertarna kislina); desno: (R=OH kavna kislina, R=H *p*-kumarna kislina, R=OCH₃ ferulna kislina) (Vrhovšek, 1996: 128)

2.2.2.1.1 Kavna kislina

Kavna kislina je 3,4-dihidroksicimetna kislina, fenolna kislina. Je derivat cimetne kisline. V vinu jo najdemo v prosti ali zaestreni obliki v koncentracijah med 0,3 in 5 mg/L (Plahuta, 2004; Chung in sod., 2006).

2.2.2.1.2 Kaftarna kislina

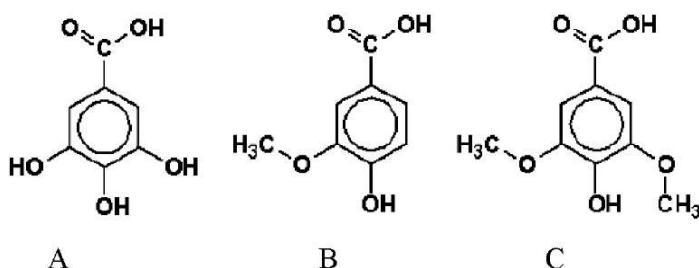
Kaftarna kislina je ester med kavno in vinsko kislino. S sorodnimi *p*-kumarinskimi in ferulnimi estri vinske kisline sestavlja velik del fenolov belih vin. Koncentracija kaftarne kisline v belih vinih zelo niha, vendar je povprečno okrog 150 mg/L mošta (Bavčar, 2006). Kaftarna kislina deluje kot zaščita pred oksidacijo. Esterke vezi hidrolizirajo encimi cinamil esteraze. Ti encimi povzročajo izgubo svežine vina. S hidrolizo nastala kavna kislina se oksidira in negativno vpliva na kakovost vina ter se poveže z glutationom v S-glutationil komplekse. Oksidacijo katalizira lakaza, vendar se glutation-hidroksicinemat ne obarvajo rjavo. Encim lakaza je oksidoreduktaza, ki jo tvori plesen vrste *Botrytis cinerea* kot zaščito pred fenoli, ki jih oksidira v kinone. Povzroča zelo obsežne oksidacije vina. Posebej je nezaželena pri rdečih vinih (izguba barve), pri belih manj, vendar pride do zlato rumene barve (Plahuta, 2004).

2.2.2.2 Hidroksibenzojske kisline

Glavne proste hidroksibenzojske kisline v rdečem vinu so galna, vanilinska in siringična. Galna kislina je hidroksibenzojska kislina, ki se ekstrahirja iz grozdnih pečk. Siringična in vanilinska kislina se ekstrahirata iz jagodne kožice, ne iz pečk in sta sestavini celičnega soka. Njune vrednosti ponavadi ne presegajo nekaj miligramov v vinih in so v belih vinih pogosto pod mejo zaznave. V rdečih vinih je razmerje med hidroksibenzojskimi kislinami zelo sortno pogojeno. Večje vrednosti prostih kislin in tudi elagične kisline so bile določene v vinih, staranih v hrastovih sodih (Vrhovšek, 1996).

2.2.2.2.1 Galna kislina

Galna kislina je 3,4,5-trihidroksibenzojska kislina (slika 4). Je neflavonoid in je osnovna enota hidrolizabilnih taninov. V vino se izloča iz lesenih sodov, predvsem hrastov les je bogat z njo. Prisotna pa je tudi v jagodnih pečkah (Plahuta, 2004). Galna kislina in njeni estri vsebujejo tri proste hidroksilne skupine, zaradi česar je ta kislina izredno dober antioksidant in je ponavadi glavna hidroksibenzojska kislina v rdečih vinih. Njene koncentracije so v rdečih vinih lahko enake koncentraciji *trans*-kaftarne kisline. V rdečih vinih se vrednosti gibljejo okoli 80 mg/L, medtem ko so vrednosti v belih vinih dosti manjše (do 10 mg/L) (Vrhovšek, 1996). Nekateri avtorji so določili manjše koncentracije v belih vinih, in sicer približno 2 mg/L, v rdečih pa med 2,7 in 35 mg/L (Plahuta, 2004).



Slika 4: Strukturne formule hidroksibenzojskih kislin v grozdju in vinu: A (galna kislina), B (vanilinska kislina), C (siringična kislina) (Vrhovšek, 1996: 129)

2.2.2.3 Stilbeni (skupina resveratrola)

V vinu se resveratrol nahaja v štirih različnih oblikah: *cis*- in *trans*-resveratrol ter *cis*- in *trans*-glukozid resveratrola (*cis*- in *trans*-piceid). Največje vrednosti vsote vseh štirih oblik resveratrola, dokazane do sedaj, dosegajo v rdečih vinih do 30 mg/L, medtem ko se povprečne vrednosti za rdeča vina gibljejo med 5 in 7 mg/L, manjše vrednosti so v rose in belih vinih - do 1 mg/L. Sorti, ki sta še posebno poznani po veliki vsebnosti resveratrola, sta modri pinot in modra frankinja.

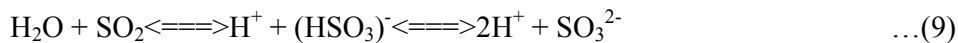
Poleg fenolov imata v vinu antioksidativno vlogo tudi askorbinska kislina in žveplov dioksid, ki se v vinarstvu uporablja kot enološka sredstva. Askorbinska kislina in žveplov dioksid ščitita flavonoidne fenole pred oksidacijo, ker se sama oksidirata, žveplov dioksid pa dodatno inhibira oksidaze in mikrobe ter se veže na aldehyde in druge vezalce žvepla (Plahuta, 2004).

2.2.3 Žveplov dioksid

Žveplov dioksid (SO₂) je pod normalnimi pogoji plin, katerega molska masa je 64,06 g/mol. Je dobro topen v vodi, njegova topnost pa je odvisna tudi od temperature (Košmerl, 2000).

V kletarstvu se delovanje žveplovega dioksida odraža v vrsti fizikalnih in kemijskih reakcij, ki vključujejo predvsem: preprečevanje rasti neželenih mikroorganizmov (bakterij rodov *Lactobacillus* in *Pediococcus* ter ne-*Saccharomyces* kvasovk); preprečevanje delovanja oksidacijskih encimov (polifenoloksidaz ali lakaz); vezavo porabnikov žvepla; preprečevanje reakcij porjavenja (tvorbe rjavih pigmentov) (Košmerl, 2000).

Žveplov dioksid, raztopljen v moštu ali vinu, se obnaša kot kislina, kar se kaže v treh različnih disociacijskih oblikah, katerih delež je odvisen od vrednosti pH (Košmerl, 2000) kar prikazuje tudi naslednja enačba (Rotter, 2009):



(molekularni SO₂) (bisulfitni SO₂) (sulfitni SO₂)

a.) Molekularna oblika žveplovega dioksida (SO₂) je glavna oblika pri pH pod 1,86. Pomembna je zaradi protimikrobnega delovanja, hkrati pa je tudi senzorično zaznavna z vohanjem. V okviru prostega SO₂ odpade na molekularno obliko le manjši delež, poleg pH vrednosti pa je močno odvisna tudi od temperature in koncentracije alkohola. Molekularna oblika SO₂ izredno hitro reagira z H₂O₂, ki nastane pri oksidaciji fenolnih spojin (Košmerl, 2000).

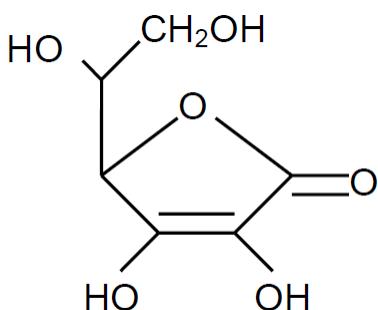
b.) Bisulfitna oblika žveplovega dioksida (HSO⁻₃) je glavna oblika pri pH od 1,86 do 7,18 in je prevladujoča oblika v moštu in vinu. Bisulfitna oblika SO₂ reagira s karbonilnimi spojinami, ki nastanejo med alkoholnofermentacijo: acetaldehidom in keto kislinami ter oksidiranimi fenolnimi spojinami, antociani, glukozo in askorbinsko kislino. Ti produkti (α -hidroksi sulfonati) vplivajo na vezano obliko SO₂ in so mikrobiološko in kemijsko stabilni. V okviru SO₂ odpade na bisulfitno obliko največji delež. Pozitiven vidik vezave bisulfitne oblike zlasti z acetaldehidom kot glavnim porabnikom, ki je produkt reakcij oksidacije mladega vina ali staranja, je senzoričen (predvsem bela vina). Druga prednost vezave žvepla je pri porjavenju, kjer pride do tvorbe rjavih pigmentov iz oksidiranih fenolnih spojin zaradi encimskih oksidacij v moštu ozziroma kemijskih oksidacij v vinu; v obeh primerih oksidacij pride do izgube prostega žveplovega dioksida (Košmerl, 2000).

c.) Sulfitna oblika žveplovega dioksida (SO⁻₃) pa je prevladujoča oblika pri pH nad 7,18. Deluje kot antioksidant (preprečuje oksidacijo drugih snovi v moštu ali vinu), čeprav je prisotna v zelo majhnih koncentracijah. Reakcija sulfitnega iona s kisikom je relativno hitra; upočasni oksidacijo fenolnih spojin v kinone, tvorbo acetaldehyda in rjavih pigmentov (Košmerl, 2000).

S kletarskega stališča je najpomembnejši podatek o prostem žveplu, zlasti njegov delež, ki je potreben za vzdrževanje želene koncentracije 0,825 mg molekularnega SO₂/L, ki zagotavlja kemijsko in mikrobiološko stabilnost vina. Koncentracija 35-50 mg dodanega žveplovega dioksida/L v mošt je zadostna in ustrezna, da se zmanjša oksidacijska aktivnost encimov zdravega grozdja za najmanj 90 %. Najpogosteje se uporablja za žveplanje žveplo v obliki 5-6 % vodne raztopine SO₂ in H₂SO₃, preostali oblici pa sta še: plinasti SO₂ in kalijev metabisulfit. Izgube skupnega žveplovega dioksida (predvsem prostega žveplovega dioksida) v stekleničenem vinu so posledica fizikalno-kemijskih reakcij, ki so izhlapevanje in izmenjava plinov (kisika) skozi zamašek, oksidacija sulfita s kisikom, tvorba močnih vezi med žveplom in porabniki (kinoni) ter počasna oksidacija sulfita s predhodno oksidiranimi fenolnimi spojinami ob tvorbi sulfata (Košmerl, 2000). Zakonsko so omejene vsebnosti žveplovega dioksida v vinih (Pravilnik o pogojih..., 2004).

2.2.4 Vitamin C (L-askorbinska kislina)

Askorbinska kislina (L-AK) z molekulsko formulo $C_6H_8O_6$ in relativno molekulsko maso 176,13 g/mol nastane v reakcijah biosinteze iz glukoze. Je v vodi topna, optično aktivna bela kristalinična snov in je močan reducent (Kuellmer, 1999). Kemijsko je askorbinska kislina lakton 2-keto-L-gulonske kisline. Močno izražene kisle lastnosti kažeta enolni hidroksilni skupini, vezani na C-2 in C-3 atomu, kar lahko ugotovimo iz strukture L-askorbinske kisline (slika 5) (Rudan-Tasič, 2000):



Slika 5: Struktura L-askorbinske kisline (Rudan-Tasič, 2000: 40)

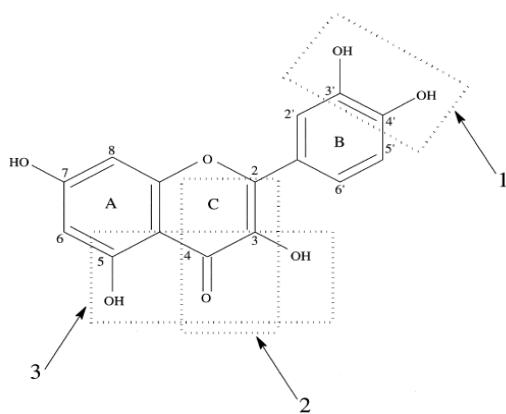
Najvažnejša kemijska lastnost vitamina C je reverzibilni oksidacijsko-reduksijski proces med L-askorbinsko in L-dehidroaskorbinsko kislino. Ugotovljeno je, da je prav ta redoksnii sistem osnova primarne fiziološke aktivnosti vitamina C in da je odgovoren za mnoge biokemijske reakcije v rastlinskem in živalskem organizmu. Zaradi antioksidativnih lastnosti je vitamin C v živilski industriji vsestransko uporaben, predvsem kot konzervans, ki ohranja barvo, aromo in teksturo proizvodov ter izboljša splošno obstojnost prehrabnenih izdelkov (Rudan-Tasič, 2000). V vinarstvu se uporablja kot enološko sredstvo za zaščito pred oksidacijo v prosti obliki ali v obliki njenih soli. V vinu je tudi naravno prisotna v koncentracijah do 2 mg/L. Pri njeni oksidaciji v 2,4-dehidroaskorbinsko kislino nastane H_2O_2 , ki pospešuje nadaljnjo oksidacijo etanola v acetaldehid (Plahuta, 2004).

2.2.5 Oksidacija in antioksidativna sposobnost fenolov

Sorte grozdja izkazujejo različno občutljivost za oksidacijo in posledično porjavenje. Vsaj delno to lahko razložimo z različno koncentracijo fenolnih spojin, njihovo sestavo in obnašanjem v prisotnosti kisika ter encimov polifenoloksidaz, odgovornih za porjavenje vina. Posebno so zanimive reakcije fenolov in kisika v rdečih vinih. Že v moštu se začne encimska oksidacija kaftarne kislina v kinone pod vplivom encimov polifenoloksidaz, ki pretežno izhajajo iz grozdja. Aktivnost polifenoloksidaz se med fermentacijo zmanjša, saj se vežejo na dele grozdne jagode. Vežejo jih tanini in nastali kinoni ter jih tako inaktivirajo. Zato se po stiskanju nadaljuje predvsem neencimska oksidacija (avtooksidacija) fenolnih snovi, kjer se fenoli spreminjajo v kinone. Pri tem se iz kisika tvori vodikov peroksid, ta pa oksidira razpoložljiv etanol v acetaldehid. Kinoni se nadalje vežejo z drugimi fenoli in pospešujejo polimerizacijo fenolov, hkrati pa s prestrukturiranjem tvorijo oblike fenolov, ki lahko nadalje reagirajo s kisikom in tvorijo še več vodikovega peroksidu ter posledično preko etanola še več acetaldehida. Tako lahko potrdimo, da imajo rdeča vina sposobnost porabe (asimilacije) kisika, saj fenolne snovi delujejo kot antioksidanti in vežejo kisik. Bela vina so bolj izpostavljena oksidativnim porjavitvam, saj vsebujejo manj barvnih snovi in tudi manj antioksidantov. Prav tako kot pri rdečih se kaftarna kislina pod vplivom polifenoloksidaz oksidira v kinon, ta pa se nadalje veže z glutationom, kar omeji obseg porjavitve. Ko se zmanjša aktivnost polifenoloksidaz, se začne oksidacija in kondenzacija razpoložljivih flavan-3-olov (predvsem katehina in epikatehina). Tako trdimo, da so flavan-3-oli odgovorni za porjavitev belih vin (Bavčar, 2006).

Zaradi majhnega redoks potenciala so flavonoidi sposobni reducirati proste radikale z večjim redoks potencialom, kot so superoksidni, alkoksilni, peroksilni in hidroksilni radikali (Musialik in sod., 2008). Čim večji negativni reduksijski potencial ima spojina, tem lažje bo oddala elektrone spojini z manj negativnim ali pozitivnim reduksijskim potencialom in se pri tem sama oksidirala. Čeprav je reduksijski potencial odločilni dejavnik pri tem, kako bo neka spojina učinkovala kot antioksidant, se je pokazalo, da k celotni učinkovitosti prispevajo tudi druge fizikalno-kemijske značilnosti (npr. hidrofilnost oz. lipofilnost antioksidantov) (Abram in sod., 2010). Prav tako je učinkovitost antioksidantov tem večja, čim manjša je jakost vezi A-H (Abram, 2000). Njihov učinek pa je odvisen tudi od strukture fenolnih spojin. Pri fenolnih kislinah se antioksidativna učinkovitost veča s številom hidroksilnih skupin na benzenovem obroču in se zmanjša, če hidroksilno skupino na tretjem in petem C-atomu v benzenovem obroču nadomesti metoksilna skupina. Hidroksicimetne kislina kažejo v primerjavi s hidroksibenzojskimi kislinami večji antioksidativni učinek. Pri flavonoidih je povezava med antioksidativnim učinkom in njihovo strukturo bolj zapletena. Antioksidativno učinkovitost flavonoidov poveča število hidroksilnih skupin na B-obroču v molekuli, dvojna vez med drugim in tretjim ogljikovim atomom, konjugirana s 4-okso skupino v C-obroču, prisotnost

hidroksilne skupine na tretjem ogljikovem atomu v C-obroču ter stopnja polimerizacije (Abramovič in sod., 2008) kot prikazuje tudi naslednja slika (slika 6):



Slika 6: Strukturne značilnosti flavonoidov, ki vplivajo na maksimalno antioksidativno aktivnost (1: hidroksilni skupini na B-obroču; 2: dvojna vez konjugirana s 4-okso skupino v C-obroču; 3: hidroksilni skupini na C- in A-obroču v kombinaciji s 4-okso skupino v C-obroču) (De Beer in sod., 2002: 54).

2.2.6 Določanje antioksidantov v vinih

2.2.6.1 Določanje skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu reagentom

Vsebnost skupnih fenolnih spojin v snovi (npr. vinu) določamo s Folin-Ciocalteujevo metodo, ki temelji na tvorbi modro obarvanega kompleksa fenolnih spojin s Folin-Ciocaltejevim (FC) reagentom (Abram in sod., 2010). FC reagent je raztopina polimernega ionskega kompleksa iz fosfomolibdenskih in fosfovolframovih kislin. Pri reakciji med fenolnimi spojinami in FC reagentom pride do oksidacije fenolatov, pri čemer zaradi redukcije heteropolnih kislin nastane moder kompleks oz. kromogen, ki ima absorpcijski maksimum pri 765 nm. Ker so fenolati prisotni le v bazičnem mediju, FC reagent in nastali produkti pa so v takih pogojih nestabilni, izvajamo reakcijo pri šibko bazičnih pogojih in z veliko koncentracijo reagenta (Roginsky in Lissi, 2005; Prior in sod., 2005; Karadag in sod., 2009). Vsebnost omenjenega kompleksa določimo spektrofotometrično: izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 765 nm (A_{765}). Večja absorbanca pomeni večjo koncentracijo fenolnih spojin. Umeritveno krivuljo pripravimo z reakcijo FC reagenta z izbrano čisto fenolno spojino. Graf odvisnosti A_{765} od koncentracije fenolne spojine omogoči, da iz izmerjene vrednosti A_{765} odčitamo vrednost koncentracije skupnih fenolnih spojin v določeni snovi (Abram in sod., 2010). Običajno se umeritvena krivulja pripravlja z galno kislino in rezultati se nato izrazijo kot mg GAE/L (Villano in sod., 2004; Košmerl in Cigić, 2008).

Posamezne fenolne snovi imajo različen odziv na to metodo. Signal je proporcionalen številu hidroksilnih skupin na aromatskem obroču. Redukcijska sposobnost je boljša, ko sta dve hidroksilni skupini v *ortho*- ali *para*-položaju (Katalinić in sod., 2004).

Slabost te metode je, da lahko določimo več fenolnih spojin, kot jih dejansko je, saj FC reagent ni specifičen in lahko poleg fenolnih spojin reagira tudi z ogljikovimi hidrati, karotenoidi, aminokislinami, vitaminom C itd. (Prior in sod., 2005) ter, da lahko prisotnost žveplovega dioksida vpliva na rezultate določanja skupnih fenolnih spojin v vinih. Stratil in sodelavci(2008) poročajo, da naj bi 100 mg SO₂/L povzročilo dvig absorbance za 0,050 za bela vina in za 0,006 za rdeča vina. Tako naj bi 100 mg SO₂/L povečalo določeno koncentracijo skupnih polifenolov za nekaj odstotkov.

2.2.6.2 Določanje skupnih fenolnih spojin v UV spektru

Fenolne spojine lahko spektrofotometrično določimo z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 280 nm, saj absorbirajo ultravijolično svetlobo. Problem te metode je, da posamezni fenoli različno absorbirajo (imajo različen ekstinkcijski koeficient) pri 280 nm, zato se rezultati ne morejo izraziti glede na določen standard, ampak se podajo kar v absorbančnih enotah ob upoštevanju razredčitvenega faktorja. Prednost te metode je, da je zelo preprosta za uporabo in hitra, vključuje lahko le filtracijo in redčenje. Zelo uporabna je za spremljanje vsebnosti polifenolov v vinih med samim procesom pridelave (npr. fermentacije) ali za primerjanje podobnih vin med seboj (npr. vina iste sorte grozdja iz različnih vinogradov ali istega vinograda vendar različnih letnikov) (Waterhouse, 2002).

2.2.6.3 Določanje antioksidativnega potenciala z ABTS⁺ radikalom

Ena izmed najpogosteje uporabljenih metod je indirektna metoda določanja antioksidativnega potenciala z ABTS⁺ radikalom (Roginsky in Lissi, 2005).

Radikal ABTS⁺ je hkrati kation in kromofor (Rice-Evans in Miller, 1997), ki ima karakterističen absorpcijski spekter z maksimumi pri valovnih dolžinah 414, 645, 734 in 815 nm (v literaturi je večina poskusov opravljenih pri valovni dolžini 414 nm). Radikal lahko pridobimo iz ABTS (2,2'-azobis-3-etylbenzotiazolin-6-sulfonska kislina) na različne načine, in sicer encimsko s peroksidazo; kemijsko z MnO₂, kalijevim persulfatom ali peroksidnimi radikali; ter elektrokemijsko (Villano in sod., 2004).

V odsotnosti fenolnih snovi je ABTS⁺ radikal precej stabilen, v prisotnosti donorja vodikovega atoma (fenoli) pa hitro reagira in postane brezbarven (Roginsky in Lissi, 2005). Zmanjšanje absorbance radikala je proporcionalno koncentraciji in aktivnosti antioksidanta v analiziranem vzorcu (Fernández-Pachón in sod., 2006). Radikal ABTS⁺ je topen v vodnih in organskih topilih in se lahko uporablja za določanje antioksidativne aktivnosti tako hidrofilnih kot lipofilnih antioksidantov (Arnao, 2000). ABTS metodo sta preizkusila tudi Rice-Evans in Miller (1997), ko sta želela povezati antioksidativno

sposobnost nekega flavonoida z njegovo strukturo. S to metodo sta definirala sposobnost antioksidantov, da polovijo radikale, v primerjavi s tisto, ki jo ima Trolox (vodotopni analog vitamina E). Vsebnost antioksidantov v nekem vzorcu tako izrazimo kot Trolox ekvivalente TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Če je v vzorcu koncentracija antioksidantov, ki ima enak učinek kot 1 mM Trolox, ima vzorec 1 TEAC. Za večji oziroma manjši antioksidativni učinek, je določena TEAC vrednost ustrezno večja ali manjša (Abram, 2000).

Trolox je strukturno podoben α -tokoferolu, vendar je brez hidrofobnega repa, zaradi česar je topen v polarnih medijih. V različnih študijah se je izkazalo, da ima enako antioksidativno sposobnost kot α -tokoferol (Yettella in Min, 2010) in zaradi tega se je tudi uveljavil kot primerjalni antioksidant pri metodah kot sta npr. ABTS metoda in DPPH metoda.

Prednost ABTS metode je predvsem njena preprosta uporaba in možnost za rutinske analize v vsakem laboratoriju. Slabost metode je, da podaja sposobnost spojin za reakcijo z ABTS⁺, saj reagira z –OH skupinami v aromatski spojini, ne glede na to, ali te prispevajo k antioksidativni aktivnosti ali ne (Roginsky in Lissi, 2005).

2.2.6.4 Določanje antioksidantov s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC)

HPLC je kromatografska metoda, ki se uporablja tudi za detekcijo posameznih antioksidantov, kot so polifenoli (antocianidini, flavonoli,...), tokoferoli, karotenoidi, vitamini (Tasioula-Margari in Okoger, 2001). Prav tako pa se uporablja za analizo aminokislin, zdravil, pesticidov, rastlinskih in živalskih hormonov, vitaminov, barvil ter ločbo kompleksnih zmesi makromolekul, kot so proteini, polisaharidi itd. (Martin-Hernandez in Juarez, 1993; Vidovic in sod., 2008).

HPLC splošno predstavlja eno izmed najbolj razširjenih in zanesljivih tehnik za analizo fenolnih spojin. Sistem HPLC ima različne detektorje, kot so UV-VIS, fluorescenčni, masno-spektrometrični (MS) in drugi. Za detekcijo antioksidantov se največkrat uporablja UV-VIS detektor (Vidovic in sod., 2008). Različni avtorji navajajo različne valovne dolžine za detekcijo antioksidantov (npr. askorbinske kisline), in sicer od 245 do 254 nm (Vidovic in sod., 2008; Nojavan in sod., 2008). Za detekcijo posameznih polifenolov se uporablja tudi detektor z diodno matriko (Tasioula-Margari in Okoger, 2001). Ker se polifenolne substance običajno nahajajo v rastlinah kot kompleksne zmesi, so v splošnem potrebne sklopljene tehnike. V te namene se uspešno uporablja HPLC-MS/MS analize (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007).

Tehnika temelji na ločbi komponent v vzorcu na osnovi različnih fizikalno-kemijskih interakcij med mobilno in stacionarno fazo pod visokim tlakom (do 400 barov) (Jeong in sod., 2008). Ločujemo snovi na osnovi adsorpcije, porazdelitve, ionske izmenjave, velikosti in biološke afinitete (Kregar, 1996). Glede na lastnost spojine, kot je polarnost in

s tem povezana topnost, se izbere mobilno in stacionarno fazo. Pri ločevanju fenolnih spojin se uporablja tako imenovana reverznofazna HPLC (tekoča polarna mobilna faza in nepolarna trdna stacionarna faza). Mobilna faza se dovaja na začetek kolone, teče po koloni, z njo pa tudi raztopljeni snovi, ki so predhodno nanešene na začetek stacionarne faze, z različno hitrostjo in ločeno iztekajo iz kolone. Topljenec se porazdeli med obema fazama zaradi različne topnosti (polarnost) v stacionarni in mobilni fazi. Različni topljeni se med seboj ločijo, ker potujejo z različno hitrostjo zaradi različno močnih vezi med topljencem in stacionarno oz. mobilno fazo (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007), kar pa se na kromatogramu pokaže kot različni retencijski časi, ki so karakteristični za vsako komponento v vzorcu (Jeong in sod., 2008). Detektor kontinuirno zaznava posamezne komponente pri prehodu skozi kolono in rekorder zapisuje dobljene rezultate v obliki vrhov (Martin-Hernandez in Juarez, 1993). Rezultat kromatografskega eksperimenta je kromatogram, ki nam daje informacijo o: sestavi vzorca (število vrhov), kvalitativni sestavi vzorca (polozaj vrhov), količini posamezne komponente v vzorcu (površinavrhov) in kvaliteti kolone (število teoretskih podov) (Prošek in Golc Wondra, 1997).

2.2.6.5 Določanje antioksidativnega potenciala z DPPH[•] radikalom

Metodo s prostim radikalom DPPH[•] je predstavil Marsden Blois na Stanford Univerzi, ki je kot modelni antioksidant uporabil cistein in je ena izmed najstarejših indirektnih metod za določanje antioksidativne aktivnosti (Molyneux, 2004; Kedare in Singh, 2011). Metoda temelji na reakciji med stabilnim prostim radikalom DPPH[•] in donorji vodika in elektrona (npr. fenoli) (Brand-Williams in sod., 1995; Abram in sod., 2010). Torej metoda DPPH, kot tudi ABTS metoda, vključuje oba mehanizma delovanja PAH (prenos H atoma; angleško HAT-hydrogen atom transfer) in PE (prenos elektrona; angleško ET-electron transfer) (Prior in sod., 2005; Musialik in sod., 2008; Karadag in sod., 2009). Je hitra, enostavna, poceni in pogosto uporabljena metoda za določanje antioksidativne aktivnosti posameznih spojin in njihovih zmesi. Gre za spektrofotometrično merjenje spremembe koncentracije DPPH[•]. Zmanjšanje koncentracije DPPH[•] je posledica reakcije med radikalom DPPH[•] in antioksidantom. Količina preostalega DPPH[•] v proučevanem sistemu je merilo za antioksidativno aktivnost določene spojine (Kedare in Singh, 2011). Koncentracijo preostalega DPPH[•] radikala se določi spektrofotometrično ali z elektronsko spinско resonanco (Magalhães in sod., 2008; Roginsky in Lissi, 2005).

Za razliko od ABTS⁺, DPPH[•] ne reagira z nekaterimi flavonoidi in aromatskimi kislinami, ki ne vsebujejo -OH skupin na obroču B oziroma imajo samo eno -OH skupino (Roginsky in Lissi, 2005).

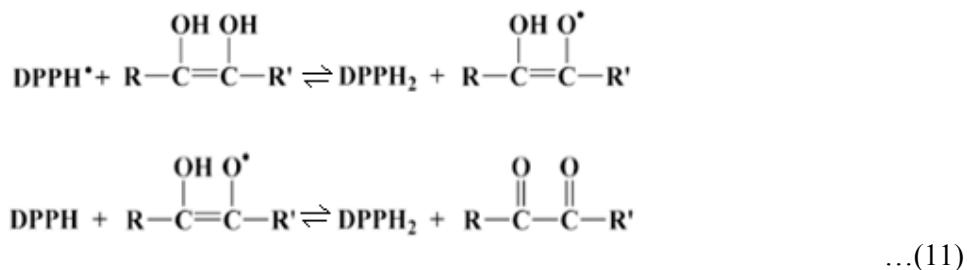
Molekula DPPH[•] (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) je stabilen prosti radikal, ki zaradi delokalizacije prostega elektrona okoli molekule, le-ta ne tvori dimer, kot bi se zgodilo z večino drugih radikalov. Delokalizacija povzroči tudi močno vijolično barvo raztopine

DPPH[•] v etanolu oziroma v metanolu. Absorpcijski maksimum je pri valovnih dolžinah približno 520 nm. Ko zmešamo raztopino DPPH[•] s snovjo, ki lahko odda vodikov atom, se tvori reducirana oblika molekule difenilpikrilhidrazin (DPPH₂) in vijolična barva raztopine se pretvori v bledo svetlo rumeno barvo, ki ostane zaradi prisotnosti pikrilne skupine. V sledeči enačbi je prikazan primer reakcije antioksidanta z DPPH[•] (Molyneux, 2004; Kedare in Singh, 2011).



Slika 7: Strukturna formula difenilpikrilhidrazila (DPPH[•]) (levo) in strukturna formula difenilpikrilhidrazina (DPPH₂, reducirana oblika) (desno) (Molyneux, 2004: 212)

Če molekula DPPH[•] reagira z eno molekulo antioksidanta, je stehiometrično razmerje reakcije 1:1. Ko pa ima antioksidant, s katerim reagira radikal DPPH[•], dve vezalni mesti, kot je na primer askorbinska kislina ali α-tokoferol, pa je stehiometrično razmerje reakcije med radikalom DPPH[•] in antioksidantom 2:1. Se pravi, da ena molekula antioksidanta reducira dve molekuli radikala DPPH[•], kot prikazujeta naslednji enačbi (Molyneux, 2004) :



Določanje antioksidativne aktivnosti se običajno izvaja v organskih topilih, predvsem v metanolu ali etanolu s spektrofotometričnim merjenjem absorbance pri 515-528 nm (Magalhães in sod., 2008) in je primerno za določanje tako hidrofilnih kot lipofilnih antioksidantov (Prior in sod., 2005). Koncentracijo DPPH[•] izberemo v območju med 50 in 100 µM zato, da so absorbance referenčne raztopine manjše od 1,0. pH reakcijske mešanice naj bi bil v območju med 5,0 in 6,5 (Molyneux, 2004; Kedare in Singh, 2011), vendar pa se s pH po večini ne ukvarjajo in njegov pomen še ni povsem jasen (Dawidowicz in sod., 2012; Karadag in sod., 2009). Reakcijski čas metode naj bi bil

30 min (Kim in sod., 2002; Molyneux, 2004), vendar so nekateri avtorji uporabljali tudi krajši čas, in sicer 5 in 10 min (Lebeau in sod., 2000; Schwarz in sod., 2001). Zopet drugi so prepričani, da je najbolje slediti reakciji do nekega ravnotežnega stanja (Yepez in sod., 2002; Lu in Foo, 2000).

Množino zreagiranega DPPH[•] v vzorcu lahko enostavno izračunamo iz Beer-Lambertovega zakona (Molyneux, 2004):

$$\Delta A = \epsilon * \Delta c * l; n_{DPPH2} = c * V_{\text{reakcijske zmesi}} \quad \dots(12)$$

ΔA ustreza razlike absorbance med referenčno raztopino, kateri je dodan samo DPPH[•] in raztopino, kjer je poleg DPPH[•] še antioksidant, ϵ je molarni ekstinkcijski koeficient DPPH[•] pri 515 nm, c je koncentracija nastalega DPPH₂, l je dolžina poti svetlobe skozi vzorec. Vrednost ϵ v metanolu ali etanolu pri 517 nm je v literaturi navedena med 11600 in 12500 L/(mol*cm) (Molyneux, 2004).

Za interpretiranje rezultatov meritev je poznan parameter, tako imenovan EC₅₀ (tudi IC₅₀) ali koncentracija učinkovitosti, ki je definirana kot koncentracija antioksidanta, potrebna za redukcijo 50 % prvočne koncentracije radikala DPPH[•] oziroma njegove barve (absorbance). Večja kot je antioksidativna aktivnost določenega antioksidanta, manjša je vrednost EC₅₀ (Kedare in Singh, 2011). Ta parameter je predstavil Brand-Williams s sodelavci (Brand-Williams in sod., 1995) in se pogosto pojavlja v literaturi (Kim in sod., 2002; Lebeau in sod., 2000; Lu in Foo, 2000). Čas, potreben, da se DPPH[•] reducira do vrednosti EC₅₀, se imenuje TEC₅₀. Antioksidativna učinkovitost naj bi tako bila kombinacija omenjenih dveh parametrov, EC₅₀ in TEC₅₀ (Villaño in sod., 2006). Drug način podajanja podatkov je, da se izračuna razmerje med množino DPPH[•], ki zreagira z ustrezno množino določenega antioksidanta. Antioksidanti z večjim razmerjem DPPH[•]/antioksidant, so bolj učinkoviti (Molyneux, 2004). Antioksidativno učinkovitost pa lahko izrazimo tudi kot TE (Trolox ekvivalenti) indeks, kjer antioksidativno učinkovitost analiziranih fenolnih raztopin primerjamo s standardnim antioksidantom Trolokom (Abram in sod., 2010; Villaño in sod., 2006; Roginsky in Lissi, 2005; Karadag in sod., 2009).

2.2.6.5.1 Kinetični vpliv na merjenje antioksidativnega potenciala z radikalom DPPH[•]

Kinetiko reakcije antioksidantov z radikalom DPPH[•] povezujejo z dvema mehanizmoma delovanja antioksidantov, in sicer na podlagi prenosa vodikovega atoma in na podlagi prenosa elektrona. PHA reakcije temeljijo na sposobnosti antioksidanta, da donira H atom prostemu radikalu in ga tako inaktivira. Pri PE reakcijah pa antioksidant stabilizira DPPH[•] radikal tako, da donira elektron. Reaktivnost PE reakcij temelji na deprotonaciji in ionozacijskem potencialu reaktivne funkcionalne spojine. So počasnejše od PHA reakcij in so odvisne od pH topila. Z naraščajočim pH se namreč ionizacijski potencial manjša, kapaciteta prenosa elektrona se pa z deprotonacijo veča. PE reakcije so odvisne od pH topila (Prior in sod., 2005; Pérez-Jiménez in Saura-Calixto, 2006; Musialik in sod., 2008). V nepolarnih topilih oziroma topilih, ki ne podpirajo ionizacije potekajo pretežno PHA reakcije (dioksan, heksan...), v polarnih topilih, ki podpirajo ionizacijo pa lahko potekajo tako PHA kot PE reakcije (alkoholi, voda). Zaradi tega reakcije antioksidantov z DPPH[•] v polarnih topilih potekajo mnogokrat hitreje kot v nepolarnih. Na kinetiko reakcije radikala DPPH[•] s fenolom vpliva več dejavnikov, in sicer kislota fenolnih -OH skupin, polarnost medija, ionizacijski potencial fenolnih anionov, sposobnost fenola donirati vodikovo vez in sposobnost topila sprejeti vodikovo vez (Musialik in sod., 2008).

Določevanje antioksidativnega potenciala z radikalom DPPH[•] je relativno hitra metoda. Nekateri antioksidanti, kot npr. askorbinska kislina, reagirajo zelo hitro z radikalom DPPH[•] in ravnotežje (ko je absorbanca konstantna) se vzpostavi v nekaj sekundah. Drugi antioksidanti pa reagirajo zelo počasi in za vzpostavitev ravnotežja je potrebno več ur (Brand-Williams in sod., 1995). Nekateri avtorji delijo antioksidante glede na kinetično obnašanje na: hitre (<5 min), srednje hitre (5-30 min) in počasne antioksidante (>30 min) (Huang in sod., 2005; Brand-Williams in sod., 1995).

Pri proučevanju kinetičnega vpliva na določen AOP v etanolni raztopini z radikalom DPPH[•] se je ugotovilo, da polifenoli in vina kažejo relativno počasno kinetiko. Najpočasnejšo so določili pri cianidinu (antocianin), ki je v dveh urah, kar je dolgo za to vrsto metode, reduciralo manj kot 75 % radikala DPPH[•]. Nekoliko hitrejšo kinetiko so prikazali pri flavonolih, kot sta (+)-catehin in (-)-epicatehin, ki sta v dveh urah reducirala manj kot 90 % radikala DPPH. Vsa tri analizirana vina sort cabernet sauvignon, modri pinot in modra frankinja pa so kazala zelo podobno kinetiko, ki pa je bila prav tako relativno počasna. Le približno 80 % radikala DPPH[•] se je reduciralo po dveh urah (Košmerl in Cigić, 2008).

Za protokatehujsko kislino in njene derivate so ugotovili, da je hitrost reakcije in določena antioksidativna učinkovitost precej večja v bolj polarnih topilih, kot sta metanol in etanol, kot pa v manj polarnem acetolu (Saito in sod., 2004).

Kurkumin in nekateri drugi izbrani antioksidanti reagirajo za štiri velikostne razrede (10000-krat) hitreje v metanolu in etanolu, kot pa v manj polarnih etil acetatu in dioksanu. Po dodatku ocetne kisline v alkoholne raztopine, ki je rezultirala v protonaciji fenolov, je

bila hitrost reakcije v metanolu in etanolu praktično enaka hitrosti reakcije v etil acetatu in dioksanu (Litwinienko in Ingold, 2004).

Dodatek vode v organsko topilo še dodatno poveča reakcijsko hitrost DPPH[•] s troloxom (Musialik in sod., 2008).

V mešanici vode in etanola (1:1) so ugotovili, da pri višjem pH poteka reakcija med DPPH[•] in troloxom hitreje (Friaa in Brault, 2006).

Z elektronsko spinско resonanco so ugotovili, da so reakcije med DPPH[•] in antioksidanti, kot so trolox, α -tokoferol, askorbinska kislina in galna kislina, hitrejše v mešanici vode in etanola kot pa v čistem alkoholu. Proučevali so prav tako vpliv vode v reakcijski zmesi voda/etanol na potek reakcije z radikalom DPPH[•]. Ugotovili so, da prisotnost 50 % vode v zmesi ugodno vpliva na lipofilne in hidrofilne antioksidante in njihovo reakcijo z radikalom DPPH[•] ter, da se z večanjem vsebnosti vode v reakcijski zmesi veča antioksidativna aktivnost. Z vsebnostjo vode nad 60 % se radikal DPPH[•] obori, kar pa ni več sprejemljivo za določanje antioksidativne aktivnosti antioksidantov (Staško in sod., 2007).

Sharma in Bhat(2009) sta v svoji študiji prikazala vpliv topila in pH reakcijske zmesi na DPPH metodo. Preizkus sta izvedla s tremi različnimi antioksidanti, in sicer z askorbinsko kislino, BHT in propil galatom. Kot topilo sta uporabila metanol in mešanico metanola z 0,1 M acetatnim pufrom pH 5,5. Vzorce sta inkubirala v temi, pri temperaturi 30 °C. Uporabila sta 50 μ M raztopino DPPH[•] v metanolu in po 30 minutah inkubacije izmerila absorbanco vzorcev pri 517 nm. Največji vpliv topila sta določila pri BHT, ki je imel po 30 min večjo antioksidativno učinkovitost v mešanici metanola z acetatom kot v samem metanolu. Reakcija BHT z radikalom DPPH[•] je potekala najdlje, in sicer po 90 minutah še vedno ni bila zaključena. Na podlagi dobljenih rezultatov sta pripisala velik vpliv pH reakcijske zmesi, vrsti topila in času, po katerem merimo antioksidativno učinkovitost antioksidantov z radikalom DPPH[•], kot tudi njegovi občutljivosti na svetlobo in omejenosti glede topnosti (Sharma in Bhat, 2009).

Bartasiute in sodelavci(2007) so za namen določitve antioksidantov po kromatografski ločbi uporabili DPPH[•] v citratnem pufru pH 7,4. Študija je pokazala, da je reakcija med kavno kislino in prostim radikalom DPPH[•] potekla hitreje kot v 2 sekundah v mešanici metanola in vodnega pufra, medtem ko je hitrost v čistem metanolu manjša. Enake rezultate so določili tudi pri izoevgenuolu. Torej reakcije so potekale hitreje v mediju s prisotno vodo kot v čistem metanolu.

Dawidowicz in sod. so prišli do rezultatov, da v topilih, kot so etil acetat, dioksan in kloroform, reakcija med BHT in radikalom DPPH[•] poteka počasneje kot v metanolu. Vpliv prisotnosti H₃O⁺ ionov pa je odvisen predvsem od koncentracije, načeloma se z naraščajočo koncentracijo kationov ionov reakcija med DPPH[•] in BHT upočasnuje, vendar pa so rezultati pokazali, da se z dvigom pH nad 4,15 reakcija pospeši. Hitrost reakcije med DPPH[•] in BHT se poveča tudi po dodatku vode do 5 % deleža v testno raztopino (Dawidowicz in sod., 2012).

Kljub velikemu številu raziskav, iz katerih je razvidno, da ima sestava topila velik vpliv na določeno antioksidativno aktivnost z DPPH[•], praktično ni narejenih študij, kjer bi analizirali vpliv mešanice različnih pufrov in alkoholov na določeno antioksidativno aktivnost modelnih antioksidantov in mešanic polifenolnih antioksidantov v realnih vzorcih.

2.3 POMEMBNE SORTNE ZNAČILNOSTI IZBRANIH VZORCEV VIN

2.3.1 Malvazija

Bela sorta vinske trte (*Vitis vinifera*) (ime izhaja iz njene domovine Male Azije) je najbolj razširjena v Italiji, čeprav raste tudi v Španiji, na Portugalskem, v Avstriji, Nemčiji in v državah na področju nekdanje Jugoslavije. Lahko daje velik pridelek, primerna je za zvrsti, sortna vina in vina posebne kakovosti (desertno vino). Čeprav je precej nagnjena k oksidaciji, lahko z ustreznimi vinogradniškimi in enotehnološkimi postopki zagotovimo odlična, sveža, mlada vina (Plahuta, 2004). Vino je slavnato rumene barve z zelenimi odsevi. Ima suh, svež, zaokrožen okus in vonj po marelicah, breskvah, eksotičnem sadju in belem popru (Nemanič, 1996).

2.3.2 Laški rizling

Bela sorta vinske trte (*Vitis vinifera*), ki jo v velikih količinah gojijo v Italiji, srednji in vzhodni Evropi (Plahuta, 2004). Označujejo jo kot nepravi rizling (Nemanič, 1996). Izvira iz Francije, kjer ni priljubljena. Ob primerni tehnologiji daje odlična osvežajoča vina, ki zlasti v drugem letu in kasneje dobijo značilno aroma. Je pozno dozorevajoča sorta, ki obilno rodi. Mošt ima od 16 do 22 % sladkorja in 6 do 12 g/L skupnih kislin. V Sloveniji ga gojijo v vseh vinorodnih deželah in je najbolj razširjena sorta na Slovenskem (Plahuta, 2004). Pri mladih kakovostnih vinih so barve od rumenkasto, zelenkaste do zlato rumene in zlate pri vinih posebne kakovosti, pridelanih iz prezrelega grozdja (pozna trgatev, ledeno vino, suhi jagodni izbor...). Pri slabših letnikih se pojavlja enostaven vonj, pri boljših pa sestavljen vonj iz šopka vonjav, kjer najdemo vonj po limoni, po dozorevajočih jabolkih in po različnem cvetju. V zrelih vinih pa se nežni cvetlični in sadni vonji spremenijo v plemenite vonjave, ki nas spominjajo na vonje po suhem listju, čajih, marelici ali breskvi, v mladih vinih posebne kakovosti na mandarine, pomaranče, pri arhivskih vinih pa na orehe, suhe fige in podobno. Ta sorta ni znana po visokih skupnih kislinah, zato daje to vino nevtralen, toda uravnotežen okus, ki daje vtis lahkosti, živahnosti, toda po požirku kmalu izgine (Nemanič, 1996).

2.3.3 Rumeni muškat

Obstaja skoraj 200 sort grozdja muškat, čeprav so pomembnejše štiri sorte. Iz grozdja muškat so odlična peneča vina, desertna vina, suha mirna vina itd. (Plahuta, 2004). Velja za najstarejšo sorto, kar jih pozna človeštvo. Prihaja iz Male Azije (Nemanič, 1996). Gojijo ga v Španiji, Italiji, JAR itd. V Sloveniji največ gojimo prednika muscat blanc à petits grains – rumeni muškat, ki daje odlična vina predvsem v vinorodnem okolišu Bela krajina, Štajerska Slovenija in Slovenska Istra (Plahuta, 2004; Nemanič, 1996). Sorta zahteva odlične lege, kamnita ali peščena zračna tla z manj apna. Težka tla in vetrovna lega ji ne ustrezajo (Nemanič, 1996). Dozoreva pozno, nekateri kloni tudi zgodaj, mošt dosega 20-24 % sladkorja. Daje izredno aromatična vina, že v jagodah je izjemno močno razvita aromatičnost (Plahuta, 2004). Vino ima zlato barvo z rumeno slamenatimi odtenki. Prevladuje muškatni vonj, toda zaznavna je tudi svežina limone, vonj vrtnic, vanilije, breskve in cimeta. S to sorto si nekateri kletarji pomagajo za žlahtnjenje sadnih arom, denimo vin sort renski rizling, zeleni silvanec, beli pinot ter drugih (Nemanič, 1996).

2.3.4 Modra frankinja

Rdeča sorta vinske trte (*Vitis vinifera*) je razširjena v številnih evropskih državah. Pri nas je posebej razširjena v Posavju. Nezahtevna sorta, ki srednje pozno zori, daje visoke hektarske donose. Ima majhne jagode. Iz grozdja sorte modra frankinja dobimo srednje močna alkoholna vina, ki so s kislinami precej bogata (mošt ima 15-18 % sladkorja in 7-8 g/L skupnih kislin) (Plahuta, 2004). Jagodna kožica ima bogato fenolno sestavo (barvne in taninske snovi) in s strokovno vodeno maceracijo lahko dobimo odlično mlado vino. Dobri letniki so primerni za daljše zorenje, po katerem dobimo krepko, intenzivno obarvano rdeče vino (Nemanič, 1996). Intenzivna rubinasto rdeča barva dolgo ohrani mladosten videz, saj se opečnati prameni pojavijo šele po nekaj letih zorenja. Ima sortno značilen, blag, topel vonj, ki je pri mladih vinih sadnega značaja, v zrelih pa spominja na vonj po usnju, praženi kavi in čokoladi. Če grozdje doseže primerno slatkorno stopnjo, lahko daje odlična rdeča vina. Kakovostni letniki omogočajo vina izredno polnega okusa s harmoničnim razmerjem med tanini in kislino (Nemanič, 1996). Vino je podobno sorti modri pinot (Plahuta, 2004). Modra frankinja je primerna za tipiziranje in je zastopana v metliški črnini, cvičku, rdečem bizeljčanu, virštanjčanu in rdečem konjičanu, lahko je tudi osnova penečih in rosé vin (Plahuta, 2004; Nemanič, 1996).

2.3.5 Modri pinot

Rdeča sorta vinske trte (*Vitis vinifera*) izvira iz Burgundije v Franciji. Gojijo jo v Franciji, Italiji, Nemčiji, Kaliforniji v ZDA, Avstraliji, JAR, Novi Zelandiji in tudi pri nas (Plahuta, 2004). Pri nas jo gojimo v vinorodnideželi Posavje in na Štajerskem. Zgodaj dozoreva, zato je primerna za hladnejša podnebja. Pridelek je na vinski trti in v vinski kleti precej občutljiv. Mošt ima 20 do 24 % sladkorja. Daje šibko obarvana rdeča vina z značilno

aromo. Primerno je kot mlado vino, ob ustremnem zorenjulahko doseže izjemno kakovost. Pogosto se ga predela tudi v peneča vina in rosé vina (Plahuta, 2004; Nemanič, 1996; Šikovec, 1996). Grozdje je sorazmerno siromašno s tanini in povprečno obarvano. Pomanjkanje sonca pri gojenju trte se izraža v odsotnosti vonjev in mehkobi taninov v vinu (Nemanič, 1996). Vino je svetlejše rubinaste rdeče barve, ki z razvojem dobiva bakrene in kavno rjave odtenke. Daje značilno, lahko razpoznavno vinsko aromo. Mlada vina imajo vonj po jagodičju in češnji, z razvojem dobijo rastlinski vonj po humusu, gomoljiki in kavi, v zadnji fazi pa se razvije živalski vonj po usnju in krvnemu. Uspela vina so glicerolno bogata, skladna, polna in vsebujejo mehke tanine (Nemanič, 1999; Šikovec, 1996).

2.3.6 Refošk

Rdeča sorta vinske trte (*Vitis vinifera*). Za tla ni izbirčen, uspeva na težkih, siromašnih in kamnitih tleh (Nemanič, 1996). Rodi močno obarvano grozdje z okusom po travi in začimbah ter z rahlo grenkim pookusom. Koncentracija sladkorja v moštu je okrog 75 °Oe in je bogat s kislinami (Plahuta, 2004). Refošk nima prave osnove za zorenje, čeprav je po jabolčno-mlečnem razkisu na pomlad bolj blag in deluje že zrelo (Nemanič, 1996). Izvira iz Furlanije, raste tudi v predelih Colli, pa tudi v Kaliforniji v ZDA, v Franciji itd. Eden izmed klonov raste v okolici Trsta, kjer ga imenujejo terrano. Slovenski refošk se razlikuje od italijanskih različic po rodnosti in okusu. Pri nas ga gojijo v vinorodnih okoliših Slovenske Istra in Kras, kjer daje vino teran PTP. Daje vina z izjemno kompleksnostjo aromе in okusa v odvisnosti od vinorodnega okoliša (Plahuta, 2004). Vino ima intenzivno vijoličasto barvo (Nemanič, 1996).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorci

Za poskus smo izbrali vrhunska vina ZGP, sort:

- malvazija (suho vino, št. serije: 02/13000, reg. št. 60 – 1204/2010, alk. 12,5 % vol., letnik 2009, pridelal in polnil: Vinakoper d.o.o., Slovenska Istra, Debeli rtič),
- laški rizling (suho vino, št. serije 01, št. steklenic v seriji 42000, št. odločbe: MB – 603/10/5, alk. 12,5 % vol., letnik 2009, pridelal in polnil: Jeruzalem Ormož d.o.o. (Puklavec & friends), vinorodni okoliš Štajerska Slovenija),
- rumeni muškat (polsladko vino, št. serije I/2010, št. steklenic v seriji 2800, datum polnitve: 23.3.2010, reg. št.: NM – I 39/2010, alk. 12,5 % vol., letnik 2009, pridelal in polnil: Jožef Prus, Bela krajina),
- refošk (suho vino, št. serije 01/33000, reg. št.: 60 – 282/2010, alk. 13,0 % vol., letnik 2009, pridelal in polnil: Vinakoper d.o.o., Slovenska Istra),
- modri pinot (suho vino, serijska št. polnitve: 1108003, št. steklenic v seriji: 13300, št. odločbe o oceni: MB – 2702/08/S, alk. 11,0 % vol., letnik 2007, pridelal in polnil: Ptujška klet d.o.o. (Pullus), Štajerska – Slovenija),
- modra frankinja (suho vino, št. serije 1/5 – 07, št. steklenic v seriji: 10000, reg. Št. odločbe: NM 703/2008, alk. 11,5 % vol., letnik 2007, pridelal in polnil: KZ Metlika z.o.o., Bela krajina)

in sledeče modelne antioksidante:

- askorbinska kislina (Sigma)
- trolox (Sigma)
- galna kislina (Merck)
- katehin (Sigma)
- kavna kislina (Sigma)
- kaftarna kislina
- žveplov dioksid (v obliki žveplove(IV) kisline, Merck).

3.1.2 Laboratorijska oprema

Za poskus smo potrebovali:

- UV-VIS spektrofotometer (Agilent Alpha Omega),
- termostat (Memmert),
- kivete (2,5 mL makro PS, Brand),
- avtomatske pipete,
- analitska tehnica (AE Adam equipment),
- štoparica,
- centrifugirke (15 mL, TPP),
- centrifugirke (50 mL, TPP),
- mikrocentrifugirke (2 mL, Brand),
- pH meter,
- kapalke,
- erlenmajerice,
- stojala za epruvete.

3.1.3 Reagenti

- 10 M raztopina NaOH: zatehtali smo 20 g NaOH v čašo in raztopili z mQ vodo v skupnem volumnu 50 mL,
- citronska kislina ($C_6H_8O_7$, M=210,14 g/mol, MERCK),
- mravljična kislina (98-100% CH_2O_2 , M=46,03 g/mol, KEMIKA),
- ocetna kislina (100% CH_3COOH , M=60,05 g/mol, MERCK),
- citratni pufer: v čašo smo zatehtali ustrezzo maso citronske kisline, prilili miliQ (mQ) vodo in ob mešanju z magnetnim mešalom uravnali pH z 10 M NaOH. Tako smo pripravili pufre s pH 2,75; 3,75; 4,75 in 5,75. Raztopine citratnega pufra z različnimi vrednostmi pH smo v bučki razredčili do oznake in tako pripravili 50 mM raztopine citratnega pufra, ki smo jih uporabili v poskusu.
- formiatni pufer smo pripravili po enakem postopku kot citratni pufer, le da smo zatehtali ustrezzo maso mravljične kisline in pH uravnali z 10 M NaOH na vrednosti pH 2,75; 3,75 in 4,75.
- acetatni pufer: v čašo smo zatehtali ustrezzo maso ocetne kisline, dodali mQ vodo in uravnali pH z 10 mM raztopino NaOH na vrednosti pH 3,75; 4,75 in 5,75. Tako pripravljene raztopine smo nato še razredčili z mQ vodo in pripravili 50 mM raztopine acetatnega pufra, ki smo jih uporabili v poskusu.
- etanol (C_2H_5OH , 96 %, MERCK),
- metanol (CH_3OH , MERCK),

- DPPH[•] (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl, C₁₈H₁₂N₅O₆, approx. 90 %, M=394,32 g/mol, SIGMA): v 50 mL centrifugirko smo zatehtali 9 mg DPPH[•] in dodali 45 mL metanola. Na ta način smo pripravili 500 µM raztopino DPPH[•]. Nato pa smo to razredčili, tako da smo zatehtali 15,8 g 500 µM raztopine DPPH[•] in dodali 23,7 g metanola ter tako pripravili 200 µM raztopino DPPH[•], ki smo jo uporabili v poskusu.
- Folin-Ciocalteu reagent (MERCK): tik pred uporabo smo ga razredčili z mQ vodo v razmerju 1:2 (1 mL FC reagenta + 2 mL mQ vode),
- 20% raztopina natrijevega karbonata (Na₂CO₃),
- vodna raztopina žveplove(IV) kisline (H₂SO₃, M=82,074 g/mol, MERCK).

3.2 METODE DELA

3.2.1 Določanje vsebnosti SO₂ v žveplovi(IV) kislini

V 250 mL erlenmajerico smo odpipetirali 200 µL vodne raztopine H₂SO₃ in dodali 24,8 mL mQ vode. Nato smo dodali 5 mL škrobovice, 5 mL raztopine žveplove(IV) kisline in takoj titrirali s standardno raztopino joda do modre barve. Na bireti smo odčitali volumen porabljenega joda in s pomočjo matematične zvezne 13 izračunali masno koncentracijo (mg/L) SO₂ v žveplovi(IV) kislini.

$$\gamma_{(\text{SO}_2)} = a * c(I_2) * M * 1000 / (n * V) \quad \dots(13)$$

V kateri pomeni a volumen standardizirane raztopine joda (mL), c(I₂) koncentracijo joda (0,007284 mol/L), M molsko maso SO₂ (64,06 g/mol), n molsko razmerje med jodom in žveplovim dioksidom (n = 1) in V volumen vzorca vina (25 mL) (Košmerl in Kač, 2007).

3.2.2 Karakterizacija vin

3.2.2.1 Določanje žveplovega dioksida v vinih po Ripperju

a.) Določanje prostega SO₂

V 250 mL erlenmajerico smo odpipetirali 25 mL vzorca vina, dodali 5 mL škrobovice in premešali. Nato smo dodali 5 mL raztopine žveplove(VI) kisline in takoj titrirali s standardizirano raztopino joda do modre barve, ki mora biti obstojna približno 20 sekund. Na bireti smo odčitali volumen porabljenega joda in s pomočjo matematične zvezne 13 izračunali masno koncentracijo prostega SO₂ v mg/L (Košmerl in Kač, 2007).

b.) Določanje skupnega SO₂

V 250 mL erlenmajerico smo odpipetirali 25 mL vzorca vina in dodali 25 mL 1 M raztopine NaOH, premešali in počakali točno 10 min, da je potekla reakcija hidrolize vezanega žveplovega dioksidu. Nato smo dodali 5 mL škrobovice, 10 mL raztopine žveplove(VI) kisline in takoj titrirali s standardizirano raztopino joda do modre barve, ki je mora biti obstojna približno 20 sekund. Koncentracijo skupnega SO₂ smo izračunali na enak način kot koncentracijo prostega SO₂ (Košmerl in Kač, 2007).

c.) Izračun vezanega SO₂

Koncentracijo vezanega SO₂ smo izračunali iz razlike izračunanih koncentracij skupnega in prostega SO₂ v vzorcu vina, kot je razvidno iz formule 14 (Košmerl in Kač, 2007).

$$\gamma_{\text{SO}_2} (\text{vezani}) = \gamma_{\text{SO}_2} (\text{skupni}) - \gamma_{\text{SO}_2} (\text{prosti}) \quad \dots(14)$$

3.2.2.2 Določanje barvnih parametrov

Osnovne barvne parametre, kot so intenziteta barve, ton barve in delež rdeče barve v obliki flavilijevega kationa, določamo spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri različnih valovnih dolžinah. Obarvanost belih vin smo izmerili direktno (brez predhodne razredčitve) s spektrofotometrom, in sicer tako, da smo odpipetirali vzorec vina v kvarčno kiveto in mu izmerili absorbanco pri valovni dolžini 420 nm. Za določanje barve rdečih vin pa smo vzorce predhodno ustrezno razredčili s pufrno raztopino pH 3,4. Vino sorte refošk smo razredčili 10-krat, vino sort modra frankinja in modri pinot pa 5-krat. pH pufrne raztopine, ki smo jo pripravili tako, da smo mQ vodi dodajali 0,1 N H₂SO₄, naj bi ustrezal pH vrednosti posameznega vina, katerega smo predhodno določili. Nato smo vzorcem pomerili absorbanco pri valovnih dolžinah 420 nm, 520 nm in 620 nm ter s pomočjo matematičnih relacij in ob upoštevanju razredčitvenega faktorja, izračunali osnovne barvne parametre vin (Košmerl in Kač, 2007).

a.) Intenziteta barve (I):

Bela vina:

$$I = A_{420} \quad \dots(15)$$

Rdeča vina:

$$I = \Sigma (A_{420} + A_{520} + A_{620}) \quad \dots(16)$$

b) Ton barve:

$$\text{Ton} = A_{420}/A_{520} \quad \dots(17)$$

c) Delež (%) rdeče barve, tj. prostih in vezanih antocianinov v obliki flavilijevega kationa (dA_F):

$$dA_F(\%) = (A_{520} - (A_{420} + A_{620})/2) * 1/A_{520} * 100 \quad \dots(18)$$

č) Delež (%) rdeče barve pri posamezni valovni dolžini:

$$\text{pri } 420\text{nm: } dA_{420} (\%) = (A_{420}/I) * 100 \quad \dots(19)$$

$$\text{pri } 520\text{nm: } dA_{520} (\%) = (A_{520}/I) * 100 \quad \dots(20)$$

$$\text{pri } 620\text{nm: } dA_{620} (\%) = (A_{620}/I) * 100 \quad \dots(21)$$

3.2.2.3 Določanje pH vin

V 100 mL plastično čašo smo nalili približno 60 mL vina in jo namestili na pH meter tako, da sta bila mešalo in elektroda potopljena v vzorec. Ko se je pH meter umiril, smo na aparatu odčitali izmerjeno vrednost pH vina.

3.2.3 Karakterizacija topil

3.2.3.1 Določanje vpliva topila na absorbanco radikala DPPH[•] pri 520 nm

Za test smo uporabili različna topila, in sicer citratni pufer pH 2,75; pH 3,75; pH 4,75; pH 5,75; formiatni pufer pH 2,75; pH 3,75; pH 4,75; acetatni pufer pH 3,75; pH 4,75; pH 5,75 in metanol. Vse eksperimente smo opravili v dveh neodvisnih paralelkah, in sicer tako, da smo v 2 mL centrifugirke dodali 1 mL 200 µM radikala DPPH[•] v metanolu, 900 uL topila (50 mM pufer ali MeOH) in 100 uL mQ vode ter po 15 minutah inkubacije pri 25 °C izmerili absorbanco v 2,5 mL PS kivetah pri valovni dolžini 520 nm.

3.2.3.2 Določanje vpliva topila na absorbanco DPPH₂ pri 520 nm v odvisnosti od pH medija

V 15 mL centrifugirko smo zatehtali 20,1 mg askorbinske kisline in dodali 11,4 mL mQ vode. Na ta način smo pripravili 10 mM raztopino askorbinske kisline. Za test smo uporabili različna topila, in sicer: acetatni pufer pH 3,75; 4,25; 4,75; 5,25; 5,75 in metanol.

Eksperiment smo izvedli tako, da smo v vsako 2 mL centrifugirko odpipetirali 900 uL posameznega topila (pufer ali MeOH), dodali 1000 µL 200 µM radikala DPPH[•] v MeOH in 100 µL 10 mM askorbinske kisline. Vse skupaj smo dobro premešali in po 10 min inkubacije pri 25 °C prenesli v 2,5 mL PS kivete ter izmerili absorbanco pri valovni dolžini 520 nm. V danih razmerah smo s petkratnim molarnim presežkom askorbinske kisline nad DPPH[•], slednjega popolnoma reducirali v DPPH₂.

3.2.3.3 Določanje vpliva vrste in pH topila na stabilnost radikala DPPH[•]

Kot topilo smo uporabili 50 mM raztopino acetatnega pufra različnih pH vrednosti, in sicer pH 3,75; pH 4,75; pH 5,25; pH 5,75 in metanol. V 15 mL centrifugirke smo odpipetirali 4,5 mL topila, dodali 5 mL 200 uM radikala DPPH[•] v MeOH in 0,5 mL mQ vode. Vse eksperimente smo izvedli v dveh neodvisnih paralelkah. Tako pripravljene vzorce smo termostatirali pri 25 °C in po 30 min, 60 min, 120 min, 300 min in 1440 min izmerili absorbanco pri valovni dolžini 520 nm.

3.2.4 Vpliv medija in pH medija na kinetiko reakcije modelnih antioksidantov in vin z radikalom DPPH[•]

Kot vzorec smo v testu uporabili predhodno pripravljene raztopine modelnih antioksidantov (preglednica 3) in ustrezno razredčena vina (preglednica 4). Uporabili smo različna topila, in sicer 50 mM raztopino acetatnega pufra pH 3.75, pH 4.75, pH 5.25, pH 5.75 in metanol. V 15 mL centrifugirke smo odpipetirali 4,5 mL topila, dodali 5 mL 200 µM radikala DPPH[•] in 0,5 mL vzorca razredčenega v mQ vodi. Prav tako smo naredili kontrolno raztopino, kjer smo namesto vzorca dodali mQ vodo. Nato smo v 2,5 mL PS kivetah merili absorbanco pri valovni dolžini 520 nm po 30 min, 60 min, 120 min, 300 min in 1440 min. Delali smo v dveh neodvisnih paralelkah, raztopine pa smo do merjenja absorbance termostatirali na 25 °C.

Preglednica 3: Priprava modelnih antioksidantov za določanje vpliva topila in pH na kinetiko reakcije antioksidantov z radikalom DPPH[•]

| STANDARDI | PRIPRAVA |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ASKORBINSKA KISLINA | V 15 mL centrifugirko smo zatehtali 17,6 mg askorbinske kisline in dodali 10 mL mQ vode, nato pa to raztopino razredčili tako, da smo odpipetirali 0,7 mL le-te raztopine in dodali 14 mL mQ vode. Tako smo pripravili 0,48 mM raztopino, ki smo jo v testu še 20-krat razredčili. |
| TROLOX | V 15 mL centrifugirko smo zatehtali 25 mg troloxa in dodali 10 mL etanola, nato pa to raztopino razredčili tako, da smo odpipetirali 0,7 mL le-te raztopine in dodali 14 mL mQ vode. Tako smo pripravili 0,48 mM raztopino, ki smo jo v testu še 20-krat razredčili. |
| GALNA KISLINA | V 15 mL centrifugirko smo zatehtali 5,5 mg galne kisline in dodali 12,7 mL mQ vode, nato pa to raztopino razredčili tako, da smo odpipetirali 1 mL le-te raztopine in dodali 14 mL mQ vode. Tako smo pripravili 0,17 mM raztopino, ki smo jo v testu še 20-krat razredčili. |
| KATEHIN | V 15 mL centrifugirko smo zatehtali 7,6 mg katehina in dodali 10,3 mL etanola, nato pa to raztopino razredčili tako, da smo odpipetirali 1 mL le-te raztopine in dodali 9 mL mQ vode. Tako smo pripravili 0,25 mM raztopino katehina, katere pa smo odpipetirali 7 mL in ji dodali še 7 mL mQ vode. Tako smo pripravili 0,13 mM raztopino, ki smo jo v testu še 20-krat razredčili. |
| KAVNA KISLINA | V 15 mL centrifugirko smo zatehtali 4,6 mg kavne kisline in dodali 10 mL etanola, nato pa to raztopino razredčili tako, da smo odpipetirali 1 mL le-te raztopine in dodali 12 mL mQ vode. Tako smo pripravili 0,2 mM raztopino, ki smo jo v testu še 20-krat razredčili. |
| KAFTARNA KISLINA | V 15 mL centrifugirko smo odpipetirali 10 uL 70 mM kaftarne kisline in dodali 2320 uL mQ vode. Tako smo pripravili 0,3 mM raztopino, ki smo jo v testu še 20-krat razredčili. |
| ŽVEPLOV DIOKSID | V 15 mL centrifugirko smo odpipetirali 200 uL H ₂ SO ₃ s koncentracijo 31,6 g/L SO ₂ in dodali 11,8 mL mQ vode, nato pa to raztopino razredčili tako, da smo odpipetirali 1 mL le-te raztopine in dodali 9 mL mQ vode. Tako smo pripravili 0,82 mM raztopino, ki smo jo v testu še 20-krat razredčili. |

Preglednica 4: Končni razredčitveni faktorji pri določanju vpliva topila in pH na kinetiko reakcije vin z radikalom DPPH[•]

| VINO | FAKTOR R (končna razredčitev v testu) |
|------------------------|---------------------------------------|
| malvazija | 80 |
| laški rizling | 120 |
| rumeni muškat | 160 |
| refošk | 1250 |
| modri pinot | 833,3 |
| modra frankinja | 666,7 |

3.2.5 Vpliv koncentracije antioksidantov v testu in razredčitve vin na določeno antioksidativno aktivnost

Modelne antioksidante smo predhodno pripravili (preglednica 5) in vina primerno razredčili z mQ vodo (preglednica 6). Za umeritvene krivulje v metanolu (5 % vode) smo v mikrocentrifugirko odpipetirali 1 mL 200 µM radikala DPPH[•] v MeOH, dodali 900 µl MeOH in različne volumne modelnih antioksidantov in vin (razredčenih z mQ vodo) ter razliko do končnega volumna 2 mL dopolnili z mQ vodo. Za analizo v mešanici metanola in acetatnega pufra smo v mikrocentrifugirko odpipetirali 1 mL 200 µM radikala DPPH[•] v MeOH, dodali 450 µl 100 mM acetatnega pufra pH 5,25 in različne volumne modelnih antioksidantov in vin ter razliko do končnega volumna 2 mL dopolnili z mQ vodo. Vzorcem smo po 60 min inkubacije na 25 °C izmerili absorbanco pri valovni dolžini 520 nm.

Preglednica 5: Priprava modelnih antioksidantov za določanje vpliva koncentracije antioksidantov v testu na določeno antioksidativno aktivnost vzorcev z radikalom DPPH[•]

| STANDARDI | PRIPRAVA |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| GALNA KISLINA | V 50 mL centrifugirko smo zatehtali 10,3 mg galne kisline in dodali 34,3 mL mQ vode, nato pa to razredčili tako, da smo odpipetirali 1 mL le-te raztopine in dodali 4 mL mQ vode. Tako smo pripravili 0,35 mM raztopino, ki smo jo nato v testu še razredčili. |
| KATEHIN | V 50 mL centrifugirko smo zatehtali 15,4 mg katehina in dodali 17,1 mL metanola, nato pa to razredčili tako, da smo odpipetirali 1 mL le-te raztopine in dodali 4 mL mQ vode. Tako smo pripravili 0,62 mM raztopino, ki smo jo nato v testu še razredčili. |
| KAVNA KISLINA | V 50 mL centrifugirko smo zatehtali 16,5 mg kavne kisline in dodali 16,5 mL metanola, nato pa to razredčili tako, da smo odpipetirali 1 mL le-te raztopine in dodali 4 mL mQ vode. Tako smo pripravili 1,11 mM raztopino, ki smo jo nato v testu še razredčili. |
| KAFTARNA KISLINA | V 15 mL centrifugirko smo odpipetirali 10 µL 70 mM kaftarne kisline in dodali 190 µL metanola, nato pa to razredčili tako, da smo tej raztopini dodali še 800 µL mQ vode. Tako smo pripravili 0,7 mM raztopino, ki smo jo nato v testu še razredčili. |
| ASKORBINSKA KISLINA | V 50 mL centrifugirko smo zatehtali 16 mg askorbinske kisline in dodali 16 mL mQ vode, nato pa to razredčili tako, da smo odpipetirali 1 mL le-te raztopine in dodali 4 mL mQ vode. Tako smo pripravili 1,14 mM raztopino, ki smo jo nato v testu še razredčili. |
| TROLOX | V 15 mL centrifugirko smo zatehtali 16,8 mg katehina in dodali 12 mL metanola, nato pa to razredčili tako, da smo odpipetirali 1 mL le-te raztopine in dodali 4 mL mQ vode. Tako smo pripravili 1,12 mM raztopino, ki smo jo nato v testu še razredčili. |
| ŽVEPLOV DIOKSID | V 15 mL centrifugirko smo odpipetirali 180 µL H ₂ SO ₃ s koncentracijo 31,6 g/L SO ₂ in dodali 11,82 mL mQ vode. Tako smo pripravili 7,42 mM raztopino, ki smo jo nato v testu še razredčili. |

Preglednica 6: Priprava razredčitev posameznih vin za določanje vpliva razredčitve vin na določeno antioksidativno aktivnost vzorcev z radikalom DPPH[•]

| VINO | PRIPRAVA RAZREDČITVE |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| REFOŠK | V 15 mL centrifugirko smo odpipetirali 0,43 mL vina in dodali 9,57 mL mQ vode. |
| MODRI PINOT | V 15 mL centrifugirko smo odpipetirali 0,64 mL vina in dodali 9,36 mL mQ vode. |
| MODRA FRANKINJA | V 15 mL centrifugirko smo odpipetirali 0,88 mL vina in dodali 9,12 mL mQ vode. |
| RUMENI MUŠKAT | V 15 mL centrifugirko smo odpipetirali 1 mL vina in dodali 1,7 mL mQ vode. |
| MALVAZIJA | V 15 mL centrifugirko smo odpipetirali 1 mL vina in dodali 0,3 mL mQ vode. |
| LAŠKI RIZLING | V 15 mL centrifugirko smo odpipetirali 1 mL vina in dodali 0,9 mL mQ vode. |

3.2.6 Vpliv deleža vode in pufra v mešanici z metanolom na določeno antioksidativno aktivnost katehina

V 50 mL centrifugirko smo zatehtali 16,4 mg katehina in dodali 18,2mL metanola, nato pa to raztopino razredčili tako, da smo odpipetirali 1 mL le-te raztopine in dodali 9 mL metanola. Tako smo pripravili katehin s koncentracijo 310,1 $\mu\text{mol/L}$ v metanolu. V 2 mL centrifugirke smo odpipetirali 1 mL metanolne raztopine radikala DPPH's koncentracijo 200 $\mu\text{mol/L}$. Preostanek do 1,93 mL smo dopolnili z metanolom in mQ vodo ali 100 mM acetatnim pufrom pH 5,25 in tako pripravili raztopine, ki so se razlikovale v volumskih % vode ali acetatnega pufra. Nato smo v reakcijsko zmes dodali 70 μl katehina s koncentracijo 310,1 $\mu\text{mol/L}$. Centrifugirke smo dobro premešali in termostatirali na 25°C ter po 60 min izmerili absorbanco pri valovni dolžini 520 nm. Pripravili smo tudi referenčne raztopine, kjer smo namesto raztopine katehina dodali MeOH. Vse eksperimente smo izvedli v dveh neodvisnih paralelkah.

3.2.7 Določanje koncentracije skupnih fenolnih spojin v vinih

3.2.7.1 Določanje skupnih fenolnih spojin v vinih s Folin-Ciocalteu reagentom

Priprava umeritvenih krivulj za določanje skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu reagentom z modelnimi antioksidanti in vini:

v vsako 2 mL centrifugirko smo odpipetirali različne volumne osnovnih raztopin modelnih antioksidantov (preglednica 7) in ustrezno razredčena vina (preglednica 8). Razliko do 1400 µl smo dopolnili z mQ vodo. Nato smo v centrifugirke dodali 300 µl Folin-Ciocalteu reagenta in premešali. Po 5 minutah smo dodali 300 µl 20 % raztopine Na₂CO₃ ter ponovno premešali. Po 90 minutah inkubacije na sobni temperaturi, smo vsebino centrifugirk prenesli v 2,5 mL PS kivete in izmerili absorbanco proti slepemu vzorcu pri valovni dolžini 765 nm. S pomočjo enačbe premice umeritvene krivulje z galno kislino in troloxom smo izračunali koncentracijo skupnih fenolnih spojin v vinih in jo izrazili kot ekvivalent galne kisline (mmol/L) in ekvivalent troloxa (mmol/L).

Preglednica 7: Standardi za pripravo umeritvenih krivulj za določanje skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu reagentom

| STANDARDI | PRIPRAVA |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ASKORBINSKA KISLINA | V 50 mL centrifugirko smo zatehtali 8,05 mg askorbinske kisline in dodali 50 mL mQ vode, nato pa to raztopino razredčili tako, da smo odpipetirali 1 mLle-te in dodali 9 mL mQ vode. Tako smo pripravili 0,09 mM raztopino. |
| KATEHIN | V 50 mL centrifugirko smo zatehtali 13,3 mg katehina in dodali 50 mL etanola, nato pa to raztopino razredčili tako, da smo odpipetirali 1 mLle-te in dodali 9 mL mQ vode. Tako smo pripravili 0,09 mM raztopino. |
| TROLOX | V 50 mL centrifugirko smo zatehtali 11,45 mg troloxa in dodali 50 mL etanola, nato pa to raztopino razredčili tako, da smo odpipetirali 1 mLle-te in dodali 9 mL mQ vode. Tako smo pripravili 0,09 mM raztopino. |
| KAVNA KISLINA | V 50 mL centrifugirko smo zatehtali 8,26 mg kavne kisline in dodali 50 mL etanola, nato pa to raztopino razredčili tako, da smo odpipetirali 1 mLle-te in dodali 9 mL mQ vode. Tako smo pripravili 0,09 mM raztopino. |
| KAFTARNA KISLINA | V 15 mL centrifugirko smo odpipetirali 10 µl 70 mM kaftarne kisline in dodali 2,32 mL mQ vode, nato pa to raztopino razredčili tako, da smo odpipetirali 1,2 mLle-te in dodali 2,4 mL mQ vode. Tako smo pripravili 0,1 mM raztopino. |
| ŽVEPLOV DIOKSID | V 15 mL centrifugirko smo odpipetirali 200 µL 3,16 % H_2SO_3 in dodali 11,8 mL mQ vode, nato pa to raztopino razredčili tako, da smo v centrifugirko odpipetirali 1 mL le-te in dodali 4 mL mQ vode. Tako smo pripravili 1,65 mM raztopino. |
| GALNA KISLINA | V 15 mL centrifugirko smo zatehtali 7,8 mg galne kisline kisline in dodali 50 mL mQ vode, nato pa to raztopino razredčili tako, da smo odpipetirali 1 mLle-te in dodali 9 mL mQ vode. Tako smo pripravili 0,09 mM raztopino. |

Preglednica 8: Razredčitve posameznih vin za pripravo umeritvenih krivulja določanje skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu reagentom

| VINA | PRIPRAVA RAZREDČITVE |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| MALVAZIJA | V 15 mL centrifugirko smo odpipetirali 3 mL vina in dodali 9 mL mQ vode. |
| LAŠKI RIZLING | V 15 mL centrifugirko smo odpipetirali 1 mL vina in dodali 5 mL mQ vode. |
| RUMENI MUŠKAT | V 15 mL centrifugirko smo odpipetirali 1 mL vina in dodali 7 mL mQ vode. |
| REFOŠK | V 15 mL centrifugirko smo odpipetirali 0,16 mL vina in dodali 9,84 mL mQ vode. |
| MODRI PINOT | V 15 mL centrifugirko smo odpipetirali 0,24 mL vina in dodali 9,76 mL mQ vode. |
| MODRA FRANKINJA | V 15 mL centrifugirko smo odpipetirali 0,3 mL vina in dodali 9,7 mL mQ vode. |

3.2.7.2 Določanje skupnih fenolnih spojin v vinih s spektrofotometričnim merjenjem v UV spektru

V 15 mL centrifugirkah smo razredčili bela vina z mQ vodo v razmerju 1:20, rdeča pa v razmerju 1:100. Vzorce smo nato odpipetirali v kvarčno kiveto in jim pomerili absorbanco pri valovih dolžinah od 260 do 400 nm.

4 REZULTATI

4.1 KARAKTERIZACIJA VIN

4.1.1 Razultati določanja žveplovega dioksida

4.1.1.1 Rezultati določanja vsebnosti SO₂ v žveplovih(IV) kislini

Volumen porabljenega joda 11,7 mL smo odčitali na bireti in iz matematične relacije 13, ob upoštevanju razredčitvenega faktorja 125 izračunali, da vsebuje žveplova(IV) kislina 31,6 g/L SO₂.

4.1.1.2 Rezultati določanja žveplovega dioksida v vinih po Ripperju

Preglednica 9: Koncentracije (mg/L) skupnega, prostega in vezanega SO₂ v izbranih sortah vin, določene po Ripperjevi metodi

| VINO | Koncentracija skupnega SO ₂ (mg/L) | Koncentracija prostega SO ₂ (mg/L) | Koncentracija vezanega SO ₂ (mg/L) |
|------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| modri pinot | 54 | 15 | 39 |
| modra frankinja | 70 | 25 | 44 |
| refošk | 52 | 33 | 19 |
| rumeni muškat | 191 | 47 | 144 |
| malvazija | 58 | 22 | 36 |
| laški rizling | 108 | 28 | 80 |

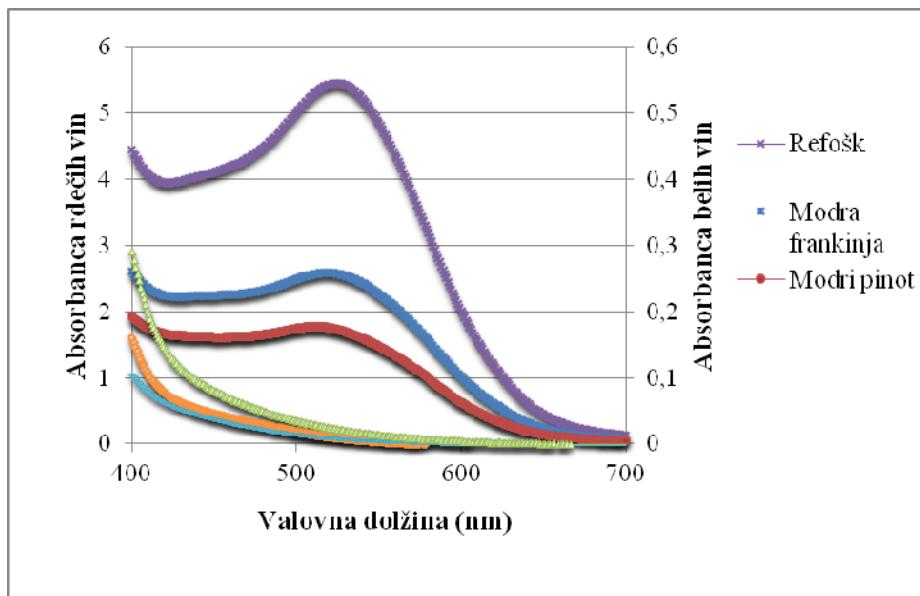
Vrednosti v preglednici 9 prikazujejo koncentracije skupnega, prostega in vezanega SO₂ (mg/L) v izbranih sortah vin. Največjo koncentracijo SO₂ med belimi vini smo določili vinu sorte rumeni muškat in najmanjšo vinu sorte malvazija. Pri rdečih vinih pa smo največjo koncentracijo SO₂ določili vinu sorte modra frankinja in najmanjšo vinu sorte refošk.

4.1.2 Rezultati določanja barvnih parametrov

Preglednica 10: Vrednosti barvnih parametrov izbranih sort vin

| VINO | R | Intenziteta barve | Ton barve | dA _F (%) | dA ₄₂₀ (%) | dA ₅₂₀ (%) | dA ₆₂₀ (%) |
|------------------------|----|----------------------|--------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| rumeni muškat | | 0,077 | | | | | |
| laški rizling | | 0,063 | | | | | |
| malvazija | | 0,143 | | | | | |
| refošk | 10 | 10,567 | 0,727 | 52,7 | 37,4 | 51,4 | 11,2 |
| modri pinot | 5 | 3,780 | 0,949 | 42,2 | 44,0 | 46,4 | 9,6 |
| modra frankinja | 5 | 5,434 | 0,868 | 44,9 | 41,3 | 47,6 | 11,1 |

Vzorce rdečih vin smo predhodno razredčili s pufrno raztopino pH 3,4, in sicer vino sorte refošk v razmerju 1:10, vina sorte modra frankinja in modri pinot pa v razmerju 1:5. Kot je razvidno iz preglednice 10 smo vinu belih sort določili le intenziteto barve. Največjo smo določili vinu sorte malvazija. Med rdečimi vini smo največjo intenziteto določili vinu sorte refošk, kateremu smo določili tudinajvečji delež odtenka rdeče barve (tj. prostih in vezanih antocianinov v obliki flavilijevega kationa). Največji ton barve smo določili vinu sorte modri pinot in vinu sorte refošk najmanjši. Z merjenjem deleža barve pri valovnih dolžinah 420 nm, 520 nm in 620 nm smo pri vseh treh rdečih vinih največje vrednosti izmerili pri valovni dolžini 520 nm, kar pomeni, da v vseh teh prevladujejo odtenki rdeče barve. Vrednosti so bile visoke tudi pri 420 nm, kjer prevladujejo odtenki rjave barve, predvsem pri vinu sorte modri pinot. Najmanjše vrednosti smo izmerili pri 620 nm, ki kažejo na odtenke modro-vijolične barve, ki pa so med vini v največji meri zastopani v vinu sorte refošk in modra frankinja.



Slika 8: Grafični prikaz absorbance izbranih vin v vidnem delu spektra za določanje barve vin

S slike 8 je razvidno, da smo za rdeča vina izmerili največjo absorbanco pri valovni dolžini 520 nm, kar pa predstavlja zastopanost odtenkov rdeče barve v vinih. Razvidno je tudi, da je razmerje med odtenki rdeče in rjave barve večje pri vinu sorte refošk, kot pri vinu sort modra frankinja in modri pinot. Pri belih vinih lahko rečemo, da smo največje vrednosti absorbanc vzorcev izmerili pri valovni dolžini 400 nm, kjer so že zaznavni odtenki zelene barve. Zaradi boljše preglednosti smo vrednosti absorbanc, izmerjenih v belih vinih, prikazali na sekundarni ordinatni osi.

4.1.3 Rezultati določanja pH vin

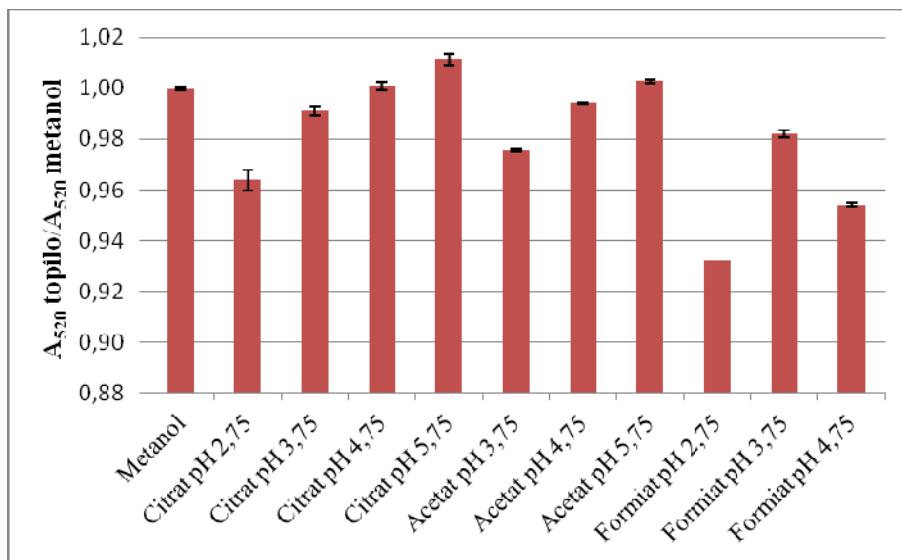
Preglednica 11: Vrednosti pH izbranih sort vin

| VINO | vrednost pH |
|-----------------|-------------|
| malvazija | 3,3 |
| laški rizling | 3,2 |
| rumeni muškat | 3,4 |
| refošk | 3,3 |
| modri pinot | 3,4 |
| modra frankinja | 3,5 |

Iz preglednice 11 je razvidno, da se pH posameznih vin gibljejo med 3,2 in 3,5. Podatke rdečih vin smo uporabili pri določevanju barve vin, saj smo osnovna vina redčili v pufrupH 3,4.

4.2 KARAKTERIZACIJA TOPIL

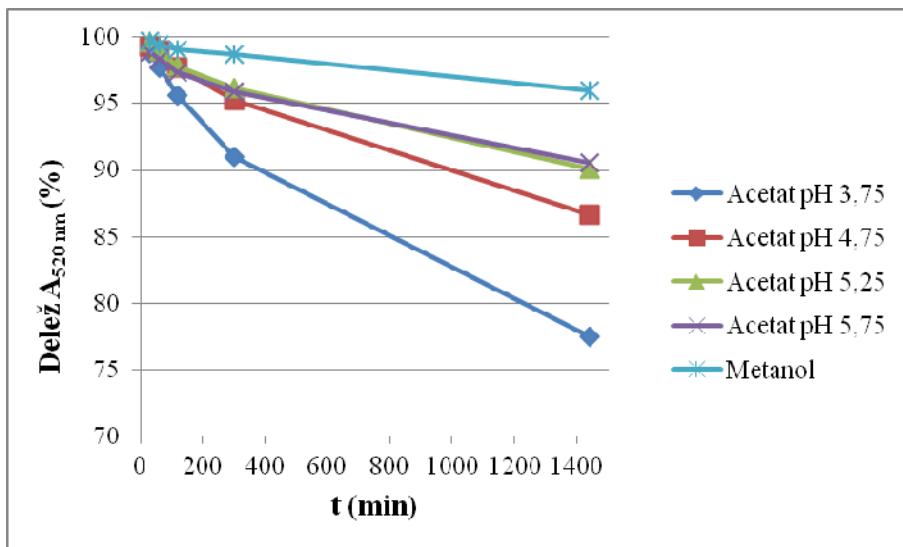
4.2.1 Rezultati vpliva topila na absorbanco radikala DPPH[•] pri 520 nm



Slika 9: Grafični prikaz vpliva topila na absorbenco 100 µM radikala DPPH[•] izmerjeno po 15 min inkubacije pri 25°C pri valovni dolžini 520 nm. Vrednosti absorbance so normalizirane na metanol in so izražene kot razmerje med absorbanco, pomerjeno v topilu in v metanolu, ki je 1.

S slike 9 je razvidno, da citratni pufer in acetatni pufer manj vplivata na absorbenco radikala DPPH[•] kot formiatni. Najmanjše odstopanje od absorbance DPPH[•] v metanolu smo določili za acetatni in citratni pufer pH 4,75 in 5,75 v mešanici z MeOH. Za formiatni pufer pH 2,75 smo določili kar 7 % manjšo absorbanco kot v MeOH.

4.2.2 Rezultati stabilnosti radikala DPPH[•] kot funkcije vrste in pH medija



Slika 10: Grafični prikaz vpliva pH na absorbanco radikala DPPH[•] pri inkubaciji v acetatnem pufru in metanolu pri 25°C v odvisnosti od časa

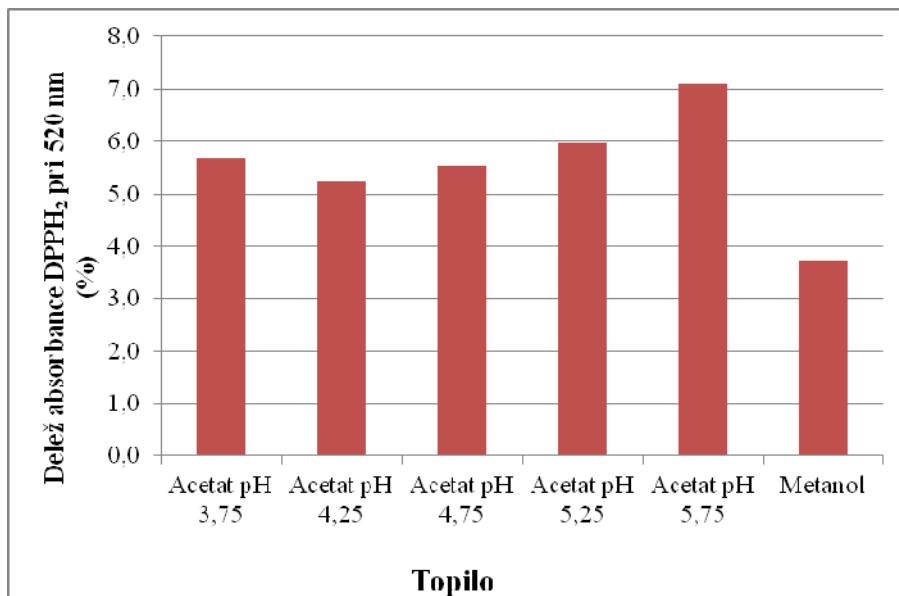
Delež A₅₂₀ smo izračunali s pomočjo matematične relacije 22:

$$A_{520} (\%) = \frac{At_x \text{ v ustreznem topilu}}{At_0 \text{ v ustreznem topilu}} * 100 \quad \dots(22)$$

Oznaka x pomeni 30 min, 60 min, 120 min, 300 min ali 1440 min inubacije v ustreznem topilu kot je metanol ali acetatni pufer različnih pH vrednosti.

Na sliki 10 so prikazani rezultati, ki so povprečne vrednosti rezultatov dveh meritev, in sicer opazimo, da je radikal DPPH[•] najbolje obstojen v metanolu ter, da se stabilnost samega radikala DPPH[•] proporcionalno zmanjšuje z nižanjem pH acetatnega pufra. To je opazno predvsem po daljem času, in sicer se delež A₅₂₀ radikala DPPH[•] po 24 h v acetatu pH 5,75 in 5,25 zmanjša za približno 10 %, medtem ko se v acetatu pH 3,75 zmanjša za več kot 20 %. Po 1 uri se opazi bistveno manjši vpliv pH, in sicer se A₅₂₀ v metanolu zmanjša le za 0,5 %, A₅₂₀ v acetatnem pufru pH 4,75; 5,25 in 5,75 se zmanjša za približno 1 %, A₅₂₀ v acetatnem pufru pH 3,75 pa za 2 %.

4.2.3 Absorbanca DPPH₂ pri 520 nm v odvisnosti od pH medija



Slika 11: Grafični prikaz absorbance DPPH₂ izražene v odstotkih absorbance DPPH[•] pri 520 nm in 25 °C v odvisnosti od pH topila

Delež absorbance DPPH₂ (A_{520}) smo izračunali z matematično zvezo 23:

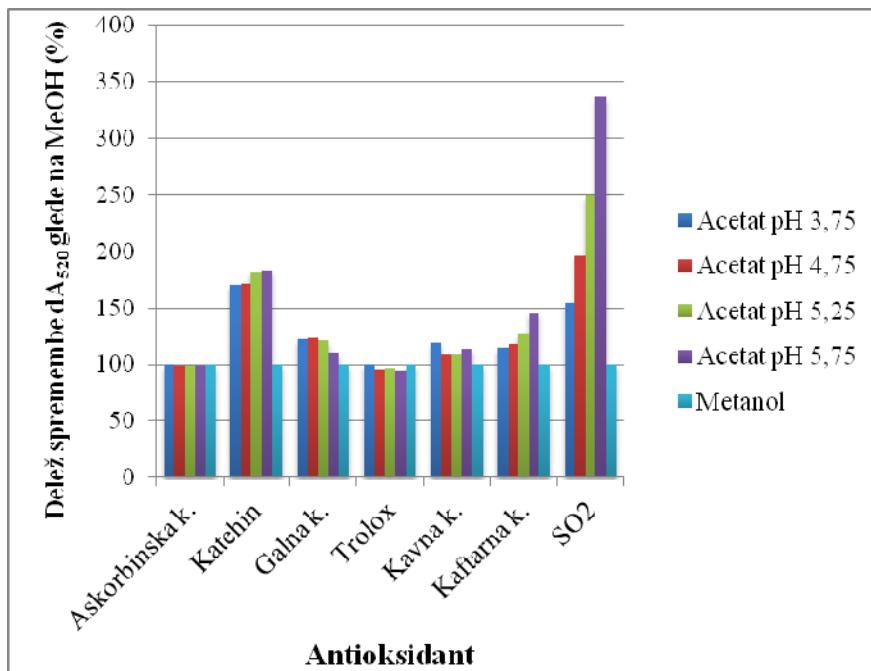
$$\frac{A_{520} \text{ (100 } \mu\text{M DPPH}^{\bullet} + 500 \mu\text{M AK) po 15 min inkubaciji v ustreznem pufru}}{A_{520} \text{ (100 } \mu\text{M DPPH}^{\bullet} \text{ po 15 min inkubaciji v ustreznem pufru}} * 10$$

0 ...(23)

Oznaka AK označuje askorbinsko kislino.

Slike 11 je razvidno, da je absorbanca 100 μM DPPH₂, ki nastane z redukcijo radikala DPPH[•] s 500 μM askorbinsko kislino največja v acetatnem pufru pH 5,75. Tudi v acetatnih pufrih z nižjimi pH vrednostimi opazimo, da DPPH₂ absorbira bolje kot v metanolu. Absorbanca DPPH₂ pri 520 nm v mešanici acetatnega pufra pH 5,75 in MeOH doseže 7 % absorbance radikala DPPH[•]. V MeOH je razmerje absorbanc manjše, saj po redukciji radikala DPPH[•] preostane manj kot 4 % začetne absorbance.

4.3 VPLIV MEDIJA IN pH MEDIJA NA KINETIKO REAKCIJE RADIKALA DPPH[•] IN VIN TER MODELNIH ANTIOKSIDANTOV



Slika 12: Grafični prikaz vpliva pH topila na dA_{520} izmerjeno po 60 min inkubacije pri 25°C za različne modelne antioksidante. Delež spremembe absorbance DPPH[•] pri 520 nm (dA_{520}) izračunan glede na metanol in izražen v odstotkih

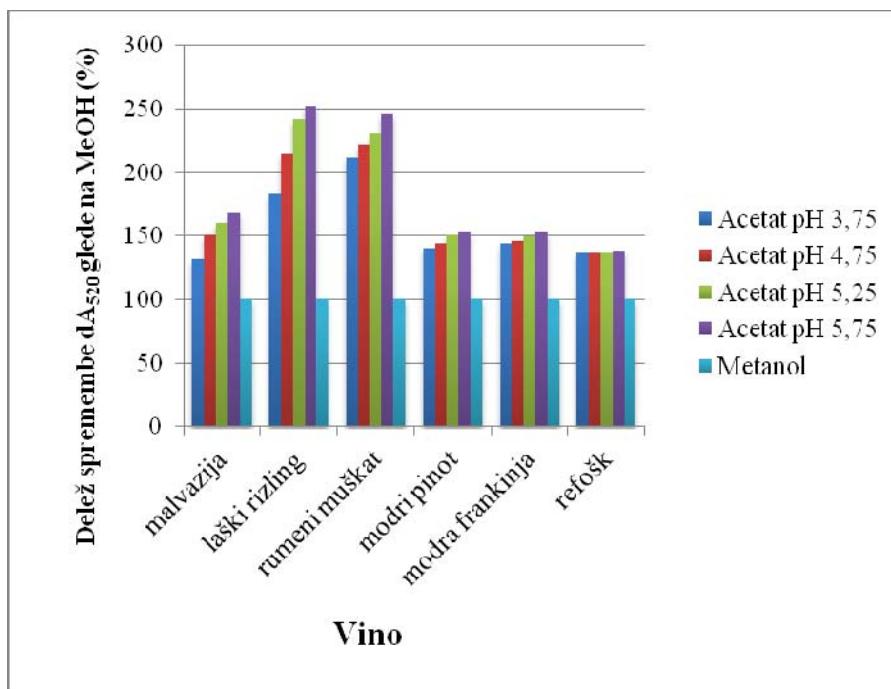
Delež spremembe dA_{520} glede na MeOH po 60 min inkubacije smo izračunali s pomočjo matematične relacije 24:

$$\frac{dA_{520} \text{ topilo} (\text{po } 60 \text{ min inkubaciji})}{dA_{520} \text{ MeOH} (\text{po } 60 \text{ min inkubaciji})} * 100 \quad \dots(24)$$

Oznaka x je MeOH ali acetatni pufer pH 3,75; 4,75; 5,25 ali 5,75.

Slika 12 prikazuje potek reakcije med radikalom DPPH[•] in modelnimi antioksidanti pri inkubaciji 60 min v metanolu in mešanici MeOH ter acetatnih pufov različnih vrednosti pH. Slike 12 je razvidno, da je določena antioksidativna učinkovitost modelnih antioksidantov odvisna od pH topila. Koncentracija posameznega antioksidanta v reakcijskih zmeseh je bila konstantna, tako da smo proučevali le vpliv topila oziroma njegovega pH. Največje razlike med pH vrednostimi smo opazili pri SO₂ in kaftarni kislini. Pri SO₂ smo v acetatu pH 5,75 določili najmanj dvakrat večjo dA_{520} kot v acetatu pH 3,75 in trikrat večjo kot v metanolu. Pri kaftarni kislini smo določili 15 % večjo dA_{520} v acetatu pH 3,75 in 46 % večjo dA_{520} v acetatu pH 5,75 kot v MeOH. Pri katehinu nismo opazili

tako velikih razlik med pH vrednostimi, in sicer smo v acetatu pH 3,75 določili 71 % večjo dA_{520} kot v metanolu, v acetatu pH 5,75 pa 83 % večjo dA_{520} kot v metanolu. Kot je razvidno s slike 12 je dA_{520} pri večini antioksidantov naraščala z naraščajočim pH, razen pri galni kislini. Pri tej smo v nižjem pH medija (acetat pH 3,75) določil kar 22 % večjo dA_{520} kot v metanolu, v acetatu pH 5,75 pa 10 % večjo dA_{520} kot v metanolu. Pri askorbinski kislini in troloku so bile razlike med topili oziroma različnimi pH vrednostimi manjše kot 5 %.



Slika 13: Grafični prikaz vpliva pH topila na dA_{520} izmerjeno po 60 min inkubacije pri 25°C za izbrana vina. Delež dA_{520} je izračunan glede na metanol in izražen v odstotkih

Delež spremembe dA_{520} glede na MeOH po 60 min inkubacije smo izračunali s pomočjo matematične relacije 24, anako kot pri modelnih antioksidantih (slika 12).

Slika 13 prikazuje vpliv pH na dA_{520} pri reakciji antioksidantov v izbranih vinih z radikalom DPPH[•]. Pri vseh vzorcih vin smo po 1 h določili večjo dA_{520} v acetatnem pufru kot v metanolu. S slike 13 je razvidno proporcionalno večanje dA_{520} z naraščajočim pH. Razlike med različnimi pH so bistveno večje pri belih vinih kot pri rdečih. Pri vnu sorte refošk so razlike med vrednostmi dA_{520} različnih pH najmanjše, in sicer manjše kot 2 %. Pri belih vinih smo določili približno 150 % večjo dA_{520} v acetatu pH 5,75 kot v metanolu,

razen pri vinu sorte malvazija, kjer smo določili le 67 % večjo dA_{520} v acetatu pH 5,75 kot v metanolu. Pri vinu sorte laški rizling smo opazili največje razlike med pH, in sicer je bila v acetatu pH 3,75 dA_{520} 83 % večja, v acetatu pH 5,75 pa kar 152 % večja kot v metanolu. Pri rdečih vinih smo tako v acetatu pH 5,75 kot tudi acetatu pH 3,75 določili najmanj 37 % večjo dA_{520} kot v metanolu.

Preglednica 12: Vpliv topila na dA_{520} pri reakciji modelnih antioksidantov z radikalom DPPH[•] v odvisnosti od časa. Vrednosti dA_{520} so prikazane v odstotkih in normalizirane glede na dA_{520} reakcije v metanolu izmerjeno po 30 min inkubacije pri 25 °C

| ANTIOKSIDANT | TOPILO | dA_{520} (%) | | | | |
|----------------------------|-----------------------|----------------|--------|---------|---------|----------|
| | | 30 min | 60 min | 120 min | 300 min | 1440 min |
| Katehin | Acetat pH 5,25 | 196 | 218 | 237 | 261 | 301 |
| | Metanol | 100 | 120 | 146 | 195 | 291 |
| Kaftarna kislina | Acetat pH 5,25 | 115 | 132 | 159 | 222 | 323 |
| | Metanol | 100 | 104 | 109 | 123 | 184 |
| Galna kislina | Acetat pH 5,25 | 124 | 124 | 127 | 132 | 143 |
| | Metanol | 100 | 102 | 109 | 117 | 133 |
| Kavna kislina | Acetat pH 5,25 | 102 | 114 | 134 | 178 | 292 |
| | Metanol | 100 | 104 | 110 | 127 | 198 |
| Trolox | Acetat pH 5,25 | 97 | 98 | 100 | 101 | 107 |
| | Metanol | 100 | 101 | 101 | 102 | 105 |
| Askorbinska kislina | Acetat pH 5,25 | 98 | 100 | 102 | 107 | 133 |
| | Metanol | 100 | 101 | 101 | 102 | 104 |
| SO₂ | Acetat pH 5,25 | 307 | 337 | 359 | 370 | 432 |
| | Metanol | 100 | 139 | 195 | 281 | 444 |

dA_{520} (%) smo normalizirali na dA_{520} po 30 min inkubacije v MeOH z matematično zvezo 25:

$$dA_{520} (\%) = \frac{dA_{520} \text{ topilox (po ty inkubacijs)} * 100}{dA_{520} \text{ MeOH (po 30 min inkubacijs)}} \quad \dots(25)$$

x je MeOH ali acetatni pufer pH 5,25; oznaka y je 30 min, 60 min, 120 min, 300 min ali 1440 min.

Iz preglednice 12 je razvidno, da reakcije radikala DPPH[•] z modelnimi antioksidanti v večini potekajo hitreje v acetatnem pufru pH 5,25 kot v metanolu. Izjemaje trolox, kjer ne opazimo velikih razlik med enim in drugim topilom, saj poteče reakcija med njim in radikalom DPPH[•] zelo hitro, in sicer po 30 minutah dalje je dA_{520} bolj ali manj konstantna. Pri vseh ostalih standardih bi lahko rekli, da kažejo bolj počasno kinetiko. Pri kavni kislini smo opazili najmanjše razlike med topiloma, in sicer smo po 30 min v acetatu pH 5,25 določili le 2 % večjo dA_{520} kot v metanolu, nato pa so bile s časom razlike med topiloma vedno večje. Pri galni kislini nismo niti po 5 h inkubacije v metanolu določili enake vrednosti dA_{520} kot v acetatu pH 5,25 po 30 min. Pri kaftarni kislini smo opazili po 1 h inkubacije v acetatu pH 5,25 skoraj 30 % večjo dA_{520} kot v metanolu, kjer nismo dobili takega signala niti po 5 h inkubacije. Največji vpliv topila smo opazili pri katehinu in žveplovem dioksidu. Pri katehinu smo po 30 minutah določili skoraj dvakrat večjo dA_{520} v acetatu pH 5,25 kot v metanolu, kjer smo to vrednost dosegli šele po 5h. Pri žveplovem dioksidu pa smo po 30 min določili kar trikrat večjo dA_{520} v acetatu pH 5,25 kot v metanolu, kjer nismo enake vrednosti dA_{520} dosegli niti po 5 h. Pri askorbinski kislini se je dA_{520} v metanolu le malo spremenjala med inkubacijo, medtem ko se je v acetatu pH 5,25 absorbanca povečala med 5 h in 24 h inkubacije.

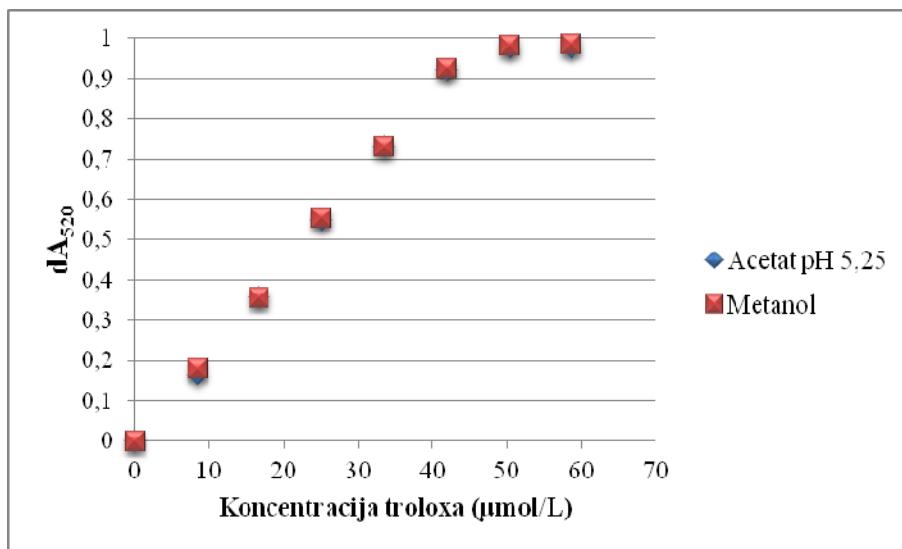
Preglednica 13: Vpliv topila na dA_{520} pri reakciji polifenolov v vzorcih vin z radikalom DPPH[•] v odvisnosti od časa. Vrednosti dA_{520} so prikazane v odstotkih in normalizirane glede na dA_{520} reakcije v metanolu izmerjeno po 30 min inkubacije pri 25 °C

| VINO | TOPILO | dA_{520} (%) | | | | |
|-----------------|-----------------------|----------------|--------|---------|---------|----------|
| | | 30 min | 60 min | 120 min | 300 min | 1440 min |
| malvazija | Acetat pH 5,25 | 162 | 181 | 206 | 237 | 301 |
| | Metanol | 100 | 113 | 140 | 179 | 270 |
| laški rizling | Acetat pH 5,25 | 253 | 289 | 328 | 380 | 479 |
| | Metanol | 100 | 119 | 145 | 202 | 337 |
| rumeni muškat | Acetat pH 5,25 | 268 | 310 | 354 | 396 | 463 |
| | Metanol | 100 | 134 | 176 | 226 | 337 |
| modri pinot | Acetat pH 5,25 | 159 | 175 | 190 | 211 | 258 |
| | Metanol | 100 | 116 | 130 | 152 | 208 |
| modra frankinja | Acetat pH 5,25 | 159 | 174 | 191 | 216 | 264 |
| | Metanol | 100 | 116 | 132 | 157 | 208 |
| refošk | Acetat pH 5,25 | 143 | 157 | 172 | 192 | 227 |
| | Metanol | 100 | 115 | 130 | 151 | 194 |

dA_{520} (%) smo normalizirali na dA_{520} po 30 min inkubacije v MeOH z matematično zvezo 25, enako kot pri modelnih antioksidantih (preglednica 12).

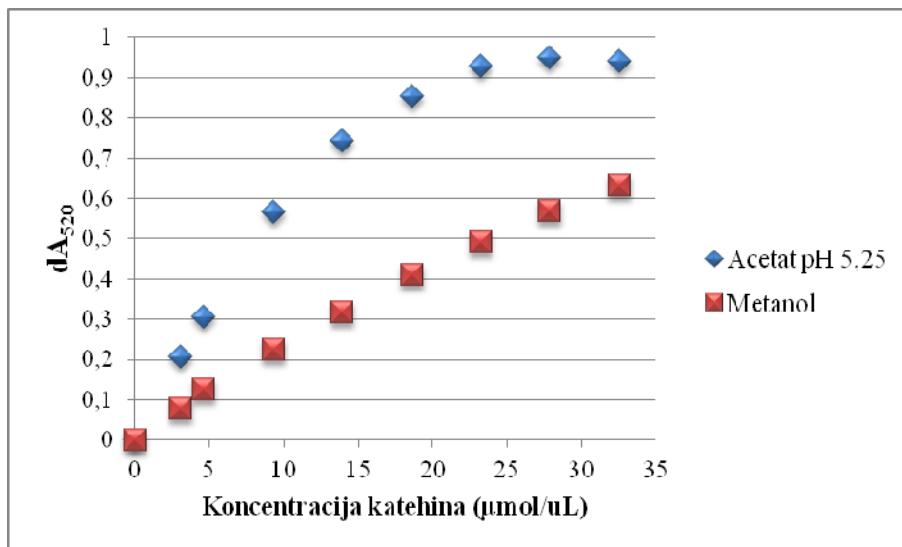
Iz preglednice 13 je razvidno, da vsa vina kažejo bolj počasno kinetiko, vendar smo opazili, da je ta še nekoliko počasnejša pri belih vinih kot pri rdečih. Pri vseh vzorcih se je izkazalo, da acetatni pufer pH 5,25 bistveno vpliva na kinetiko reakcije radikala DPPH[•] z vini oz. v vinih prisotnimi antioksidanti in, da v tem mediju reakcija poteka za vse vzorce bistveno hitreje. Pri belih vinih smo po 30 min določili vrednost dA_{520} najmanj 60 % večjo v acetatu pH 5,25 kot v metanolu, kjer je bilo za enako dA_{520} potrebno vzorec inkubirati najmanj 5 h. Pri rdečih vinih pa smo po 30 min v acetatu pH 5,25 določili najmanj 43 % večjo dA_{520} kot v metanolu. Tudi tu je bilo za primerljivo dA_{520} v metanolu vzorce inkubirati majmanj 5 h.

4.4 VPLIV KONCENTRACIJE ANTOOKSIDANTOV IN RAZREDČITVE VIN V TESTU NA DOLOČENO ANTOOKSIDATIVNO AKTIVNOST VZORCEV



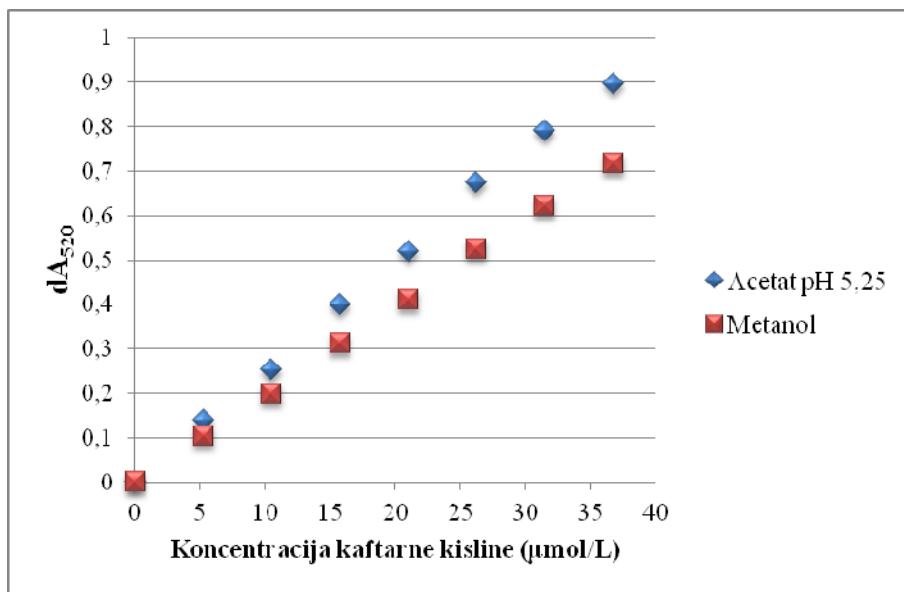
Slika 14: Grafični prikaz vpliva topila in koncentracije troloxa v testu na redukcijo radikala DPPH[•], izmerjeno kot zmanjšanje absorbance pri 520 nm po 60 min inkubacije pri 25 °C

S slike 14 je razvidno, da po 60 minutah inkubacije troloxa in DPPH[•] v acetatnem pufru in metanolu praktično ni razlik. V obeh topilih opazimo proporcionalno naraščanje dA₅₂₀ z naraščajočo koncentracijo troloxa. Do približno 90 % redukcije radikala DPPH[•] je krivulja naraščanja dA₅₂₀ linearna. Pri večjih testiranih koncentracijah troloxa, ko se porabi ves DPPH[•], se absorbanca s koncentracijo ne spreminja več.



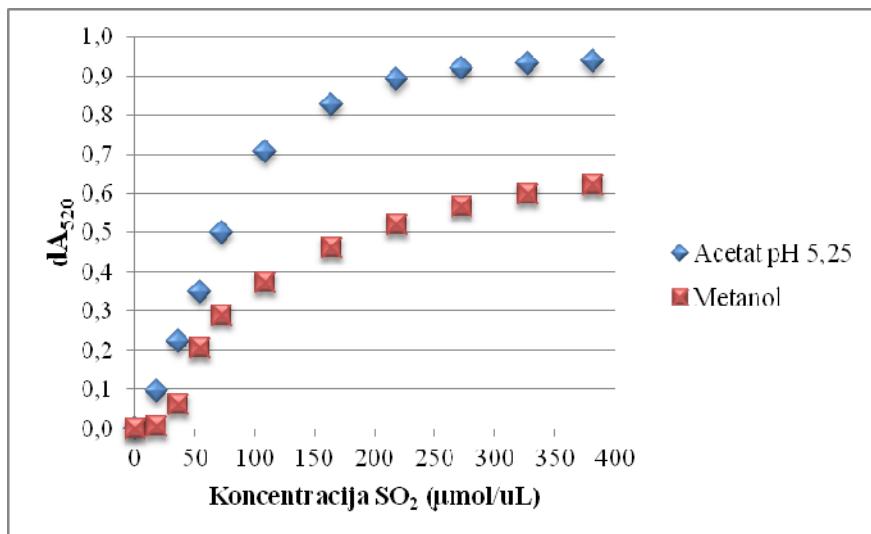
Slika 15: Grafični prikaz vpliva topila in koncentracije katehina v testu na redukcijo radikala DPPH*, izmerjeno kot zmanjšanje absorbance pri 520 nm po 60 min inkubacije pri 25 °C

Za razliko od troloxa (slika 14) smo pri katehinu opazili veliko razliko med acetatnim pufrom in metanolom (slika 15). Razvidno je nelinearno naraščanje dA₅₂₀ z naraščajočo koncentracijo katehina v testu. Razmerje med dA₅₂₀ v acetatu in dA₅₂₀ v metanolu se z naraščajočo koncentracijo katehina v testu manjša.



Slika 16: Grafični prikaz vpliva topila in koncentracije kaftarne kisline v testu na redukcijo radikala DPPH[•], izmerjeno kot zmanjšanje absorbance pri 520 nm po 60 min inkubacije pri 25 °C

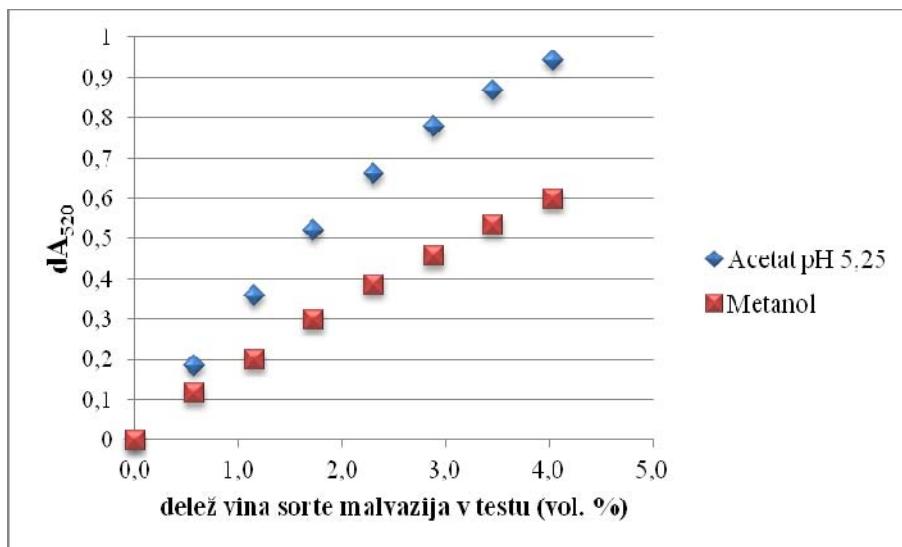
Pri kaftarni kislini za razliko od katehina (slika 15) opazimo, da je razmerje med dA_{520} v metanolu in acetatu pH 5,25 bolj ali manj konstantno (slika 16). V analiziranem koncentracijskem območju opazimo tudi linearnonaraščanje dA_{520} z naraščajočo koncentracijo antioksidanta v testu.



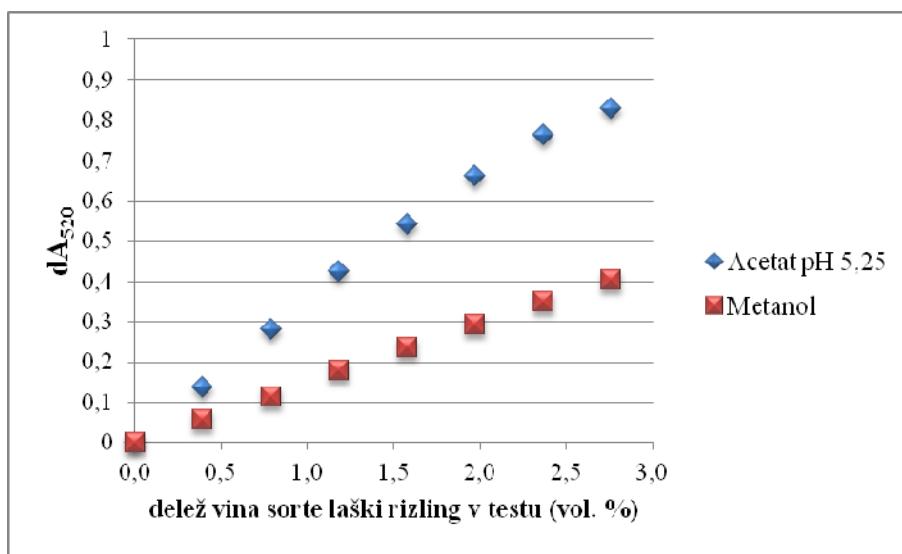
Slika 17: Grafični prikaz vpliva topila in koncentracije žveplovega dioksida v testu na redukcijo radikala DPPH[•], izmerjeno kot zmanjšanje absorbance pri 520 nm po 60 min inkubacije pri 25 °C

Prav tako kot pri katehinu (slika 15) smo tudi pri SO_2 opazili, da dA_{520} ne narašča linearno z naraščajočo koncentracijo SO_2 v testu (slika 17). Tako v metanolu kot v acetatnem pufru pH 5,25 smo opazili, da ima krivulja sigmoidno obliko. Pri zelo majhnih koncentracijah SO_2 je naklon krivulje manjši, v srednjem delu krivulje največji, pri večjih koncentracijah pa zopet manjši, čeprav se ves DPPH[•] še ni porabil. Zaradi dokaj nenavadnih rezultatov smo eksperiment večkrat ponovili, a dobili enake rezultate. Podrobnejša analiza dA_{520} pri majhnih koncentracijah, je prikazana v prilogi A2.

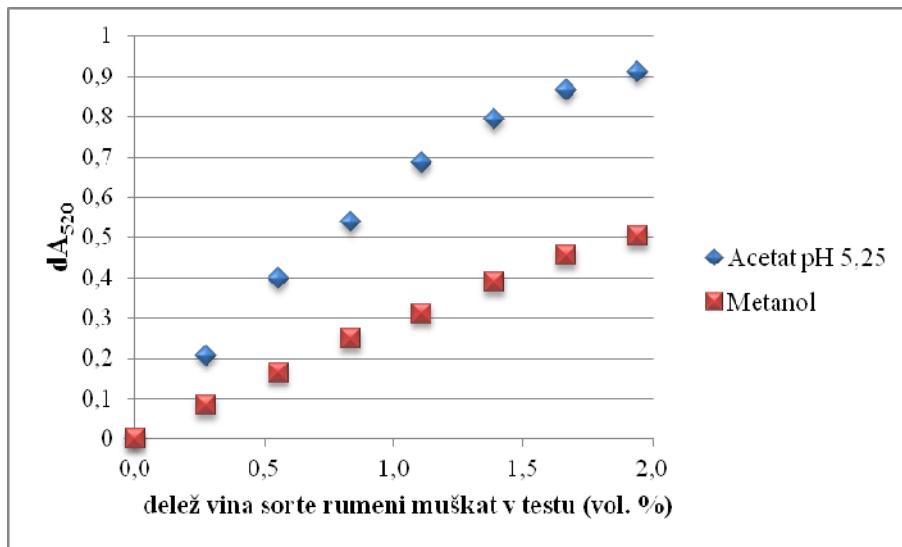
Poleg prikazanih antioksidantov smo naredili preizkus vpliva koncentracije antioksidantov v testu na redukcijo radikala DPPH[•] tudi za galno kislino, askorbinsko kislino in kavno kislino. Rezultati teh so prikazani v prilogah B1, B2 in B3.



Slika 18: Grafični prikaz vpliva topila in razredčitve vina malvazija v testu na redukcijo radikala DPPH[•], izmerjeno kot zmanjšanje absorbance pri 520 nm po 60 min inkubacije pri 25 °C



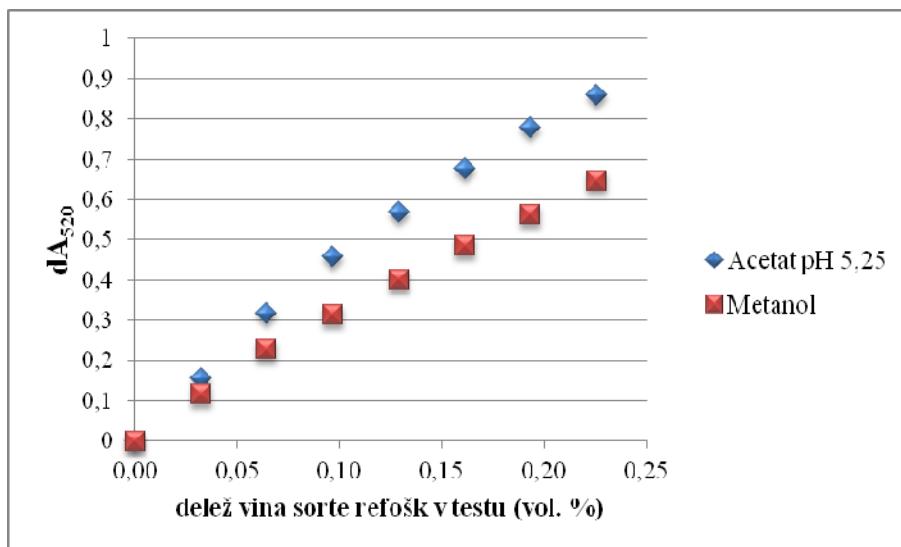
Slika 19: Grafični prikaz vpliva topila in razredčitve vina laški rizling v testu na redukcijo radikala DPPH[•], izmerjeno kot zmanjšanje absorbance pri 520 nm po 60 min inkubacije pri 25 °C



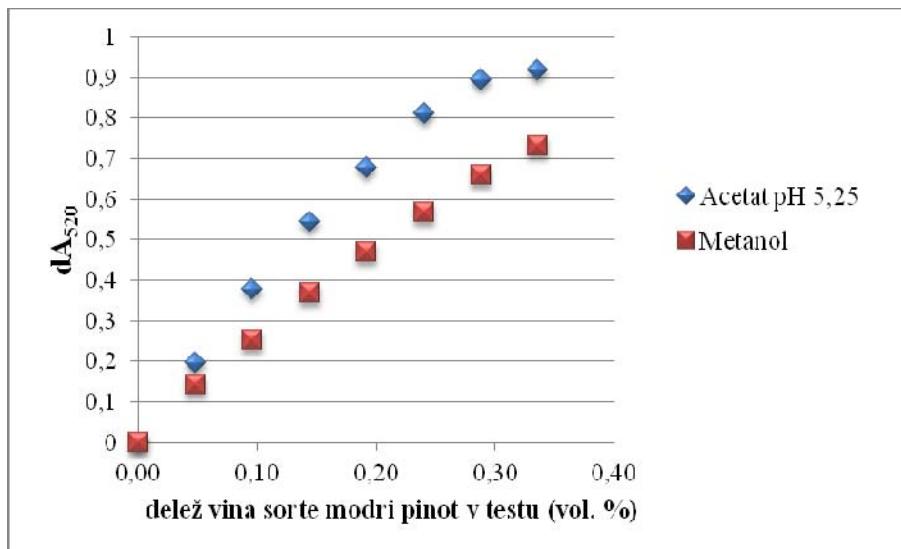
Slika 20: Grafični prikaz vpliva topila in razredčitve vina rumeni muškat v testu na redukcijo radikala DPPH[•], izmerjeno kot zmanjšanje absorbance pri 520 nm po 60 min inkubacije pri 25 °C

Na slikah 18, 19 in 20 je prikazan vpliv razredčitve belih vin in posledično različnih koncentracij antioksidantov v testu, kjer je potekala redukcija radikala DPPH[•]. Pri vseh treh belih vinih smo v celotnem koncentracijskem območju določili večjo antioksidativno aktivnost v acetatnem pufru pH 5,25 kot v metanolu. Zveza med dA₅₂₀ in deležem vina v testu ni popolnoma linearna. Pri manjših razredčitvah, ko je preostala koncentracija DPPH[•]

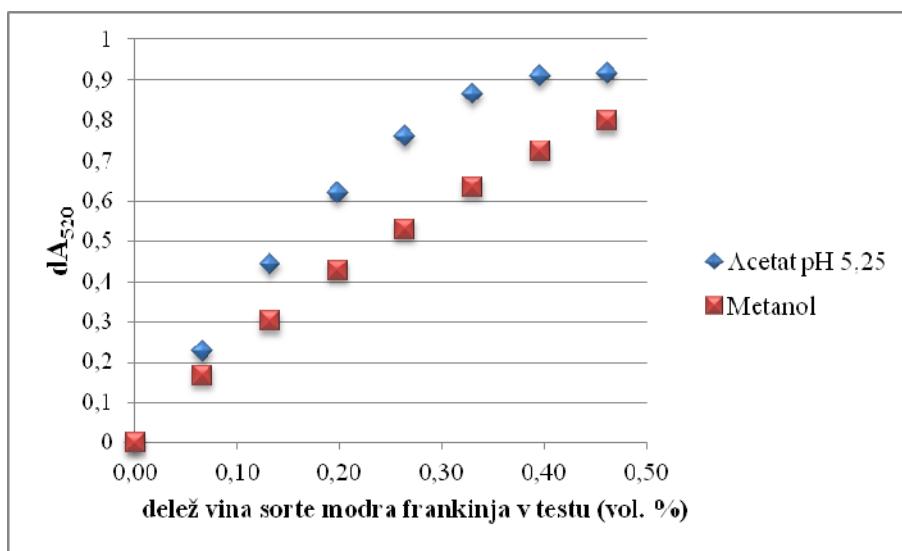
v testu majhna, se naklon krivulje zmanjša. V acetatnem pufru antioksidanti učinkoviteje reagirajo in se porabi več DPPH[•], zato je pri enakih razredčitvah zmanjšanje naklona bolj izrazito.



Slika 21: Grafični prikaz vpliva topila in razredčitve vina refošk v testu na redukcijo radikala DPPH[•], izmerjeno kot zmanjšanje absorbance pri 520 nm po 60 min inkubacije pri 25 °C



Slika 22: Grafični prikaz vpliva topila in razredčitve vina modri pinot v testu na redukcijo radikala DPPH[•], izmerjeno kot zmanjšanje absorbance pri 520 nm po 60 min inkubacije pri 25 °C



Slika 23: Grafični prikaz vpliva topila in razredčitve vina modra frankinja v testu na redukcijo radikala DPPH[•], izmerjeno kot zmanjšanje absorbance pri 520 nm po 60 min inkubacije pri 25 °C

Na slikah 22, 23 in 24 je prikazana odvisnost dA₅₂₀ od razredčitve rdečih vin. Tako kot pri belih smo tudi pri rdečih vinih določili v acetatnem pufru pH 5,25 v vseh primerih večjo antioksidativno aktivnost kot v metanolu. Čeprav z večjim deležem vina v testu v vseh primerih določimo večjo dA₅₂₀, zveza ni linearна. Naklon krivulje se pri razmerah, ko se porabi večji delež DPPH[•], zmanjša. To še dodatno potrjuje ugotovitve iz kinetičnih študij, kjer smo za vzorce vin ugotovili, da po 1 h še ni doseženo ravnotežno stanje.

Preglednica 14: Vpliv topila na določeno molsko razmerje med radikalom DPPH[•] in modelnimi antioksidanti pri EC₅₀ po 60 min inkubacije pri 25 °C

| ANTIOKSIDANT | Molsko razmerje (DPPH[•]:antioksidant) | | kvocient $n_{\text{acetat 5,25}}/n_{\text{metanol}}$ |
|--------------------------------|------------------------------------------------------------|----------------|----------------------------------------------------------------|
| | Acetat pH 5,25 | Metanol | |
| Katehin | 5,6 | 1,9 | 2,9 |
| Kaftarna kislina | 2,3 | 1,8 | 1,3 |
| Galna kislina | 6,8 | 6,1 | 1,1 |
| Kavna kislina | 2,4 | 2,1 | 1,1 |
| Trolox | 2,0 | 2,0 | 1,0 |
| Askorbinska kislina | 2,0 | 2,0 | 1,0 |
| SO₂ | 0,6 | 0,2 | 2,6 |

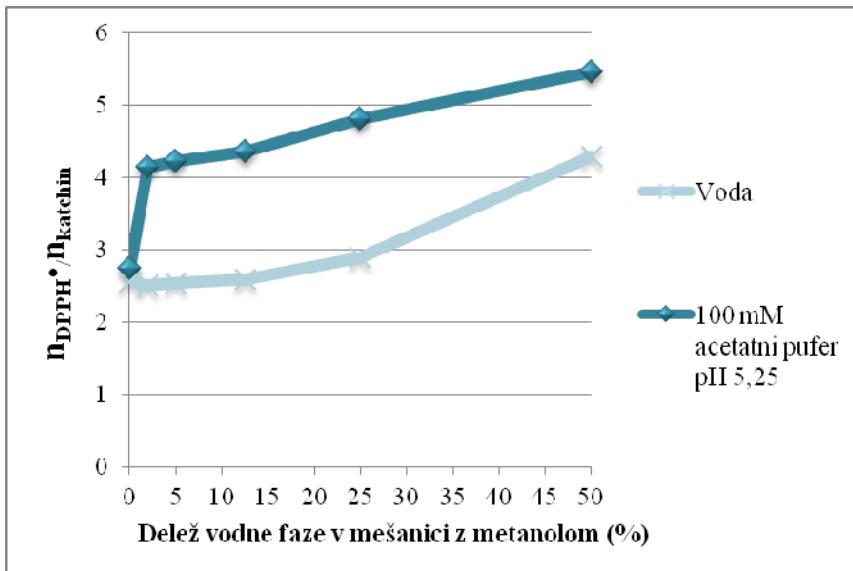
Iz preglednice 14 je razvidno molsko razmerje med radikalom DPPH[•] in posameznim antioksidantom v acetatnem pufru pH 5,25 in v metanolu določeno pri 50 % zmanjšanju prvotne koncentracije radikala DPPH[•] (EC₅₀) ter razmerje med določenim molskim razmerjem v acetatu in molskim razmerjem v metanolu. Pri vseh modelnih antioksidantih smo opazili, da je za enako učinkovitost potrebna večja koncentracija antioksidantov v metanolu kot v acetatu, z izjemo askorbinske kisline in troloxa, kjer nismo opazili vpliva topila na molsko razmerje med radikalom DPPH[•] in antioksidantom. Največje razlike med metanolom in acetatom smo opazili pri katehinu in SO₂. Pri katehinu smo določili, da je v acetatumolsko razmerje DPPH[•]:catehin 5,6:1, v metanolu pa 1,9:1. Torej smo pri katehinu, enako kot pri SO₂, določili skoraj trikrat večje molsko razmerje $n_{\text{DPPH}}/n_{\text{AO}}$ v acetatu kot v metanolu. Pri askorbinski kislini in troloxu molska razmerja niso odvisna od koncentracije antioksidanta v testu, medtem ko je pri vseh ostalih antioksidantih določeno molsko razmerje pri večjih koncentracijah, manjše. To je še predvsem opazno pri katehinu in SO₂, kar pa je tudi prikazano v prilogah C1 in C2.

Preglednica 15: Vpliv topila na določeno molsko razmerje med radikalom DPPH[•] in antioksidanti v vinih. Določena vsebnost antioksidantov v vinih je izražena kot ekvivalenti troloxa (TE) v mmol/L, ki so določeni pri razredčitvah, ki ustrezajo EC₅₀ po 60 min inkubacije na 25 °C

| VINO | TE v vinih (mmol/L) | | kvocient |
|------------------------|----------------------------|----------------|--------------------------------------------------------|
| | Acetat pH 5,25 | Metanol | TE_{acetatpH 5,25}/TE_{metanol} |
| malvazija | 1,4 | 0,7 | 2,0 |
| laški rizling | 1,6 | 0,7 | 2,5 |
| rumeni muškat | 2,9 | 1,1 | 2,6 |
| modri pinot | 18,0 | 11,0 | 1,6 |
| modra frankinja | 15,0 | 9,5 | 1,6 |
| refošk | 20,0 | 13,0 | 1,5 |

Ocena TE(ekvivalenti troloxa) v preglednici 15 prikazuje določeno vsebnost antioksidantov v vinih v odvisnosti od topila pri 50 % zmanjšanju prвotne koncentracije radikala DPPH[•]. Kot standard smo uporabili trolox in rezultate podali v TE (mmol/L). Pri vseh vinih smo določili večjo antioksidativno učinkovitost antioksidantov v acetatu kot v metanolu, pri rdečih vinih pa 1,5-do 1,6-krat večjo vsebnost antioksidantov v acetatu kot v metanolu. Molsko razmerje med acetatom in metanolom se je z naraščajočo vsebnostjo vina v testu in posledično večanjem koncentracije antioksidantov v testu, pri vseh vinih zmanjševalo. Rezultat je najverjetneje posledica dejstva, da je zaradi večje reaktivnosti antioksidantov in DPPH[•] v acetatem pufru preostala koncentracija DPPH[•] manjša, kar rezultira v zmanjšanju reakcijske hitrosti v primerjavi, ko je koncentracija DPPH[•] večja.

4.5 VPLIV DELEŽA VODE IN PUFRA V MEŠANICI Z METANOLOM NA DOLOČENO ANTOOKSIDATIVNO UČINKOVITOST KATEHINA

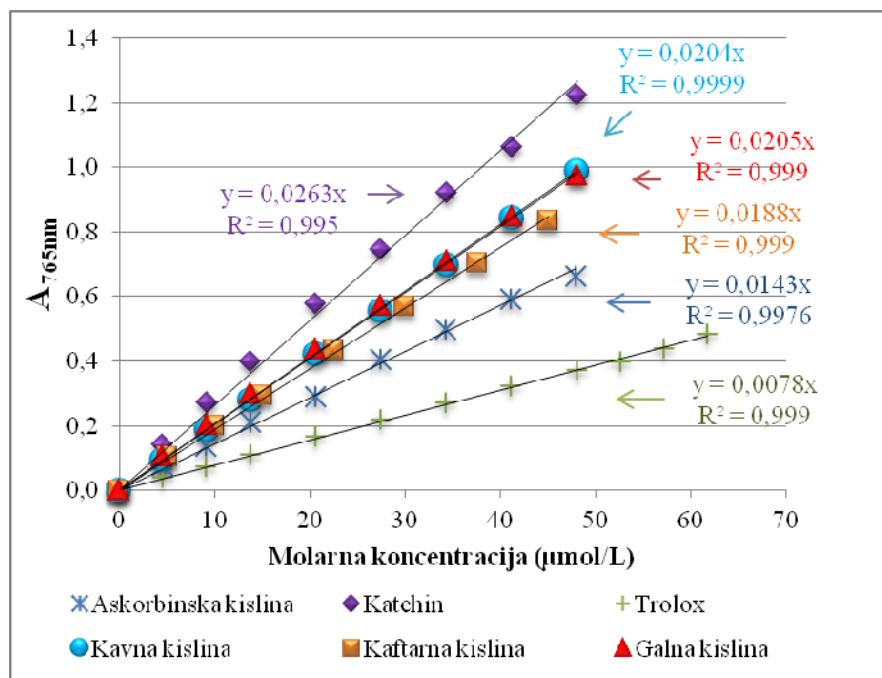


Slika 24: Grafični prikaz vpliva topila na določeno molsko razmerje med radikalom DPPH[•] in katehinom po 60 min inkubacije pri 25 °C

Na sliki 24 je prikazan vpliv deleža vodne faze (mQ voda ali acetatni pufer) v testu na molsko razmerje med radikalom DPPH[•] in katehinom. V čistem metanolu (kar prikazuje prva točka, kjer ni dodane vode ali acetatnega pufra) smo določili najmanjše molsko razmerje med katehinom in radikalom DPPH[•]. Ugotovili smo, da se z večanjem deleža vodne faze v testu veča tudi molsko razmerje DPPH[•]/catehin. Še večje vrednosti pa smo dobili v acetatnem pufru pH 5,25 kot v vodi. S 50 % deležem vode v metanolu smo določili molsko razmerje med radikalom DPPH[•] in katehinom 4,3, s 50 % deležem acetata pa kar 5,8, medtem ko smo v čistem metanolu določili molsko razmerje DPPH[•]/catehin le približno 2,6. Že v mešanici metanola z dodanim 2 % acetata smo dosegli skoraj 1,6-krat večje molsko razmerje DPPH[•]/catehin kot v čistem metanolu.

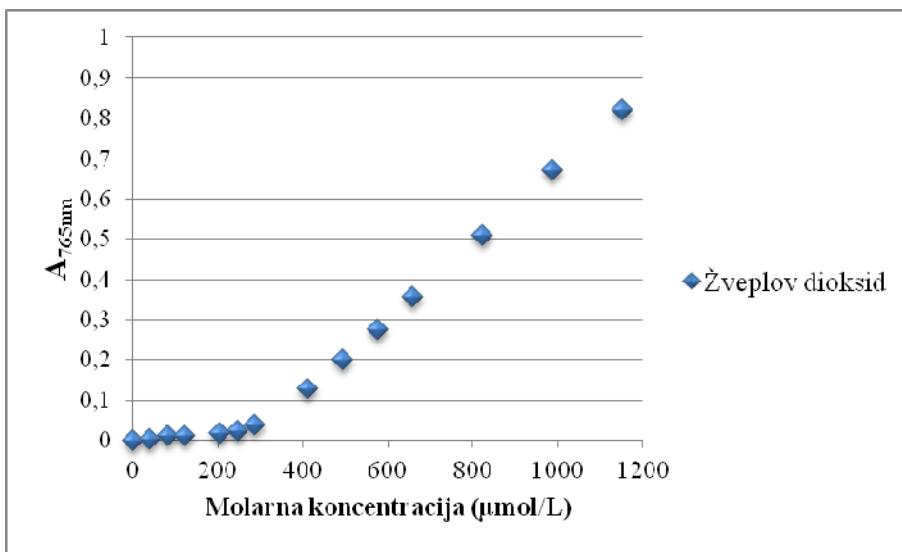
4.6 DOLOČANJE KONCENTRACIJE SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN V VINIH

4.6.1 Določanje skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu reagentom



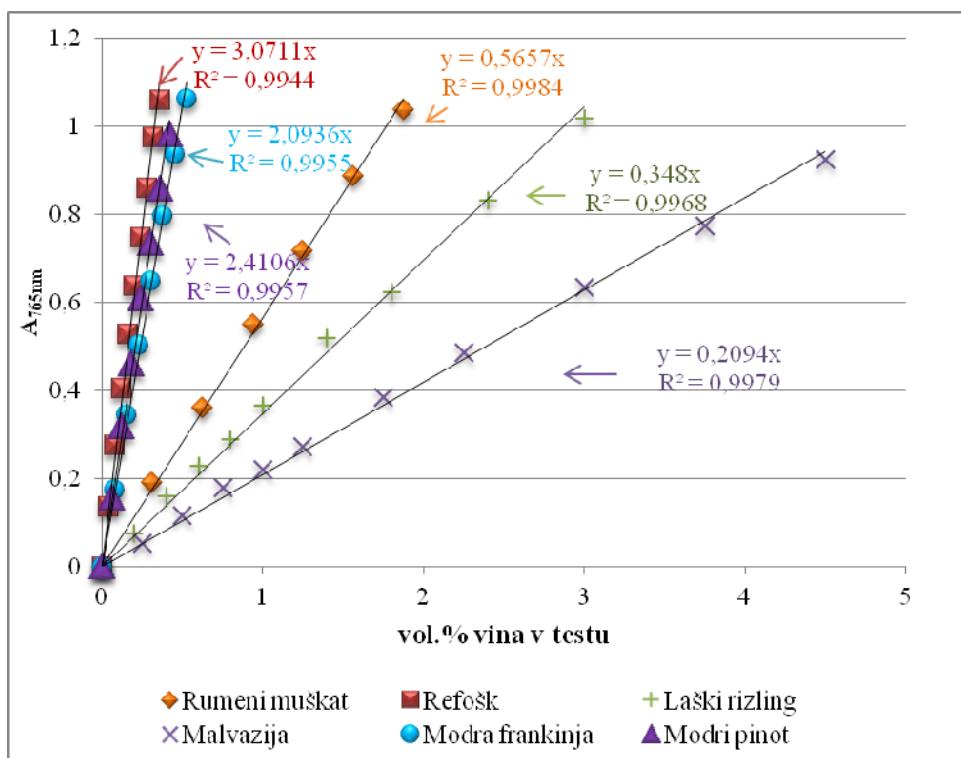
Slika 25: Grafični prikaz umeritvenih krivulj za modelne antioksidante po metodi za določanje koncentracije skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu reagentom

Na sliki 25 so prikazane umeritvene krivulje za modelne antioksidante po Folin-Ciocalteu metodi. V testiranem koncentracijskem območju smo za vse antioksidante določili linearno odvisnost A_{765} od koncentracije. Največji signal (A_{765}) pri enaki koncentraciji antioksidanta smo določili za katehin, najmanjšega pa za trolox, kjer je naklonkrivulje skoraj štirikrat manjši. Umeritvene krivulje, ki smo jih pripravili z modelnimi antioksidanti, smo uporabili za vrednotenje vsebnosti polifenolov v vinih, ki smo jih izražali kot ekvivalent troloxaali ekvivalent galne kisline (preglednica 16).



Slika 26: Grafični prikaz umeritvene krivulje za žveplov dioksid po metodi za določanje koncentracije skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu reagentom

Na sliki 26 je prikazana absorbanca pri 765 nm (A_{765}) kot funkcija koncentracije SO_2 v Folin-Ciocalteu (FC) testu. Za razliko od ostalih testiranih antioksidantov pri SO_2 ne opazimo linearne odvisnosti v celotnem koncentracijskem območju. Pri koncentracijah do 400 $\mu\text{mol/L}$ SO_2 v testu, je odziv zelo majhen. Pri večjih koncentracijah pa je naklon krivulje precej večji in konstanten. Majhen odziv pri majhnih koncentracijah smo določili tudi v DPPH testu.



Slika 27: Grafični prikaz umeritvenih krivulj za izbrana vina po metodi za določanje koncentracije skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu reagentom

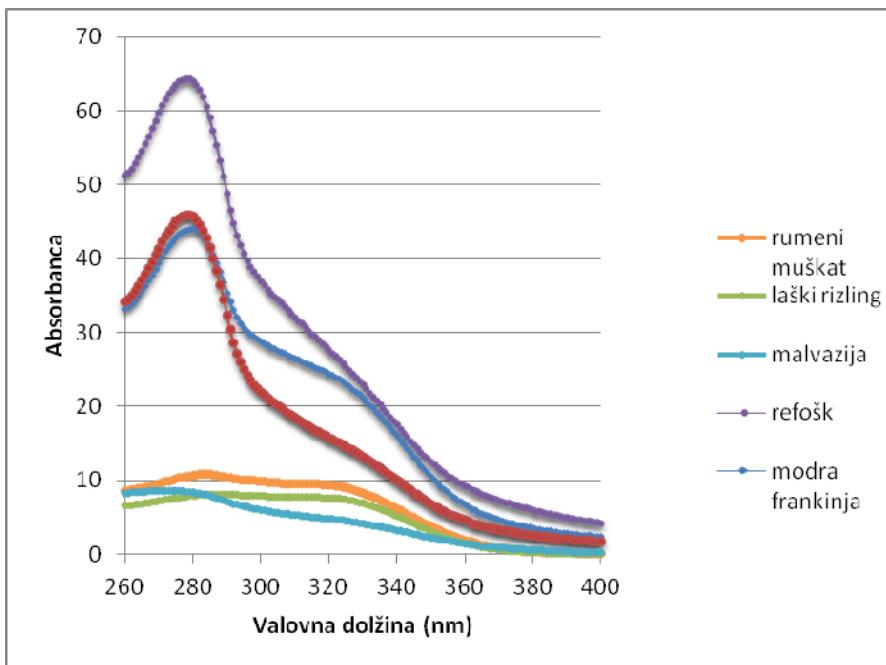
Na sliki 27 so prikazane umeritvene krivulje za bela in rdeča vina po Folin-Ciocalteu metodi. Tako kot pri modelnih antioksidantih smo tudi za vina določili linearen odziv v celotnem koncentracijskem območju. Rezultati se skladajo z meritvami AOP, saj smo za vino sorte malvazija določili najmanjši odziv (A_{765}), za refošk pa največji pri enaki razredčitvi vina.

Preglednica 16: Koncentracija skupnih fenolnih spojin v izbranih vzorcih vin določena s Folin-Ciocalteu metodo in izražena kot ekvivalenti galne kisline (GAE, mmol/L) in ekvivalenti troloxa (TE, mmol/L)

| VINO | GAE (mmol/L) | TE (mmol/L) |
|------------------------|--------------|-------------|
| laški rizling | 1,7 | 4,5 |
| malvazija | 1,3 | 3,3 |
| rumeni muškat | 2,8 | 7,3 |
| refošk | 15,0 | 39,4 |
| modri pinot | 11,8 | 30,9 |
| modra frankinja | 10,2 | 26,8 |

Koncentracijo skupnih fenolnih spojin v vinih smo določili s pomočjo umeritvenih krivulj, pripravljenih z galno kislino in troloxom (slika 25). S preglednice 16 je razvidno, da vsebuje pri rdečih vinih največ fenolnih spojin vino sorte refošk, pri belih vinih pa vino sorte rumeni muškat, v katerem smo določili skoraj dvakrat več skupnih fenolnih spojin kot v ostalih belih vinih.

4.6.2 Določanje skupnih fenolnih spojin v vinih z merjenjem absorbance v UV delu spektra



Slika 28: Grafični prikaz absorbcijskih spektrov izbranih vin v UV delu spektra za določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin v vinih

Za spojine z aromatskim obročem je značilno, da absorbirajo svetlobo v UV delu spektra (Waterhouse, 2002). Modelni polifenoli, ki so prisotni tudi v vinih imajo absorpcijske maksimume v območju od 260 do 350 nm (priloga D). Vsa vina močno absorbirajo v UV delu spektra, vendar rdeča bolj kot bela, kar se sklada z večjo vsebnostjo polifenolov in antioksidantov v vinih. Razvidno je tudi, da se absorpcijski spektri razlikujejo, kar kaže na razlike v polifenolni sestavi. Laški rizling ima pri 320 nm praktično enako absorbenco kot pri 280 nm, kar bi lahko kazalo na relativno veliko vsebnost derivatov kavne kisline v primerjavi z nekaterimi drugimi antioksidanti (priloga D).

Preglednica 17: Vrednosti absorbance izmerjene pri 280 nm in izražene v absorbančnih enotah (AU). Absorbance so bile pomerjene v razredčenih raztopinah, vrednosti AU so izračunane iz ustreznih razredčitev

| VINO | R (končni razredčitveni faktor) | A ₂₈₀ (AU) |
|-----------------|---------------------------------|-----------------------|
| laški rizling | 20 | 7,94 |
| malvazija | 20 | 8,39 |
| rumeni muškat | 20 | 10,68 |
| refošk | 100 | 64,04 |
| modri pinot | 100 | 45,67 |
| modra frankinja | 100 | 44,03 |

V preglednici 17 so prikazane vrednosti absorbanc vzorcev pri 280 nm, vin izražene v AU ob upoštevanju razredčitvenega faktorja. Če jih primerjamo s preglednico 17 lahko opazimo, da si vzorci vin sledijo v enakem zaporedju po vsebnosti skupnih fenolnih spojin. Izjema je par laški rizling:malvazija, kjer smo za laški rizling pomerili manjšo absorbanco pri 280 nm kot pri vinu sorte malvazija, čeprav je vsebnost polifenolov večja. Možno je, da laški rizling vsebuje več polifenolov z velikim molarnim ekstinkcijskim koeficientom pri valovnih dolžinah nad 300 nm, kot je razvidno na sliki 28.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo proučevali predvsem vpliv acetanega pufra kot topila v reakcijski mešanici z metanolno raztopino radikala DPPH[•] na določanje antioksidativnega potenciala (AOP).

Najprej smo okarakterizirali izbrana vina, v katerih smo določali polifenolne spojine in skupne antioksidante. Vzorcem izbranih vin smo izmerili pH in jim določili koncentracijo žveplovega dioksida. Žveplov dioksid, ki ga v vino dodajajo zaradi mikrobiološke stabilizacije in preprečevanja porjavenja, je dober reducent (Plahuta, 2004; Bavčar, 2006). Prosti in skupni SO₂ v vinih smo določali po Ripperjevi metodi, ki temelji na oksidacijsko-reduktijski reakciji z raztopino joda. Točnost metode je ±7 mg/L za skupni SO₂ (Košmerl in Kač, 2007). Največjo koncentracijo žveplovega dioksida smo določili v vinu sorte rumeni muškat in najmanjšo v vinu sorte refošk. Rezultati meritev, kjer smo za vsa analizirana rdeča vina določili manjše koncentracije kot za bela vina, se skladajo z enološko prakso, da so bela vina, ki vsebujejo manj antioksidantov, bolj žveplana od rdečih.

AOP vin in modelnih antioksidantov smo določali v različnih topilih. Ker smo AOP in molsko razmerje DPPH[•]:antioksidant določali iz Beer-Lambertovega zakona (Molyneux, 2004), je bilo potrebno preveriti, ali se molarni absorpcijski koeficient pri 520 nm v različnih topilih razlikuje. Dodatek acetatnih in fosfatnih pufrov s pH 4,75 in 5,75 je le malo vplival na absorbanco, medtem ko je bila absorbanca v pufrih z nižjim pH za nekaj odstotkov manjša od absorbance v metanolu. Študij stabilnosti DPPH[•] v omenjenih pufrih je razkril, da je manjša izmerjena absorbanca lahko tudi posledica relativno hitre razgradnje radikala v raztopinah z nižjim pH, medtem ko je bila stabilnost v metanolu boljša.

Za samo meritev v različnih medijih je zelo pomembno tudi, da je absorbanca reduciranega produkta (DPPH₂) čim manjša, saj se pri vrednotenju antioksidativnega učinka absorbanca nastalega produkta največkrat zanemari. Pri metanolu dosega rezidualna absorbanca (DPPH₂) manj kot 4% absorbance ekvimolarne koncentracije DPPH[•], v mešanici z acetatom pH 5,75 pa 7%. Razlika je manjša pri pufrih z nižjim pH. Da ima pH velik vpliv na absorbanco DPPH₂, posebej v bazičnih raztopinah, so predhodno že opazili (Friaa in Brault, 2006). Kot kompromis med relativno dobro stabilnostjo radikala in čim manjšim vplivom rezidualne absorbance smo se odločili, da bomo večino eksperimentov opravili v mešanici metanola in acetatnega pufra pH 5,25. Acetatne pufre so v preteklosti že uporabljali za določanje AOP z DPPH[•] (Al-Dabbas in sod., 2006; Sharma in Bhat, 2008; Noipa in sod., 2011).

Pri študiju vpliva topil na določen AOP smo absorbanco reakcijskih mešanic pri 520 nm merili po 30 min, 60 min, 120 min, 300 min in 1440 min. Vrednosti dA_{520} , ki ponazarjajo spremembo absorbance pri 520 nm zaradi redukcije radikala DPPH \cdot , smo preračunali v odstotke glede na vrednosti dA_{520} po 30 min inkubacije v metanolu, kar predstavlja standarne pogoje pri analizi antioksidantov z DPPH \cdot . Za vse antioksidante, razen za trolox in askorbinsko kislino, ki sta tako imenovana "hitra" antioksidanta, in za vsa vina, smo ugotovili, da v mešanici metanola in acetatnega pufra pH 5,25 določimo večjo dA_{520} kot v metanolu za vse merjene čase. Pri vseh vinih je reakcija med DPPH \cdot in antiokidanti v metanolu morala potekati najmanj 300 minut, da smo izmerili enako dA_{520} kot v mešanici acetata in metanola po 30 minutah. Dejstvo, da za askorbinsko kislino in trolox nismo zaznali povečane hitrosti v pufru, ne pomeni, da tu reakcija ne poteka hitreje, ampak le, da je tu po tridesetih minutah že doseženo ravnotežno stanje. Povečano dA_{520} za askorbinsko kislino po 24 urah lahko pripisemo tvorbi razgradnih produktov dehidroaskorbinske kisline, ki imajo antioksidativne lastnosti (Wechtersbach in sod., 2012).

Analizirali smo tudi vpliv pH acetatnih pufrov (od pH 3,75 do pH 5,75) na hitrost reakcije. Za vsa vina in večino antioksidantov smo ugotovili, da pri najvišjem analiziranem pH po 60 minutah določimo največji dA_{520} . Dejansko pri teh pogojih zreagira še več DPPH \cdot kot pa je razvidno iz dA_{520} , saj je pri tem pH rezidualna absorbanca DPPH $_2$ največja. Povečanje hitrosti v medijih, ki povzročajo deprotonacijo redoks aktivnih fenolnih skupin so predhodno že opazili, kakor tudi dejstvo, da nakisanje reakcijskega medija lahko močno upočasni reakcijo med DPPH \cdot in antioksidantom (Musialik in sod., 2008; Noipa in sod., 2011).

Kot je razvidno iz objav v literaturi so že drugi avtorji veliko pozornost posvečali ugotovitvi, da nekateri antioksidanti hitreje reagirajo s prostim radikalom DPPH \cdot in drugi počasneje (Terpinc in Abramovič, 2010; Košmerl in Cigić, 2008; Sharma in Bhat, 2008; Brand-Williams in sod., 1995, Miklavčič, 2008). Posledično je tudi vprašljiv čas inkubacije pri metodi DPPH, ki je v večini primerov 30 do 60 min inkubacije v metanolu. Glede na rezultate v diplomski nalogi je vprašljiva tudi uporaba čistega metanola kot medija za DPPH test, saj reakcije v prisotnosti vodnih pufrov potekajo bistveno hitreje. Antioksidanti, ki smo jih analizirali, so polarni in stabilizirajo proste radikale v vodnih medijih, zato tudi rezultati analiz, ki jih opravimo v vodnih pufrih, bolj odražajo realno učinkovnajo antioksidantov v matriksih, kjer se nahajajo.

V diplomski nalogi smo tudi testirali kolikšen je vpliv deleža vode in acetatnega pufra pH 5,25 v mešanici z metanolom na določeno antioksidativno učinkovitost katehina. Iz rezultatov (slika 24) je razvidno, da se z večanjem deleža polarne faze v testu veča tudi določeno molsko razmerje med radikalom DPPH \cdot in katehinom (po 1 uri). Dodatek acetatnega pufra ima precej večji vpliv, saj že pri 2% deležu v mešanici z metanolno raztopino DPPH \cdot dosežemo enak učinek kot s 50% deležem mQ vode. Tudi ta

eksperimentalna ugotovitev se sklada z rezultati predhodnih študij, da reakcije potekajo hitreje v topilih, ki pospešujejo ionizacijo fenolne skupine (Noipa in sod., 2011).

Reakcija med DPPH' in večino modelnih antioksidantov ter vsemi vini po 60 minutah še vedno ni končana. Posledično v razmerah, ko se koncentracija preostalega DPPH' zelo zmanjša, reakcija poteka počasneje, kot v razmerah, ko se je le malo radikala porabilo. Zaradi tega v reakcijah, ki niso kinetično zaključene, ne opazimo linearne zveze med koncentracijo antioksidantov v testu in dA_{520} . Naše ugotovitve lahko primerjamo z ostalimi avtorji, ki so tudi ugotovili, da kinetika reakcije antioksidantov z radikalom DPPH' ni linearno odvisna od koncentracije DPPH', zato je podajanje rezultatov s parametrom EC50 lahko problematično (Karadag in sod., 2009; Prior in sod., 2005).

Med vsemi antioksidanti smo najbolj zanimive rezulata dobili pri SO_2 . Tako pri določevanju AOP z DPPH' kot pri določevanju skupnih fenolov s Folin-Ciocalteau reagentom pri majhnih koncentracijah antioksidanta SO_2 praktično nismo zaznali reaktivnosti v testu. Pri večjih koncentracijah smo za FC test zaznali linearno povečanje A_{765} , medtem ko smo pri DPPH testu zaznali sigmoidno obliko krivulje, saj se je pri večjih koncentracijah naklon krivulje precej bolj zmanjšal kot pri ostalih antioksidantih. Vpliv topila na izmerjen AOP je bil pri SO_2 najbolj izrazit (tudi pri katehinu), saj smo pri razmerah EC₅₀ v mešanici acetata in metanola dobili enak signal pri trikrat manjši koncentraciji SO_2 kot je bila ta v metanolu. Vsaj del določenega AOP belih vin lahko pripisemo SO_2 , še posebej zato, ker smo za bela vina ugotovili, da na določeno antioksidativno aktivnost zelo vpliva dodatek acetatnega pufra v reakcijski medij. Pri SO_2 smo opazili tudi močno izrazito pH odvisnost določenega AOP, ki je bil pri pH 5,75 enkrat večji kot pri pH 3,75. Takšni rezultati se tudi skladajo z literurnimi podatki, da ima antioksidativno aktivnost predvsem sulfitna oblika, ki prevladuje pri pH nad 7,18 (Košmerl, 2000; Rotter, 2009). Ob upoštevanju razredčitev v testu in določene koncentracije SO_2 v vinih pa lahko kljub vsemu sklepamo, da SO_2 le malo vpliva na določen AOP tudi pri belih vinih.

Koncentracijo skupnih fenolnih spojin smo določili s Folin-Ciocalteu reagentom in rezultate izrazili kot ekvivalente galne kislino (mmol/L) in kot ekvivalente troloxa (mmol/L). Primerjali smo umeritvene krivulje tudi za ostale modelne antioksidante in ugotovili, da je umeritvena krivulja s kavno kislino najbolj podobna umeritveni krivulji z galno kislino, medtem ko ima s troloxom umeritvena krivulja manjši naklon in s katehinom večji. Temu primerno bi določili tudi večjo ali manjšo koncentracijo skupnih fenolnih spojin. Največjo koncentracijo skupnih fenolnih spojin med rdečimi vini smo določili v vinu sorte refošk, med belimi vini pa v vinu sorte rumeni muškat. Če primerjamo vrednosti koncentracije skupnih fenolov v vinih, pridobljene s Folin-Ciocalteu metodo (preglednica 16) in vrednosti TE (mmol/L) (preglednica 15), pridobljene z DPPH metodo, opazimo, da si sorte vin sledijo po enakem zaporedju po vsebnosti skupnih fenolnih spojin in antioksidativni učinkovitosti antioksidantov v vinih. S tem lahko potrdimo trditev, da je

v povezavi z večjo vsebnostjo skupnih fenolov, značilno večji tudi antioksidativni potencial (Košmerl in sod., 2005).

Konkretnejšo primerjavo antioksidacijskega delovanja polifenolov v izbranih vinih, določenega z DPPH metodo v acetatu pH 5,25 in v metanolu ter s Folin-Ciocalteu metodo, smo prikazali v prilogah E1 in E2. Rezultate smo normalizirali na dva standarda, in sicer na trolox(mmol/L) in na galno kislino (mmol/L). Iz rezultatov je razvidno, da smo pri vseh vzorcih vin, ne glede na standard, določili večje vsebnosti antioksidantov s Folin-Ciocalteu metodo kot z DPPH metodo, pri kateri pa smo določili večje vsebnosti antioksidantov v acetatnem pufru pH 5,25 kot v metanolu.

5.2 SKLEPI

- Acetatni pufer v mešanici z metanolom le malo vpliva na ekstinkcijski koeficient radikala DPPH[•] pri 520 nm.
- Radikal DPPH[•] je najbolj stabilen v metanolu. Slabša je stabilnost v mešanici pufra in metanola pri vrednosti pH manj kot 4.
- DPPH₂, reducirana oblika DPPH[•], ima večji molarni absorpcijski koeficient pri 520 nm v mešanici metanola in acetatnega pufra kot v metanolu. V območju od pH od 3,75 do 5,75 je molarni absorpcijski koeficient večji pri višjem pH. Posledica večje rezidualne absorbance DPPH₂ pri 520 nm je, da ob upoštevanju Beer-Lambertovega zakona, določimo manjši AOP oziroma večji EC₅₀, če ne upoštevamo rezidualne absorbance.
- Pri večini antioksidantov kot tudi pri vseh izbranih vinih je hitrost reakcije med antioksidanti in DPPH[•] večja pri višjem pH, medtem ko je pri galni kislini hitrost večja pri nižjem pH topila. Na reakcijo askorbinske kisline in troloxa z DPPH[•] v merjenem časovnem intervalu (prva točka po 30 min) pH nima vpliva.
- Vzorce vin in večine modelnih antioksidantov v mešanici z radikalom DPPH[•] bi bilo potrebno desetkrat daljši čas inkubirati v MeOH, da bi dosegli enake vrednosti dA₅₂₀ kot v acetatu pH 5,25 po 30 min. Reakcija DPPH[•] z askorbinsko kislino in troloxom je doseglja ravnotežno stanje že v prej kot 30 min, zato razlik med topiloma nismo opazili.
- Pri večini antioksidantov kot pri vseh vinih ni bilo linearne odvisnosti dA₅₂₀ od koncentracije antioksidanta v testu. Linearna zveza se je pokazala le pri askorbinski kislini in troloku ter pri kaftarni kislini v analiziranem koncentracijskem območju.
- Določeno molsko razmerje DPPH[•]:antioksidant v acetatu pH 5,25 in MeOH se je pri večini modelnih antioksidantov in vin zmanjševalo s koncentracijo, razen pri askorbinski kislini in troloku.
- Za vse modelne antioksidante kot tudi vsa vina smo določili večjo molsko razmerje n_{DPPH}:n_{AOP} 60 min inkubaciji pri 25 °C v acetatu pH 5,25 kot v metanolu, razen pri askorbinski kislini in troloku, kjer razlik ni bilo.
- Določena antioksidativna učinkovitost katehina narašča z večanjem deležem vode v testu, še večje rezultate kot v vodi pa smo dobili v acetatnem pufru pH 5,25, najmanjše vrednosti pa smo določili v čistem metanolu.
- Največjo koncentracijo skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu(FC) metodo smo določili v vinu sorte refošk in najmanjšo v vinu sorte malvazija.
- Največjo koncentracijo SO₂, ki lahko vpliva na vrednosti rezultatov FC metode, kot tudi DPPH metode, smo določili v vinu sorte rumeni muškat in najmanjšo v vinu sorte refošk.
- S FC metodo določimo večjo vsebnost antioksidantov v vinih kot z DPPH metodo.

6 POVZETEK

V diplomski nalogi smo kot vzorce uporabili tri vrhunska bela vina sort rumeni muškat, laški rizling, in malvazija ter tri vrhunska rdeča vina sort refošk, modri pinot in modra frankinja. Uporabili smo prav tako modelne antioksidante, in sicer askorbinsko kislino, trolox, katehin, kavno kislino, kaftarno kislino, galno kislino in žveplov dioksid.

Da bi delo izvedli čim bolj uspešno, smo vina kot tudi različna topila najprej okaraterizirali. Preverili smo namreč vpliv posameznega topila na molarni ekstinkcijski koeficient radikala DPPH[•] pri 520 nm in ugotovili, da je acetatni pufer zelo primeren za uporabo pri metodi DPPH. Vzorcem vin smo določili koncentracijo SO₂ in barvne parametre ter posneli absorpcijski spekter vin v UV in vidnem delu spektra. Za primerjavo rezultatov metode DPPH, smo določili vzorcem vin tudi koncentracijo skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu metodo in z metodo merjenja absorbance fenolnih spojin v UV spektru. Pri Folin-Ciocalteu metodi smo glede na galno kislino in trolox določili vinu sorte refošk največjo koncentracijo skupnih fenolov in vinu sorte malvazija najmanjšo. Ugotovili smo tudi, da bi glede na umeritveno krivuljo s trolokom kot standardom določili bistveno večjo koncentracijo skupnih fenolnih spojin v vinih, glede na katehin pa manjšo koncentracijo kot z galno kislino, kar je posledica različnih naklonov umeritvenih krivulj. Večje rezultate antioksidativne aktivnosti vin določimo s Folin-Ciocalteu metodo kot z DPPH metodo.

Namen diplomske naloge je bil predvsem proučiti vpliv vrste in pH topila na hitrost reakcije antioksidantov z DPPH[•] in na določeno molsko razmerje DPPH[•]:antioksidant. V preizkušu smo uporabili dve reakcijski zmesi, in sicer enkrat mešanico metanolne raztopine 100 µM DPPH[•] s 50 % deležem 50 mM acetatnega pufra različnih pH vrednosti in drugič mešanico 95 % metanolne raztopine 100 µM DPPH[•] in 5 % vode. Najprej smo ugotovili, da jepri večini modelnih antioksidantov kot tudi pri vseh vinih določena antioksidativna učinkovitost antioksidantov večja v pufrih z višjim pH. Najmanjše razlike med pH topil so se izkazale pri katehinu in kavni kislini, medtem ko pri askorbinski kislini in troloku vpliva pH nismo zasledili. Prav tako smo ugotovili, da produkt reakcije, DPPH₂, največ svetlobe absorbira pri pH 5,75, in sicer kar dvakrat več kot v metanolu, kar bi lahko vplivalo na končni rezultat o antioksidativni učinkovitosti antioksidantov in vin. Pri ugotavljanju vpliva topila na hitrost reakcije antioksidantov in vin z radikalom DPPH[•], smo prišli do zaključka, da je bila reakcija bistveno hitrejša v acetatnem pufru izbrane vrednosti pH 5,25 kot v metanolu pri vseh standardih in vinih, razen pri askorbinski kislini in troloku, kjer razlik med topiliv merjenem časovnem intervalu ni bilo. Tudi določena antioksidativna učinkovitost modelnih antioksidantov in vseh vzorcev vin je bila večja v acetatnem pufru kot v metanolu, razen pri askorbinski kislini in troloku, kjer so bili rezultati v obeh topilih enaki. Ker se podatek o antioksidativni učinkovitosti ponavadi podaja kot vrednost EC₅₀, smo žeeli preveriti koncentracijsko odvisnost dA₅₂₀ in ugotovili, da pri večini antioksidantov kot tudi pri vseh vinih ni linearne zveze med koncentracijo

antioksidanta v testu in dA_{520} , razen pri askorbinski kislini, troloxi in kaftarni kislini. Molsko razmerje DPPH $^{\cdot}$:antioksidant pri EC₅₀ po 1 h je pri večini antioksidantov kot tudi pri vseh sortah vin večje v acetatnem pufru pH 5,25 kot v metanolu. Pri katehinu in SO₂ je bilo namreč to razmerje kar približno trikrat večje v acetatu kot v metanolu. Pri vinih pa smo molsko razmerje DPPH $^{\cdot}$:antioksidant izrazili kot TE (mmol/L) in določili, da je bil pri belih vinih najmanj dvakrat večji v acetatu pH 5,25 kot v metanolu, pri rdečih pa najmanj 1,5-krat večji v acetatu kot v metanolu. Na določeno antioksidativno aktivnosti katehina pa smo tudi preverili vpliv deleža vode in 100 mM acetatnega pufra pH 5,25 v mešanici z metanolom in prišli do ugotovitve, da določena antioksidativna učinkovitost katehina narašča z naraščajočim deležem vode v testu, še večje rezultate kot v vodi pa smo dobili v acetatnem pufru pH 5,25.

Zaključili bi lahko s trditvijo, da je za določanje antioksidativne aktivnosti vin kot tudi modelnih antioksidantov v vseh pogledih primernejša uporaba acetatnega pufra v mešanici z metanolom kot uporaba čistega metanola. Tako določimo predvsem antioksidantom, ki reagirajo z DPPH $^{\cdot}$ počasi, večjo antioksidativno učinkovitost v krajšem času tertako najverjetneje določimo realnejše rezultate, saj so antioksidanti prisotni v vinih vodotopni in učinkujejo v polarnih topilih.

7 VIRI

- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26.-27. okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32
- Abram V., Abramovič H., Skrt M., Kač M., Poklar Ulrich N. 2010. Antioksidacijska učinkovitost fenolnih spojin. Kemija v šoli in družbi, 22, 2: 14-19
- Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. Farmacevtski vestnik, 48: 573-589
- Abramovič H., Smole Možina S., Abram V. 2008. Fenolne spojine iz stranskih proizvodov rastlinske predelave-funkcionalni dodatki živilom. V: Stranski proizvodi in odpadki v živilstvu-uporabnost in ekologija. 25. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 17.-18. april 2008. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 177-188
- Al-Dabbas M. M., Al-Ismail K., Kitahara K., Chishaki N., Hashinaga F., Suganuma T., Tadera K. 2007. The effects of different inorganic salts, buffer systems, and desalting of *Varthemia* crude water extract on DPPH radical scavenging activity. Food Chemistry, 104: 734-739
- Arnao M. B. 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. Trends in Food Science & Technology, 11: 419-421
- Bartasiute A., Westerink B. H., Verpoorte E., Niederlander H. A. 2007. Free Radical Biology and Medicine, 42, 3: 413-423
- Bavčar D. 2006. Kletarjenje danes. Ljubljana, Kmečki glas: 286 str.
- Bondet V., Brand-Williams W., Berset C. 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 30: 609-615
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie, 28: 25-30
- Cerezo B. A., Cuevas E., Winterhalter P., Garcia-Parilla C. M., Troncoso M. A. 2010. Anthocyanin composition in Cabernet Sauvignon red wine vinegar obtained by submerged acetification. Food Research International, 43: 1577-1584

- Chung M. J., Walker P. A., Hogstrand C. 2006. Dietary phenolic antioxidants, caffeic acid and trolox, protect rainbow trout gill cells from nitric oxide-induced apoptosis. *Aquatic Toxicology*, 80: 321-328
- Cigić B., Rudan Tasič D. 2006. Antioksidanti in prooksidanti. V: Karcinogene in antikarcinogene komponente v živilih. 24. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 9.-10. november 2006. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 103-116
- Dawidowicz A. L., Wianowska D., Olszowy M. 2012. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH[•] method (problems in estimation of antioxidant activity). *Food Chemistry*, 131: 1037-1043
- De Beer D., Joubert E., Gelderblom W. C. A., Manley M. 2002. Phenolic compounds: A review of their possible role as *in vivo* antioxidants of wine. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 23, 2: 48-61
- Fernández-Pachón M.S., Villaño D., Troncoso A.M., García-Parrilla M.C. 2006. Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity. *Analytica Chimica Acta*, 563:101-108
- Frankel E., Waterhouse A., Teissedre P.I. 1993. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 890-894
- Friaa O., Brault D. 2006. Kinetics of the reaction between the antioxidant Trolox and the free radical DPPH[•] in semi-aqueous solution. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 4: 2417-2423
- Gambelli L., Santaroni G.P. 2004. Polyphenols content in some Italian red wines of different geographical origins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17:613-618
- Gutiérrez H. I., Sánchez-Palomo Lorenzo E., Espinosa A. V. 2005. Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chemistry*, 92: 269-283
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 2000. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford, Clarendon Press: 936 str.
- Huang D., Ou B., Prior R. L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1841-1856

Jeong D.M., Jung H.A., Choi J.S. 2008. Comparative antioxidant activity and HPLC profiles of some selected Korean thistles. *Archives of Pharmacal Research*, 31: 28-33

Karadag A., Ozcelik B., Saner S. 2009. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2: 41-60

Katalinić V., Milos M., Modun D., Musić I., Boban M. 2004. Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+) catechin. *Food Chemistry*, 86: 593-600

Kedare S. B., Singh R. P. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48: 412-422

Kim J. K., Noh J. H., Lee S., Choi J. S., Suh H., Chung H. Y., Song Y. O., Choi W. C. 2002. The first total synthesis of 2, 3, 6-tribromo-4, 5-dihydroxybenzyl methyl ether (TDB) and its antioxidant activity. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 23, 5: 661-662

Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26.-27. okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-21

Košmerl T. 2000. Preprečevanje oksidacije vin in ohranjanje njihovih antioksidacijskih lastnosti. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26. in 27. okt., 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 167-177

Košmerl T., Cigic B. 2008. Antioxidant potential and phenolic composition of white and red wines. *Le Bulletin de L'OIV*, 81, 926/928: 251-259

Košmerl T., Kač M. 2010. Kemijске analize in postopki čiščenja vina: laboratorijske vaje pri izbirnem predmetu Vinarstvo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 72 str.

Košmerl T., Kač M. 2007. Osnove kemijске analize mošta in vina: laboratorijske vaje za predmet Tehnologija vina. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 106 str.

Košmerl T., Rački M., Cigic B. 2005. Zveza med antioksidacijskim potencialom vina in vsebnostjo fenolnih spojin. V: Slovenski kemijski dnevi 2005, Maribor, 22. in 23. september 2005. Glavič P., Brodnjak-Vončina D. (ur.). Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Mariboru: 118-118

Košmerl T., Vrhovšek U., Wondra M. 2006. Alkohol in rakava obolenja: se vino razlikuje od ostalih alkoholnih pičač? V: Karcinogene in antikarcinogene komponente v živilih. 24. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 9.-10. november 2006. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 149-156

Kreft S., Pečar S. 1998. Vloga radikalov pri obolenjih. Farmacevtski vestnik, 49: 469-481

Kregar I. 1996. Kromatografske metode. V: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspored P. (ur.). Ljubljana, Bia, d.o.o.: 609-632

Kuellmer V. 1999. Vitamins: Ascorbic acid. V: Wiley encyclopedia of food science and technology. 4 volume Set. 2nd ed. Francis F. J. (ed.). Massachusetts, John Wiley and Sons, 4: 2449-2467

Lebeau J., Furman C., Bernier J. L., Duriez P., Teissier E., Cotelle N. 2000. Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids. Free Radical Biology and Medicine, 29, 9: 900-912

Litwinienko G., Ingold K. U. 2004. Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstraction. 2. Resolution of the curcumin antioxidant controversy. The role of sequential proton loss electron transfer. Journal of Organic Chemistry, 69, 18: 5888-5896

Lu Y., Foo L. Y. 2000. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. Food Chemistry, 68: 81-85

Magalhães L. M., Segundo M. A., Salette R., Lima J.L.F.C. 2008. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. Analytica Chimica Acta, 613: 1-19

March J. 1992. Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms and structure. 4th ed. New York, John Wiley & Sons: 165-204

Martin-Hernandez M.C., Juarez M. 1993. Cromatography. V: Encyclopedia of food science, food technology and nutrition. Vol.2. Macrae R., Robinson R.K., Sadler M.J. (eds.). London, Academic Press: 954-972

Middleton E. J. R., Kandaswami C., Theoharides T.C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacological Reviews, 52, 4:673-751

Miklavčič A. 2008. Priprava in karakterizacija ekstraktov liofiliziranih vin. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 92 str.

- Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazone (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 2: 211-219
- Mozetič B., Tomažič I., Škvarč A., Trebše P. 2006. Determination of polyphenols in white grape berries cv. Rebula. *Acta Chimica Slovenica*, 53: 58-64
- Musialik M., Kuzmicz R., Pawłowski T. S., Litwinienko G. 2008. Acidity of hydroxyl groups: an overlooked influence on antiradical properties of flavonoids. *Journal of Organic Chemistry*, 74: 2699-2709
- Nemanič J. 1996. Spoznajmo vino. Ljubljana, Kmečki glas: 178 str.
- Noipa T., Srijaranai S., Tuntulani T., Ngeontae W. 2011. New approach for evaluation of the antioxidant capacity base don scavenging DPPH free radical in micelle systems. *Food Research International*, 44: 798-806
- Nojavan S., Khalilian F., Kiaie F.M., Rahimic A., Arabanian A., Chalavi S. 2008 Extraction and quantitative determination of ascorbic acid during different maturity stages of *Rosa canina* L. fruit. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21: 300-305
- Pérez-Jiménez J., Saura-Calixto F. 2006. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*, 39: 791-800
- Phenolic standards. 2011. Winnipeg, University of Manitoba: 1 str.
<http://home.cc.umanitoba.ca/~adam/lab/hplc/index.shtml> (20.nov. 2011)
- Plahuta P. 2004. Veliki vinski leksikon. Ljubljana, Mladinska knjiga: 515 str.
- Pravilnik o pogojih, ki jih mora izpolnjevati grozdje za predelavo v vino, o dovoljenih tehnoloških postopkih in enoloških sredstvih za pridelavo vina in o pogojih glede kakovosti vina, mošta in drugih proizvodov v prometu. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 43: 5353-5353
- 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: 4290-4302
- Prošek M., Golc Wondra A. 1997. Validacija analiznih metod v tenkoplastni in tekočinski kromatografiji. Ljubljana, Kemijski inštitut: 173-214
- Rice-Evans C. A., Miller N. J. 1997. Structure: antioxidant activity relationship of flavonoids and isoflavonoids. V: *Natural antioxidants in human health and disease*. Rice-Evans C. A., Packer L. (eds.). New York, Marcel Dekker: 199-219
- Roginsky V., Lissi E. A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92: 235-254

Rotter B. 2009. Sulphur dioxide. Vancouver, Improved Winemaking: 56 str.
<http://www.brsquared.org/wine/Articles/SO2/SO2.htm> (20. nov. 2011)

Rudan-Tasič D., Klofutar C. 2007. Fizikalno kemijske metode v živilstvu. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo Ljubljana: 23-51

Rudan-Tasič D. 2000. Vitamin C, vitamin E in koencim Q₁₀. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26. in 27. okt., 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 39-42

Saito S., Okamoto Y., Kawabata J. 2004. Effects of alcoholic solvents on antiradical abilities of protocatechuic acid and its alkyl esters. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 68, 6: 1221-1227

Scalzo L. R. 2008. Organic acids influence on DPPH scavenging by ascorbic acid. Food Chemistry, 107: 40-43

Schwarz K., Bertelsen G., Nissen L. R., Gardner P. T., Heinonen M. I., Hopia A., Huynh-Ba T., Lambelet P., McPhail D., Skibsted L. H., Tijburg L. 2001. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. European Food Research and Technology, 212: 319-328

Sharma O.M., Bhat T. K. 2009. DPPH antioxidant assay revisited. Food Chemistry, 113: 1202-1205

Siddhuaju P. 2006. The antioxidantactivity and freeradical scavenging capacity of phenolics of raw and dry heated moth bean (*Vigna aconitifolia*) (Jacq.) Marechal seed extracts. Food Chemistry, 99: 149-157

Singleton V. L., Zaya J., Trousdale E. K. 1986. Caftaric and coutaric acids in fruit of *Vitis*. Phytochemistry, 25: 2127–2133

Sovinc N. 2005. Vpliv letnika na antioksidacijski potencial belih in rdečih vin. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 102 str.

Staško A., Brezova V., Biskupič S., Mišik V. 2007. The potential pitfalls of using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl to characterize antioxidants in mixed water solvents. Free Radical Research, 41, 4: 379-390

Stratil P., Kuban V., Fojtova J. 2008. Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods. Czech Journal of Food Sciences, 26, 4: 242-253

Šikovec S. 1996. Vino, pijača doživetja. Ljubljana, Kmečki glas: 321 str.

- Tasioula-Margari M., Okogeri O. 2001. Simultaneous determination of phenolic compounds and tocopherols in virgin olive oil using HPLC and UV detection. *Food Chemistry*, 74: 377-383
- Terpinc P., Abramovič H. 2010. A kinetic approach for evaluation of the antioxidant activity of selected phenolic acids. *Food Chemistry*, 121: 366-371
- Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros Zevallos L., Hawkins Byrne D. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 669-675
- Vidovic S., Stojanovic B., Veljkovic J., Pražic Arsic L., Roglic G., Manojlovic D. 2008. Simultaneous determination of some water-soluble vitamins and preservatives in multivitamin syrup by validated stability-indicating high-performance liquid chromatography method. *Journal of Chromatography A*, 1202, 2: 155-162
- Vidrih R., Kač M. 2000. Analitika antioksidantov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26. in 27. Okt., 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 101-114
- Vilaño D., Fernández-Pachón M. S., Troncoso A. M., García-Parrilla M. C. 2004. The antioxidant activity of wines determined by the ABTS⁺ method: influence of sample dilution and time. *Talanta*, 64: 501-509
- Vilaño D., Fernández-Pachón M. S., Moyá M. L., Troncoso A. M., García-Parrilla M. C. 2006. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71: 230-235
- Vrhovšek U. 1998. Extraction of hydroxycinnamoyltartaric acids from berries of different grape berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4203-4208
- Vrhovšek U. 1996. Fenoli kot antioksidanti v vinu. V: Zbornik referatov 1. slovenskega vinogradniško-vinarskega kongresa, Portorož od 4. do 6. decembra 1996. Ptuj, Slovenska vinska akademija Veritas: 124-134
- Vrhovšek U. 2001. Flavonoidi kot predstavniki antioksidantov. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 8. In 9. nov. 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 97-107
- Wagner H. 2001. Zdravilna moč vina. Ljubljana, Mladinska knjiga: 95 str.
- Waterhouse A. L. 2002. Determination of total phenolics. V: Current protocols in food analytical chemistry. New York, John Wiley and Sons: I1.1.1-I1.1.8

Wechtersbach L., Poklar-Ulrich N., Cigić B. 2012. Liposomal stabilization of ascorbic acid in model systems and in food matrices. *LWT-Food Science and Technology*, 45, 1: 43-49

Yepez B., Espinosa M., Lopez S., Bolanos G. 2002. Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction. *Fluid Phase Equilibria*, 194: 879-884

Yettella R. R., Min D. B. 2010. Effects of trolox and ascorbic acid on the riboflavin photosensitised oxidation of aromatic amino acids. *Food Chemistry*, 118: 35-41

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Blažu Cigiću za strokovno pomoč, nasvete, vso pozornost in naklonjenost ter ves vložen trud, ki ga je namenil raziskovalnemu delu in pisanju diplomske naloge, saj brez njega tako zastavljene in napisane naloge ne bi bilo.

Prav tako se iskreno zahvaljujem somentorci prof. dr. Tatjani Košmerl za strokovni pregled diplomske naloge kot tudi za vso pozornost, razumevanje in spodbudne besede tekom nastajanja diplomske naloge.

Zahvalila bi se rada tudi recenzentki doc. dr. Heleni Abramovič za strokovni pregled diplomske naloge.

Lini Burkan se zahvaljujem za pregled referenc in same oblike diplomske naloge.

Najlepša hvala Katji Černe za vso njeno pomoč pri oblikovanju, tiskanju in vezavi diplomske naloge.

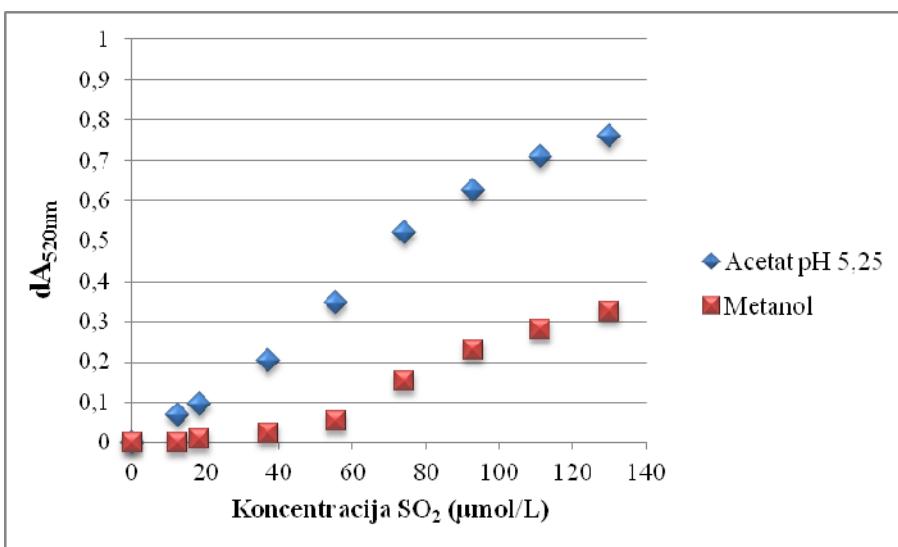
Velika zahvala gre tudi sošolcem Diani Paveljšek, Tei Durjava, Evi Grohar, Miranu Hodniku, Suzani Povše in Špeli Justin. Hvala vam za vso naklonjenost in nesebično podporo kakor tudi za vsa skupna doživetja, zaradi katerih se bom študijskih let na Biotehniški fakulteti spominjala sleherni trenutek svojega življenja.

Posebna zahvala gre moji družini, predvsem mami Tatjani Železnik, ki mi je omogočila študij in babici Darinki Šetrajčič ter fantu Sandiju Lukaniču za potrpežljivost in spodbudo ter čustveno in moralno podporo tekom nastajanja diplomske naloge kot tudi med samim študijom.

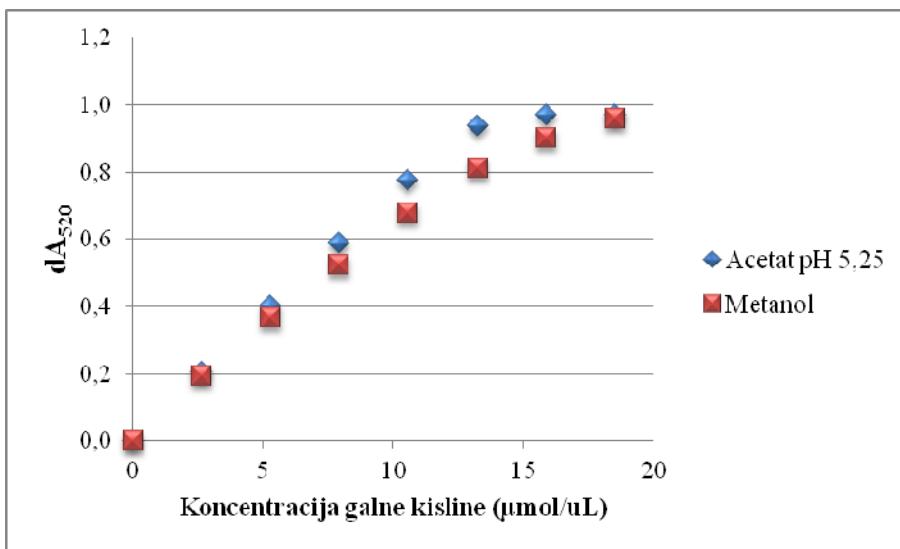
PRILOGE

Priloga A 1:Maksimalne vrednosti kemijskih parametrov, ki so zahtevane pri posameznih kakovostnih razredih vin, ki so pridelana ali se tržijo na ozemlju Republike Slovenije, ki jih predpisuje veljavni Pravilnik (Pravilnik o pogojih..., 2004; Košmerl in Kač, 2010).

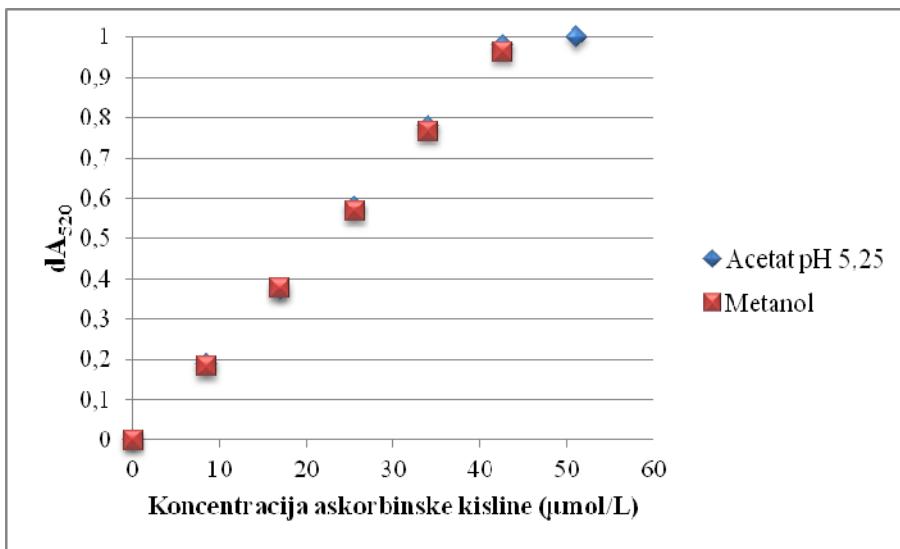
| Kemijski parameter | | | Največja dovoljena koncentracija | |
|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|---------------------|
| Skupni SO ₂ (mg/L) | rdeča vina | suha (do 5 g/L red. sladkorjev) | 160 | |
| | | (nad 5 g/L red. sladkorjev) | 210 | |
| | bela in rose vina | suha (do 5 g/L red. sladkorjev) | 210 | |
| | | (nad 5 g/L red. sladkorjev) | 260 | |
| Skupni / prosti SO ₂ (mg/L) | vrhunsko vino ZGP | (do 7 g/L red. sladkorjev) | 180 / 40 (bela in rose) | 140 / 35 (rdeča) |
| | | (nad 7 g/L red. sladkorjev) | 240 / 45 (bela in rose) | 180 / 40 (rdeča) |
| | vrhunsko vino ZGP - pozna trgatelj | | 300 / 50 | |
| | vrhunsko vino ZGP - izbor | | 350 / 50 | |
| | vrhunsko vino ZGP - jagodni izbor, ledeno vino, suhi jagodni izbor | | 400 / 50 | |
| | barrique vino | | 160 / 50 (bela in rose) | 160 / 40 (rdeča) |



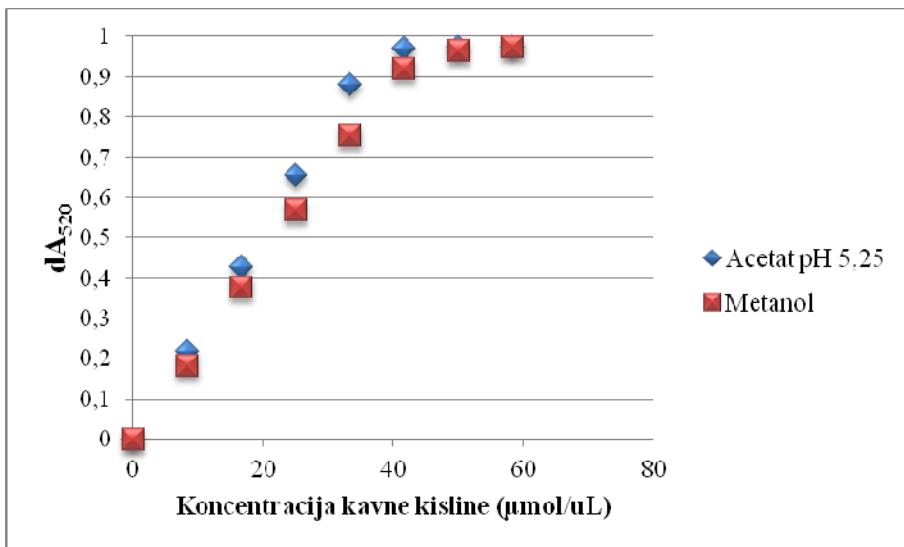
Priloga A 2: Grafični prikaz vpliva topila in majhne koncenracije SO₂ v testu na redukcijo radikala DPPH[•], izmerjeno kot zmanjšanje absorbance pri 520 nm po 60 min inkubacije pri 25 °C



Priloga B 1: Grafični prikaz vpliva topila in koncentracije galne kisline v testu na redukcijo radikala DPPH[•], izmerjeno kot zmanjšanje absorbance pri 520 nm po 60 min inkubacije pri 25 °C



Priloga B 2: Grafični prikaz vpliva topila in koncentracije askorbinske kisline v testu na redukcijo radikala DPPH[•], izmerjeno kot zmanjšanje absorbance pri 520 nm po 60 min inkubacije pri 25 °C



Priloga B 3: Grafični prikaz vpliva topila in koncentracije kavne kisline v testu na redukcijo radikala DPPH[•], izmerjeno kot zmanjšanje absorbance pri 520 nm po 60 min inkubacije pri 25 °C

Priloga C 1: Vpliv topila na molsko razmerje med radikalom DPPH[•] in katehinom pri določeni koncentraciji katehina ($\mu\text{mol}/\text{L}$) po 60 min inkubacije v acetatnem pufru pH 5,25 in v metanolu pri 25 °C

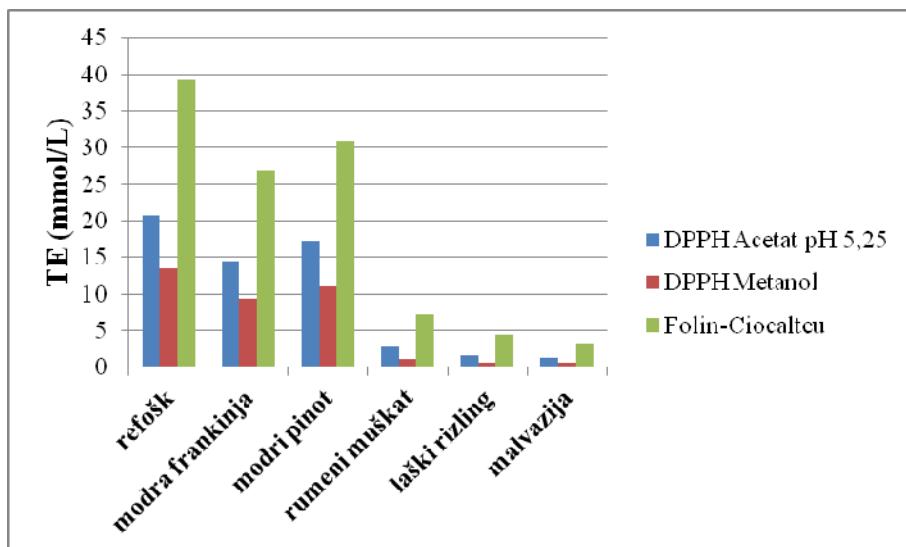
| Koncentracija katehina ($\mu\text{mol}/\text{L}$) | $n_{\text{DPPH}^{\cdot}}/n_{\text{katehin}}$ | $n_{\text{DPPH}^{\cdot}}/n_{\text{katehin}}$ | kvocient |
|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|----------|
| 3,1 | 6,1 | 2,3 | 2,7 |
| 4,7 | 6,0 | 2,4 | 2,5 |
| 9,3 | 5,5 | 2,2 | 2,5 |
| 14,0 | 4,8 | 2,1 | 2,3 |
| 18,6 | 4,2 | 2,0 | 2,1 |
| 23,3 | 3,6 | 1,9 | 1,9 |
| 27,9 | 3,1 | 1,8 | 1,7 |
| 32,6 | 2,6 | 1,8 | 1,5 |

Priloga C 2: Vpliv topila na molsko razmerje med radikalom DPPH[•] in žveplovim dioksidom pri določeni koncentraciji SO₂ (μmol/L) po 60 min inkubacije v acetatnem pufru pH 5,25 in v metanolu pri 25 °C

| | Acetat pH 5,25 | Metanol | kvocient |
|----------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Koncentracija SO ₂ (μmol/L) | n _{DPPH[•]} /n _{SO₂} | n _{DPPH[•]} /n _{SO₂} | n _{acetat 5,25} /n _{metanol} |
| 36,3 | 1,8 | 0,5 | 3,5 |
| 54,5 | 1,9 | 1,1 | 1,7 |
| 109,0 | 1,9 | 1,0 | 1,9 |
| 163,5 | 1,5 | 0,8 | 1,8 |
| 218,0 | 1,2 | 0,7 | 1,7 |
| 272,5 | 1,0 | 0,6 | 1,6 |
| 327,0 | 0,9 | 0,5 | 1,6 |
| 381,4 | 0,7 | 0,5 | 1,5 |

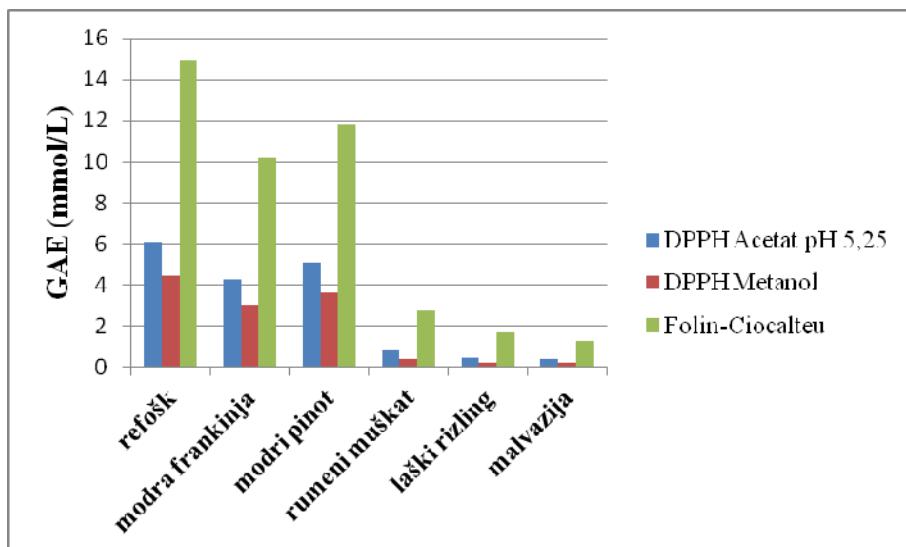
Priloga D 1: Valovne dolžine absorpcijskih maksimumov nekaterih posameznih polifenolov (Phenolic standards, 2011)

| FENOLNE SNOVI | λ _{max} v območju od 260 do 360 nm |
|-------------------|---------------------------------------------|
| Kavna kislina | 324,2 |
| Kaftarna kislina | 329,0 |
| Katehin | 279,2 |
| Galna kislina | 272,1 |
| Ferulna kislina | 323,0 |
| p-kumarna kislina | 310,0 |



Priloga E 1:

Primerjava antioksidativnega delovanja polifenolov, prisotnih v izbranih vinih, določenega z DPPH metodo, enkrat v acetatu pH 5,25 in drugič v metanolu ter s Folin-Ciocalteu metodo. Rezultati so normalizirani na troloxa in izraženi kot TE v mmol/L



Priloga E 2: Primerjava antioksidativnega delovanja polifenolov prisotnih v izbranih vinih, določenega z DPPH metodo, enkrat v acetatu pH 5,25 in drugič v metanolu ter s Folin Ciocalteu-jevo metodo. Rezultati so normalizirani na galno kislino in podani v mmol/L