

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Peter HORVAT

ANTIOKSIDATIVNI POTENCIAL VOJAŠKIH OBROKOV

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

ANTIOXIDANT POTENCIAL OF MILITARY MEALS

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

POPRAVKI

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biokemijo in kemijo živil, Katedri za tehnologijo, prehrano in vino ter na Katedri za tehnologijo mesa in vrednotenje živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorja imenovala prof. dr. Marjana Simčiča, za somentorja doc. dr. Blaža Cigića in za recenzenta prof. dr. Janeza Salobirja.

Mentor: prof. dr. Marjan Simčič

Somentor: doc. dr. Blaž Cigić

Recenzent: prof. dr. Janez Salobir

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Peter Horvat

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 613.2 –057.36 : 577.164.2 :641.1 (043.3) =163.6
KG prehrana / prehrana vojakov / vojaška prehrana / celodnevni vojaški obroki / Slovenska vojska / antioksidativni potencial / vitamin C / vitamin E / askorbinska kislina / dehidroaskorbinska kislina
AV HORVAT, Peter
SA SIMČIČ, Marjan (mentor) / CIGIČ, Blaž (somentor) / SALOBIR, Janez (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2009
IN ANTIOKSIDATIVNI POTENCIAL VOJAŠKIH OBROKOV
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 47 str., 21 pregl., 8 sl., 1 pril., 51 vir.
IJ sl
JI sl / en
AI V sklopu diplomske naloge smo ugotavljali vsebnost makro in mikro hranil s poudarkom na vitaminoma C in E ter antioksidativnem potencialu celodnevni vojaških obrokov. Analize so bile opravljene na 30 naključno izbranih celodnevni obrokih hrane. Povprečna določena vsebnost vitamina C je bila 182,6 mg, povprečna vsebnost vitamina E pa je bila 18,2 mg. Eksperimentalne podatke smo primerjali z računalniško analizo, ki temelji na široki bazi podatkov za različna živila. Z analizo s programom Prodi 5.0 smo določili, da živila v povprečju vsebujejo 206,1 mg vitamina C in 19,6 mg vitamina E. Dobljeni rezultati ustrezajo normativom (vsaj 100 mg vitamina C ter vsaj 15 mg vitamina E). Povprečen energijski delež maščob od skupne energijske vrednosti, določen eksperimentalno, je bil 30 %, z računalniškim programom pa 30,3 %. Obe vrednosti ustrezata predpisanemu normativu (30-35 %). Antioksidativni potencial smo določali z radikalom 2,2–difetil–1–pikril–hidrazil (DPPH[•]). Vsebnost polarnih antioksidantov izražena kot moli reduciranega DPPH[•] v povprečnem celodnevni obroku hrane, je bila približno trikrat večja kot vsebnost nepolarnih antioksidantov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 613.2 –057.36 : 577.164.2 : 641.1 (043.3) =163.6
CX nutrition / military nutrition / military meals / Slovenian army / antioxidant potential / vitamin C / vitamin E / ascorbic acid / dehydroascorbic acid
AU HORVAT, Peter
AA SIMČIČ, Marjan (supervisor) / CIGIČ, Blaž (co-advisor) / SALOBIR, Janez (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2009
TI ANTIOXIDANT POTENCIAL OF MILITARY MEALS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 47 p., 21 tab., 8 fig., 1 ann., 51 ref.
LA sl
AL sl / en
AB Contents of macro and micro nutritive substances, with the emphasis on vitamins C and E and antioxidant potential, were determined in the military daily meals. Analyses of 30 randomly chosen whole-day meals were performed. Experimentally determined contents of chosen components were compared with data obtained by software analysis with computer program PRODI 5.0. Average experimentally determined contents of vitamins C and E in a whole-day meal were 182.6 mg and 18.2 mg respectively. Experimental data were compared to the results obtained software analysis that is based on the comprehensive databank for various foods. Software analysis revealed that the average contents of vitamins C and E in a whole-day meals were 206.1 mg and 19.6 mg respectively. Results obtained by both methods are adequate to the standards (at least 100 mg of vitamin C and at least 15 mg of vitamin E). Experimentally determined energy content of fats in average whole-day meal was 30.0 %, which is comparable to 30.3 % obtained by software analysis. Both values are in accordance with guideline that average daily energy intake from fats should be 30-35 %. Antioxidant potential was determined by radical 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH[•]). Content of polar antioxidants, expressed as moles of reduced DPPH[•] in average whole-day meal, was around 3-fold higher than the content of non-polar antioxidants.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMATIKA	III
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ENERGIJA	3
2.2 MAŠČOBE	5
2.3 ANTIOKSIDANTI	6
2.4 VITAMINI	7
2.4.1 Vitamin C (Askorbinska kislina)	7
2.4.1.1 Splošne značilnosti	7
2.4.1.2 Kemijske lastnosti	8
2.4.1.3 Vitamin C v živilih	9
2.4.2 Dehidroaskorbinska kislina	10
2.4.3 Vitamin E (Tokoferoli)	11
2.4.3.1 Splošne značilnosti	11
2.4.3.2 Kemijske lastnosti	12
2.4.3.3 Vitamin E v živilih	13
2.5 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNEGA POTENCIALA V ŽIVILU	14

2.5.1	Indirektna metoda za določevanje antioksidativne aktivnosti v živilu s prostim radikalom DPPH[•]	14
2.6	EKSTRAKCIJA ANTIOKSIDANTOV	16
2.6.1	Ekstrakcija polarnih antioksidantov	16
2.6.2	Ekstrakcija nepolarnih antioksidantov	17
2.6.2.1	Superkritična tekočinska ekstrakcija	17
2.6.2.2	Ekstrakcija s trdno fazo (Solid-phase extraction).....	17
2.6.2.3	Organska solventna ekstrakcija	17
3	MATERIALI IN METODE	19
3.1	MATERIALI	19
3.1.1	Protokol vzorčenja celodnevni obrokov hrane (Stibilj in sod., 2002)....	19
3.1.2	Priprava vzorcev	19
3.2	METODE	20
3.2.1	Določanje antioksidativnega potenciala živila z radikalom DPPH[•]	20
3.2.2	Postopek določitve vsebnosti askorbinske kisline (vitamin C) s HPLC ..	21
3.2.3	Postopek določitve vsebnosti dehidroaskorbinske kisline (DHA).....	22
3.2.4	Postopek določanja vitamina E	22
3.2.5	Določanje maščob po Weibull–Stoldtovi metodi (Plestenjak in Golob, 2000).....	22
3.2.6	Določanje maščobnokislinske sestave maščob	23
3.2.7	Ocena hranilnosti obrokov	25
3.2.8	Statistična obdelava podatkov	25
3.2.8.1	Korelacija	26
4	REZULTATI.....	27

4.1	VSEBNOSTI POLARNIH IN NEPOLARNIH ANTIOKSIDANTOV V OBROKIH .	27
4.2	KROMATOGRAFSKO DOLOČENA VSEBNOST VITAMINA C NA HPLC SISTEMU	30
4.2.1	Umeritvena krivulja za kromatografsko določanje askorbinske kisline.	30
4.3	VSEBNOST VITAMINA C V OBROKIH.....	32
4.4	VSEBNOST VITAMINA E V OBROKIH.....	33
4.5	ENERGIJSKI DELEŽI MAŠČOB (% ED _M) V OBROKIH.....	34
4.6	KORELACIJE MED RAČUNALNIŠKIM PROGRAMOM IN KEMIJSKO ANALIZO	35
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	39
5.1	RAZPRAVA.....	39
5.2	SKLEPI.....	42
6	POVZETEK.....	43
7	VIRI	44
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Primeri za povprečno dnevno porabo energije pri različnih poklicnih dejavnostih in aktivnostih v prostem času pri odraslih (referenčne vrednosti..., 2004).....	3
Preglednica 2: Referenčne vrednosti za povprečen energijski vnos pri osebah različnih starosti v odvisnosti od bazalnega metabolizma in od naraščajoče fizične aktivnosti (Referenčne vrednosti..., 2004).....	4
Preglednica 3: Referenčna vrednost za vnose maščob v obrokih (Referenčne vrednosti..., 2004).....	5
Preglednica 4: Fizikalne lastnosti L-askorbinske kisline (Davey in sod., 2000).....	9
Preglednica 5: Vsebnost vitamina C v nekaterih vrstah sadja in zelenjave (Rubatzky in Yamaguchi, 1997).....	10
Preglednica 6: Strukture tokoferolov (Sen in sod., 2006).....	13
Preglednica 7: Vsebnost posameznih tokoferolov (TF), tokotrienolov (T3) in števila ekvivalentov α -tokoferola v različnih oljih v mg / 100 g (Schwartz in sod., 2007).....	13
Preglednica 8: Razredčitve pri pripravi vzorcev za polarne antioksidante.....	28
Preglednica 9: Razredčitve pri pripravi vzorcev za nepolarne antioksidante.....	28
Preglednica 10: Povprečne vsebnosti polarnih in nepolarnih antioksidantov v obroki.....	29
Preglednica 11: Povprečja določenih vrednosti mg askorbinske kisline in mg vitamina C v 100 g obroka.....	31
Preglednica 12: Vsebnost vitamina C v vojaških obrokih.....	32
Preglednica 13: Vsebnost α -tokoferola, β - in γ - tokoferolov ter δ -tokoferola v vzorcih vojaških obrokov določenih z analizo na sistemu HPLC.....	33
Preglednica 14: Vsebnost vitamina E v vojaških obrokih.....	34
Preglednica 15: Energijski delež maščob v vojaških obrokih.....	34
Preglednica 16: Korelacija med vitaminom C analiziranega s HPLC in vitaminom C izračunanega s programom Prodi 5.0.....	35
Preglednica 17: Korelacija med vitaminom E analiziranega s HPLC in vitaminom E izračunanega s programom Prodi 5.0.....	35

Preglednica 18: Korelacija med NMK analiziranimi s HPLC in NMK izračunanimi s programom Prodi 5.0	36
Preglednica 19: Korelacija med skupnimi maščobami analiziranimi s HPLC in skupnimi maščobami izračunanimi s programom Prodi 5.0	36
Preglednica 20: Korelacija med vsebnostmi vitamina E, skupnih maščob in maščobnih kislin izračunanih s programom Prodi 5.0.....	37
Preglednica 21: Korelacija med vsebnostmi vitamina E, skupnih maščob in maščobnih kislin analiziranih s HPLC	38

KAZALO SLIK

Slika 1: Skupna poraba energije med vojaškimi vajami v različnih pogojih delovanja vojaških enot (Nutrition Composition of..., 2005)	4
Slika 2: Struktura L-askorbinske kisline (Klofutar in sod., 1998).....	9
Slika 3: Struktura DHA (Deutsch, 2000).....	10
Slika 4: Tvorba dehidroaskorbinske kisline (DHA) iz askorbinske kisline (AA) (Deutsch, 2000).....	11
Slika 5: Strukturna formula tokoferola (Sen in sod., 2006).....	13
Slika 6: 2,2–difetil–1–pikril-hidrazil	20
Slika 7: Odvisnost množine porabljenega DPPH• od množine askorbinske kisline in α -tokoferola.....	27
Slika 8: Umeritvena krivulja askorbinske kisline (♦) na HPLC sistemu	30

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ASK – askorbinska kislina

BMR – Basal metabolic rate (bazalni metabolizem)

DHA – Dehydroascorbic acid (dehidroaskorbinska kislina)

ED_M – energijski delež maščob

ENMK – enkrat nenasičene maščobne kisline

HDL – high density lipoprotein (lipoprotein velike gostote)

HPLC – High performance liquid chromatography

(tekočinska kromatografija visoke ločljivosti)

LDL- low density lipoprotein (lipoprotein majhne gostote)

MEMK - metilni estri maščobnih kislin

MFK – metafosforna kislina

NMK – nasičene maščobne kisline

PAL – physical activity level (stopnja telesne aktivnosti)

SD – standardna deviacija

TCEP – tris(2-karboksietil)fosfin

TEE - total energy expenditure (celotna poraba energije)

VLDL - very low density lipoprotein (lipoprotein zelo majhne gostote)

VNMK – večkrat nenasičene maščobne kisline

1 UVOD

Želja vsakega vojaka in predvsem njegovega nadrejenega je, da bi bil učinkovit, natančen, vzdržljiv, skratka uspešen v še tako zahtevnih in nenavadnih pogojih delovanja. Daljša obdobja intenzivnega fizičnega napora brez ali s premalo počitka, moderna oborožitev, ki zahteva največjo pozornost oziroma fino motoriko, natančnost in sposobnost odločanja, večja nevarnost infekcij, poškodb in izpostavljenost ekstremnim okoljskim dejavnikom ter pomanjkanje spanca, so realnost s katero se sooča moderen vojak. Na misijah, kjer vojaki praviloma ne morejo izbirati kaj, kako, kdaj in v kakšnih okoliščinah bodo jedli, je okusnost hrane najpomembnejši dejavnik. Večletna preizkušanja že pripravljenih terenskih obrokov (suhi dnevni obroki) so pokazala, da je vnos hrane nezadosten, če je le-ta edini vir hrane. V misijah se omenjeni način prehranjevanja pogosto uporablja, lahko celo do dvajset dni zaporedoma, preden se vzpostavi potrebna logistična podpora za pripravljanje kuhanih obrokov (Pograjc, 2007).

Hrana je energijska osnova življenja, ki daje energijo za presnovne procese ter snovi za sinteze in obnavljanja. S hrano človeški organizem dobi potrebno energijo in hranilne snovi, ki služijo kot gradbeni elementi za sintezo telesu lastnih snovi ter za obnavljanje telesnih sestavin.

Potrebe po energiji in hranilnih snoveh se med ljudmi razlikujejo ter so odvisne od načina življenja, fizične aktivnosti in fiziološkega stanja ter spola in teže posameznika. Zato je pomembno, da se potrebna količina ter kakovost hrane prilagodi potrebam različnih kategorij prebivalstva. Prav zato je tudi nujna osredotočenost glede ustreznosti hrane, ki je pripravljena doma ali na obroke, ki se servirajo v restavracijah, ustreznost hrane je kritičnega pomena tudi pri drugih ustanovah, kjer se prehranjuje veliko število ljudi ob določenem času in v določenem okolju. Med vsemi institucijami, ki pripravljajo hrano, je ustreznost hrane zelo pomembna tudi na vojaškem področju. Izjemne zahteve kot so telesni, psihološki, časovni in okoljski dejavniki stresa, vplivajo na to, kako pomembni sta priprava in ustreznost hrane, predvsem zato, koliko hrane vojak poje in tudi zaradi tega, če sploh je ponujeno hrano. Poraba ali neuporaba vojaške hrane pomembno vplivata na psihološko funkcioniranje, izvedbo misij in tudi na preživetje v nevarnem okolju (Jaeger in Cardello, 2007).

V diplomskem delu sem se omejil na vojake iz vojašnice v Vipavi, katerih potrebe po energiji in hranilnih snoveh so zaradi težkih fizičnih obremenitev znatno povečane. Prehrana vojakov mora biti energijsko in hranilno uravnotežena, zdravstveno ustrezna, varovalna ter navsezadnje tudi okusna. To vpliva tako na fizično kot tudi na psihično kondicijo vojaka, njegov odziv na različne obremenitve in zbranost, kar pogojuje uspešnost urjenja ter se posredno kaže tudi v bojni pripravljenosti.

Predvidevam, da imajo vojaški obroki hrane visoko vsebnost antioksidantov, predvsem vitamina C in E, saj priporočeni normativi za izračun energijskih potreb vojakov upoštevajo težko fizično aktivnost.

1.1 NAMEN DELA

Namen raziskave je pridobiti podatke o vsebnosti makro in mikro hranil, s poudarkom na vitaminih C in E ter določiti antioksidativni potencial v celodnevni vojaški obroki. Podatke bomo pridobili s pomočjo kemijske analize ter jih primerjali s podatki pridobljenimi s pomočjo računalniškega programa Prodi 5.0.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Rezultati vsebnosti vitamina C in E pridobljeni s kemijsko analizo, bodo v močni povezavi z rezultati pridobljenimi z računalniškim programom Prodi 5.0.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ENERGIJA

Potrebe po energiji izhajajo iz bazalnega metabolizma, termogeneze po vnosu hranilnih snovi, mišičnega dela ter potreb za rast. Podatki o priporočljivem energijskem vnosu se navajajo v megajoulih (MJ) in v kilokalorijah (kcal).

Bazalni metabolizem pri običajni fizični obremenitvi predstavlja največji del porabe energije. Stopnja bazalnega metabolizma je odvisna od nemaščobne telesne mase, ki se z leti zmanjšuje. Moški imajo zaradi večje nemaščobne telesne mase za okoli 10 % večji bazalni metabolizem kot ženske.

Določanje ali računanje bazalnega metabolizma dobiva vse večji pomen, ker se pri definiranju dnevnih energijskih potreb sedaj praviloma izhaja iz bazalnega metabolizma v odvisnosti od fizičnega dela in od drugih dejavnosti. Potrebe po energiji se navajajo v večkratnikih bazalnega metabolizma.

Mednarodno uveljavljeno je navajanje v večkratnikih bazalnega metabolizma (BMR) in ne več absolutno v MJ ali kcal. V odvisnosti od poklicnih aktivnosti in aktivnosti v prostem času dobimo iz kvocienta TEE (celotna poraba energije) / BMR (bazalni metabolizem) povprečne dnevne potrebe po energiji v večkratnikih BMR. Za to vrednost se uporablja izraz PAL (stopnja telesne aktivnosti). V običajnih življenjskih razmerah lahko variira med 1,2 in 2,4 (preglednica 1 in 2).

Za športne aktivnosti ali za kake druge napore aktivnosti v prostem času (30-60 min, 4-5 krat na teden) se lahko k dnevni porabi energije pri delu dodatno na dan prišteje 0,3 enote PAL (Referenčne vrednosti..., 2004).

Preglednica 1: Primeri za povprečno dnevno porabo energije pri različnih poklicnih dejavnostih in aktivnostih v prostem času pri odraslih (Referenčne vrednosti..., 2004)

Težavnost dela in preživljanje prostega časa	PAL ^{1,2}	Primeri
izključno sedeč ali ležeč način življenja	1,2	stari, bolni ljudje
izključno sedeča dejavnost z malo ali brez napore aktivnosti v prostem času	1,4-1,5	pisarniški uslužbenci, finomehaniki
sedeča dejavnost, občasno tudi večja poraba energije za hojo in stoječe aktivnosti ²	1,6-1,7	laboranti, vozniki, študenti, delavci za tekočim trakom
pretežno stoječe delo ²	1,8-1,9	gospodinje, prodajalci, natakarji, mehaniki, obrtniki
fizično naporno poklicno delo ²	2,0-2,4	gradbeni delavci, kmetovalci, gozdarji, rudarji, tekmovalni športniki, vojaki

¹ – PAL = (physical activity level) povprečne dnevne potrebe po energiji za fizično aktivnost kot večkratnik bazalnega metabolizma

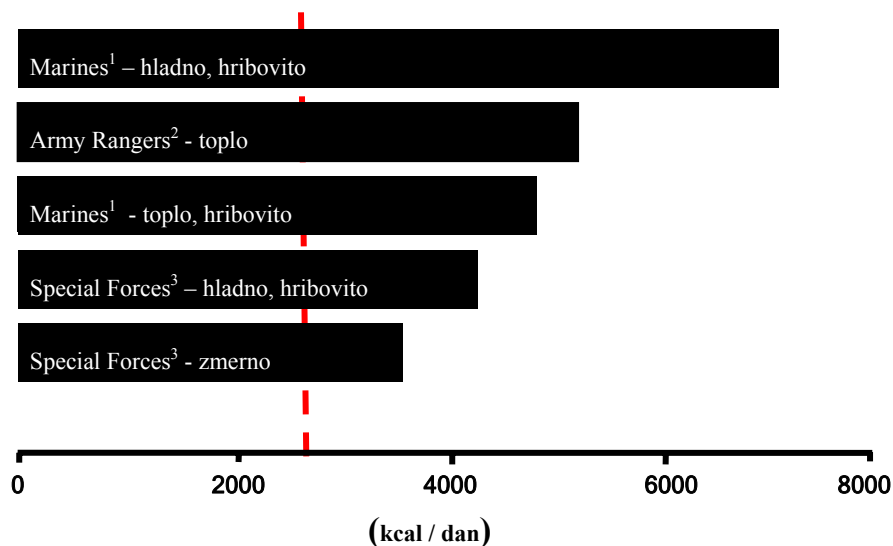
² – za športno udejstvovanje ali za napore aktivnosti v prostem času se lahko doda še 0,3 enote PAL

Razpon vrednosti PAL je od 1,2 za izključno sedeč način življenja do 2,4 za najbolj naporno fizično delo.

Preglednica 2: Referenčne vrednosti za povprečen energijski vnos pri osebah različnih starosti v odvisnosti od bazalnega metabolizma in od naraščajoče fizične aktivnosti (Referenčne vrednosti..., 2004)

Starost	Bazalni metabolizem		Fizična aktivnost (vrednost PAL)							
			1,4		1,6		1,8		2,0	
	MJ/dan	kcal/dan	MJ	kcal	MJ	kcal	MJ	kcal	MJ	kcal
Moški										
19 do manj kot 25 let	7,6	1820	10,6	2500	12,2	2900	13,7	3300	15,2	3600
25 do manj kot 51 let	7,3	1740	10,2	2400	11,7	2800	13,1	3100	14,6	3500
Ženske										
19 do manj kot 25 let	5,8	1390	8,1	1900	9,3	2200	10,4	2500	11,6	2800
25 do manj kot 51 let	5,6	1340	7,8	1900	9,0	2100	10,1	2400	11,2	2700

POTREBE PO ENERGIJI



Slika 1: Skupna poraba energije med vojaškimi vajami v različnih pogojih delovanja vojaških enot (Nutrient Compositions of..., 2005)

¹ – Marines (Mornarica, mornariška pehota)

² – Army Rangers (Specialne enote v okviru kopenskih sil)

³ – Special Forces (Specialne enote na splošno; Navy Seals (tjuljni), delta force...)

2.2 MAŠČOBE

Prehranske maščobe so pomemben vir energije, posebej pri večjih energijskih potrebah (opravljanje težkih fizičnih del). Njihova energijska vrednost je skoraj dvakrat večja kot pri ogljikovih hidratih in beljakovinah.

Prehranske maščobe, ki obstajajo v naravi, sestojijo skoraj izključno iz mešanih trigliceridov, zdravi ljudje jih absorbirajo povprečno 98 %.

Preglednica 3: Referenčna vrednost za vnose maščob v obrokih (Referenčne vrednosti..., 2004)

Starost	Maščobe (% energije)
19 do manj kot 25 let	30 ¹
25 do manj kot 51 let	30 ¹

¹ - Osebe s težko fizično aktivnostjo potrebujejo večji odstotek

Osebe z lahkim in srednje težkim delom naj ne bi uživale več kot 30 % energije v obliki maščob (preglednica 3). Če je količina zaužitih maščob pod to referenčno vrednostjo in dosega okoli 25 % energije, to ni problematično, temveč kvečjemu ugodno, ker se pri tem praviloma uživa več rastlinskih živil. Pri znatnem mišičnem delu je lahko zaradi povečanih potreb po energiji delež maščob zaradi zmanjšanja volumna hrane za 5 % višji od referenčnih vrednosti, pri tistih, ki opravljajo težja fizična dela, pa do 10 %.

Najpomembnejše komponente prehranskih maščob so maščobne kisline. Te so lahko nasičene, enkrat nenasičene ali večkrat nenasičene. Nasičene maščobne kisline se večinoma vnašajo s hrano, lahko pa se tvorijo v telesu z lipogenezo iz glukoze. Enkrat- in večkrat nenasičene maščobne kisline se prav tako vnašajo s hrano ali pa se sintetizirajo iz nasičenih maščobnih kislin. Če odrasla oseba uživa do 30 % skupne energijske vrednosti v obliki maščob, naj bi delež nasičenih maščobnih kislin z dolgimi verigami znašal največ tretjino v obliki maščob vnesene energije, kar ustreza 10 % skupne energije. Če pa se več kot 30 % skupne energije uživa v obliki maščob, naj bi presežena maščoba vsebovala predvsem enkrat- in večkrat nenasičene maščobne kisline, da se koncentracija holesterola v plazmi ne bi zvišala. Poenostavljeno rečeno naj bi bile pri celokupnem vnosu maščob v obsegu 30 % prehranske energije nasičene maščobne kisline (pod 10 % energije) in nenasičene maščobne kisline (skupno nad 20 % energije in pretežno rastlinskega izvora) v razmerju približno 1 : 2. Zdravju škodljivi dolgoročni skupni vnosi maščob pri odraslih so nad 40 % od skupne energije dnevno, pri nasičenih in večkrat nenasičenih maščobnih kislinah pa nad 10 %. Več kot 40 % energijskega vnosa v obliki maščob spodbuja nastajanje arterioskleroze, raka na debelem črevesju in debelosti (Referenčne vrednosti..., 2004).

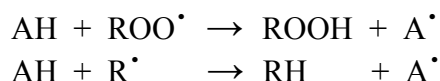
2.3 ANTIOKSIDANTI

Antioksidanti so spojine, ki varujejo celice pred poškodbami, katere povzročajo prosti radikali (Krinsky, 1989) in so pomembni za zdravje, ker reducirajo oziroma vežejo proste radikale (Kaur in Kapoor, 2001). V zadnjem času se je zanimanje za antioksidante zelo povečalo, predvsem zaradi ugotovljenega vpliva pri preprečevanju kroničnih in degenerativnih boleznih, kot so rak in srčno-žilne bolezni (Young in Woodside, 2001). Predvsem pa je bila ugotovljena povezava med uživanjem sadja in zelenjave, ki vsebujejo večje količine antioksidantov, ter zmanjšanim obolevanjem za naštetimi boleznimi. Antioksidanti, ki telo ščitijo pred učinki prostih radikalov, so encimi (katalaza, glutation-peroksidaza), vitamini (A, C, E), betakaroteni, bioflavonoidi, ter mikro rudnine - mangan, cink, selen. Nekatere antioksidante telo sintetizira samo (ubikinon, sečna kislina, glutation), druge pa dobimo s hrano (antioksidativni vitamini) (Korošec, 2000).

Antioksidante glede na način delovanja razdelimo v dve skupini:

Primarni antioksidanti ali pravi oksidanti, ki pretvarjajo nastajajoče proste radikale in ostale reaktivne kisikove spojine, preden ti oksidirajo biološko pomembne molekule (Diplock, 1993). Ti antioksidanti predstavljajo glavno znotrajcelično obrambo (npr. katalaza, glutation-peroksidaza).

Sekundarni antioksidanti so reducenti. To so prekinjevalci verižnih reakcij, ker so donorji vodika (AH) prostim radikalom in jih tako spremenijo v bolj stabilne oblike. Ob tem se sicer oksidirajo, vendar ne vstopajo v verižno reakcijo, ker so stabilni v obeh oblikah.



Predstavniki sekundarnih antioksidantov so fenoli (tokoferoli), flavonoidi (rutin, ramnetin, kamferol, kvercetin, kvamozin, rožmarinska kislina), galna kislina in njeni derivati ter nekatere druge naravne spojine.

Neencimski naravni oksidanti so predvsem v sadju, zelenjavi, zeliščih, začimbah, raznih travah, algah ali pa so produkti mikroorganizmov. Vsebnost neencimskih antioksidantov v hrani živalskega izvora je precej manjša kot v hrani rastlinskega izvora. Večina zaužitih naravnih antioksidantov je rastlinskega izvora, najpogostejši so flavonoidi (flavoni, flavanoni, flavonoli, flavani, antociani), tokoferoli, organske kisline, tanini, karotenoidi, askorbinska kislina in drugi. K antioksidativni učinkovitosti sadja in zelenjave največ prispevajo askorbinska kislina, α -tokoferol, β -karoten in flavonoidi (Wang in sod., 1996).

Terciarni antioksidanti so snovi, ki popravljajo poškodbe, ki jih povzročajo prosti radikali v strukturi celice. Največkrat so to encimi, ki popravljajo poškodbe DNA (Raspor in sod., 2000)

2.4 VITAMINI

2.4.1 Vitamin C (Askorbinska kislina)

2.4.1.1 Splošne značilnosti

Vitamin C ali askorbinska kislina (*Acidum ascorbicum*) je vodotopen vitamin in je eden izmed najbolj raziskanih in največkrat opisanih vitaminov. Vitamin C je najmočnejši antioksidant med vodotopnimi vitamini (Medić-Šarić in sod., 2000).

Kot donor elektronov je askorbinska kislina pri mnogih intra- in ekstracelularnih reakcijah zelo učinkovito redukcijsko sredstvo. Askorbatni radikal sicer reagira z drugimi prostimi radikali toda biokemično najučinkovitejša komponenta redoks sistema je askorbat. Je kofaktor ali kosubstrat osmih definiranih encimov in prek njih posega v sintezo kolagena, karnitina in kateholaminov ter v amidiranje peptidov in v presnovo tirozina. Askorbat reducira superoksid, hidroksilne radikale, hipoklorasto kislino in druge reaktivne (pro)oksidante in zato velja kot učinkovit antioksidant. Intracelularno je askorbinska kislina kot donor elektronov udeležena pri součinkovanju med železom in feritinom. Od ekstracelularnih funkcij velja poudariti zaščito pred oksidacijo LDL ter regeneracijo tokoferola iz tokoferolnega radikala in glutaciona iz njegove oksidirane oblike. Pomembni so tudi redukcija rastlinskega prehranskega železa in s tem pogojeno spodbujanje intestinalne absorpcije železa ter zaviranje reakcije nitrita z amini, ki lahko v želodcu pripelje do kancerogenih nitrozaminov. Absorpcija v črevesu poteka tako kot prehod s placente v plod ali tubularna reabsorpcija v ledvicah ter kopičenje v telesnih celicah prvenstveno z aktivnim transportom askorbata. Le-ta je odvisen od koncentracije, natrija ter energije in se ravna po kinetiki nasičenja. Drug mehanizem vnosa vitamina C v telesna tkiva temelji na transportu dehidroaskorbinske kisline (DHA). Ta se nato takoj reducira, v mnogih tkivih večinoma s tioltransferazo (glutaredoksin), zaradi česar je običajno ni mogoče dokazati niti intracelularno niti v krvni plazmi. Njen transport sicer poteka 10-krat hitreje kot transport askorbata, vendar pa je količinsko omejen. Klasični klinični stanji pomanjkanja vitamina C sta pri dojenčku Moeller-Barlowova bolezen, pri odraslem pa skorbut. V glavnem se izražata v obliki motenj tvorbe kosti in rasti pri otroku ter v kasnejših življenjskih obdobjih v obliki nagnjenja do krvavitev v koži, sluznicah, mišičevju in notranjih organih. V industrializiranih državah se takšna stanja pomanjkanja praktično ne pojavljajo več. V njih na nezadostno preskrbo z vitaminom C večinoma kažejo le predklinični znaki, od katerih najprej nastopi splošna utrujenost. Pridružijo se lahko zmanjšana storilnost in motnje v dobrem duševnem počutju ter počasnejše okrevanje po boleznih, neredko pa tudi dovzetnost za infekcije in slabo celjenje ran (Referenčne vrednosti..., 2004).

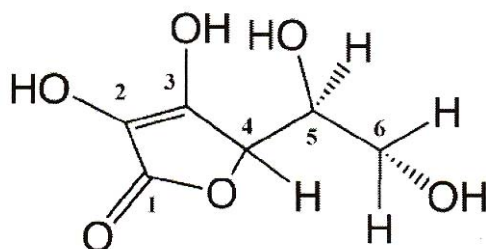
Za moške stare od 19 pa do 25 let je priporočen dnevni vnos vitamina C 100 mg ali natančneje 9 mg / MJ hranilne gostote snovi ter 10 mg / MJ hranilne gostote snovi za moške stare od 25 pa vse tja do 51 let (Referenčne vrednosti..., 2004). V nekaterih življenjskih okoliščinah so lahko potrebe po vitaminu C povišane: hudi telesni naporji (npr. težka fizična dela, tekmovalni šport), trajen umski in duševni stres, zloraba alkohola in zdravil (npr. barbituratov, antibiotikov, ki vsebujejo tetraciklin) in nekatera obolenja, na primer sladkorna bolezen, zmanjšana ledvična zmogljivost, ki terja dializo, in infekcije.

Kako visoke so vsakokratne dodatne potrebe pri današnjem stanju spoznanj, ni mogoče izraziti s številkami. Močni kadilci (nad 20 cigaret na dan) imajo pri vitaminu C za okoli 10 % zmanjšano absorpcijo, zanje se tudi zato priporoča dodatek 150 mg/dan. Do nezadostnega vnosa vitamina C dostikrat pride tudi pri starejših ljudeh, ki se zaradi problemov z žvečenjem in drugače omejenih življenjskih pogojev hranijo enostransko ali nezadostno in stalno jemljejo zdravila. Ni še ugotovljeno, da bi starostniki zaradi slabše absorpcije in za zmanjšanje tveganja katarakte potrebovali več kot 100 mg vitamina C na dan (Carr in Frei, 1999). Na splošno se okoli 1 % neuporabljene askorbinske kisline presnovi v oksalat. Ker stopnja absorpcije pri vnosu nad 200 mg hitro upada in ustrezno narašča izločanje nepresnovljene askorbinske kisline s sečem, so nastale količine oksalata (do 40 mg/dan) običajno majhne in s tem tudi tveganje za nastanek ledvičnih kamnov. Drugače pa je pri pacientih z okvarami ledvic in z nagnjenjem k tvorbi kamnov in imajo probleme z malabsorpcijo. Le ti neabsorbirani vitamin C v prebavilih pretvarjajo direktno v oksalat, ga absorbirajo in izločajo s sečem (Gerster, 1997).

Nevarnost spreobrnitve antioksidativnega učinka v oksidativni učinek askorbinske kisline obstaja pri motnjah izrabe prehranskega železa, naprimer hemokromatoza, ki je motnja, pri kateri se kopiči železo v tkivih, zlasti v jetrih in pankreasu, kar povzroča cirozo, diabetes, bronasto barvo kože ter spremembe na sklepih. (Halliwell, 1996). Pri zelo visokih odmerkih (posamične doze 500 mg ali več) lahko askorbinska kislina povzroči kratkotrajne driske. Učinki preprečevanja infekcij z jemanjem visokih odmerkov vitamina C do danes še niso znanstveno dovolj dokazani.

2.4.1.2 Kemijske lastnosti

V živilih se nahajata dve obliki vitamina C, askorbinska in dehidroaskorbinska kislina. L-askorbinska kislina (slika 2) je močan reducent, v oksidirani obliki pa je kot L-dehidroaskorbinska kislina, ki se v encimsko kataliziranih reakcijah oksidacije in redukcije pretvarjata ena v drugo (Basu in Dickerson, 1996). Kemično je askorbinska kislina lakton 2-keto-1-glukonske kisline (Rudan-Tasič, 2000) oziroma aldono-1,4 lakton heksuronske kisline, ki je po strukturi podobna heksoznim sladkorjem (Davey in sod., 2000). Zaradi enolnih hidroksilnih skupin, vezanih na drugem in tretjem C atomu, med katerima je dvojna vez, kaže L-askorbinska kislina močno kisle lastnosti (Rudan-Tasič, 2000). Na četrtem in petem mestu ima dva kiralna centra, ki omogočata štiri različne izomere (L-askorbinska kislina, D-askorbinska kislina ter L-araboaskorbinska kislina in D-araboaskorbinska kislina). L-izomera askorbinske kisline deluje kot vitamin, D-izomera pa ne (Davies, 1991). V območju fiziološkega pH (okrog 7) je L-askorbinska kislina v obliki monovalentnega aniona (L-askorbata) (Davey in sod., 2000).



Slika 2: Struktura L-askorbinske kisline (Klofutar in sod., 1998)

Preglednica 4: Fizikalne lastnosti L-askorbinske kisline (Davey in sod., 2000)

Izgled	Bela kristalična snov, brez vonja z ostrim in kislim okusom
Formula / Molska masa	$C_6H_8O_6$ / 176,13 g/mol
Točka tališča	190-192 °C
Gostota	1,65 g/ml
pH vrednost	3 (5 mg/ml) 2 (50 mg/ml)
pK1	4,13
pK2	11,6
Topnost	Voda: 0,33 g/ml 95 % etanol: 0,033 g/ml Glicerol: 0,01 g/ml Maščoba in olja: netopna

2.4.1.3 Vitamin C v živilih

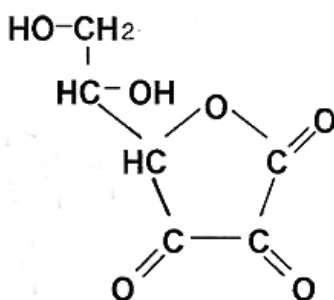
Najboljši viri vitamina C so sadje in zelenjava ter iz njih izdelani sokovi. Posebej bogati viri so jagode rakitovca in njihov sok, rdeča in zelena paprika, brokoli, črni ribez, kosmulje, koromač in citrusi (agrumi) (Souci in sod., 2000). Količinsko pa so za preskrbo z vitaminom C pomembni tudi krompir, ohrovt, brstični ohrovt, rdeče in belo zelje, špinača in paradižnik. Priporočenega dnevnega vnosa 100 mg vitamina C z ustrezno izbiro živil ni težko doseči.

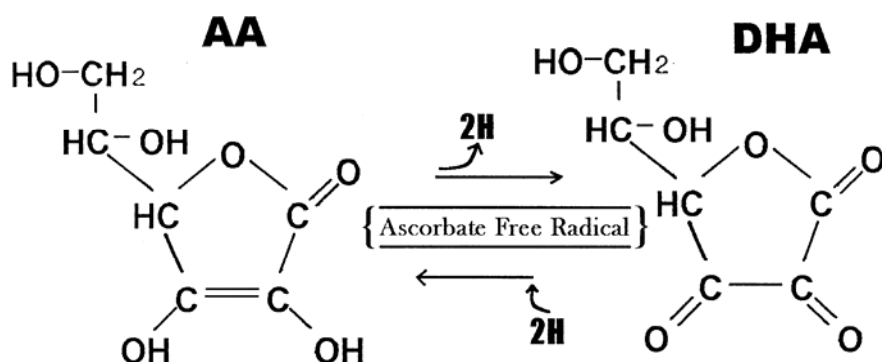
Preglednica 5: Vsebnost vitamina C v nekaterih vrstah sadja in zelenjave (Rubatzky in Yamaguchi, 1997)

DOMAČE IME	LATINSKO IME	Vitamin C (mg/100 g)
Acerola	<i>Malpighra punififolica</i>	1700
Aktinidija	<i>Actinidia chinensis</i>	71
Ananas	<i>Ananas comosus</i>	50
Jabolko	<i>Malus silvestris</i>	12
Jagoda	<i>Fragaria vesca</i>	64
Limona	<i>Citrus medica</i>	53
Paprika – zelena	<i>Capsicum Annuum</i>	81
Paprika – rdeča	<i>Capsicum Annuum</i>	240
Krompir	<i>Solanum tuberosum</i>	11
Solata	<i>Lactuca sattiva var. capitata</i>	9
Špinača	<i>Spinacia oleracea</i>	30
Belo zelje	<i>Brassica oleracea</i>	46
Paradižnik	<i>Solanum lycopersicum</i>	13
Borovnice	<i>Vaccinium mrytillus</i>	10
Kivi	<i>Actinidia deliciosa</i>	93
Česnje	<i>Prunus avium</i>	7

2.4.2 Dehidroaskorbinska kislina

Askorbinska kislina (AA) in dehidroaskorbinska kislina (DHA) predstavljata vitamin C in se v organizmu v encimsko kataliziranih reakcijah oksidacije in redukcije medsebojno reverzibilno pretvarjata. Po strukturi je dehidroaskorbinska kislina γ -lakton treo-2,3-heksadilusonske kisline (slika 3) in nastane po reverzibilni oksidaciji iz askorbinske kisline (slika 4). Pri fiziološkem pH (približno 7) prihaja do hidrolize DHA v diketogulonata, ki ga ne moremo reducirati nazaj v AA in posledično nima vitaminskega učinka.

**Slika 3:** Struktura DHA (Deutsch, 2000)



Slika 4: Tvorba dehidroaskorbinske kisline (DHA) iz askorbinske kisline (AA) (Deutsch, 2000)

2.4.3 Vitamin E (Tokoferoli)

2.4.3.1 Splošne značilnosti

Pod izrazom vitamin E je zbrana skupina kemičnih spojin, ki imajo vse v molekuli sistem obroča (kromanski obroč) z eno prosto oziroma eno zaestreno OH-skupino ter eno nasičeno ali nenasičeno izoprenoidno stransko verigo (16 C-atomov). Po številu in porazdelitvi metilnih (CH₃) skupin na kromanskem obroču razlikujemo med α -, β -, γ - in δ -tokoferolom. Po veljavni nomenklaturi naravne tokoferole označujemo kot RRR-spojine, npr. RRR- α -tokoferol (prej D- α -tokoferol). Oznaka RRR pomeni, da ima molekula tri kiralne centre z R konfiguracijo. Priporočen vnos vitamina E za moške stare od 19 pa do 25 let je 15 mg ekvivalentov tokoferol na dan, za moške stare od 25 pa do 51 let, pa je priporočen vnos 14 mg ekvivalentov tokoferola na dan (Referenčne vrednosti..., 2004).

Tokoferole, ki nastopajo v naravi, sintetizirajo samo rastline. Tako kot v živalskem organizmu, tokoferoli delujejo kot sistem zaščite pred kopičenjem reaktivnega kisika (radikal, prosti kisik) in tako preprečujejo peroksidacijo večkratno nenasičenih maščobnih kislin v membranskih lipidih in procese, ki so lahko v zvezi z mnogimi kroničnimi boleznimi staranja, kot so rak, diabetes in kardiovaskularne bolezni. Tokoferol v živem organizmu deluje kot eden najpomembnejših sistemov zaščite proti peroksidaciji lipidov. Zavira nastajanje oksidirane LDL v plazmi, ki je pomemben faktor tveganja arterioskleroze. V tej funkciji ga podpirajo neencimski (npr. vitamin C, β -karoten) in encimski sistemi (npr. glutationperoksidaze, ki vsebujejo selen). V tej zvezi vitamin E vpliva na imunski sistem, na razmerje holesterola in fosfolipidov v membranah in ima posredno vlogo pri celičnem dihanju (Elmadfa s sod. 1985).

Pri pomanjkanju vitamina E pri človeku pride, kot posledica kopičenja radikalov in peroksidacije lipidov, do različnih simptomov pomanjkanja, ki zadevajo funkcije membran, mišično presnovo in živčni sistem. S temi reakcijami je treba računati, če se vitamina E ne more absorbirati če je v ne izkoristljivi obliki. Pri A- β -lipoproteinemiji po mnogih letih pride do nevnetne bolezni živcev z udeleženo centralnega in perifernega živčevja, očesne mrežnice in skeletnih mišic. Premajhna preskrba z vitaminom E lahko nastopi tudi po odstranitvah dela črevesa, pri hudih boleznih jeter. Pri nedonošenčkih je

pred uvedbo hrane, ki vsebuje tokoferole, včasih prišlo do hemolitične anemije (Pietrzik s sod., 2008).

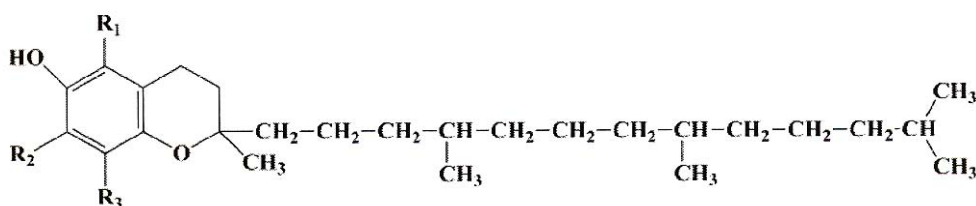
Absorpcija tokoferolov je odvisna od količine vnosa. Pri povprečnem vnosu maščob se npr. pri odmerku 12 mg giblje okoli 54 %, pri vnosu 24 mg, absorpcija pade na 30 % in pri farmakoloških doziranjih 200 mg znaša le še 10 %. Pri nepravilnem delovanju žolča lahko emulgatorji, kot so lecitin in polisorbati, izboljšajo absorpcijo majhnih količin tokoferola. Za prakso velja povprečna stopnja absorpcije 30 % (Referenčne vrednosti..., 2004).

V krvi se tokoferoli v povprečju razporedijo po naslednjem ključu. 65 % tokoferola sprejme LDL, 8 % VLDL in okoli 24 % HDL. Med vsebnostjo tokoferola in skupno vsebnostjo lipidov zato obstaja visoka korelacija. Zaradi svojega univerzalnega zaščitnega učinka na membrane se vitamin E pojavlja v vseh tkivih. Največje vsebnosti najdemo v maščobnem tkivu, jetrih in nadledvični žlezi, tudi srce, skeletne mišice in moda vsebujejo večje količine. V plazmi, jetrih, ledvicah in vranici se tokoferol hitro porablja (razpolovna doba je 5-7 dni), medtem ko se v maščobnem tkivu, kljub temu da je tam količina vitamina E velika, porablja počasi (Pietrzik s sod., 2008).

Zadosten vnos vitamina E je možen brez prehranskih dodatkov, saj živila z visoko vsebnostjo večkratno nenasičenih maščobnih kislin praviloma vsebujejo tudi veliko vitamina E. Pri izbiri rastlinskih olj in margarin je zato treba paziti na vsebnost vitamina E. V primerjavi z v maščobah topnima vitaminoma A in D je vitamin E pri oralnem vnosu nestrupen. Oralni vnos 200-800 mg α -tokoferolnih ekvivalentov na dan je še sprejemljiv za odrasle. Pri visokem doziranju občasno prihaja do prebavnih motenj in zmanjšanja koncentracije hormonov ščitnice v krvi. Kot zgornja meja vnosa brez nezaželenih stranskih učinkov velja 200 mg ekvivalentov α -tokoferola na dan, še posebej, če se obenem redno uživa acetilsalicilna kislina (ASK). Zelo velike količine (nad 800 mg tokoferolnih ekvivalentov na dan) lahko ovirajo agregacijo trombocitov in tako podaljšajo čas krvavitve. Zato se priporoča, naj se dva tedna pred operativnimi posegi oziroma po njih ne dodaja tako visokih doz vitamina E (Referenčne vrednosti..., 2004).

2.4.3.2 Kemijske lastnosti

Najpomembnejši tokoferol je α -tokoferol (5,7,8-trimetiltokol), ki predstavlja 90 % vseh tokoferolov v živalskih tkivih (slika 5). Pojavlja se v dveh optično izomernih oblikah, od katerih je D-oblika aktivnejša od L-oblike. α -tokoferol je derivat kromana z izoprenoidno bočno verigo. Ena najpomembnejših kemijskih lastnosti tokoferola je, da deluje kot antioksidant v preventivi lipidne peroksidacije polinenasičenih maščobnih kislin v celičnih membranah. Antioksidativna aktivnost α -tokoferola je podobna aktivnosti glutation peroksidaze, ki vsebuje selen (Medić-Šarić in sod., 2000)



Slika 5: Strukturna formula tokoferola (Sen in sod., 2006)

Preglednica 6: Strukture tokoferolov (Sen in sod., 2006)

Oblike tokoferola	R ₁	R ₂	R ₃
α-tokoferol	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β-tokoferol	CH ₃	H	CH ₃
γ-tokoferol	H	CH ₃	CH ₃
δ-tokoferol	H	H	CH ₃

2.4.3.3 Vitamin E v živilih

Dobri viri α-tokoferola so olje iz pšeničnih kalčkov, sončnično olje, olje iz koruznih kalčkov in repično olje, za β-tokoferol olje iz pšeničnih kalčkov; za γ-tokoferol olje iz koruznih kalčkov in sojino olje in za δ-tokoferol sojino olje. Pri tem je potrebno upoštevati, da je del vsebnosti vitamina E potreben za zaščito nenasičenih maščobnih kislin iz olj in da so za to β in γ-tokoferoli bistveno učinkovitejši kot v organizmu. Pšenični kalčki in lešniki prav tako vsebujejo omembe vredne količine. V živilih živalskega izvora je vsebnost tokoferolov relativno majhna in je odvisna od prehrane živali (Referenčne vrednosti..., 2004).

Preglednica 7: Vsebnost posameznih tokoferolov (TF), tokotrienolov (T3) in števila ekvivalentov α-tokoferola v različnih oljih v mg/100 g (Schwartz in sod., 2007)

	α - TF	β - TF	γ - TF	δ - TF	α - T3	β - T3	γ - T3	α - TF Ekvivalentov
sončnično olje	59	2,4	1,4	0,27	0,11	/	/	60
repično olje	24	/	39	0,98	/	/	/	28
koruzno olje	18	1,1	44	2,2	0,94	/	1,3	23
oljčno olje	24	0,3	1,4	/	/	/	/	24
laneno olje	1,2	/	52	0,95	/	/	/	6,4
kokosovo olje	0,2	/	0,12	/	3	0,17	0,64	1,1

2.5 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNEGA POTENCIALA V ŽIVILU

V kompleksnem obroku so prisotni različni antioksidanti. K antioksidativnemu potencialu vodotopne frakcije največ prispevajo različni polifenoli, vitamin C (askorbinska kislina) in različni reducenti, ki vsebujejo aminokislino cistein (v največji koncentraciji je prisoten tripeptid glutation). Vse tri našete spojine reagirajo v testu s Folin-Ciocalteaujevim reagentom, kar pomeni, da je test primeren za določevanje skupne antioksidativne aktivnosti kompleksnega živila (Roginsky in Lissi, 2005).

Velik problem pri določevanju antioksidativne aktivnosti v kompleksnih matriksih predstavlja stabilnost antioksidantov. Izjemno nestabilen je vitamin C, ki se po homogenizaciji zelo hitro pretvarja v dehidroaskorbinsko kislino. Vitamin C lahko stabiliziramo z dodatkom reducenta ali metafosforne kisline med postopkom homogenizacije (Wechtersbach, 2005).

Antioksidativno aktivnost v obroku oziroma v živilu lahko določamo na dva načina, direktno ali indirektno. Pri indirektnih metodah merimo sposobnost antioksidantov za lovljenje tistih prostih radikalov, ki niso direktno povezani z oksidacijsko razgradnjo.

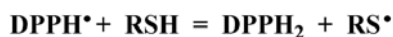
Primer indirektnega določanja je uporaba obarvanih prostih radikalov, kjer določamo sposobnost antioksidanta da odda vodikov atom in ne direktno antioksidativno aktivnost, čeprav sta ti dve lastnosti včasih neposredno povezani. Direktne metode pa na splošno temeljijo na preučevanju vpliva dodanega antioksidanta na potek verižne oksidacije določenega substrata s prostimi radikali. Za substrate oksidacije lahko izberemo posamezne lipide, proteine, DNA, ali biološki material, ki vsebuje lipide (krvna plazma, LDL, biološke membrane, ...) (Roginsky in Lissi, 2005).

2.5.1 Indirektna metoda za določevanje antioksidativne aktivnosti v živilu s prostim radikalom DPPH[•]

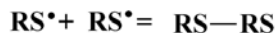
Metoda s prostim radikalom DPPH[•] je ena izmed najstarejših indirektnih metod za določanje antioksidativne aktivnosti. Temelji na reakciji med stabilnim prostim radikalom DPPH[•] in donorji vodika (npr. fenoli) (Brand-Williams in sod., 1995). DPPH[•] ima velik molarni absorpcijski koeficient v vidnem delu spektra z maksimumom pri 517 nm, kar pomeni, da lahko koncentracijo radikala DPPH[•] določamo spektrofotometrično, možno pa je tudi določanje z elektronsko spinsko resonanco (Roginsky in Lissi, 2005).

Antioksidativno aktivnost z radikalom DPPH[•] lahko določamo na dva načina: dinamično ali statično. Pri dinamični metodi merimo hitrost razpada DPPH[•] po dodatku vzorca antioksidanta. Pri statični metodi pa določamo ravnotežno stanje, ko vsi prisotni antioksidanti reagirajo z radikalom (Brand-Williams, 1995). S prvo metodo torej preučujemo reaktivnost antioksidantov, z drugo pa stehiometrijo med antioksidanti in DPPH[•].

Če molekula DPPH[•] reagira samo z 1 molekulo antioksidanta, potem je stehiometrija reakcije 1:1. V naslednjih enačbah je prikazan primer reakcije cisteina (RSH) z DPPH[•].

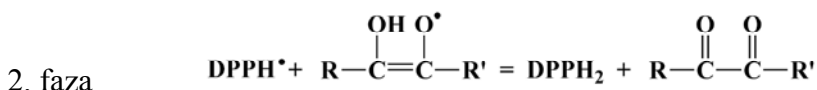
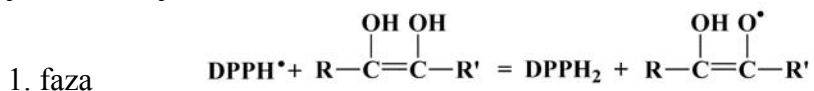


Prosti radikal RS^\bullet reagira s še eno sebi enako molekulo, ki nastane z vzporedno reakcijo.



Torej sta za redukcijo dveh radikalov DPPH^\bullet potrebni dve molekuli cisteina.

V primeru, da ima molekula, ki reagira z radikalom, dve vezalni mesti (npr. askorbinska kislina) je teoretično razmerje med DPPH^\bullet in antioksidantom 2:1. Primer reakcije prikazujeta naslednji enačbi:



Iz zgornjih enačb je razvidno, da je za redukcijo dveh molekul DPPH^\bullet teoretično potrebna ena molekula askorbinske kisline. Stehiometrija $\approx 2:1$ velja tudi za α -TF in nekatere druge spojine (Molyneux, 2004).

Rezultat dinamične metode največkrat podamo kot hitrostno konstanto reakcije razpada radikala. Rezultate statične metode pa lahko podamo na več načinov.

Eden izmed načinov je tako imenovana koncentracija učinkovitosti, pogosto pisana kot EC_{50} ali IC_{50} . Koncentracija učinkovitosti je definirana kot koncentracija antioksidanta, ki je potrebna za redukcijo 50 % radikala DPPH^\bullet oz. za ustrezno zmanjšanje absorbance. V literaturi se ta način podajanja rezultatov uporablja zelo pogosto, čeprav ima določene pomanjkljivosti. Avtorji na primer velikokrat ne navedejo uporabljene koncentracije radikala DPPH^\bullet v testirani raztopini, kar onemogoča direktno določanje antioksidativne aktivnosti in primerjavo z rezultati drugih avtorjev. Poleg tega se z večanjem antioksidativne aktivnosti zmanjšuje tudi vrednost EC_{50} , kar je predvsem nerodno pri grafičnem predstavljanju (Molyneux, 2004).

Podatke lahko predstavimo tudi tako, da izračunamo razmerje med številom molov DPPH^\bullet , ki reagira z ustreznim številom molov določenega antioksidanta. Antioksidanti z večjim razmerjem DPPH^\bullet /antioksidant so bolj učinkoviti. Vzorci, ki jim določamo antioksidativno aktivnost, so pogosto kompleksni, npr. rastlinski ekstrakti, kar pomeni, da ne poznamo njihove dejanske sestave in molarne koncentracije. Takrat antioksidativno učinkovitost vzorca smiselno podati kot razmerje med številom molov DPPH^\bullet , ki reagirajo z antioksidanti v 1g suhe snovi (Molyneux, 2004).

Porabljene mole DPPH[•] v vzorcu lahko enostavno izračunamo iz Beer-Lambertovega zakona.

$$\Delta A = \varepsilon \cdot \Delta c \cdot l; \quad n_{DPPH_2} = c \cdot V_{reakcijske\ zmesi} \quad \dots (1)$$

ΔA ustreza razliki absorbance med referenčno raztopino kateri je dodan samo DPPH[•] in raztopino kjer je poleg DPPH[•] še antioksidant, ε je molarni absorpcijski 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).

Ne glede na to, ali DPPH[•] raztopimo v etanolu ali metanolu, je metoda enako učinkovita, ker ne povzročata interferenc. Osnovni opis metode je priporočal, da se reakcijo izvaja v pH območju med 5,0 in 6,5, vendar so kasnejše raziskave pokazale, da pH nima posebne vloge pri reakciji. Koncentracijo DPPH[•] izberemo v območju med 50 in 100 μ M, zato da so absorbance referenčne raztopine manjše od 1,0. Za standarde se najpogosteje uporabljata askorbinska kislina in α -tokoferol. Delovna valovna dolžina je v literaturi podana različno, med 515 in 520 nm. Reakcijski čas metode je običajno 30 min, vendar so nekateri avtorji uporabljali tudi krajši čas (Molyneux, 2004).

2.6 EKSTRAKCIJA ANTIOKSIDANTOV

Živila vsebujejo nepolarne kot tudi polarne antioksidante, ki skupaj sestavljajo zelo kompleksno mešanico. Za določitev celotne antioksidativne aktivnosti nekega živila je potrebno določiti tako nepolarne kot polarne antioksidante (Arnao in sod., 2001). Za vsako živilo posebej je zaradi različne polarnosti antioksidantov in ostalih komponent potrebna optimizacija metode ekstrakcije. To vključuje predvsem izbor topila in tudi ostale parametre ekstrakcije (Andersen in sod., 2005).

2.6.1 Ekstrakcija polarnih antioksidantov

Pred ekstrakcijo je potrebno kompleksne vzorce antioksidantov, v katerih določamo tudi askorbinsko kislino, dobro nakisati. Največkrat se doda metafosforno kislino. Dodana količina kisline mora biti taka, da je končna koncentracija okoli 2 %. Ugotovljeno je bilo, da 75 % askorbinske kisline, ki je bila raztopljena v destilirani vodi, razpade že po pol ure, medtem pa so vzorci, raztopljeni v 2 % metafosforni kislini, ostali stabilni še po 2 urah tudi, če so bili dodani Cu²⁺ ioni, ki katalizirajo oksidacijo askorbinske kisline (Musulin in King, 1936). Pri določanju askorbinske kisline v zelenjavi avtorji priporočajo ekstrakcijo z 10 % trikloroocetno kislino, 8 % očetno kislino, 5 % oksalno kislino ali 3 % metafosforno kislino. V vseh teh ekstraktih so antioksidanti stabilni vsaj še 1 uro po ekstrakciji in čeprav so razlike majhne, so avtorji določili največ askorbinske kisline z uporabo 10 % trikloroocetne kisline (Aydoğmuş in sod., 2002).

2.6.2 Ekstrakcija nepolarnih antioksidantov

Za ločevanje nepolarnih antioksidantov se uporablja več različnih vrst ekstrakcij. Probleme pri ločevanju nepolarnih antioksidantov predstavljajo predvsem relativno majhne koncentracije nepolarnih antioksidantov glede na ostale komponente, ki so topne v maščobah, njihove nestabilne kemične strukture ter občutljivost na UV svetlobo in toploto. Zaradi tega je ekstrakcija nepolarnih antioksidantov običajno sestavljena iz več faz. Za določanje antioksidantov v živilih, ki so običajno v trdni ali poltrdni obliki, se navadno najprej izvede ekstrakcija trdo-tekoče in nato postopek koncentriranja. V nekaterih primerih lahko izvedemo tudi ekstrakcijo z disperzijo trdne faze (Luque-Garcia in Luque de Castro, 2001).

2.6.2.1 Superkritična tekočinska ekstrakcija

V zadnjem obdobju se je superkritična tekočinska ekstrakcija, še posebej z uporabo CO₂, izkazala kot izredno učinkovita metoda ekstrakcije nepolarnih spojin iz trdnih vzorcev. Superkritično ekstrakcijo so prilagodili za ekstrakcijo iz živil. Poskusi ekstrakcije so bili opravljeni na jetrih, pri čemer je bila ponovljivost metode določanja vitamina E, 96 % (Luque-Garcia in Luque de Castro, 2001).

2.6.2.2 Ekstrakcija s trdno fazo (Solid-phase extraction)

Ekstrakcija s trdno fazo je primerna za pripravo vzorcev in čiščenje ekstraktov. Metoda je hitra, dobro ponovljiva, prilagodljiva, selektivna in omogoča ekstrakcije z manjšo porabo organskih topil kot solventna ekstrakcija. Ekstrakcija s trdno fazo zmanjšuje možnost kontaminacije in je primerna tudi za čiščenje in koncentriranje vitaminov in antioksidantov. Glede na izbiro separacijske kolone in povezavo s HPLC je metoda primerna za določanje vitaminov A, D₂, D₃, E, K₁ in K₃ v izredno nizkih koncentracijah. Najpogosteje uporabljena kolona za ekstrakcijo v maščobah topnih vitaminov je kolona, polnjena z reverzno fazo (C₁₈) (Luque-Garcia in Luque de Castro, 2001).

2.6.2.3 Organska solventna ekstrakcija

Organska solventna ekstrakcija je separacijska metoda za ločevanje posameznih faz mešanic na osnovi različnih topnosti komponent v mešanici. Metoda je primerna za izolacijo antioksidantov iz tekočih matriksov in se zato pogosto uporablja za ekstrakcijo v maščobi topnih vitaminov iz telesnih tekočin in je primerna tudi za tekoča živila. Za organsko solventno ekstrakcijo je na voljo mnogo različnih čistih ali mešanih topil z različno polarnostjo. Za ekstrakcijo α -tokoferola se uporabljajo predvsem etil acetat, dietileter ter mešanice metanola in toluena, tetrahidrofurana in dietiletra, ksilen, dietileter ali heksan. Po ekstrakciji lahko proteine in ostale moteče snovi odstranimo s filtracijo ali z dodatkom acetonitrila. Ta faza je zelo pomembna, ko izvajamo analizo antioksidantov s HPLC metodo. Za izolacijo v maščobi topnih vitaminov in antioksidantov iz trdnih ali pol trdnih živil predhodno opravimo izpiranje. Izpiranje največkrat opravimo kar z organsko ekstrakcijo. Vitamin E iz trdnih ali poltrdnih vzorcev ekstrahiramo s Soxhletovo ekstrakcijo s pomočjo etanola ali heksana (Luque-Garcia in Luque de Castro, 2001). Nekateri avtorji priporočajo homogenizacijo živila pri 4 °C z etil acetatom pri zmanjšani

svetlobi in nato ločevanje faz. Izbor etil acetata je primeren predvsem takrat, kadar istočasno določamo polarne in nepolarne antioksidante, predvsem zaradi večje polarnosti glede na heksan in še nekatera druga topila (Arnao in sod., 2001). Spet drugi avtorji pa priporočajo postopke, ki vključujejo umiljenje. Ti postopki so sestavljeni iz več zaporednih solventnih ekstrakcij, sušenja in koncentriranja. Vendar pa ima ta postopek več slabosti. Največji problem predstavlja majhna stabilnost α -tokoferola v alkalnem, zato je potrebno izvajati postopke ob dodatkih drugih antioksidantov, ki stabilizirajo α -tokoferol, zmanjšani svetlobi in vpihovanju dušika. Isti avtorji tudi ugotavljajo, da med hladno saponifikacijo in direktno ekstrakcijo α -tokoferola iz žitaric z mešanico topil heksan, etil acetat (8:2) ni značilne razlike (Ryynänen in sod., 2004).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Vzorčene in stehtane obroke, ki so jih dnevno pripravljali v vojaški kuhinji v Vipavi, so dostavljali vsak dan na Biotehniško fakulteto. Vojašnica je od 20. do 27. oktobra ter od 14. do 21. novembra, vsak dan, razen ob petkih, dostavljala 6 celodnevni obrokov, ki so vsebovali zajtrk, kosilo večerjo.

3.1.1 Protokol vzorčenja celodnevni obrokov hrane (Stibilj in sod., 2002)

Ustrezen način odvzema tipičnega vzorca je zelo pomemben, saj ima odločilen vpliv na rezultate analiz. Pri odvzemu celodnevni obroka je potrebno upoštevati naslednje:

- Odvzame se posebej vsak obrok in vedno vse štiri obroke (zajtrk, kosilo, večerja in malica). Analizirajo se celodnevni jedilniki tistih vojaških kuhinj, ki dnevno pripravijo vsaj 100 obrokov.
- Odvzamejo se trije obroki, ki predstavljajo povprečen vojaški obrok in vsebujejo vse z jedilnikom predpisane jedi
- Odvzamejo se obroki neposredno z delilne linije. Odvzame se približno deseti, petdeseti in osemdeseti vzorec.
- Obrok se iz krožnika strese neposredno v suho in čisto plastično posodo in se pokrije s pokrovom. Vzorce se do dostave na dogovorjeno lokacijo shrani v hladilniku.
- Vsako jed se pred tem, ko se da v posodo, stehta. Teža se vpiše v priložen obrazec.
- Vzorce se na dogovorjeno lokacijo dostavi v hladilni torbi ali izolirani (termo) posodi.
- Jedi, ki so industrijsko pakirane, kot npr. porcijski med, pašteta, jogurti in pakirane pijače ipd. ter sadje se prav tako hrani v hladilniku v PE vrečkah in se jih odda v analizo skupaj z vzorci, ki so v posodi.
- Pijača, ki je sestavni del obroka, se zbira posebej v čisti posodi.
- Kruh, ki je sestavni del celodnevni jedilnika, se da v čisto PE vrečko in se ga priloži k ostalemu vzorcu.

Celodnevne vojaške obroke, ki so bili predhodno stehtani v vojaški kuhinji v Vipavi, so dostavili na Biotehniško fakulteto, oddelek za živilstvo.

3.1.2 Priprava vzorcev

Preden smo ohlajene obroke dali v mali kuter (homogenizator) v laboratoriju Katedre za tehnologijo mesa in vrednotenje živil, smo sadju odstranili olupke (banane in pomaranče) in peške (jabolka in hruške), ter takoj dodali fosforno (V) kislino, da smo znižali pH vrednost, saj je znano, da je predvsem vitamin C mnogo bolj obstojen pri nizkem pH. Dodatek fosforne kisline (pH homogenizata = 2) pred homogenizacijo je dal pričakovano najboljše rezultate, saj so določili največji delež polarnih antioksidantov in vitamina C v vzorcih (Wectersbach, 2005).

Najprej smo homogenizirali eno minuto pri 300 min^{-1} in nato povečali obrate na 3000 min^{-1} , po treh minutah smo zaključili homogenizacijo. Takoj smo izmerili temperaturo in

pH s pH metrom. Nato smo približno 2 g homogenizata dali v zatehtane plastične centrifugirke in jih takoj zamrznili s tekočim dušikom. Do analize, ki smo jo opravili še isti dan smo vzorce shranjevali v zamrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ostale ostanke homogeniziranih obrokov smo dali v plastične vrečke in jih shranili do nadaljnjih analiz v hladilnici pri temperaturi $0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2 METODE

3.2.1 Določanje antioksidativnega potenciala živila z radikalom DPPH[•]

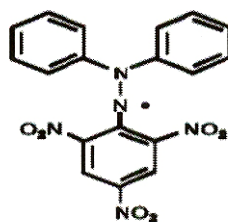
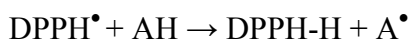
Znano je, da so nekateri antioksidanti zelo nestabilni v kompleksnih matriksih (Kaur in Kapoor 2001). Dejavniki kot so temperatura, pH, kovinski ioni in svetloba lahko vplivajo na kemijske pretvorbe določenih antioksidantov, med drugimi tudi na stabilnost vitaminov C in E (Kamaleldin in Appelqvist 1996).

Zaradi pomanjkanja strokovne literature na področju hkratnega določevanja polarnih in nepolarnih antioksidantov v kompleksnem matriksu, so izvedli preliminarne eksperimente, s katerimi so določili vsebnost antioksidantov v homogeniziranem obroku. Izkazalo se je, da so tako polarni kot nepolarni antioksidanti zelo nestabilni, če je pH homogenizirane zmesi v nevtralnem območju. Z zniževanjem pH reakcijske zmesi so zagotovili boljšo stabilnost antioksidantov in določili njihovo večjo vsebnost v obroku, vendar so tudi v teh primerih opazili zmanjševanje antioksidativne aktivnosti pri vzorcih, ki so bili nekaj dni shranjeni tako na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ kot na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. (Wechtersbach, 2005)

Pri postopku določevanja celokupnih antioksidantov v obroku je nujno potrebno določiti primerno metodo in stopnjo homogenizacije. Primerna homogenost vzorca omogoča, da lahko z odvzemom manjšega deleža obroka zagotovimo pravilnost in ponovljivost rezultatov. Polarne in nepolarne antioksidante v obrokih smo določali z metodo, ki temelji na redukciji radikala DPPH[•] (Brand-Williams in sod., 1995) s prisotnimi antioksidanti in kromatografsko za vitamin C (Koshiishi in Imanari 1997).

Princip

Prosti radikal DPPH[•], (2,2–difetil–1–pikril–hidrazil) je topen v organskih topilih kot sta etanol in metanol. Rastopina radikala, ki se maksimalno absorbira pri valovni dolžini 517 nm, je vijolično obarvana. Radikal se reducira po naslednji reakciji, v kateri je AH nek reducent, DPPH[•] pa oksidant:



Slika 6: 2,2–difetil–1–pikril–hidrazil

Reducirana oblika radikala (DPPH-H) ne absorbira pri 517 nm, kar pomeni, da ima dodatek antioksidantov za posledico zmanjšanje absorbance pri 517 nm (Brand-Williams in sod., 1995, Molyneux, 2004).

Reagenti:

- DPPH[•] (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil), Sigma, ZDA
- 2 % MFK (metafosforna kislina), Aldrich, ZDA
- 96 % etanol, Merck, Nemčija
- metanol, Merck, Nemčija

Izvedba

Umeritvena krivulja z reagentom DPPH[•]: Za določanje skupnega antioksidativnega potenciala polarnih antioksidantov uporabimo umeritveno krivuljo s standardi askorbinske kisline za določanje nepolarnih antioksidantov pa α -tokoferol. Na analitski tehtnici smo zatehtali 4 mg DPPH[•] in ga ob mešanju z magnetnim mešalom raztopili v 20 ml etanola oziroma metanola. Etanol smo uporabili v primeru ko smo določali antioksidativno aktivnost v nepolarni fazi, metanol pa za določanje antioksidativne aktivnosti v polarni fazi.

Vzorci: 2 g homogeniziranega vzorca zatehtamo v plastične centrifugirke in zamrznemo s tekočim dušikom. Za določanje vsebnosti nepolarnih antioksidantov dodamo 10 ml etilacetata in izvedemo 3 minutno ekstrakcijo na vrtinčniku. Po ekstrakciji centrifugiramo 1 minuto pri 3000 min⁻¹. Nepolarne antioksidante določamo v 500 μ l supernatanta, ki ga mešamo z 500 μ l etanola in 250 μ l prostega radikala DPPH[•], raztopljenega v etanolu. Za določanje polarnih antioksidantov odvečno nepolarno fazo zavržemo in dodamo 4 g 2 % MFK. Vzorec smo pomešali na vrtinčniku in centrifugirali 3 minute pri 3000 min⁻¹, da smo dobili bistro polarno fazo. Del polarne faze smo porabili za določanje askorbinske kisline z metodo HPLC, ostali del pa smo razredčili v razmerju 1:1 z 2 % MFK in ponovno centrifugirali 5 minut pri 14000 min⁻¹. Polarne antioksidante določamo v 250 μ l polarne faze, ki jo dodamo v mešanico 750 μ l metanola in 250 μ l DPPH[•], raztopljenega v metanolu.

3.2.2 Postopek določitve vsebnosti askorbinske kisline (vitamin C) s HPLC

Za določanje askorbinske kisline na HPLC sistemu zmešamo 500 μ l supernatanta z 1000 μ l 2 % MFK. Za določanje celokupnega vitamina C (askorbinska kislina + dehidroaskorbinska kislina) zmešamo 500 μ l supernatanta z 1000 μ l 10 mM TCEP (tris[2-karboksietil]fosfin hidroklorid) raztopljenega v 2 % MFK. Askorbinsko kislino smo določali na koloni Synergie C₁₈ 250 mm x 4 mm. Vzorce smo pred nanosom prefiltrirali (0,45 μ m) v steklene vialke. Na kolono, ekvilibrirano s fosfatnim pufrom s koncentracijo 3,54 g/l KH₂PO₄, pH 2,9, smo nanosili 20 μ l prefiltriranega vzorca. Kolono smo po nanosu posameznega vzorca 20 minut spirali pri konstantnem pretoku 0,6 ml/min. Uporabili smo UV detektor (254 nm) (Oruña-Concha in sod., 1998). Koncentracijo askorbinske kisline v vzorcih smo določili s pomočjo umeritvene krivulje standardnih raztopin askorbinske kisline.

3.2.3 Postopek določitve vsebnosti dehidroaskorbinske kisline (DHA)

DHA smo določili indirektno s predhodno redukcijo in merjenjem razlike med askorbinsko kislino v vzorcu pred redukcijo in po njej. Za redukcijo DHA v askorbinsko kislino smo uporabili reducent TCEP (Tris(2-karboksietil)fosfin) (Wechtersbach in Cigić, 2007). Za redukcijo pri nizkih pH vrednostih je možna uporaba novejšega reducenta TCEP, ki dobro deluje v širokem spektru pH. Vzorci, reducirani s TCEP, so stabilni tudi po 96 urah. Čas za redukcijo z reagentom TCEP s končno koncentracijo 0,25 mmol/l v vzorcu je približno 90 minut pri sobni temperaturi. Učinkovitost redukcije s TCEP je enaka pri pH 6,2 in 4,3 (Lykkesfeldt, 2000).

3.2.4 Postopek določanja vitamina E

Po končani homogenizaciji na malem kutru smo del obrokov poslali na analizo v certificirani laboratorij Neutron-Maranello v Modeni, Italija. Pri vzorcih so določili količino α -tokoferola, skupno količino β - in γ -tokoferolov ter količino δ -tokoferola po metodi AOAC Official Methods (1995). Vzorec je bil 45 min podvržen delovanju KOH (z refluksom). Za ekstrakcijo tokoferolov iz neumiljenega dela je bil uporabljen petrol eter. Ločevanje je potekalo s pomočjo tekočinske kromatografije na reverznofazni koloni, za določanje je bil uporabljen fluorometrični detektor.

3.2.5 Določanje maščob po Weibull-Stoldtovi metodi (Plestenjak in Golob, 2000)

Princip

Hidroliza vzorca s HCL, filtriranje, sušenje in ekstrakcija s petroletrom v Soxhletovem aparatu.

Reagenti:

- koncentrirana HCL
- petroleter

Izvedba

V 250 ml čašo odtehtamo od 5 do 10 g zračno suhega vzorca, dodamo 100 ml destilirane vode in 80 ml koncentrirane HCL ter segrevamo 15 minut na vreli vodni kopeli, pri tem mešamo s stekleno palčko. Čašo nato postavimo na kuhalnik ali plinski gorilnik, pokrijemo z urnim steklom in pustimo 30 min rahlo vreti. Še vroče razredčimo z vodo, speremo urno steklo in takoj filtriramo skozi filtrirni papir. Spiramo z vročo vodo do negativne reakcije na kloridne ione. Filtrirni papir z vsebino položimo na urno steklo in sušimo od 2 do 4 ure pri temperaturi 105 °C.

Suh filtrirni papir z vsebino damo v ekstrakcijski tulec, pokrijemo z vato, tulec vstavimo v ekstrakcijski nastavek Soxhletovega aparata, namestimo čisto, stehtano bučko in prilijemo s topilom. Topila mora biti dovolj, da se v ekstraktorju lahko pretaka. Ekstrahiramo 4 do 6 ur, nato topilo oddestiliramo, ostanek v bučki sušimo eno uro pri temperaturi 105 °C, ohladimo in stehtamo.

Račun:

$$\% \text{ maščob v zračno suhem vzorcu} = \frac{b - c}{a} \times 100 \quad \dots(2)$$

a = odtehta vzorca (g)

b = teža bučke z ostankom (g)

c = teža prazne bučke (g)

Izračunamo odstotek maščob v svežem obroku:

$$\% \text{ maščob v svežem obroku} = (\% \text{ maščob v zračni sušini} \times \% \text{ suhe snovi}) / (100 - B)$$

3.2.6 Določanje maščobnokislinske sestave maščob

Princip

Maščobnokislinska sestava maščob se določa z metodo, modificirano po Park in Goinsu.

Reagenti:

- NaCl
- metilenklorid (CH_2Cl_2)
- sveže pripravljene NaOH v metanolu
- BF_3 (borov trifluorid) v metanolu
- heksan
- standardna mešanica (Nu Chek 85)
- standardna mešanica (Nu Chek 68 D)
- standardna mešanica (FAME Mix C4-C24)

Izvedba

Odtehtamo 0,2 g ($\pm 0,001$ g) predhodno homogeniziranega vzorca maščobe (masa vzorca : masa NaCl = 2 : 1) v epruvete. Sledi dodatek 300 μl metilen klorida (CH_2Cl_2) in 3 ml 0,5 M sveže pripravljenega natrijevega hidroksida (NaOH) v metanolu. Epruvete tesno zapremo s teflonskim pokrovčkom in jih dobro premešamo. Vzorce segrevamo v termobloku 10 minut pri 90 °C ter jih vmes večkrat premešamo. Po segrevanju sledi hitro hlajenje v ledeni vodi (0 °C). Ohlajeni zmesi dodamo 3 ml 14 % BF_3 v metanolu, dobro premešamo in ponovno segrevamo v termobloku 10 minut pri 90 °C. Sledi hlajenje na sobno temperaturo (23 °C), dodatek 3 ml 10 % NaCl v vodi in 2 ml heksana. Epruvete nato 1 minuto močno stresamo, da pride do čim boljše ekstrakcije metilnih estrov maščobnih kislin (MEMK) iz vodne v nepolarno, heksansko fazo. Sledi centrifugiranje 10 minut pri 2000 x g. Po centrifugiranju previdno odpipetiramo zgornjo heksansko fazo v temne penicilinke in 1 μl injiciramo v plinski kromatograf s plamensko ionizacijskim detektorjem (GC-FID).

Plinska kromatografija

Vsebnost in deleže posameznih maščobnih kislin določamo s plinsko kromatografijo na plinskem kromatografu (Agilent Technologies 6890), s plamensko ionizacijskim detektorjem (FID). Uporabimo kapilarno kolono SPTM-2380 (Supelco, 24111) (60 m × 0,25 mm × 0,2 μm).

Temperaturni program za ločevanje in detekcijo: 150 °C (4 min); 4 °C/min do 180 °C (5 min), 3 °C/min do 240 °C (2 min); temperatura injektorja 250 °C; injektor: split:splitless = 1:30, volumen 0,5 μl; temperatura detektorja FID 280 °C; nosilni plin: He (čistost 6) 2,3 ml/min; maskirni plin: N₂ (čistost 6) 45 ml/min; plina detektorja: H₂ (čistost 6) 40 ml/min; sintetični zrak (čistost 6) (21 % O₂) 450 ml/min.

Za določitev in vrednotenje rezultatov uporabimo naslednje standarde MEMK: standardno mešanico (Nu Chehk 85 Prep. Inc), standardno mešanico (Nu Chehk 68 D Prep. Inc.) ter standardno mešanico FAME Mix C4-C24 (Supelco, 18919-1AMP).

Določanje faktorja odzivnosti (Rf) plamensko ionizacijskega detektorja (FID)

Za natančno kvantitativno vrednotenje kromatogramov je potrebno določiti faktor odzivnosti detektorja (Rf). Določimo ga s standardno mešanico (Nu Check 85 Prep. Inc), kjer so znani utežni % posameznih maščobnih kislin.

Račun:

$$Rf = \frac{ut.\%_{posam.MEMK} \times \sum_{i=1}^n A_i}{A_i \times 100 ut.\%} \quad \dots(3)$$

A_i = površina posameznega MEMK-standarda

ut. % posameznih metilnih estrov maščobnih kislin v Nu Check 85 znaša 3,03, razen za metilne estre heksadekanojske (palmitinske) maščobne kisline, kjer znaša 6,06.

Določanje konverzijskega faktorja (FA_i) za posamezno MK

Faktor za pretvorbo MEMK v MK (FA_i) določimo po naslednji formuli:

Račun:

$$FA_i = \frac{MrMK_i}{MrMEMK_i} = \frac{MrMK_i}{MrMK_i + 14} \quad \dots(4)$$

MrMK_i = molska masa posamezne maščobne kisline

MrMEMK_i = molska masa posameznega metilnega estra maščobnih kislin, ki se od MrMK_i razlikuje za Mr (CH₂) skupine = 14

Izračun utežnih deležev maščobnih kislin (ut %)

Utežni delež maščobnih kislin v vzorcu izračunamo iz relativne površine vrha posamezne maščobne kisline na kromatogramu (A_i) in upoštevanjem faktorja odzivnosti detektorja (Rf_i) ter konverzijskega faktorja (FA_i) pretvorbe MEMK v MK.

Račun:

$$ut. \% MK = \frac{(Rf_i \times FA_i \times A_i)}{\sum_{i=1}^n (Rf_i \times FA_i \times A_i)} \times 100 \quad \dots(5)$$

A_i = površina posamezne maščobne kisline

Rf_i = faktor odzivnosti detektorja za posamezno maščobno kislino

FA_i = konverzijski faktor za posamezno maščobno kislino

3.2.7 Ocena hranilnih vrednosti obrokov

Ocena hranilnih vrednosti vojaških obrokov smo opravljali s pomočjo računalniškega programa Prodi 5.0. Program Prodi 5.0 je računalniški program podjetja Nutri-Science GmbH katerega sedež je v Nemčiji. Program je zasnovan na bazi podatkov (Souci – Fachmann – Kraut) in na prehranskih smernicah DACH (Nemčija, Avstrija, Švica).

3.2.8 Statistična obdelava podatkov

Metode statistične analize temeljijo na postavljanju, preverjanju, sprejemanju ali zavračanju domnev. Vedno natančno definiramo osnovno domnevo (H), ki pravi, da se preiskovane vrednosti med seboj statistično značilno razlikujejo. Osnovni domnevi poiščemo nasprotno, ničelno domnevo (H_0), ki trdi, da razlik ni ali pa so zgolj naključne. Ker si osnovna in ničelna domneva nasprotujeta, ima zavrnitev ničelne domneve za posledico sprejetje osnovne domneve. Pred preverjanjem domnev je potrebno določiti kritično oziroma zgornjo mejo tveganja (α), pri kateri sprejmemo ali zavrnemo ničelno hipotezo. V biostatistiki so najpogosteje izbrane vrednosti 0,001, 0,01 in 0,05 oz. govorimo o 0,1%, 1% in 5% stopnji tveganja. Nato za podatke, ki jih želimo analizirati, izberemo ustrezen statistični test. Če je izračunana vrednost izraza manjša od kritične vrednosti, ki jo pri izbrani stopnji tveganja in številu prostostnih stopinj odčitamo iz ustrezne statistične preglednice, zavrnemo ničelno domnevo in sprejmemo osnovno. V nasprotnem primeru ničelne domneve ne moremo zavrniti in osnovna ostane nepotrjena (Adamič, 1989).

Podatke, ki smo jih pridobili z analizami smo uredili v Microsoft Excel-u. Tako urejene podatke smo statistično obdelali s pomočjo računalniškega programa SPSS. Obdelani rezultati ekperimentalnih podatkov so podani v obliki vrednosti statistične značilnosti (signifikance) in predstavljajo izračunano vrednost izraza, ki ji je bila pripisana verjetnost, odčitana iz ustrezne statistične preglednice vzorčnih podatkov pri 0,01 in 0,05 stopnji tveganja. Kadar je vrednost signifikance manjša od stopnje tveganja, katerega smo določili, potem sprejmemo osnovno hipotezo, saj je tveganje, s katerim zavračamo ničelno hipotezo, dovolj majhno. Signifikanca, večja od stopnje tveganja pomeni, da je tveganje zavrnitve ničelne domneve preveliko.

3.2.8.1 Korelacija

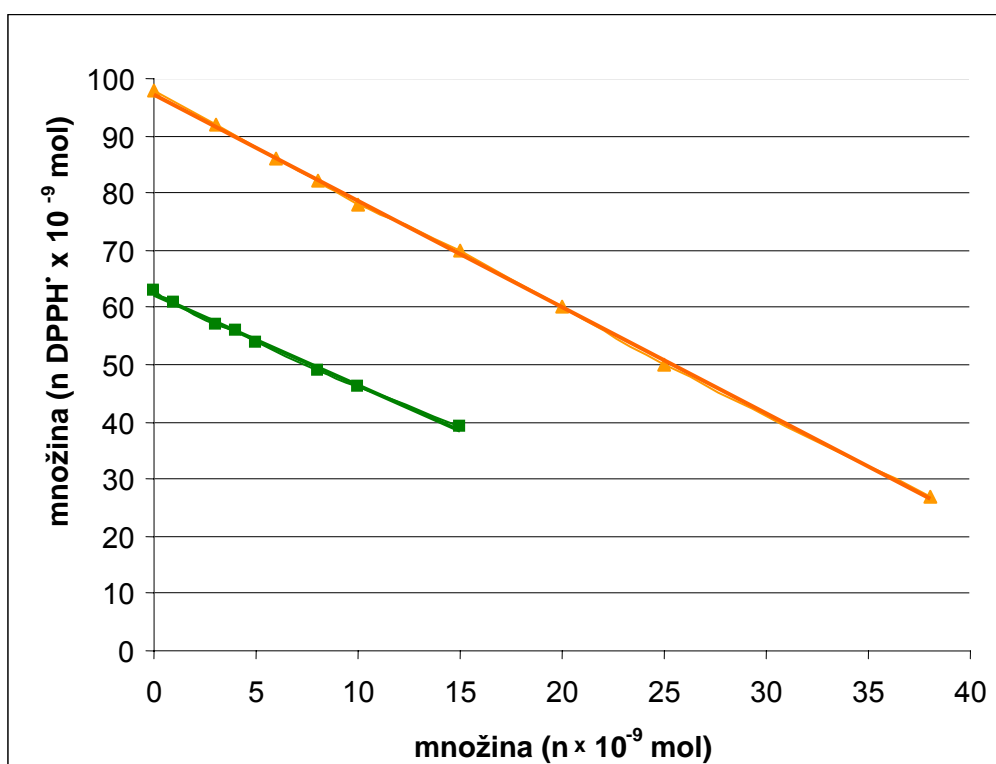
Korelacija je metoda, ki jo uporabimo takrat, kadar imamo podatke o dveh naključnih kvantitativnih spremenljivkah, od katerih nobene ne izberemo sami vnaprej in ne moremo govoriti o odvisnosti ene od druge, ampak le o njuni medsebojni povezanosti. Korelacija se razlikuje glede na smer povezanosti in zato govorimo o pozitivni in negativni korelaciji. Koeficienti korelacije imajo lahko vse vrednosti med -1 in +1. Vrednost -1 pomeni, da imamo maksimalno negativno korelacijo, vrednost +1 pa, da imamo maksimalno pozitivno korelacijo. Če je koeficient korelacije enak 0, pomeni, da med obema spremenljivkama ni nobene povezanosti. (Adamič, 1989)

4 REZULTATI

4.1 VSEBNOSTI POLARNIH IN NEPOLARNIH ANTIOKSIDANTOV V OBROKIH

Vsebnost polarnih in nepolarnih antioksidantov v obrokih smo določali s pomočjo radikala DPPH[•] (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil).

Na spodnjem grafu (slika 7) je podana množina porabljenega DPPH[•] v kiveti v odvisnosti od množine dodane askorbinske kisline in α -tokoferola. Absolutna vrednost naklona premic poda število molov DPPH[•], ki oksidira mol antioksidanta. Mol askorbinske kisline reducira 1,878 mola DPPH[•] in mol α -tokoferola reducira 1,596 mola DPPH[•].



Slika 7: Odvisnost množine porabljenega DPPH[•] od množine askorbinske kisline (▲) in α -tokoferola(■)

Množino porabljenega reagenta DPPH[•] smo izračunali s pomočjo Beer-Lambertovega zakona. Vrednost polarnih in nepolarnih antioksidantov v obrokih smo izračunali po naslednjem postopku: izmerili smo vrednost absorbance raztopine DPPH[•], v kateri je bilo samo topilo, ter vrednost absorbance za raztopine DPPH[•], ki smo jim dodali antioksidante. Razlika absorbanc je bila merilo za količino reduciranega DPPH[•].

Primer:

$$\Delta A = \Delta_{\max} - \Delta_{\min} = 0,681 - 0,257 = 0,423$$

Iz znanega povprečnega absorpcijskega koeficienta DPPH[•] in razlike absorbanc smo izračunali množino reduciranega DPPH[•], ki je enak nastali množini DPPH₂.

$$n_{DPPH_2} = \frac{\Delta A \cdot V}{\epsilon \cdot l} = \frac{0,423 \cdot 0,00125 l}{12000 l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}} = 4,406 \times 10^{-8} mol \quad \dots(6)$$

Ker poznamo razmerje med moli reduciranega DPPH[•] in oksidirano askorbinsko kislino, lahko izrazimo antioksidante kot ekvivalente askorbinske kisline (za polarne antioksidante).

$$4,406 \times 10^{-8} mol / 1,878 = 2,346 \times 10^{-8} mol \quad \dots(7)$$

Iz znanih razredčitev (preglednica 8) lahko izrazimo ekvivalentno maso askorbinske kisline na g obroka (upoštevamo, da je gostota vseh raztopin približno 1,0 g/ml)

Preglednica 8: Razredčitve pri pripravi vzorcev za polarne antioksidante

Stopnje	Razredčitev
2 g obroka + 4 g 2 % MFK	3
750 µl vzorca v 1500 µl raztopine	2
250 µl polarne faze v 1250 µl raztopine	5
Skupna razredčitev:	30

V vzorcu je vsebnost askorbinske kisline na g obroka:

$$\frac{m_{AK \text{ v testu}}}{m_{obroka \text{ v testu}}} = \frac{n_{AK} \times M_{AK}}{\left(\frac{m_{bruto}}{m_{neto}} \right) R} = \frac{2,346 \times 10^{-8} mol \times 176,1 g/mol}{\left(\frac{13163 g}{11807 g} \right) 30} = 111 \frac{\mu g AK}{g obroka} \quad \dots(8)$$

Vsebnost nepolarnih antioksidantov izračunamo po istih enačbah kot v primeru polarnih, vendar moramo vstaviti drugo razmerje med moli reduciranega DPPH[•] in α-tokoferola, ki v našem primeru znaša 1,596. Upoštevati je potrebno tudi drugi razredčitveni faktor, ki je pri nepolarnih antioksidantih 12,5 (preglednica 9). Tudi tu smo upoštevali, da je gostota vzorca približno 1,0 g/ml.

Preglednica 9: Razredčitve pri pripravi vzorcev za nepolarne antioksidante

Stopnje	Razredčitev
2 g vzorca + 10 ml etilacetata	5
500 µl nepolarne polarne faze iz 1250 µl raztopine	2,5
Skupna razredčitev:	12,5

Tako dobimo končno vsebnost ekvivalentov α -tokoferola na g obroka: $= 105 \frac{\mu\text{g } \alpha \text{ TF}}{\text{g obroka}}$

V spodnji tabeli so upoštevani povprečni rezultati za tri paralelke, ki so bile določene v vsakem obroku.

Preglednica 10: Povprečne vsebnosti polarnih in nepolarnih antioksidantov v vojaških obrokih

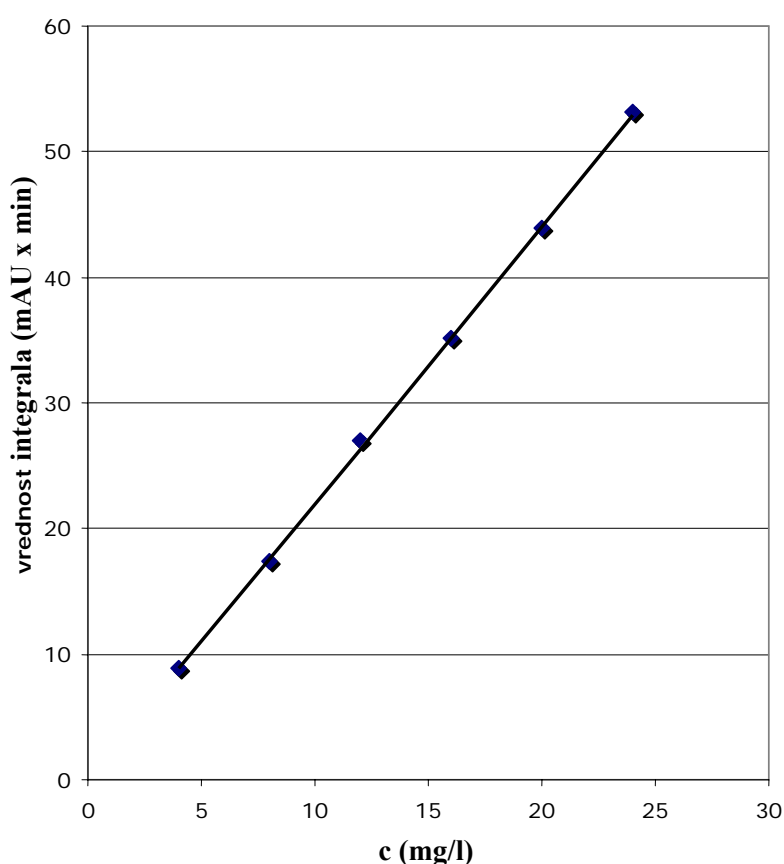
Obrok	Povprečje polarni antioksidanti (mg ASK / 100g)	SD	povprečje nepolarni antioksidanti (mg α -TF /100g)	SD
1	10,77	$\pm 0,57$	10,02	$\pm 0,75$
2	11,04	$\pm 0,52$	8,97	$\pm 0,64$
3	9,87	$\pm 0,69$	10,73	$\pm 0,78$
4	13,75	$\pm 0,69$	9,29	$\pm 0,66$
5	12,82	$\pm 0,91$	11,92	$\pm 0,46$
6	12,01	$\pm 0,81$	8,87	$\pm 0,89$
7	9,06	$\pm 1,15$	9,85	$\pm 0,88$
8	14,87	$\pm 0,98$	12,67	$\pm 0,78$
9	11,16	$\pm 1,11$	10,17	$\pm 0,44$
10	11,02	$\pm 0,97$	8,11	$\pm 0,42$

4.2 KROMATOGRAFSKO DOLOČENA VSEBNOST VITAMINA C NA HPLC SISTEMU

4.2.1 Umeritvena krivulja za kromatografsko določanje askorbinske kisline

Vrednost površine kromatografskega vrha je izražena kot $\text{mAU}_{254 \text{ nm}} \times \text{min}$ pri pretoku 0,6 ml/min in nanosu 20 μL standardne raztopine askorbinske kisline. Enačba, iz katere lahko izračunamo masno koncentracijo askorbinske kisline v vzorcu, se glasi:

$$c_{\text{ASK}} (\text{mg/L}) = \text{vrednost integrala} / 2,207 \quad \dots(9)$$



Slika 8: Umeritvena krivulja askorbinske kisline (\blacklozen) na HPLC sistemu.

Odvisnost vrednosti integrala (mAU x min) od koncentracije askorbinske kisline. Kolona Synergie C_{18} 250 mm x 4 mm, mobilna faza fosfat pH 2,9, pretok 0,6 ml/min, detekcija pri 254 nm.

Povprečno vrednost koncentracije askorbinske kisline v 100 g obroka izračunamo po sledeči formuli, v kateri je R razredčitev, k je naklon premice, m pa je masa obroka.

$$\Delta \text{ mg ASK} / 100\text{g obroka} = \frac{\Delta \text{ vrednost integrala} \times R \times \frac{m_{\text{bruto}}}{m_{\text{neto}}}}{k \times 10} = \frac{8,8643 \times 9 \times \frac{13163 \text{ g}}{11807 \text{ g}}}{2,2066 \times 10} = 4,03 \quad \dots(10)$$

Povprečno vsebnost vitamina C v obroku izračunamo tako, da vsebnost, ki smo jo določili v 100 g, preračunamo na maso celotnega obroka. V preglednici 11 so predstavljene vrednosti vitamina C v posameznih celodnevni obrokih.

Odstotek DHA (dehidroaskorbinska kislina) izračunamo po naslednji formuli:

$$\% \text{ DHA} = \frac{\text{celota} - \text{ASK}}{\text{celota}} = \frac{5,27 \text{ mg} / 100 \text{ g} - 4,03 \text{ mg} / 100 \text{ g}}{5,27 \text{ mg} / 100 \text{ g}} = 23,5 \quad \dots(11)$$

Preglednica 11: Povprečja določenih vrednosti mg askorbinske kisline in mg vitamina C v 100g obroka

Obrok	povprečje (mg ASK / 100g)	SD	povprečje (mg vit. C / 100g)	SD	% DHA
1	4,03	± 0,18	5,27	± 0,21	23,5
2	5,7	± 0,14	7,68	± 0,51	25,8
3	1,95	± 0,06	4,42	± 0,16	55,9
4	4,81	± 0,17	6,27	± 0,10	23,3
5	4,45	± 0,04	7,43	± 0,23	40,1
6	3,07	± 0,15	5,62	± 0,21	45,4
7	1,47	± 0,04	3,2	± 0,12	54,1
8	4,75	± 0,15	8,67	± 0,10	45,2
9	3,11	± 0,29	4,96	± 0,19	37,3
10	2,55	± 0,11	4,15	± 0,05	38,6

4.3 VSEBNOST VITAMINA C V OBROKIH

Povprečne vrednosti količine vitamina C v 100 g obroka pomnožimo z maso posameznega obroka in dobimo količino vitamina C, ki ga vsebuje posamezen vojaški obrok. Rezultati so podani v preglednici 12.

Preglednica 12: Vsebnosti vitamina C v vojaških obrokih

Obrok	1. Sklop					2. Sklop					povprečna vrednost (mg/dan) 1 in 2 sklopa
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	
Računalniška analiza (Prodi 5.0)	250,8	156,3	262,8	153,5	200,6	236,1	209,8	148,5	192,9	250,1	206,1
Kemijska analiza (HPLC)	207,4	264,4	143,4	192,5	219,3	182,6	86,1	260,7	155,7	114,0	182,6

Iz dobljenih podatkov je razvidno, da zaužita količina vitamina C v vojašnici, določenega s računalniško analizo močno variira in sicer od 148,5 mg pa vse tja do 262,8 mg. Najmanj vitamina C naj bi vojaki zaužili v osmem obroku, največ pa v tretjem obroku. Iz dodane priloge A je razvidno, da je bilo v osmem obroku zelo malo sadja in skoraj nič zelenjave, prav sadje in zelenjava ter tudi sadni sokovi s 100 % sadnim deležem so največji vir vitaminov. Pravo nasprotje je bil tretji obrok, saj je bilo vanj vključenega veliko več sadja in zelenjave.

Količina vitamina C, določenega s kemijsko analizo, pa je variirala med 86,1 mg in 264,4 mg. Najmanj vitamina C naj bi zaužili v sedmem obroku, največ pa v drugem. Iz priloge A je razvidno, da je bilo najmanj vitamina C v sedmem obroku, ki je vseboval veliko sadja in zelenjave, vendar pa je bila ta termično obdelana, kar posledično vodi k izgubi vitamina. Največ vitamina C je bilo v drugem obroku, ki je vseboval veliko sadnih sokov, sadja in zelenjave.

Primerjava obeh analiz kaže na velika nihanja količine vitamina C v obrokih. Vzemimo na primer drugi obrok, kjer smo s kemijsko analizo določili najvišjo vsebnost vitamina C in sicer 264,4 mg, medtem ko smo z računalniško analizo določili le 156,3 mg vitamina C. Podoben primer je pri sedmem obroku, ki je ravno obraten od prejšnjega primera, saj smo s kemijsko analizo določili najnižjo vsebnost vitamina C in sicer 86,1 mg, medtem ko smo z matematično analizo določili 209,8 mg vitamina C na dan. Do takih razhajanj rezultatov med metodama prihaja verjetno zaradi načina priprave, oziroma termične obdelave obrokov, saj je kemijska analiza pokazala dejansko vsebnost vitamina C v obroku po termični obdelavi. S programom Prodi 5.0 izračunamo vsebnost vitamina C glede na to, kako so nastavljeni parametri v programu, kjer upoštevanje vpliva termične obdelave nujno ne sovpa z dejanskim stanjem.

Povprečna izračunana energijska vrednost preučevanih celodnevni obrokov je znašala 14.300 KJ. Iz tega sledi, da je priporočen vnos vitamina C za izbran vzorec vojakov 143 mg na dan.

4.4 VSEBNOST VITAMINA E V OBROKIH

Vitamin E podajamo kot mg α -tokoferol ekvivalenta. Za izračun α -tokoferol ekvivalenta smo upoštevali biološko aktivnost posameznih vrst tokoferolov. Po definiciji je biološka aktivnost α -tokoferola 100 %, β -tokoferola 50 %, γ -tokoferola 25 % in δ -tokoferola 0,1 % (Referenčne vrednosti..., 2004).

Računalniška analiza je pokazala, da je bila najmanjša vsebnost vitamina E v šestem in sedmem vojaškem obroku, in sicer 13,6 mg ter 12,8 mg. Največ vitamina E v šestem obroku je vsebovala rižota s svinjskim mesom, 3,39 mg na porcijo, v sedmem obroku pa so največ vitamina E vsebovali skutni štruklji z 2,77 mg na porcijo. Največ vitamina E je bilo v tretjem obroku, in sicer 29,7 mg. V tem obroku je največ vitamina E vsebovala paradižnikova omaka, ki je bila dodana k sirovim raviolom, in sicer 8,56 mg.

S kemijsko analizo smo izmerili najmanjšo vsebnost vitamina E v drugem in v šestem obroku, 10,9 mg ter 10,7 mg, največjo vsebnost vitamina E pa smo izmerili v prvem obroku, in sicer 27,7 mg.

Preglednica 13: Vsebnost α -tokoferola, β -in γ -tokoferolov ter δ -tokoferola v vzorcih vojaških obrokov, določenih z kemijsko analizo Neutron

Obrok	α -tokoferol (mg/100g)	β + σ -tokoferol (mg/100g)	beta faktor (x 0,5)	δ -tokoferol (mg/100g)	delta faktor (x0,01)	skupaj (mg/100g obroka)	m obroka (g)	α -tokoferol ekvivalent mg/obrok
1	0,574	0,290	0,145	0,019	0,000	0,719	3852	27,7
2	0,241	0,140	0,070	0,007	0,000	0,311	3498	10,9
3	0,622	0,395	0,198	0,035	0,000	0,820	3261	26,7
4	0,361	0,254	0,127	0,022	0,000	0,488	3057	14,9
5	0,474	0,448	0,224	0,114	0,001	0,699	2975	20,8
6	0,236	0,183	0,092	0,012	0,000	0,328	3272	10,7
7	0,504	0,490	0,245	0,117	0,001	0,750	2715	20,4
8	0,261	0,545	0,273	0,142	0,001	0,534	3020	16,1
9	0,316	0,617	0,308	0,170	0,002	0,626	3185	19,9
10	0,352	0,324	0,162	0,077	0,001	0,514	2731	14,0

1 mg RRR- α -tokoferol ekvivalent = 2 mg RRR- β -tokoferola = 100 mg RRR- δ -tokoferola

Preglednica 14: Vsebnost vitamina E v vojaških obrokih

Obrok	1. Sklop					2. Sklop					povprečna vrednost (mg/dan) 1 in 2 sklopa
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	
Računalniška analiza (Prodi 5.0)	21,4	16,1	29,7	18,2	20,2	13,6	12,8	25,5	19,2	18,9	19,6
Kemijska analiza (Neotron)	27,7	10,9	26,7	14,9	20,8	10,7	20,4	16,1	19,9	14,0	18,2

Dobljeni rezultati kažejo, da se povprečni vsebnosti vitamina E v obrokih, določeni z eksperimentalno in računalniško analizo le malo razlikujeta. Vsebnost vitamina E, določenega s kemijsko analizo, je bila v šestih obrokih nižja kot je bila vsebnost vitamina E v obrokih, ki smo jo določili s pomočjo računalniškega programa. Vsebnost vitamina E, določenega s kemijsko analizo, je bila v primerjavi z računalniško analizo, presežena v štirih obrokih.

4.5 ENERGIJSKI DELEŽI MAŠČOB (% ED_M) V OBROKIH

Energijske deleže maščob v vojaških obrokih smo izračunali po naslednji enačbi

$$ED \text{ mašč. v \%} = \frac{EV \text{ mašč. (v } 100 \text{ g)}}{EV \text{ } 100 \text{ g obroka}} \times 100 \quad \dots(12)$$

Najnižji energijski delež maščob določen s kemijsko analizo (preglednica 15) je bil v osmem obroku in sicer 25,0 %, kar kaže na to, da je ta obrok vseboval najmanj maščob (priloga A) v primerjavi s četrtem in petim obrokom, ki sta vsebovala več maščob, kar je prispevalo k najvišjemu energijskemu deležu, in sicer 36,8 % ter 36,5 %.

Računalniška analiza je pokazala (preglednica 15), da sta drugi in sedmi obrok vsebovala najmanj maščob, saj sta le 27,0 % prispevala k celotnemu energijskemu deležu, k največjemu celotnemu energijskemu deležu pa so maščobe prispevale v četrtem obroku, 35,0 %.

Preglednica 15: Energijski delež maščob v vojaških obrokih

Obrok	1. Sklop					2. Sklop					Povprečen ED _M (%) 1 in 2 sklopa
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	
Kemijska analiza (HPLC)											
ED_M (%)	34,2	27,2	34,2	36,8	36,5	26,0	26,6	25,0	27,4	26,0	30,0
Računalniška analiza (Prodi 5.0)											
ED_M (%)	30,0	27,0	30,0	35,0	32,0	28,0	27,0	29,0	32,0	33,0	30,3

Medsebojna primerjava obeh analiz je pokazala zelo podoben energijski delež, ki ga prispevajo zaužite maščobe. V obeh primerih so maščobe v povprečju prispevale 30 % energije od celotnega energijskega deleža.

4.6 KORELACIJE MED RAČUNALNIŠKIM PROGRAMOM IN KEMIJSKO ANALIZO

Primerjali smo rezultate vsebnosti vitamina C in E, ki smo jih pridobili z računalniško in kemijsko analizo. Predvsem so nas zanimala povezave med izbranimi metodama. V preglednicah 16 in 17 lahko vidimo, da med izbranimi metodama ni statistično značilne korelacije pri vsebnostih obeh vitaminov.

Preglednica 16: Korelacija med vitaminom C analiziranega s HPLC in vitaminom C izračunanega s programom Prodi 5.0

Korelacija		Vit C - HPLC	Vit C – Prodi 5.0
Vit C - HPLC	Pearsonov koeficient korelacije	1	-,579
	p - vrednost		,079
	število vzorcev	10	10
Vit C – Prodi 5.0	Pearsonov koeficient korelacije	-,579	1
	p - vrednost	,079	
	število vzorcev	10	10

Preglednica 17: Korelacija med vitaminom E analiziranega s HPLC in vitaminom E izračunanega s programom Prodi 5.0

Korelacija		Vit E – Prodi 5.0	Vit E - HPLC
Vit E – Prodi 5.0	Pearsonov koeficient korelacije	1	,573
	p - vrednost		,084
	število vzorcev	10	10
Vit E - HPLC	Pearsonov koeficient korelacije	,573	1
	p - vrednost	,084	
	število vzorcev	10	10

Preverili smo tudi možne povezave med izbranimi metodama glede vsebnosti skupnih maščob in posameznih skupin maščobnih kislin (NMK, ENMK, VNMK). Statistično značilna povezava (stopnja značilnosti 0.05) se je pokazala le pri vsebnosti celokupnih maščob in enkrat nenasičenih maščobnih kislin (ENMK), kar je razvidno iz preglednic 18 in 19.

Preglednica 18: Korelacija med NMK analiziranimi s HPLC in NMK izračunanimi s programom Prodi 5.0

Korelacija		NMK – Prodi 5.0	NMK - HPLC
NMK - Prodi 5.0	Pearsonov koeficient korelacije	1	,673*
	p - vrednost		,033
	število vzorcev	10	10
NMK - HPLC	Pearsonov koeficient korelacije	,673*	1
	p - vrednost	,033	
	število vzorcev	10	10

Legenda:

* - korelacija je značilna na stopnji 0,05

NMK – nasičene maščobne kisline

Preglednica 19: Korelacija med skupnimi maščobami analiziranimi s HPLC in skupnimi maščobami izračunanimi s programom Prodi 5.0

Korelacija		Skupne maščobe – Prodi 5.0	Skupne maščobe – HPLC
Skupne maščobe – Prodi 5.0	Pearsonov koeficient korelacije	1	,690*
	p - vrednost		,027
	število vzorcev	10	10
Skupne maščobe – HPLC	Pearsonov koeficient korelacije	,690*	1
	p - vrednost	,027	
	število vzorcev	10	10

Legenda:

* - korelacija je značilna na stopnji 0,05

Preglednica 20 prikazuje povezave med vsebnostjo celokupnih maščob, posameznimi vrstami maščobnih kislin in vitaminom E pri računalniški analizi s programom Prodi 5.0.

Preglednica 20: Korelacija med vsebnostmi vitamina E, skupnih maščob in maščobnih kislin izračunanimi s programom Prodi 5.0

Korelacija		Vit E – Prodi 5.0	Skupne maščobe – Prodi 5.0	NMK – Prodi 5.0	ENMK – Prodi 5.0	VNMK – Prodi 5.0
Vit E – Prodi 5.0	Pearsonov koeficient	1	,655*	,440	-,049	,937**
	p - vrednost		,040	,204	,892	,000
	število vzorcev	10	10	10	10	10
Skupne maščobe – prodi 5.0	Pearsonov koeficient	,655*	1	,864**	,323	,688*
	p - vrednost	,040		,001	,363	,028
	število vzorcev	10	10	10	10	10
NMK – Prodi 5.0	Pearsonov koeficient	,440	,864**	1	-,064	,532
	p - vrednost	,204	,001		,860	,114
	število vzorcev	10	10	10	10	10
ENMK – Prodi 5.0	Pearsonov koeficient	-,049	,323	-,064	1	-,146
	p - vrednost	,892	,363	,860		,688
	število vzorcev	10	10	10	10	10
VNMK – Prodi 5.0	Pearsonov koeficient	,937**	,688*	,532	-,146	1
	p - vrednost	,000	,028	,114	,688	
	število vzorcev	10	10	10	10	10

Legenda:

* - korelacija je značilna na stopnji 0,05

** - korelacija je značilna na stopnji 0,01

NMK – nasičene maščobne kisline

ENMK – enkrat nenasičene maščobne kisline

VNMK – večkrat nenasičene maščobne kisline

Statistična analiza je potrdila povezavo med vsebnostjo vitamina E in celokupnih maščob pri stopnji tveganja 0.05. Še močnejša povezava (stopnja tveganja 0.01) se je pokazala med večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami in vitaminom E (Pearsonov koeficient korelacije je 0,937), kot tudi med skupnimi maščobami in enkrat nenasičenimi maščobnimi

kislinami (Pearsonov koeficient korelacije je 0,864). Prav tako je statistično značilna povezava (stopnja tveganja 0.05) med skupnimi maščobami in večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami.

Preglednica 21 prikazuje povezave med vsebnostjo celokupnih maščob, posameznimi vrstami maščobnih kislin in vitaminom E pri kemijski analizi. Korelacije med vsebnostjo vitamina E in ostalimi naštetimi parametri nismo potrdili. Dokazana je le statistično značilna povezava med skupnimi maščobami in vsemi tremi skupinami maščobnih kislin. Šibka povezava (Pearsonov koeficient korelacije je 0,645) se je pokazala tudi med enkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami (ENMK) in nasičenimi maščobnimi kislinami (NMK).

Preglednica 21: Korelacija med vsebnostmi vitamina E, skupnih maščob in maščobnih kislin analiziranih s HPLC

Korelacija		Vit E – HPLC	Skupne maščobe – HPLC	ENMK – HPLC	NMK – HPLC	VNMK – HPLC
Vit E – HPLC	Pearsonov koeficient korelacije	1	,311	,451	-,034	,522
	p - vrednost		,382	,190	,925	,122
	število vzorcev	10	10	10	10	10
Skupne maščobe – HPLC	Pearsonov koeficient korelacije	,311	1	,846**	,882**	,691*
	p - vrednost	,382		,002	,001	,027
	število vzorcev	10	10	10	10	10
NMK – HPLC	Pearsonov koeficient korelacije	,451	,846**	1	,645*	,467
	p - vrednost	,190	,002		,044	,173
	Število vzorcev	10	10	10	10	10
ENMK – HPLC	Pearsonov koeficient korelacije	-,034	,882**	,645*	1	,352
	p - vrednost	,925	,001	,044		,318
	Število vzorcev	10	10	10	10	10
VNMK – HPLC	Pearsonov koeficient korelacije	,522	,691*	,467	,352	1
	p - vrednost	,122	,027	,173	,318	
	Število vzorcev	10	10	10	10	10

Legenda:

* - korelacija je značilna na stopnji 0,05

** - korelacija je značilna na stopnji 0,01

NMK – nasičene maščobne kisline

ENMK – enkrat nenasičene maščobne kisline

VNMK – večkrat nenasičene maščobne kisline

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Vojaške obroke smo analizirali v dveh sklopih, in sicer smo v prvem sklopu, ki je trajal od 20. do 27. oktobra, vzorčili in analizirali pet celodnevni vojaških obrokov, ki smo jih na razdelilni liniji v vojaški jedilnici vsak dan odvzeli trem naključno izbranim vojakom in jih pred homogenizacijo združili. V drugem sklopu, ki se je začel 14. novembra in končal 21. novembra, smo na enak način vzorčili in analizirali še 5 vojaških obrokov. Rezultati analiz vsebnosti vitamina C in vitamina E ter skupnega antioksidativnega potenciala obrokov so pokazali določene razlike, ki smo jih skušali tudi statistično ovrednotiti in pojasniti.

Povprečna vsebnost vitamina C v celodnevni vojaških obrokih prvega sklopa, ki smo jo izračunali s pomočjo računalniškega programoma Prodi 5.0, je bila 204,8 mg. Največ vitamina C je med obroki prvega sklopa vseboval obrok tri in sicer 262,8 mg, kar je bila tudi najvišja določena vrednost med vsemi preiskovanimi obroki nasploh. Najmanj vitamina C (153,5 mg), je glede na rezultate računalniške analize vseboval četrti obrok.

Izračunana povprečna vsebnost vitamina C v drugem sklopu je bila 207,5 mg.. Najvišjo vrednost je dosegel prvi obrok, 250,8 mg, najnižjo pa tretji in to kar za okoli 100 mg manj, 148,5 mg. Izračunana povprečna vsebnost vitamina C za obroke obeh sklopov je bila 206,1 mg.

Vzporedno z računalniško analizo smo naredili še kemijsko analizo na HPLC sistemu. Povprečna vsebnost vitamina C v je bila v obrokih prvega sklopa 205,4 mg, kar se ujema z rezultati računalniške analize. Ugotovili pa smo večje razlike v vsebnostih vitamina C med posameznimi obroki. Med najvišjo vsebnostjo 264,4 mg, ki smo jo določili v obroku št. dve, in najnižjo v obroku št. tri 143,4 mg, je namreč kar za 121 mg razlike. Vzroki tako velikega razhajanja so verjetno različna sestava obrokov (sadje, zelenjava), izbrana metoda toplotne obdelave ter dodatka sadne pijače z dodanim vitaminom C (Fruc - korenček, pomaranča) pri drugem obroku. Rezultati kromatografske analize drugega sklopa obrokov so pokazali večje razlike med eksperimentalnimi in izračunanimi povprečnimi vsebnostmi vitamina C. Obroki so v povprečju vsebovali le 159,8 mg vitamina C, kar je v primerjavi z izračunano vrednostjo 207,5 mg skoraj za četrtno manj. Največ vitamina C smo določili v tretjem obroku drugega sklopa in sicer 260,7 mg, najmanj pa v drugem, le 86,1 mg, kar je hkrati tudi najnižja določena vsebnost vitamina C pri celotnem poskusu. Omenjena vsebnost vitamina C v celodnevni vojaškem obroku tudi ne dosega priporočil referenčnih vrednosti (Referenčne vrednosti..., 2004) za dnevni vnos, ki je za odrasle osebe 100 mg, oziroma za kadilce 150 mg. Vzorci obeh sklopov, ki smo jih analizirali na HPLC aparaturi, so skupno v povprečju vsebovali 182,6 mg vitamina C, kar presega priporočila. Povprečni vnos desetdnevnega obdobja je višji od priporočil (Referenčne vrednosti..., 2004), kar je za vojake zelo ugodno, ker so tako med urjenjem kot tudi rednim delovnim časom podvrženi velikim psihofizičnim naporom in imajo v primerjavi z ostalo populacijo povišane potrebe po vitaminu C. Glede na količino zaužite energije, v povprečju 14,3 MJ, je referenčna vrednost za vitamin C pri vojaki 143 mg vitamina C na dan (Referenčne vrednosti..., 2004).

Dehidroaskorbinska kislina je oksidirana oblika askorbinske kisline in je pokazatelj, koliko askorbinske kisline se je reduciralo. Dva izmed možnih vzrokov pospešene oksidacije askorbinske kisline sta toplotna obdelava ali mehanske poškodbe (rezanje, mečkanje) sadja in zelenjave (Hussein in sod., 2000). Pomembno pa vplivata tudi čas in temperatura skladiščenja (Sablani in sod., 2006).

Najvišji odstotek dehidroaskorbinske kisline smo določili v tretjem obroku: 55,9 %, ter v sedmem obroku: 54,1 %. Razlog za tako visok delež DHA so verjetno težave pri pripravi vzorcev (homogenizacija na malem kutru). Vzorec je vseboval veliko zelenjave z visokim deležem prehranske vlaknine zato smo ga morali dodatno homogenizirati še v multipraktiku s titanovim nožem, kar je podaljšalo čas priprave, oziroma stik vzorca z zrakom. Zaradi dodatne homogenizacije se je nekoliko dvignila tudi temperatura obdelane mase, preden smo jo ohladili s tekočim dušikom, kar je lahko še dodatno prispevalo k izgubljanju nestabilnih antioksidantov, predvsem vitamina C.

Najmanjši odstotek DHA je bil določen v prvem, drugem in četrtem obroku. Vsi trije vzorci so imeli v povprečju le 24,2 % DHA, kar je za več kot polovico manj od deleža DHA, ki smo ga določili v tretjem in sedmem obroku. Glavni vzrok za nastalo razliko je verjetno dejstvo, da je pri omenjenih obrokih homogenizacija potekala brez težav (pri solati veliki kosi niso ostajali nehomogenizirani) zato smo lahko vzorca tudi veliko prej ohladili s tekočim dušikom.

V ostalih vzorcih se je odstotek DHA gibal od 37,3 % do 45,4 %, kar prav tako nakazuje na rahle težave pri posameznih fazah priprave vzorca, predvsem homogenizaciji.

Pri določanju vsebnosti vitamina E v vojaških obrokih smo z računalniškim programom v prvem sklopu določili povprečno vsebnost vitamina 21,1 mg. Največ ga je vseboval tretji obrok in sicer 29,7 mg, kar je celo dvakrat več od referenčnih vrednosti za vnos hranil (Referenčne vrednosti..., 2004). Kljub temu, da je vitamin E topen v maščobah, v našem primeru prekoračene dnevne količine ne predstavljajo nikakršne nevarnosti za zdravje vojakov. Literatura namreč navaja, da je zgornja dopustna meja, ki še ne ogroža našega zdravja, dnevni vnos v višini 800 mg (Lukaski, 2007). Najnižja izračunana vsebnost vitamina E v prvem sklopu je bila 16,1 mg v drugem obroku, kar je le za 1 mg več kot dnevno priporočilo, ki ga navajajo referenčne vrednosti za vnos hranil (Referenčne vrednosti..., 2004). V drugem sklopu sta prvi in drugi obrok vsebovala manj vitamina E od priporočenih vrednosti in sicer le 13,6 mg ter 12,8 mg. Povprečna vsebnost vitamina E za obroke drugega sklopa pa je bila 18,0 mg, kar je približno za 3 mg manj kot so ga v povprečju vsebovali obroki prvega sklopa. Tretji obrok v drugem sklopu je vseboval enkrat več vitamina E kot pa prvi in drugi obrok in sicer kar 25,5 mg, kot sta ga vsebovala prvi in drugi obrok. Povprečna vsebnost vitamina E v obeh sklopih vojaških obrokov je bila 19,6 mg, kar je za 30 % več od priporočil.

Dodatna analiza na HPLC sistemu je pokazala, da so obroki obeh sklopov v povprečju dejansko vsebovali nekoliko manj vitamina E kot smo ga določili s pomočjo računalniškega programa (18,2 mg). Razlika je približno 6 %, kar kaže na zelo dobro ujemanje rezultatov pridobljenih po obeh metodah. Povprečna vsebnost vitamina E v obrokih prvega sklopa je bila 20,2 mg. Najmanj, le 10,9 mg, ga je bilo v drugem obroku,

kar je skoraj za polovico manj od povprečja. Prvi obrok pa ga je vseboval največ in sicer 27,7 mg. V drugem sklopu obrokov je bila povprečna vsebnost vitamina E s 16,2 mg približno za petino nižja od povprečne vsebnosti prvega sklopa. K tej razliki je verjetno najbolj pripomogel prvi obrok, ki je vseboval le 10,7 mg vitamina E. Drugi in četrti obrok sta vsebovala 20,4 mg in 19,9 mg vitamina E kar je za tretjino več od priporočil. Skupna povprečna vsebnost vitamina E v obeh sklopih je bila 18,2 mg vitamina E. Rezultati so pokazali, da so vojaki tudi v primeru vitamina E dnevno zaužili količine, ki so precej višje od referenčnih vrednosti (Referenčne vrednosti..., 2004). Ti rezultati so sprejemljivi, saj so potrebe oseb, ki so podvržene velikim psihofizičnim naporom, po vitaminih večje kot pri ostali populaciji.

Analiza s programom Prodi 5.0 je pokazala, da so skupno zaužite maščobe v povprečju prispevale 30,3 % k celotnemu energijskemu deležu. V prvem sklopu je bil povprečen energijski delež maščob v obrokih 30,8 % in v drugem 29,8 %.

S kemijsko analizo smo v prvem sklopu določili za spoznanje večji energijski delež maščob 33,8 %, kot smo ga izračunali z računalniškim programom. Drugi sklop je v povprečju vseboval 26,2 % energijskega deleža maščob, v obeh sklopih so tako maščobe prispevale 30,0 % k celotnemu energijskemu deležu. Obe povprečni vrednosti, določeni z računalniškim programom in kemijsko analizo, ustrezata predpisanemu normativu, ki pravi, da naj bi maščobe prispevale 30,0–35,0 % k celotnemu energijskemu deležu (Referenčne vrednosti..., 2004), vendar pa obstajajo med posameznimi obroki večja nihanja v vsebnosti celokupnih maščob. Tako so na primer maščobe, ki smo jih določili z računalniškim programom v četrtem (35,0 %) in petem (32,0 %) obroku prvega sklopa, ustrezale predpisanemu normativu, drugi obrok pa je bil s 27,0 % za 3 % pod priporočilom. V drugem sklopu so bili prvi (28,0 %), drugi (27,0 %) in tretji (29,0 %) obrok pod normativom medtem ko sta četrti in peti ustrezala predpisanim (32,0 % in 33,0 %). Rezultati kemijskih analiz prvega sklopa pa so pokazali, da priporočene vrednosti s 27,2 % ne dosega le drugi obrok, medtem ko je bil pri prvem in tretjem obroku delež zaužitih maščob 34,2 %. V četrtem in petem obroku so maščobe prispevale skoraj 37,0 % celotnemu energijskemu deležu, kar je glede na postavljen normativ WHO (Diet, nutrition ... , 2002) nekoliko nad dopustno zgornjo mejo, ki znaša 35,0 % celotnega deleža dnevno zaužite energije. To velja predvsem za zdrave in zelo aktivne ljudi. Zanimivo je, da je energijski delež maščob, v vseh obrokih drugega sklopa manjši od priporočila. vendar nikoli nižji od 25,0 %. Vseeno pa lahko vseeno rečemo, da glede na rezultate kemijskih analiz obroki drugega sklopa ne dosega normativa (30,0–35,0 %), ki je predviden za težko fizično delo.

Zanimale so nas tudi korelacije oziroma povezanosti med vsebnostjo obeh vitaminov ter korelacija med izbranimi metodama za ovrednotenje ustreznosti vojaških obrokov, računalniško in kemijsko analizo.

Pri primerjavi vsebnosti vitaminov C in E, ki smo jih pridobili z računalniško in kemijsko analizo, med izbranimi metodama nismo potrdili statistično značilne korelacije. Preverili smo tudi možne povezave med izbranimi metodama glede vsebnosti skupnih maščob in posameznih skupin maščobnih kislin (NMK, ENMK, VNMK). Statistično značilna

povezava (stopnja značilnosti 0.05) se je pokazala le pri vsebnosti celokupnih maščob in enkrat nenasičenih maščobnih kislin (ENMK).

Pri obdelavi rezultatov smo dokazali korelacijo med vsebnostjo vitamina E in celokupnimi maščobami (stopnja tveganja 0,05) pri podatkih, ki so bili pridobljeni z računalniškim programom Prodi 5.0. Še močnejša povezava pa se je pokazala med večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami in vitaminom E.

5.2 SKLEPI

Na osnovi pridobljenih rezultatov iz raziskave lahko povzamemo naslednje sklepe:

- Jedilniki v povprečju ustrezajo postavljenim prehranskim priporočilom za vitamin C. S pomočjo računalniškega programa Prodi 5.0 smo na podlagi analize desetih vzorcev ugotovili, da so vojaki v povprečju zaužili 206 mg vitamina C. Kemijska analiza, ki smo jo opravili na HPLC sistemu, je pokazala, da je vojak v povprečju zaužil 182 mg vitamina C.
- Povprečna vrednost vitamina E v vojaških obrokih, določenega z računalniško analizo, je bila 19,4 mg. S kemijsko analizo smo ugotovili, da so obroki v povprečju vsebovali 18,3 mg vitamina E.
- Količina maščob v celodnevem vojaškem obroku v povprečju dosega priporočilo, to je od 30 do 35 % dnevnega energijskega vnosa. Z računalniškim programom Prodi 5.0 smo izračunali, da predstavljajo zaužite maščobe v povprečju 30,3 % celotnega dnevnega vnosa energije. Tudi povprečni rezultati kemijske analize so bili zelo podobni (30,0 %). Opazili pa smo večja nihanja v količini zaužitih maščob med posameznimi celodnevnimi obroki. Zgornje meje 35 % ni presegel noben obrok, nasprotno pa nekaj obrokov ni dosegalo spodnje meje, vendar v nobenem primeru dnevni vnos maščob ni bil nižji od 25 % celotne dnevno zaužite energije. Pozornost bi morali posvetiti uravnoteženi maščobno kislinski sestavi obrokov.
- Statistična analiza ni pokazala korelacije med rezultati vitamina C in E, pridobljenimi s pomočjo računalniške analize in tistimi, ki so pridobljeni s pomočjo kemijske analize.
- Zavedati se moramo omejitev, ki so za vsak poskus specifične. Določanje vitaminov je zaradi njihove nestabilnosti še posebej zahtevno, zato lahko pri obdelavi z računalniškimi programi in tudi pri kemijskih analizah, pričakujemo večja odstopanja v primerjavi z dejanskimi vrednostmi.
- S primernim vnašanjem podatkov in dodelano bazo podatkov računalniški program Prodi omogoča cenovno ugodno in hitro oceno količine zaužitih mikro in makro hranil.
- Statistična analiza korelacije med obema izbranimi metodama je pokazala značilno povezavo le pri vsebnosti celokupnih maščob in enkrat nenasičenih maščobnih kislin, med tem ko pri vsebnostih vitamina C in E povezave nismo potrdili.
- Pri rezultatih računalniške analize (Prodi 5.0) smo potrdili korelacijo med vsebnostjo vitamina E in celokupnimi maščobami ter med vitaminom E in večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami.

6 POVZETEK

Namen raziskave je bil določiti vsebnost nekaterih antioksidantov v izbranih celodnevni vojaških obrokih.

V računalniško in kemijsko analizo smo vključili deset naključno izbranih celodnevni obrokov iz vojašnice Vipava. Določali smo vsebnost vitamina C in vitamina E ter skupni antioksidativni potencial v obrokih ter energijski delež maščobe v celotnem energijskem deležu vojaških obrokov.

Povprečna količina vitamina C v obrokih, določenega z računalniško in kemijsko analizo je bila višja od priporočenih vrednosti (143 mg), vendar če upoštevamo velike psihofizične napore vojakov, ki so primerljivi z vrhunskim športniki, vsebnost vitamina C ustreza normativom.

Povprečna vrednost vitamina E v vojaških obrokih, določenega z računalniško analizo, je bila 19 mg. S kemijsko analizo smo ugotovili, da so obroki v povprečju vsebovali 18 mg vitamina E.

Določanje vsebnosti vitaminov s kemijsko analizo je zahtevno. Upoštevati moramo posebne pogoje pri odvzemu obrokov in pri pripravi vzorca. Zaradi nestabilnosti vitaminov lahko pride do večjih odstopanj v primerjavi z dejanskimi vrednostmi.

Statistična analiza je pokazala povezavo med vsebnostjo celokupnih maščob in enkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami, ki so bili dobljeni z računalniško in kemijsko analizo. Pri rezultatih, med vitaminoma C in E, pridobljenimi z izbranimi metodama pa statistična analiza ni pokazala povezave.

Korelacije, med rezultati vsebnosti vitamina E in celokupnimi maščobami ter med vitaminom E in večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami, smo potrdili le pri analizi z računalniškim programom.

Energijski delež maščob (30,3 %), dobljenih pri računalniški analizi, kot tudi dobljeni podatki pri kemijski analizi (30,0 %), v povprečju ustreza postavljenim priporočilom (30-35 %). Med posameznimi obroki so velike razlike v vsebnosti maščob.

Iz dobljenih podatkov lahko zaključimo, da zaužita količina vitamina C, kot tudi vitamina E v vojaških obrokih ustreza prehranskim priporočilom. Prav tako prehranskim priporočilom ustreza tudi energijski delež maščob, ki je na spodnji meji priporočenih vrednosti.

Obdelava podatkov z računalniškimi programi je primerna metoda za določanje makro in mikro hranil v obrokih. Bistven del računalniškega programa je celovita baza podatkov o vsebnosti hranil v živilih. S pomočjo računalniških programov pridobimo cenovno ugodne podatke o vsebnosti makro in mikro hranil v obrokih.

7 VIRI

- Adamič Š. 1989. Temelji biostatistike. 2. izd. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 66-67, 116-117.
- Andersen M.L., Lauridsen R.K., Skibsten L. 2005. Power of phenolic compounds. V: Phytochemical functional foods. Johnson I., Williams G. (eds.). Cambridge, Woodhead Publishing Ltd.: 315-346.
- Arnao M.B., Cano A., Acosta M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73: 239-244.
- Ayedoğmuş Z., Çetin M., Üstün Özgür M. 2002. Determination of ascorbic acid in vegetables by derivate spectrophotometry. *Turkish Journal of Chemistry*, 26: 697-704.
- Basu T.K., Dickerson J.W.T. 1996. Vitamins in human health and disease. Wallingford, CAB International: 125-146.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie/Food Science and Technology*, 28: 25-30.
- Carr A. C., Frei B. 1999. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant an health effects in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69: 1086-1107.
- Davey W.M., Montagu M.V., Inze D., Sanmartin M., Kanelis A., Smirnoff N., Bejzie J.J. I., Strain J.J., Favell D., Fletcher J. 2000. Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 825-860.
- Davies M.B., Austin J., Patridge D.A. 1991. Vitamin C: It's chemistry and biochemistry. Cambridge, The Royal Society of Chemistry: 154 str.
- Deutsch J.C. 2000. Dehydroascorbic acid. *Journal of Chromatography A*, 881: 299-307.
- Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: Report of a joint FAO/WHO consultation. 2002. Geneva, World Health Organization: 107 str.
- Diplock A.T. 1993. Antioxidants. V: Encyclopedia of food science, food technology and nutrition. Vol. 1. Macrae R., Robinson R.K., Sadler M.J. (eds.). London, Academic Press: 212-237.
- Gerster H. 1997. No contribution of ascorbic acid to acid to renal calcium oxalate stones. *Journal of Nutrition, Metabolic Diseases and Dietetics*. 41: 269-282.

- Hallwell B. 1996. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Radical Research*, 25: 439-454
- Hussein A., Odumeru J.A., Ayanbadejo T., Faulkner H., McNab W.B., Hager H., Szijarto L. 2000. Effect of processing and packaging on vitamin C and β -carotene content of ready-to-use (RTU) vegetables. *Food Research International*, 33: 131-136.
- Jaeger S.R., Cardello A.V. 2007. A construct analysis of meal convenience applied to military foods. *Appetite*, 49: 231-239.
- Kamaleldin A., Appelqvist LA. 1996. The chemistry and antioxidants properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31, 7: 671-701.
- Kaur C., Kapoor H.C. 2001. Antioxidants in fruits and vegetables – the millenium's health. *International Journal of Food Science and Technology*, 36: 703-725.
- Klofutar C., Šmalc A., Rudan-Tasič D., 1998. Laboratorijske vaje iz kemije. 3. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 282-285.
- Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi. 26. in 27. oktober 2000, Portorož. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-21.
- Koshiishi I., Imanari T. 1997. Measurement of ascorbate and dehydroascorbate contents in biological fluids. *Analytical Chemistry*, 69: 216-220.
- Krinsky N.I. 1989. Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 7: 617-635.
- Lukaski H. C. 2004. Vitamin and mineral status: Effects on physical performance. *Nutrition*, 20, 7/8: 632-644.
- Luque-García J.L., Luque de Castro M.D. 2001. Extraction of fat-soluble vitamins. *Journal of Chromatography A*, 935: 3-11.
- Lykkesfeldt J. 2000. Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in biological samples using subtraction methods: reliable reduction with Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride. *Analytical Biochemistry*, 282: 89-93.
- Medić-Šarić M., Buhač I., Bradamante V. 2000. Vitamini i minerali, istine i predrasude. Zagreb, F. Hoffmann-La Roche: 359 str.
- Molyneux P. 2004. The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 2: 211-219.

Musulín R.R., King C.G. 1936. Metaphosphoric acid in the extraction and titration of vitamin C. *Journal of Biological Chemistry*, 116: 409-413.

Nutrient composition of rations for short-term, high-intensity combat operations. 2005. Committee on Optimization of Nutrient Composition of Military Rations for Short-term, High-stress Situations, Committee on Military Nutrition Research (eds.). Washington, The National Academies Press: 462 str.
www.nap.edu/catalog/11325.html

Oruña-Concha M.J., Gonzalez-Castro M.J., Lopez-Hernandez J., Simal-Lozano J. 1998. Monitoring of the vitamin C content of frozen green beans and padron peppers by HPLC. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76: 477-480.

Park P. W., Goins R.E. 1994. In situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. *Journal of Food Science*, 59: 1262–1266

Pietrzik K., Golly I., Loew D. 2008. *Handbuch Vitamine: Für Prophylaxe, Therapie und Beratung*. 1. Auflage. München, Elsevier GmbH: 598 str.

Plestenjak A., Golob T. 2000. Analiza kakovosti živil. 2. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 91-99.

Pograjc L. 2007. Bojna učinkovitost. *Obramba*, Julij 2007: 17-19.

Pokorn D. 1998. Gorivo za zmagovalce: prehrana športnika in rekreativca. 2. izd. Ljubljana, Forma 7 d.o.o.: 153 str.

Kluthe B. 2004. Prodi 5.0 Euro Software für Ernährungs- und Diätberatung Funktionsbeschreibung. Hausach, Nutri-Science: 35 str. + 1 CD ROM
www.nutri-science.de

Raspor P., Kovač B., Batič M., Berglez D. 2000. Bioproceni pridobivanja antioksidantov. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi. 26. in 27. oktober 2000, Portorož. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 53-65.

Referenčne vrednosti za vnos hranil. 2004. 1. izd. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije: 215 str.

Roginsky V., Lissi E.A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92: 235-254.

Rubatzky V.E., Yamaguchi M. 1997. *World vegetables: principles, production and nutritive values*. 2nd. New York, Chapman and Hall: 843 str.

- Rudan-Tasič D. 2000. Vitamin C, vitamin E in koencim Q10. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi. 26. in 27. oktober 2000, Portorož. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 39-51.
- Ryynänen M., Lampi A.M., Salo-Väänänen P., Ollilainen V., Piironen V. 2004. A small-scale sample preparation method with HPLC analysis for determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17: 749-765.
- Sablani S.S., Opara L.U., Al-Balushi K. 2006. Influence of bruising and storage temperature on vitamin C content of tomato fruit. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 4, 1: 54-56.
- Schwartz H., Ollilainen V., Piironen V., Lampi A.M. 2007. Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21: 152-161.
- Sen C.K., Khanna S., Roy S. 2006. Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. *Life Science*, 78: 2088-2098.
- Souci S.W., Fachmann W., Kraut H. 2008. Food composition and nutrition tables. 7th rev. ed. Stuttgart, Medpharm Scientific Publishers: 1364 str.
www.sfk-online.net
- Stibilj V., Pokorn D., Hlastan-Ribič C., Milačič R., Smrkolj P., Trkov Z. 2002. Ustreznost vojaške prehrane in skladnost s fiziološkimi normativi: Delovno poročilo. Ljubljana, Inštitut Jožef Stefan: 23 str.
- Young I.S., Woodside J.V. 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54: 176-186.
- Wang H., Cao G., Prior R.L. 1996. Total Antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 701-705.
- Wechtersbach L. 2005. Stabilnost polarnih in nepolarnih antioksidantov v kompleksnem matriksu. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 74 str.
- Wechtersbach L., Cigić B. 2007. Reduction of dehydroascorbic acid at low pH. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70: 767-772.

ZAHVALA

Ob tej priložnosti bi se rad zahvalil mentorju prof. dr. Marjanu Simčiču za strokoven pregled diplomskega dela, prijateljsko pomoč, nasvete in potrpežljivost, ki jo je pokazal tekom nastajanja diplome.

Posebna zahvala tudi somentorju doc. dr. Blažu Cigiću za strokovno pomoč pri nastajanju diplomskega dela.

Hvala recenzentu prof. dr. Janezu Salobirju za skrben pregled diplomskega dela.

Zahvaljujem se osebju Katedre za tehnologije, prehrano in vino, še posebej Kseniji Podgrajšek in Anji Janeš za pomoč pri nastajanju diplomske naloge. Za pomoč pri delu bi se rad zahvalil tudi osebju Katedre za biokemijo in kemijo živil ter osebju na Katedri tehnologije mesa in vrednotenje živil.

Za pomoč pri iskanju literature se zahvaljujem Gospem Ivici Hočevar, Lini Burkan in Barbari Slemenik.

Hvala Mihu Bricu za pomoč pri prevajanju literature ter za pomoč pri reševanju zapletov z računalnikom.

Hvala tudi prof. slovenščine in angleščine Mojci Rižnar – Nedeljko za lektoriranje diplomskega dela.

Posebna zahvala gre podjetju Radenska d.d., ki me je v času študija štipendiralo.

Hvala sošolcem in sošolkam za prijetna študentska leta, hvala tudi vsem ostalim, ki so mi tako ali drugače pomagali pri dokončanju študija.

Iskreno hvala svojim staršem, mami Majdi, očetu Petru in sestri Mojci ter sorodnikom za spodbudo in podporo pri študiju.

Hvala vsem!

PRILOGE

Priloga A: Jedilniki celodnevnih vojaških obrokov (20.10. - 22.11.2005)

Obrok 1:

Zajtrk: polbel kruh, jabolko, sirni namaz s smetano (50 g), muesli z mlekom Mlinotest, ledeni čaj breskev (0,5 l)

Kosilo: juha prežganka, zelenjavni riž, ocvrto piščančje bedro, zelena solata z radičem in krompirjem, polbel kruh, mini rulada Gorenjka (50 g), pomaranča, ledeni čaj breskev (0,5 l)

Večerja: ričet s suhim mesom, polbel kruh, kompot

Obrok 2:

Zajtrk: zeliščni čaj, zimska salama (70 g), čokoladni namaz (40 g), polbel kruh, sok (0,2 l), jabolko

Kosilo: grahova kremna juha, čebulna bržola, krompirjevi svaljki, zelena solata in radič s krompirjem, polbel kruh, Fruc korenček - pomaranča (0,5 l)

Večerja: oslič po dunajsko, krompirjeva solata, ledeni čaj (0,5 l), polbel kruh

Obrok 3:

Zajtrk: mleko, čokoladni namaz (40 g), polbel kruh, sendvič ind. (200 g), ledeni čaj (0,5 l), banana

Kosilo: gobova juha, postrv po tržaško, peteršiljev krompir, brokoli z margarino, radič s krompirjem, polbel kruh, rulada (115 g)

Večerja: sirovi ravioli, zeljna solata s fižolom, sadje, polbel kruh

Obrok 4:

Zajtrk: bela kava, maslo (20 g), marmelada (25 g), jetrna pašteta (50 g), polbel kruh, jabolko

Kosilo: zelenjavna juha, svinjska pečenka, zelenjavni riž, rdeča pesa v solati, mešani kompot, polbel kruh, Fruc korenček – pomaranča (0,5 l)

Večerja: goveji golaž, polenta, zelena solata, rulada, kruh polbel

Obrok 5:

Zajtrk: zeliščni čaj, kranjska klobasa, polbel kruh, kolač s koščki čokolade (80 g), hruške, gorčica (30 g)

Kosilo: paradižnikova juha z rižem, ocvrte sardele, krompirjeva solata, polbel kruh, gosti sok breskev Fructal (0,2 l)

Večerja: krompirjeva musaka, konzervirana mešana solata, jabolko, tekoči sadni jogurt (250 g), polbel kruh

Obrok 6:

Zajtrk: bela kava, med (20 g), maslo (15 g), šunka (70 g), polbel kruh, jabolko

Kosilo: cvetačna juha, mesne kroglice, krompirjev pire, fižolova solata, sok (0,2 l), polbel kruh

Večerja: rižota s svinjskim mesom, radič s krompirjem, banana, ledeni čaj (0,5 l), polbel Kruh

Obrok 7:

Zajtrk: čaj, sir lahki jošt (50 g), šunka prešana (70 g), žemlja velika (110 g), kruh polbel, jabolko

Kosilo: kostna juha z zakuho, puranov zrezek v smetanovi omaki, krompirjevi ocvrtki, zelenjavna obloga, radič s krompirjem, kruh polbel, jabolko

Večerja: brokolijeva juha, skutini štruklji, kompot hruškov, kruh polbel

Obrok 8:

Zajtrk: zelenjavni čaj, topljeni sir (25 g), ribe z zelenjavo (125 g), kruh polbel, sirova štručka (120 g), čokoladno mleko (0,2 l), hruška

Kosilo: pasulj, suho meso, paprika vložena, kruh polbel, vanilijeva rezina ind. (40 g), jabolko, gorčica (25 g), ledeni čaj (0,5 l)

Večerja: carski praženec, jabolčni pire

Obrok 9:

Zajtrk: bela kava, trdo kuhano jajce, pašteta iz zelenjave in morskih rib (80 g), kruh polbel, francoski rogljič (70 g), jabolko

Kosilo: kostna juha z zakuho, sesekljana pečenka, kremna špinača, krompirjev pire, kruh polbel, nektar iz pomaranč (0,2 l)

Večerja: špageti z gobami, zelena solata, banana, ledeni čaj (0,5 l), kruh polbel

Obrok 10:

Zajtrk: sadni čaj, piščančje prsi v ovitku (50 g), maslo (2x15 g), polbel kruh, štrukelj, hruška

Kosilo: goveja juha z zakuho, pečena piščančja bedra, ohrovtova prikuha s krompirjem, konzervirana mešana solata, zdrobov narastek, polbel kruh, jabolčni nektar (0,2 l)

Večerja: kuhana govedina, kremna špinača, peteršiljev krompir, jabolčni zavitek (110g), polbel kruh