

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Kim JERMAN

**VPLIV PREHRANE POSAMEZNIKA NA KOLIČINO SKUPNIH
FENOLNIH SPOJIN V URINU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE INFLUENCE OF THE INDIVIDUAL'S DIET ON THE AMOUNT
OF THE TOTAL PHENOLIC COMPOUNDS IN URINE**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za tehnologije, prehrano in vino, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Za mentorja diplomskega dela je imenovan prof. dr. Marjan Simčič in za recenzenta doc. dr. Blaž Cigić.

Mentor: prof. dr. Marjan Simčič

Recenzent: doc. dr. Blaž Cigić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Diplomska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

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

Kim Jerman

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 613.2 + 612.3: 547.56: 543.42 (043) = 163.6
- KG prehrana / antioksidanti / polifenoli / skupne fenolne spojine / urin / določanje polifenolov v urinu / Folin-Ciocalteu / ekstrakcija na trdni fazi
- AV JERMAN, Kim
- SA SIMČIČ, Marjan (mentor)/ CIGIČ, Blaž (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2012
- IN VPLIV PREHRANE POSAMEZNIKA NA KOLIČINO SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN V URINU
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
- OP X, 44 str., 7 pregl., 15 sl., 2 pril., 79 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI V diplomskem delu smo želeli ugotoviti ali obstaja povezava med zaužitimi in izločenimi fenolnimi spojinami v urinu. V raziskavi je sodelovala odrasla oseba ženskega spola, ki je redno 22 dni zapisovala zaužita živila v prehranski dnevnik. Uporabili smo modificirano Folin-Ciocalteu metodo za določevanje skupnih fenolnih spojin v urinu, ki smo ga v obdobju raziskave shranjevali. Zaradi cene kartuš, ki se uporabljajo pri ekstrakciji na trdni fazi smo se želeli prepričati ali je ta korak potreben za določevanje skupnih fenolnih spojin (SFS) v urinu. Korelacija med določenimi SFS brez ekstrakcije in z ekstrakcijo je visoka ($r = 0,914$, $p = 0,00$), vendar ni zadosten pogoj za določitev SFS v urinu brez ekstrakcije na trdni fazi. Pri preverjanju korelacije med zaužitimi polifenoli in izločenimi skupnimi fenolnimi spojinami smo dokazali, da obstaja zmerna povezava ($r = 0,532$; $p < 0,05$). Korelacija je zmerna tudi med vnosom sadja in zelenjave ter izločenimi SFS ($r = 0,549$). Primerjali smo tudi korelaciji med 24 urnim urinom, jutranjim urinom normaliziranim na kreatinin in zaužitimi polifenoli. Ugotovili smo, da dobimo najboljšo korelacijo pri upoštevanju 24 urnega urina.

KEY WORDS DOCUMENTATION

Nd Dn

DC UDC 613.2 + 612.3: 547.56: 543.42 (043) = 163.6

CX nutrition / antioxidants / polyphenols / total phenolic compounds / urine /
determination of polyphenols in urine / Folin-Ciocalteu / solid phase extraction

AU JERMAN, Kim

AA SIMČIČ, Marjan (supervisor)/ CIGIČ, Blaž (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and
Technology

PY 2012

TI THE INFLUENCE OF THE INDIVIDUAL'S DIET ON THE AMOUNT OF THE
TOTAL PHENOLIC COMPOUNDS IN URINE

DT Graduation Thesis (University studies)

NO X, 44 p., 7 tab., 15 fig., 2 ann., 79 ref.

LA sl

AL sl/en

AB The purpose of the study was to determine whether there is a link between
ingested and excreted phenolic compounds in urine. The study involved an adult
female who was regularly recording a food diary during 22 days. Urinary total
polyphenol excretion was analyzed by Folin–Ciocalteu assay. Because of the
price of cartridges used in the solid phase extraction (SPE) we wanted to make
sure if this step is necessary for the determination of total phenolic compounds
(TP) in the urine. We found a significant correlation ($r = 0,914$, $P = 0,00$) between
TP determined with and without SPE. There is a moderate correlation between
ingested polyphenols and TP detected in urine ($r = 0,532$, $P < 0,05$). The
correlation between the intake of the fruits and vegetables and excreted TP is
also moderate ($r = 0,549$). We compared the measurements obtained from 24
urine samples, spot morning urine normalized by creatinine and the ingested
polyphenols. We found out that the best correlation is obtained with the 24-hour
urine.

KAZALO VSEBINE

| | |
|---|-----------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA | III |
| KEY WORDS DOCUMENTATION | IV |
| KAZALO VSEBINE | V |
| KAZALO SLIK | VII |
| KAZALO PREGLEDNIC | VIII |
| KAZALO PRILOG | IX |
| OKRAJŠAVE IN SIMBOLI | X |
| | |
| 1 UVOD | 1 |
| 1.1 NAMEN DELA | 1 |
| 1.2 DELOVNA HIPOTEZA | 1 |
| 2 PREGLED OBJAV | 2 |
| 2.1 FENOLNE SPOJINE | 2 |
| 2.1.1 Razdelitev | 2 |
| 2.1.2 Sinteza | 3 |
| 2.1.3 Vpliv okolja | 4 |
| 2.1.4 Presnova polifenolov | 4 |
| 2.2 FENOLI KOT ANTIOKSIDANTI | 4 |
| 2.3 POLIFENOLI IN ZDRAVJE | 6 |
| 2.3.1 Dnevni vnos polifenolov v nekaterih državah | 7 |
| 2.3.2 Vaskularno in antitrombocitno delovanje | 7 |
| 2.3.3 Proti rakavo delovanje | 8 |
| 2.3.4 Delovanje proti diabetesu | 9 |
| 2.3.5 Antimikrobno delovanje | 9 |
| 2.3.6 Proti vnetno delovanje | 10 |
| 2.3.7 Nevroprotektivni in antialergijski učinki | 10 |
| 2.4 DOLOČANJE | 10 |
| 2.4.1 Ravnanje z vzorci/shranjevanje | 10 |
| 2.4.2 Ekstrakcija | 11 |
| 2.4.3 Kvantifikacija in separacija polifenolov | 12 |
| 2.4.4 Povezanost med zaužitimi in izločenimi skupnimi fenolnimi spojinami v urinu | 13 |
| 3 MATERIAL IN METODE DE LA | 14 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.1 | VREDNOTENJE PREHRANE | 14 |
| 3.2 | KEMIJSKA ANALIZA URINA | 14 |
| 3.2.1 | Reagenti | 14 |
| 3.2.2 | Pribor | 15 |
| 3.2.3 | Določanje skupnih fenolnih spojin v urinu | 15 |
| 3.2.4 | Ekstrakcija | 16 |
| 3.2.5 | Modificirana Folin-Ciocalteu metoda (Roura in sod., 2006) | 17 |
| 3.2.6 | Priprava sintetičnega urina | 17 |
| 3.2.7 | Umeritvena krivulja | 17 |
| 3.3 | UREJANJE PODATKOV | 18 |
| 4 | REZULTATI | 19 |
| 4.1 | KOLIČINA ZAUŽITIH ŽIVIL | 19 |
| 4.2 | KOLIČINA ZAUŽITIH SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN | 21 |
| 4.3 | KOLIČINA IZLOČENIH SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN | 24 |
| 4.4 | PRIMERJAVA ZAUŽITIH IN IZLOČENIH SKUPNIH FENOLNIH SKUPIN | 30 |
| 5 | RAZPRAVA IN SKLEPI | 33 |
| 5.1 | RAZPRAVA | 33 |
| 5.2 | SKLEPI | 36 |
| 6 | POVZETEK | 37 |
| 7 | VIRI | 38 |
| | ZAHVALA | |
| | PRILOGE | |

KAZALO SLIK

| | |
|---|----|
| Slika 1: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Beecher, 2003)..... | 3 |
| Slika 2: Ravnotežje med antioksidanti in reaktivnimi spojinami <i>in vivo</i> (Halliwell, 2008).. | 5 |
| Slika 3: Prikaz kolektorja za ekstrakcijo na trdni fazi, kartuš za ekstrakcijo in vakuumske črpalke. | 16 |
| Slika 4: Shematski prikaz določanja skupnih fenolnih spojin (SFS) s Folin-Ciocalteu metodo (Roura in sod., 2006). | 17 |
| Slika 5: Količina zaužitega sadja in sadnih izdelkov, zelenjave in rastlinskih proizvodov ter skupne količine zaužitega sadja in zelenjave v gramih na dan. | 20 |
| Slika 6: Količina zaužitih skupnih fenolnih spojin v mg na dan. | 22 |
| Slika 7: Kvartilni diagram razporeditve koncentracij določenih skupnih fenolnih spojin (SFS) brez predhodne ekstrakcije na trdni fazi in z ekstrakcijo. | 25 |
| Slika 8: Normalizirane vrednosti določene koncentracije skupnih fenolnih spojin (SFS) v urinu brez in z ekstrakcijo na trdni fazi (SPE)..... | 26 |
| Slika 9: Količina izločenih skupnih fenolnih spojin v mg/dan določenih brez ekstrakcije na trdni fazi (SPE) in s SPE. | 27 |
| Slika 10: Korelacija med ocenjeno vrednostjo zaužite askorbinske kisline in razliko med določenimi skupnimi fenolnimi spojinami (SFS) brez in z ekstrakcijo na trdni fazi (SPE). | 28 |
| Slika 11: Povezanost med koncentracijo izločenih skupnih fenolnih spojin v vzorcu urina, ki smo jo določili z ekstrakcijo na trdni fazi (SPE) in brez SPE..... | 29 |
| Slika 12: Korelacija med izločenimi skupnimi fenolnimi spojinami v urinu (mg /dan) določenih brez ekstrakcije na trdni fazi (SPE) in s SPE..... | 29 |
| Slika 13: Količina zaužitih in določenih skupnih fenolnih spojin (SFS) brez ekstrakcije na trdni fazi (SPE) in z ekstrakcijo..... | 30 |
| Slika 14: Povezava med zaužitimi skupnimi fenolnimi spojinami (SFS) in izločenimi SFS določenimi brez ekstrakcije na trdni fazi (SPE). | 31 |
| Slika 15: Povezava med zaužitimi skupnimi fenolnimi spojinami (SFS) in izločenimi SFS določenimi z ekstrakcijo na trdni fazi (SPE)..... | 31 |

KAZALO PREGLEDNIC

| | |
|---|----|
| Preglednica 1: Delitev fenolnih spojin po številu C atomov (Abram, 2000)..... | 2 |
| Preglednica 2: Opisna statistika zaužite energije in makrohranil na dan s povprečnimi energijskimi deleži..... | 19 |
| Preglednica 3: Povprečna, minimalna, maksimalna vrednost zaužitih skupnih fenolnih spojin (SFS) na dan in standardna deviacija..... | 21 |
| Preglednica 4: Prispevek posamezne skupine zaužitih živil v deležih k dnevni vnosu skupnih fenolnih spojin..... | 23 |
| Preglednica 5: Gostota skupnih fenolnih spojin (SFS) glede na skupino živil..... | 24 |
| Preglednica 6: Korelacija med skupinami živil (g) in izločenimi skupnimi fenolnimi spojinami (SFS) podana kot Pearsonov koeficient (r)..... | 32 |
| Preglednica 7: Korelacija med skupinami živil (g) in izločenimi skupnimi fenolnimi spojinami (SFS) v jutranjem urinu normalizirana na kreatinin, podana kot Pearsonov koeficient (r)..... | 32 |

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Količina skupnih fenolnih spojin v 100 g preiskovanih živil.

PRILOGA B: Določena koncentracija izločenih skupnih fenolnih spojin (SFS) v urinu s Folin-Ciocalteu metodo (Roura in sod., 2006) brez ekstrakcije na trdni fazi in z ekstrakcijo.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| | |
|------|--|
| FAO | Organizacija za prehrano in kmetijstvo pri OZN (angl. Food and Agriculture Organization) |
| FC | Folin-Ciocalteu |
| GAE | Ekvivalent galne kisline (angl. gallic acid equivalent) |
| GC | Plinska kromatografija (angl. gas chromatography) |
| HPLC | Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. high pressure liquid chromatography) |
| LDL | Lipoproteini majhne gostote (angl. low-density lipoprotein) |
| NO | Dušikov oksid |
| PAL | Povprečne dnevne potrebe po energiji za fizično aktivnost kot večkratnik bazalnega metabolizma |
| ROS | Reaktivne kisikove spojine (angl. reactive oxygen species) |
| SFC | Superkritična kromatografija |
| SFS | Skupne fenolne spojine |
| SPE | Ekstrakcija na trdni fazi (angl. solid phase extraction) |
| WHO | Svetovna zdravstvena organizacija (angl. World Health Organization) |

1 UVOD

Od druge polovice dvajsetega stoletja smo priča pojavu kroničnih bolezni v epidemičnih razsežnosti, ki je še vedno v teku (Wilks in sod., 1998). Značilnost tega obdobja je, da so kronične bolezni nadomestile nalezljive kot glavni vzrok obolevnosti in smrti. Razlog je potrebno iskati v spremembah prehrane in načinu življenja, ki prispevajo k razvoju kroničnih bolezni. Prekomerno uživanje maščob, nizek vnos sadja in zelenjave, sedeč življenjski slog, kajenje in onesnaženost okolja so vzroki za nastanek kroničnim bolezni. Med kronične bolezni štejemo bolezni srca in ožilja, hipertenzijo, sladkorno bolezen in nekatere oblike raka. Oksidativni stres je osrednji dejavnik tveganja za kronične bolezni (Wilks in sod., 1998; Leighton in sod., 1999).

Vsi strokovnjaki za prehrano se enoglasno strinjajo, da povečan vnos žit, sadja in zelenjave ter zmanjšan vnos nenasičenih maščob skupaj z zmerno fizično aktivnostjo prispeva k zmanjšanju možnost nastanka različnih oblik raka, kardiovaskularnih bolezni in mogoče celo Alzheimerjeve bolezni. Živila in napitki rastlinskega izvora so kemijsko gledano zelo kompleksni. Njihova zaščitna funkcija izvira iz mešanice snovi kot so prehranska vlaknina, imunskih stimulatorjev, antioksidantov, enkrat nenasičenih maščobnih kislin, B vitaminov, agentov, ki spodbujajo produkcijo NO (dušikovega oksida) in celo enostavnih molekul kot so etanolove (Halliwell, 2007).

V zadnjem desetletju, zanimanje za potencialne zdravstvene koristi fenolnih spojin strmo narašča. Izvedeno je bilo veliko študij, ki opisujejo antioksidativne lastnosti polifenolov in s tem povezanimi blagodejnimi učinki na zdravje človeka.

Do nastanka polifenolov pride v rastlinah, človek jih uživa v obliki sadja, zelenjave in izdelkov. Vnos polifenolov na dnevni ravni se močno razlikuje med kulturami, etničnimi skupinami in med bližnjimi geografskimi področji (Rodrigo in sod., 2001).

Uporaba polifenolov kot bioloških označevalcev je alternativa bolj tradicionalnim prehranskim metodam. Princip je meritev enega ali več biokemijskih označevalcev v dostopnih telesnih tekočinah, tako lahko dobimo informacijo o prehranskih navadah, npr. izpostavljenosti telesa sadju in zelenjavi (Spencer in sod., 2008).

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je ovrednotenje prehrane, predvsem zaužitih polifenolov na podlagi prehranskega dnevnika, določitev skupnih fenolnih spojin v urinu in preučitev, ali obstaja povezava med zaužitimi in izločenimi polifenoli v urinu.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

- Količina skupnih fenolnih spojin izmerjena v urinu je v povezavi s količino zaužitih skupnih fenolnih spojin.
- Za pravilno določitev skupnih fenolnih spojin v vzorcu urina je potrebna uporaba ekstrakcije na trdni fazi.

2 PREGLED OBJAV

2.1 FENOLNE SPOJINE

Fenolne spojine so najpogostejši antioksidanti prisotni v humani prehrani (Han in sod., 2007). Najdemo jih v celotnem rastlinskem kraljestvu z več kot 8000 oblik (De la Rosa in sod., 2010; Croizer in sod., 2009). Izraza fenolne spojine ali polifenoli povezujemo s snovmi, ki imajo najmanj en aromatski obroč in eno ali več hidroksilnih skupin povezanih na aromatski obroč (Abram, 2000; Shahidi in sod., 2005). Fenolne spojine so heterogena skupina, ki zajemajo tako enostavne snovi z nizko molekularno maso kot tudi bolj kompleksne spojine. Pogosto jih najdemo povezane s sladkorji in organskimi kislinami (Croizer in sod., 2009).

2.1.1 Razdelitev

Obstaja več načinov delitev fenolnih spojin vendar je največkrat v uporabi razdelitev po številu C atomov v molekuli (Abram, 2000).

Preglednica 1: Delitev fenolnih spojin po številu C atomov (Abram, 2000).

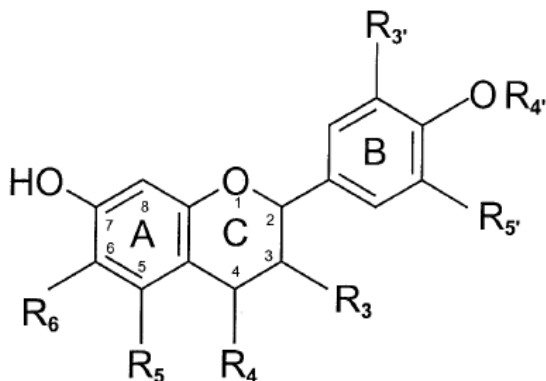
| Število C atomov | Osnovni skelet | Skupina |
|------------------|---|--|
| 6 | C ₆ | Fenoli |
| 7 | C ₆ C ₁ | Fenolne kisline |
| 8 | C ₆ C ₂ | Fenilacetne kisline |
| 9 | C ₆ C ₃ | Hidroksicimetne kisline Fenil propeni Kumarini Izokumarini Kromoni |
| 10 | C ₆ C ₄ | Naftokinoni |
| 13 | C ₆ C ₁ C ₆ | Ksantoni |
| 14 | C ₆ C ₂ C ₆ | Stilbeni Antrakinoni |
| 15 | C ₆ C ₃ C ₆ | Flavonoidi |
| 18 | (C ₆ C ₃) ₂ | Lignani Neolignani |
| 30 | (C ₆ C ₃ C ₆) ₂ | Biflavonoidi |
| n | (C ₆ C ₃) _n (C ₆) _n (C ₆ C ₃ C ₆) _n | Lignini Melanini Kondenzirani tanini |

Enostavni fenoli vključujejo monofenole kot je p-krezol in difenole kot so hidrokini (Shahidi in sod., 2005). Najdemo jih v deviškem olivnem olju, kjer imajo pomemben vpliv na stabilnost, senzorično in njegovo prehransko vrednost (Servilia in sod., 2004). Njihova koncentracija narašča med procesom staranja vina v sodih in med praženjem kave (De la Rosa in sod., 2010).

Fenolne kisline lahko razdelimo na dva razreda: hidroksibenzojske in hidroksicimetne kisline. Običajno je koncentracija hidroksibenzojske kisline v užitnih rastlinah zelo nizka (Shahidi in sod., 2005). Vir fenolnih kislin so jagode jerebice (*Sorbus aucuparia*),

borovnice, slive, češnje, zeleni ter črni čaj. Pogosta predstavnika sta elagična kislina in galna kislina (Servilia in sod., 2004).

Flavonoidi so zelo razširjena skupina vodotopnih polifenolov, ki vsebujejo 15 C atomov in jim je skupna struktura $C_6C_3C_6$. Spojine med seboj se razlikujejo po oksidacijski stopnji heterocikličnega C_3 obroča in substituentah na obročih A, B in C (Beecher, 2003).



Slika 1: Osnovna strukturna formula flavonoidov. Za večino flavonoidov velja, da je $R_4=H$, $R_5=OH$, $R_6=H$ (Beecher, 2003).

Flavonoide najdemo sadju in zelenjavi, v žitu, kakavu, čaju in začimbah. Flavonoli (kvercetin, kampferol, miricetin) so najbolj pogosti flavonoidi v hrani. Flavonoli se kopičijo predvsem v zunanjih tkivih sadja in zelenjave zato, ker je njihova sinteza pogojena s sončno svetlobo. Najdemo jih v glikoziliranih (β -glikozidi) oblikah in njihova biodostopnost je odvisna od sladkorja s katerim so povezani. Flavoni, kot so apigenin in lutein glikozidi so zelo razširjeni vendar v manjših količinah. Flavononi so običajno glikozilirani na poziciji 7 z disaharidom (neohesperidoza, rutinoza) ali manjši delež z monosaharidom (glukoza). Eriodictirol, hesperitin, naringenin so pogosti flavanoni. Izoflavoni se nahajajo skoraj samo v stročnicah. Antocianidini prispevajo k značilni rdeče modri barvi večine sadja in zelenjave. Vsebnost antocianidinov narašča med dozorevanjem. Cianidin, delfinidin, malvidin, pelargonidin, petunidin, peonidin so predstavniki te podskupine polifenolov. Flavan-3-oli so aglikoni (katehin, epikatehin, epigalokatehin). Podskupina flavonoidov so tudi kondenzirani tanini (De la Rosa in sod., 2010).

2.1.2 Sinteza

Rastlinski metabolizem lahko razdelimo na primarne in sekundarne metabolne poti. Primarni metabolizem proizvaja produkte pomembne za rast, najdemo ga v vseh rastlinskih celicah. Sekundarni metabolizem poteka v specializiranih celicah z nastankom strukturno zelo raznovrstnih spojin. Primarni metabolizem zajema katabolne in anabolne reakcije ogljikovih hidratov, lipidov, beljakovin in nukleinskih kislin. V nasprotju, sekundarni metaboliti izhajajo iz šikimatne, malonatne, mevalonatne in 3-fosfoglicerat/piruvatne poti. Večji del fenolnih spojin nastane po poti šikimiske kisline iz fenilalanina ali njegovega prekursorja šikimiske kisline. Flavonoidi nastanejo kot produkt poti malonske in šikimiske kisline. Zaradi različnih sintetskih poti se fenolne spojine kemijsko precej razlikujejo med

seboj, nekatere so topne v organskih topilih, nekatere so vodotopne, druge so pa netopljivi polimeri. Razlog njihove kemijske diverzitete je raznolikost vlog, ki jih opravljajo v rastlini, od mehanske podpore, zaščite proti škodljivim UV sončnim žarkom do preprečevanja povečanega izhlapevanja vode (De la Rosa in sod., 2010).

2.1.3 Vpliv okolja

Količina in kakovost polifenolov se v rastlinskih živilih bistveno razlikuje glede na različne notranje in zunanje dejavnike, kot so genetika in kultivar, sestava tal in rastni pogoji, zrelostna stopnja ter pogoji po obiranju. Velika antioksidativna moč uvršča polifenole med pomembne prirojene obrambne dejavnike, katerih koncentracija močno naraste pri izrednih pogojih kot so sprememba temperature, izpostavljenost UV žarkom in patogenim napadom (De la Rosa in sod., 2010).

Faller in Fialho (2010) sta preiskovala možen vpliv tipa kultivacije, biološkega ali konvencionalnega, na vsebnost polifenolov. Prišla sta do zaključka, da ima tip kultivacije manjši vpliv na vsebnost fenolnih spojin pri zelenjavi v primerjavi s sadjem. Dokazala sta, da obstaja pri nekaterih vrstah sadja razlika v vsebnosti polifenolov med biološko in konvencionalno predelano hrano.

Stres, ki nastane pred obiranjem pridelka lahko povzroči akumulacijo fenolnih spojin do količin, ki lahko hitro povzročijo diskoloracije, ki so posledica poškodbe celic. Ob prisotnosti kisika pride do interakcij med polifenoli in fenoloksidazo ter peroksidaznimi encimi kar povzroči nastanek barvnih pigmentov. V tem primeru velika koncentracija fenolnih spojin ne prispeva k boljši kvaliteti produkta ampak jo celo znižuje (De la Rosa in sod., 2010).

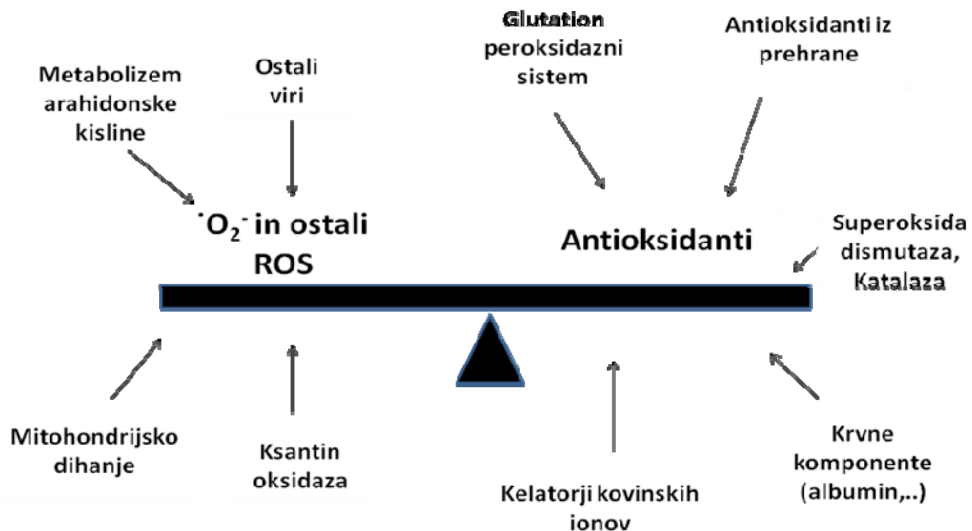
2.1.4 Presnova polifenolov

Na splošno velja, da so fenolne spojine podvržene metabolnim spremembam po zaužitju. V zgornjem delu prebavil prehranski polifenoli delujejo kot substrati za mnogo encimskih reakcij, ki vodijo do sprememb v absorpciji med njimi. Med prehodom tankega črevesja so predmet kemijskih sprememb hidrolize in oksidativnih encimov. Večina aglikonov, ki ubežijo reakcijam metabolizma v tankem črevesu se prenesejo preko krvi do jeter kjer so podvrženi razgradnji. Za preostale polifenole poskrbi intestinalna flora, ki predstavlja velik katalizatorni in hidrolitični potencial. Metaboliti se nato absorbirajo v sistemski obtok krvi iz debelega črevesa (Spencer in sod., 2008).

2.2 FENOLI KOT ANTIOKSIDANTI

Med najbolj reaktivnimi oblikami kisika prištevamo superoksidni ion ($\cdot\text{O}_2^-$), tripletni ($^3\text{O}_2$) in singletni kisik ($^1\text{O}_2$), hidroksilni radikal ($\cdot\text{OH}$), vodikov peroksid (H_2O_2), radikal dušikovega oksida (NO^\cdot) in peroksidni radikal (ROO^\cdot). Naštete oblike kisika so posledica normalne celične presnove in rezultat dejavnikov okolja: UV in gama žarkov, kajenja, toplote, onesnaženja okolja in nekaterih sintetičnih zdravil. V skladu s teorijo prostih radikalov, ti atomi, molekule ali ioni z neparnimi elektroni poškodujejo celice v organizmu

kar povzroča staranje. Porušeno ravnotežje med obrambnim mehanizmom antioksidantov ter prostimi radikali imenujemo oksidativni stres (Korošec, 2000).



Slika 2: Ravnotežje med antioksidanti in reaktivnimi spojinami *in vivo*. (ROS = reaktivne kisikove spojine), (Halliwell, 2008).

Proces oksidacije je pomemben v tehnologiji predelave hrane, ker je eden od najpomembnejših faktorjev pri spremembi živil med procesiranjem, distribucijo ter pripravo hrane. Oksidacija lipidov prispeva k spremembi prehranske vrednosti, barve, strukture in navsezadnje tudi varnosti živil. Antioksidanti pomembno vplivajo k preprečevanju oksidativne razgradnje lipidov (Shahidi in Wanasundara, 1992).

V človeškem telesu, kjer se prosti radikali tvorijo *in vivo*, se poškodbe razširijo tudi na ostale molekule poleg lipidov. Peroksidacija teče neprekinjeno ob prisotnosti primernih substratov dokler ne pride do blokiranega obrambnega sistema. Tarče oksidacije so večkratnenašičene maščobne kisline, fosfolipidi, holesterol in DNA, vendar so lipidi najbolj občutljivi na oksidativne spremembe, saj je večja verjetnost hitre in uničujoče verižne reakcije (Robards in sod., 1999).

Glede na njihovo delovanje, delimo antioksidante na primarne, sekundarne in terciarne. Primarni antioksidanti so predvsem encimi (superoksid dismutaza, glutation peroksidaza), ki lahko reaktivne radikale spremenijo v bolj stabilne produkte in s tem prekinejo verižno reakcijo avtooksidacije. Sekundarni antioksidanti nevtralizirajo na novo nastale proste radikale in tako preprečijo, da bi vstopali v nadalje verižne reakcije, reagirajo s kovinskimi ioni, odvzamejo kisik iz medija, razgrajujejo hiperokside do komponent ki niso reaktivne, absorbirajo UV svetlobo. Delimo jih na odjemalce kisika (askorbinska kislina, karotenoidi, sulfiti) in odjemalce radikalov. Terciarni antioksidanti popravljajo poškodbe, ki so jih povzročili prosti radikali (Korošec, 2000).

Poznamo veliko število rastlinskih polifenolov in pri vseh niso ugotovili enako antioksidativno aktivnost. Odkritih je bilo nekaj različnih mehanizmov delovanja fenolnih

spojin: lovljenje prostih radikalov, donacija vodika, vezava kovinskih ionov ali kot substrat superoksida (Robards in sod., 1999).

Fenolne spojine primarno delujejo kot terminator verižnih reakcij saj posegajo v verižno reakcijo s hitro donacijo vodikovega atoma lipidnemu radikal. Nastali fenoksilni radikal ne sme sprožiti novih radikalnih reakcij. Fenolni antioksidanti so odlični donorji vodikovega atoma ali elektronov, njihovi radikali so relativno stabilni (Shahidi in Wanasundara, 1992).

Alternativni mehanizmi delovanja fenolnih spojin so učinkoviti le pri manjših koncentracijah kisika, pri manjših razsežnosti verižne reakcije ali pri velikih koncentracijah antioksidanta.

Kemijska struktura polifenolov igra pri antioksidativnemu delovanju pomembno vlogo. Aktivnost fenolnih spojin narašča z večjim številom hidroksilnih skupin, pomembna je tudi pozicija –OH skupine. Večja aktivnost je opazna ko se hidroksilna skupina nahaja na B-obroču, predvsem na C-3' (Slika 1, pozicija R₃). Vpliv glikozilacije ni povsem jasen, v nekaterih primerih imajo molekule s pripetim sladkorjem in tiste brez podobno antioksidativno aktivnost, v drugih pa različno sposobnost zaustavljanja oksidativne reakcije (Robards in sod., 1999).

Fenolne spojine lahko delujejo tudi kot substrati nekaterih oksidoreduktaz kot so polifenoloksidaze in peroksidaze. Njihova vloga je raziskana predvsem v sadju, kjer pride do encimskega poorjavenja (Robards in sod., 1999).

Polifenoli zlahka oksidirajo v pijačah kot je čaj, v mediju celičnih kultur ter v ustni votlini. Pogosto pro-oksidacijski efekt vključuje interakcije med polifenoli in prehodnimi kovinskimi ioni. Oksidacija polifenolov vodi do nastanka O₂, H₂O₂ in kompleksne mešanice semikinonov ter kinonov, kateri so vsi potencialno citotoksični. V prebavnem traktu so mnogokrat prisotni neabsorbirani kovinski ioni (predvsem železo) zato lahko tudi v človeškem organizmu pričakujemo prooksidativne efekte. Vendar imajo ti efekti lahko v praksi tudi pozitivne učinke. Z rahlim dvigom oksidativnega stresa se dvigne tudi nivo antioksidacijske obrambe in aktivnost encimov, ki razgrajujejo ksenobiotike. Na ta način organizem doseže splošno obrambo celic (Halliwell, 2007, 2008).

Halliwell (2008) v svojem preglednem članku navaja, da do sedaj ni oprijemljivih raziskav, ki bi lahko definitivno pojasnile ali se polifenoli obnašajo *in vivo* kot antioksidanti ali prooksidanti. Tudi v študijah kjer skupina prostovoljcev zaužije hrano z visoko vsebnostjo polifenolov namesto čistih flavonoidov so avtorji prišli do različnih zaključkov. Nekatere raziskave kažejo antioksidativni efekt (Vinson in sod., 2006; Cooper in sod., 2008), nekatere nobenega efekta (Sanchez-Moreno in sod., 2006) ter članki, ki nakazujejo na blagi prooksidativni efekt (Dragsted in sod., 2004).

2.3 POLIFENOLI IN ZDRAVJE

V nasprotju z vitamini, polifenoli niso potrebni za rast in razvoj ter za ohranjanje življenjskih funkcij telesa skozi vse življenje. Kljub temu pa za izbrane polifenole

obstajajo klinični in epidemiološki dokazi, ki kažejo na zmanjšanje tveganja za nastanek kroničnih bolezni (Williamson in Holst, 2008).

2.3.1 Dnevni vnos polifenolov v nekaterih državah

Natančnih podatkov o dnevnem vnosu polifenolov, ki bi na splošno veljali, ni na razpolago. Opravljenih je bilo večje število študij, ki navajajo vrednosti za dnevni vnos polifenolov, ki pa se med seboj razlikujejo. Williamson in Holst (2008) sta predpostavila, da naj bi osebe, ki sledijo priporočilu "5 krat na dan" zaužile približno 500 mg polifenolov dnevno. V primeru, da popijemo še skodelico kave, morda čaja ali kakava lahko se število povzpe še za dodatnih 500 ali 1000 mg.

Leta 2005 so Scalbert in sod. ocenili, da je vnos polifenolov v povprečju 1 g dnevno, kar je precej več kot za ostale fitokemikalije in poznane prehranske antioksidante. Za primerjavo je vnos polifenolov 10 krat večji kot vnos askorbinske kisline in 100 krat večji kot vnos vitamina E in karotenoidov. Povprečni dnevni vnos polifenolov v španski oz. mediteranski dieti je bil ocenjen med 2600 in 3000 mg (Saura-Calixto in sod., 2007). Za dieto mehiškega podeželja je značilen manjši vnos sadja in zelenjave (<400 g na dan) vendar je skupni vnos polifenolov primerljiv z dieto španskega prebivalstva (>800mg na dan).

Povprečni dnevni vnos flavonoidov na Nizozemskem je bil ocenjen na 23 mg na dan. Jabolka so bila najbolj pomemben vir polifenolov, kvercetin z 16 mg na dan je bil količinsko najbolj pomemben flavonoid (Robards in sod., 1999). Odvisno do prehranskih navad je običajno vnos flavonov in flavonolov (najbolj pogosti flavonoidi) je med 3 in 70 mg/dan, kjer kvercetin predstavlja največji delež (60-75 %) (Ruiz in sod., 2009).

2.3.2 Vaskularno in antitrombotično delovanje

Endotelijske celice uravnavajo funkcijo gladkomišičnih celic medije in žilni tonus (Lunder in sod., 2007), delujejo antitrombotično, izločajo snovi, ki vplivajo na strjevanje krvi in fibrinozo ter uravnavajo izmenjavo snovi med krvjo in steno žil (Vita, 2005). Endotelijska disfunkcija lahko privede do hipertenzije, ateroskleroze in možgansko kapi. Ugotovljeno je bilo, da pri hipertenziji, pride do večje proizvodnje superoksid aniona in vodikovega peroksida, zmanjšane sinteze NO (dušikovega oksida) in aktivnosti antioksidantov. Manjša dostopnost NO, najbolj pomembnega žilnega dilatatorja, vodi do oženja žil in višanje krvnega tlaka (Stoclet in sod., 2004). Merjenje koncentracije NO se uporablja kot biomarker za izračun možnosti nastanka srčnega napada (Cooper in sod., 2008).

Polifenoli povečajo sintezo dušikovega oksida, endotelijskega hiperpolarizirajočega dejavnika (EDHF) ter inhibirajo sintezo vazokonstriktorja endotelina-1, vaskularnega endotelijskega rastnega dejavnika (VEGF) in encima MMP-2, ki ima pomembno vlogo pri vaskularni ureditvi in odzivu na vnetja v gladkih mišicah (Stoclet in sod., 2004).

Kvercetin znatno zmanjša sistolični krvni tlak posameznikom z visokim fenotipskim tveganjem za nastanek kardiovaskularnih bolezni (Egert in sod., 2010) in povzroči znatno zmanjšanje plazemske koncentracije aterogenega oksidirane LDL. Raziskava na zdravih osebkih je pokazala, da čisti kvercetin lahko izboljša endotelijsko funkcijo s spreminjanjem

kroženja koncentracije vazoaktivnih NO proizvodov in endothelina-1 (Loke in sod., 2008), kar lahko razložimo v inhibicijskem delovanju na NADPH oksidazo in aktivacijo endoteljske NO sinteze. Pozitivne učinke kvercetin pripisuje tudi 4 tedenska raziskava, kjer se je pri bolnikih z blago hipertenzijo znatno zmanjšal krvni tlak (Edwards in sod., 2007). Objavljeni so bili tudi podatki, kjer avtorji navajajo, da pri višjem vnosu kvercetina pri zdravih prostovoljcih ni bilo sprememb pri sistoličnem ali diastoličnem krvnem pritisku (Conquer in sod., 1997).

Poleg kvercetina tudi flavan-3-oli delujejo tarčno na sintezo NO ter zmanjšujejo občutljivost LDL na oksidacijo (Cooper in sod., 2008).

Preko aktivacije estrogenskega receptorja α (ER α), estradiol in 1,3,5-tris (4-hidroksifenil)-4-propil-1H-pirazol kot tudi delfinidin, spodbudijo molekularne poti, ki vključujejo fosforilacijo Src, ERK1/2 in kaveolin-1 s posledičnim povečanjem endoteljske proizvodnje NO in žilno sprostitvev ali dilatacijo (Rodrigo in sod., 2001).

Ugodne vplive na endotelne celice pripisujejo epikatehinu kajti inhibira nastanek 7 β -OH-olesterola *in vitro* (Steffen in sod., 2006). Oleuropein, hidroksitirozol, Resveratrol stimulirajo endotelij s tem, da reducirajo monocitoidno adhezijo (Rodrigo in sod., 2001).

In vitro študije so pokazale, da iz grozdja pridobljeni polifenoli zavirajo aktivnost trombocitov. Flavonoidi zavirajo ciklooksigenaze in zmanjšajo sintezo tromboksana A₂ (Dohadwala in Vita, 2009), vodikovega peroksida, zavirajo aktivacijo fosfolipaze C in protein kinaze C (Rodrigo in sod., 2001).

2.3.3 Protirakavo delovanje

Fenolne spojine imajo močan vpliv na biološke procese in sposobnost vplivati na bolezni, kot je rak preko različnih komplementarnih mehanizmov (Lambert in Elias, 2010).

MAP kinaze (mitogen aktiviran protein) delimo v tri skupine, ekstracelularne signalno regulirane kinaze (Erk), c-Jun N-terminalne kinaze (JNK) in p38^{MAPK}. Običajno so JNK in p38^{MAPK} aktivirane s strani okoljskega stresa in citokinov (npr. TNF, IL-1, IL-2, IL17), ki jih povezujemo z vnetji, bolečino ter programirano smrt celic. Epigalokatehin-3-O-galat, ki se pojavi v krvnem obtoku zatira tumorigenezo tako, da inducira antioksidativni odgovor organizma in MAPK. Katehin in kvercetin ščitijo srce in ožilje s tem, da aktivirajo MAPK, ki zavira ekspresijo PAI-1 v človeških endotelialnih celicah v žilah (Lambert in Elias, 2010).

Aktivator protein 1 (AP-1) je transkripcijski faktor, ki igra pomembno vlogo pri normalnemu razvoju in odzivu na stres. Vpliva na regulacijo rasti, transformacijo celic, vnetje in prirojen imunski odziv. Vključen je v regulacijo genov za apoptozo in proliferacijo, vpliva pa na aktivacijo cikličnega D1 gena in zatira tumor supresorske gene, kot so p53, p16. Fenoli iz zelenega čaja, flavan-3-oli, kot so kvercetin, trans-Resveratrol in kurkumin zaustavijo aktivacijo AP-1 (Lambert in Elias, 2010).

Dokazano je bilo, da antocianini inducirajo fazo II antioksidativnih in razstrupljevalnih encimov v celičnih kulturah in tako zmanjšujejo možnost nastanka tumorjev. Na podoben način delujejo tudi drugi fenoli (galna kislina, p-kumarna kislina, ferulična kislina, kurkumin, *trans*-Resveratrol), ki imajo preventivne učinke preko stimulacije Nrf2 sistema, ki ščiti celice pred prostimi radikali (Croizer in sod., 2009).

Estrogen ima pomembno vlogo pri razvoju raka na dojkah. Aromataza je encim odgovoren za sintezo estrogena, ki je v tumorskem tkivu dojke prisoten v večjih koncentracijah kot v zdravem tkivu. Resveratrol inhibira aromatazno delovanje v razvoju raka na dojkah (Rodrigo in sod., 2001). Zaradi strukturne podobnosti estrogenu, ima resveratrol agonistične in antagonistične lastnosti na estrogenskem receptorju (Wang in sod., 2006).

Največ zaslug za pozitivne učinke zelenega čaja pri preprečevanju nastajanja raka gre (2)-epigalokatehin-3-galatu (EGCG), (Mukhtar in Ahmad, 2000). Dokazano je bilo, da imajo polifenoli zelenega čaja močno antioksidativno kapaciteto *in vitro*, vendar je ta precej šibka v primerjavi z učinki na ostale poti vključene v inhibicijo karcinogeneze (Lambert in Elias, 2010).

2.3.4 Delovanje proti diabetesu

Dolgoročni učinki diabetesa vključujejo postopen razvoj ostalih bolezni, kot so retinopatija, ki povzroči slepoto, nefropatijo, v katerem se ledvične funkcije spremenijo ali so motene in nevropatija, ki je povezana s tveganji amputacij, stopalni razjed.

Povečana raven reaktivnih kisikovih spojin ima nezanemarljiv vpliv na inzulinsko rezistenco. Pacienti diabetesa tipa 2 so uživali 4 tedne ekstrakt iz pečk groznih jagod, rezultat je bil pozitiven na številne markerje vnetja in glikemije. Poleg tega lahko polifenoli vplivajo na glikemijo z različnimi mehanizmi, vključno z zaviranjem absorpcije glukoze v črevesju ali privzema s strani perifernih tkiv. Resveratrol, miricetin, kvercetin ščitijo eritrocite pacientov diabetesa pred oksidativnimi spremembami (Rodrigo in sod., 2001).

2.3.5 Antimikrobno delovanje

Poleg naštetih pozitivnih učinkov, ki jih pripisujemo fenolnim spojinam je poznano tudi protibakterijsko, protiglivično in protivirusno delovanje. (Mukhtar in Ahmad, 2000) Polifenoli preprečujejo rast bakterijam kot so *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*. Bakterijske vrste so različno občutljive na fenole, najbolj občutljiv je *Staphylococcus aureus* najmanj pa kvasovka *C. Albicans*. Visoke koncentracije flavonoidov, stilbenov in fenolnih kislin imajo močan protiglivični učinek. Podoben učinek kaže Resveratrol proti *Candida albicans*. Polifenoli iz grozdne kožice najmočneje ovirajo rast patogenca *Helicobacter pylori* (Karapinar in Sengun., 2007).

Potencial antimikrobnega delovanja je pomemben tudi na drugih področjih ne samo zdravstvenem. Veliko vlogo bi lahko imel tudi v ohranjanju živil, kot naravni konzervans in antimikrobni agent. Npr. v Turčiji je v uporabi grozdni sok kot inhibitor mikrobne rasti

in ojačevalec arome. Uporabljajo ga tudi v zelenjavnih solatah saj preprečuje rast *S. Typhimurium* (Karapinar in Sengun., 2007).

2.3.6 Proti vnetno delovanje

NF- κ B (jedrni faktor kappa B) je redoks občutljiv transkripcijski proteinski kompleks, ki regulira številne fiziološke funkcije in je vključen v patogenezo nekaterih bolezni. NF- κ B regulira ekspresijo citokinov, signalnih faktorjev in inhibitorjev apoptoze. Izražanje genov, ki povzročajo vnetje je nujno potrebno za dober imunski odziv vendar pretirana ali predolga aktivacija povzroči kronične vnetne bolezni kot je astma, Kronovo bolezen, ulcerozni kolitis, avtoimunske bolezni (arthritis) in navsezadnje tudi nevrodegenerativne bolezni in raka. Močni inhibitorji NF- κ B so kukurmin, Resveratrol, elagična kislina, epigalokatehin-3-O-galat. Kukurmin v koncentracijah od 10 do 30 μ mol/L inhibira NF- κ B aktivacijo kancerogenih človeških celic prostate (Lambert in Elias, 2010). Polifenoli preprečujejo vnetja povzročena z nekaterimi spojinami kot je 12-Otetradekanoilforbol-13-acetat ter proti ultravijoličnim žarkom B (290–320 nm) (Mukhtar in Ahmad, 2000).

2.3.7 Nevroprotektivni in antialergijski učinki

Do sedaj ni bila ugotovljena še nobena povezava med okoljskimi faktorji in nastanek Alzheimerjeve bolezni vendar so študije podprle pomembno vlogo prehrane pri preprečevanju te neozdravljive bolezni. Resveratrol ima pomembne funkcije tako *in vitro*, *in vivo* in v modelih Alzheimerjeve bolezni, učinek te spojine se kaže tudi pri Parkinsonovi bolezni, Huntingtonovi bolezni, pri preprečevanju ishemične kapi in epilepsije (Rodrigo in sod., 2001).

Pogostost alergij tipa 1 se konstantno povečuje, predvsem preobčutljivost na živila. Kondenzirani tanini iz jabolk naj bi inhibirali preobčutljivost ustne votline, kar naj bi bilo povezano z večjo prisotnostjo TCR $\gamma\delta$ -T celic v črevesnih intraepitelijskih limfocitih (Han in sod., 2007).

2.4 DOLOČANJE

2.4.1 Ravnanje z vzorci/shranjevanje

Pri shranjevanju sadja in zelenjave je potrebno upoštevati kompleksnost matriksa, dati pozornost na strukturo še posebej pri mehkih sadežih in zelenjavi (jagodičevje, grozdje, endivija, radič,...). Mehanske poškodbe lahko vodijo do encimskih reakcij porjavenja, ki so posledica pretvorbe polifenolov v melanine. Dva encima imata posebno vlogo pri oksidaciji polifenolov in sicer polifenol oksidaze in peroksidaze. Na različne načine lahko preprečimo nezaželene spremembe, z nižanjem pH, dodajanje kemikalij ali uporabe velikih koncentracij organskih topil (De la Rosa in sod., 2010).

Mnogokrat literatura priporoča, kot najboljši način shranjevanja, nižanje temperature. Liofilizacija je najbolj primerna za shranjevanje vendar pri sadju in zelenjavi jo je potrebno uporabiti pred fenolno ekstrakcijo saj nekateri SFS kažejo temperaturno nestabilnost (De la Rosa in sod., 2010).

V primeru določanja polifenolov v urinu so Roura in sod. (2006) navedli nakisanje vzorcev urina in shranjevanje pri -80°C . Conquer in sod. (1997), ki so določevali vsebnost kvercetin v krvnem serumu so shranjevali vzorce krvi pri temperaturi -70°C brez predhodnega nakisanja.

2.4.2 Ekstrakcija

Ekstrakcija je zelo pomemben korak v izolacijo, identifikacijo in uporabo fenolnih spojin in ne obstaja enotna in standardna metoda za ekstrakcijo. Solventna ekstrakcija in ekstrakcija s superkritičnimi tekočinami sta najpogostejše uporabljene metode za izolacijo fenolnih spojin (Ignat in sod., 2011).

Pri ekstrakciji tekoče-tekoče gre za porazdelitev topljenca med dve topili (A in B), ki se med seboj ne mešata v vseh razmerjih. Cilj ekstrakcije je prenos topljenca iz enega v drugo topilo. Rezultat je nastanek dveh tekočin, ena z visoko koncentracijo topljenca druga z nizko koncentracijo. Za dober rezultat je pomembna izbira topil, ki ne smeta reagirati s topljencem ali med seboj, imeti morata različno gostoto, da se fazi po mešanem čim prej ločita. Pomembna je tudi temperatura vrelišča, saj se mora topilo po končani ekstrakciji čim lažje odpareti. Ekstrakcija tekoče-tekoče se pogosto uporablja za ločitev fenolnih spojin iz stranskih proizvodov, ki nastanejo v industriji pijač (Ignat in sod., 2011).

Ekstrakcijo trdno-tekoče uporabljamo za ločbo spojin iz vzorcev s trdnim matriksom. Do prenosa mase lahko pride zaradi spremembe v koncentracijskem gradientu, difuzijskemu koeficientu ali mejni fazi. V veliki meri se uporablja za ekstrakcijo številnih pomembnih sestavin živil: saharoze iz trsa ali pese, lipidov iz oljnic, fitokemikalij iz rastlin, funkcionalnih hidrokoloidov iz alg in polifenolov iz rastlin, sadja, zelenjave. Mnogo dejavnikov vpliva na koncentracijo zelene sestavine v izvlečku: temperatura, razmerje tekoče-trdno, pretok in velikost delcev ter čas stika med trdnim in tekočim. Najpogosteje se uporabljajo topila kot so nakisan metanol in etanol. Dokazali so, da je pri ekstrakciji antocianinov metanol za 20 % bolj učinkovit od etanola in 73 % bolj učinkovit od ekstrakcije z vodo. Vendar se v živilski industriji metanola izogibajo zaradi njegove toksičnosti (Castaneda-Ovando in sod., 2009).

Ekstrakcija na trdni fazi (SPE) je metoda ekstrakcije s sorbentom. V primerjavi z ekstrakcijo s topili je SPE poceni in enostavna metoda, ki uporablja le majhno količino topila. Vendar lahko interakcija med vzorcem in topilom pogosto vodi v majhen izkoristek. SPE je tudi omejena na delno hlapne spojine, katerih temperatura vrelišča je precej višja od temperature vrelišča elucijskega topila (Pawliszyn, 1997).

Ekstrakcija s superkritično tekočino (SFE), je okolju koristna alternativa ekstrakciji bioloških spojin s konvencionalnimi organskimi topili: SFE metode so hitre, avtomatske, selektivne in z njimi se izognemo uporabi velike količine strupenih topil. Poleg tega odsotnost svetlobe in zraka med ekstrakcijo zmanjšuje možnost degradacij, ki se lahko pojavijo med tradicionalnimi ekstrakcijami tehnikami. SFE temelji na dejstvu, da blizu kritične točke, topilo hitro spremeni njegove lastnosti z rahlo spremembo tlaka. Superkritični fluidi vse bolj nadomeščajo organska topila kot heksan, diklorometan,

kloroform in drugi, ki se običajno uporabljajo v industriji ekstrakcije, čiščenja in rekristalizacije zaradi vplivov na okolje (tanjšajo ozonski plašč). Moč raztapljanja superkritične tekočine je podobna tekočim organskim topilom, vendar z višjo difuzijo, nižjo viskoznostjo in nižjo površinsko napetostjo. Najbolj uporabljena kritična tekočina je superkritični ogljikov dioksid zaradi ugodnega vpliva na okolje, nizke toksičnosti, nevnetljivosti, enostavne ločitve od topljenca in cena (Ignat in sod., 2011).

2.4.3 Kvantifikacija in separacija polifenolov

Razvitih je bilo kar nekaj spektrofotometričnih metod za kvantifikacijo rastlinskih polifenolov. Folin-Ciocalteu metoda se pogosto uporablja za določanje vsebnosti polifenolov, vanilinova in proantocianidinova metoda za kvantifikacijo skupnih antocianidinov (De la Rosa in sod., 2010). Spektrofotometrično določanje skupnih antocianinov uporablja različne pH metode, ki so osnovane na karakterističnem spektru antocianinov v kislih pogojih. Vsebnost flavonoidov lahko določimo s kolorimetrično metodo, ki temelji na nastanek kompleksov fenolnih spojin z aluminijem. S spektrofotometričnimi testi lahko določimo samo skupno vsebnost polifenolov (Ignat in sod., 2011).

Med različnimi metodami na voljo, je HPLC najbolj primerna za ločitev in kvantifikacijo polifenolov v sadju. Kromatografski pogoji za HPLC metode vključujejo uporabo skoraj izključno reverzne fazne C18 kolone, UV-Vis ter detektorjev z diodno matriko in binarnega sistema, ki vsebuje nakisano vodo (topilo A) in polarno organsko topilo (topilo B). Omejitve te metode so slabša občutljivost in prag zaznave spojin, kar se pozna pri analizi snovi kompleksne strukture in vzorcev iz okolja (Ignat in sod., 2011).

McDougall in sod. (2008) so analizirali ekstrakte nekaterih sadežev obogatenih s tanini. Zaradi kompleksnosti matriksa so se odločili uporabiti masno spektrometrijo z neposredno infuzijo namesto tekočinske kromatografije. Na ta način so pridobili negativni ESI-MS spekter in določili razlike v vzorcih.

Superkritična kromatografija (SFC) je relativno nova kromatografska tehnika, uporabljena za ločevanje in označevanje fenolnih spojin. Razlika SFC od drugih kromatografskih tehnik (plinsko kromatografijo in HPLC), je v tem, da je mobilna faza superkritični plin ali bližnja kritična tekočina. Superkritična kromatografija je bolj vsestranska kot HPCL, bolj stroškovno učinkovita, uporabniku prijazna, z večjo zmogljivostjo, boljšo ločljivostjo in hitrejšim časom analize kot splošne tekočinske kromatografske metode (Ignat in sod., 2011).

Papirna kromatografija in tankoplastna kromatografija se še vedno pogosto uporabljata za čiščenje in izolacijo antocianov, flavonolov, kondenziranih taninov in fenolnih kislin z različnimi sistemi topil (Naczki in Shahidi, 2006).

Kapilarna elektroforeza (CE), ki je alternativna ločitvena tehnika HPLC, je še posebej primerna za ločevanje in kvantifikacijo polarnih in nabitih molekul z nizko in srednjo molekulsko maso. CE postaja vsestransko analitično orodje za rutinsko določanje različnih fenolnih spojin v različnih vrst vzorcev zaradi svoje visoke učinkovitosti ločitve, kratkega

analiznega časa in majhno poraba vzorca in reagentov. Ena od glavnih omejitev te tehnike je nizka občutljivost in slabša ponovljivost v primerjavi s plinsko kromatografijo in HPLC (Ignat in sod., 2011).

NMR spektroskopija se dandanes vedno bolj pogosto uporablja za analizo živil. Prednosti so: preprostost priprave vzorca in merilnih postopkov, instrumentalna stabilnost, enostavnosti branja spektrov. Priprava vzorca hrane je običajno preprosta, odvisna je od vrste vzorca (tekoči, trdni). V nekaterih primerih je potrebna predhodna ekstrakcija ali frakcioniranje. Omejitev uporabe te tehnike je velik strošek opreme, ki je kar 7-8 krat večji od HPLC/UV- DAD sistema. Druga omejitev je relativno nizka občutljivost v primerjavi s HPLC in GC. Prednost je v tem, da so vsi glavni metaboliti (lipidi, amino in organske kisline, sladkorji, aromatične spojine) lahko odkriti z enim samim spektrom z minimalno ne destruktivno pripravo vzorca (De la Rosa in sod., 2010).

Masna spektrometrija je analitična tehnika, ki se uporablja tudi za določanje kemijske strukture molekul, kot so peptidi, polifenoli in druge kemične spojine. Masni spektrofotometri delujejo tako, da ionizirajo molekule, nato sortirajo in identificirajo ione glede na njihovo razmerje masa/naboj (De la Rosa in sod., 2010).

Plinska kromatografija-masna spektrometrija je bila v uporabi zadnjih 20 let za določanje fitokemikalij, vendar je pomanjkljivost v tem, da je večina polifenolov nehlapnih in potrebujejo zahtevne predhodne procese obdelave. Grün in sod. (2008) so uporabili to metodo za določevanje fermentacijskih polifenolnih produktov črevesnih bakterij, Owen in sod. (2003) za določanje polifenolov v rožičevih vlaknah.

2.4.4 Povezanost med zaužitimi in izločenimi skupnimi fenolnimi spojinami v urinu

Medina-Remón in sod. (2009) so uporabili Folin-Ciocalteu metodo (Roura in sod., 2006) za določanje skupnih fenolnih spojin v vzorcih urina. Metodo so modificirali tako, da so uporabili za ekstrakcijo na trdni fazi pladenj s kartušami, ki omogoča istočasno spektrofotometrično meritev več vzorcev hkrati (v tem primeru 96 vzorcev istočasno). Analizirali so SFS v jutranjem urinu in nato normalizirali podatke na kreatinin. Zanimala jih je korelacija med izločenimi SFS in vnosom sadja in zelenjave. Ugotovili so, da obstaja dobra korelacija med zaužitimi polifenoli in določenimi skupnimi fenolnimi spojinami. Navedli so tudi pozitivno korelacijo med zaužitim sadjem in zelenjavo in izločenimi SFS.

Namen raziskave Zamora in sod. (2001) je bil ovrednotiti korelacijo med zaužitimi in izločenimi polifenoli. Uporabili so Folin-Ciocalteu metodo za določitev skupnih fenolnih spojin (Roura in sod., 2006). Želeli so ugotoviti ali obstajajo razlike, če se SFS določijo v 24 urnem urinu ali se vrednosti normalizirajo na kreatinin. Dokazali so, da so SFS ne glede na to ali so določene v 24 urnem urinu ali normalizirane na kreatinin v visoki korelaciji z zaužitimi polifenoli. Poleg tega njihovi podatki potrjujejo, da so SFS določeni v urinu izraženi v 24 urnem urinu boljši biomarkerji vnosa sadja in zelenjave kot SFS normalizirani na kreatinin.

3 MATERIAL IN METODE DE LA

3.1 VREDNOTENJE PREHRANE

Prvi del preiskave je zajemal spremljanje količine in vrsto zaužite hrane ene odrasle zdrave osebe ženskega spola. Uporabljena je bila neposredna metoda ocene vnosa hranil in sicer metoda tehtanja. Za to metodo je značilno, da posameznik tehta vsako živilo in pijačo pred zaužitjem ter si zapisuje podatke v posebej pripravljen dnevnik (Simčič, 2005). Na ta način smo pridobili natančne podatke o vseh živilih, ki jih je preiskovana oseba zaužila od 5. do 26. avgusta 2010.

Sledila je uporaba računalniškega programa za strokovno načrtovanje prehrane Prodi 5.7 (Kluthe in Kassel, 2010). Za lažje ovrednotenje zaužite hrane smo razdelili živila v pet obširnih skupin.

1. Skupina: žita in žitni izdelki, riž (žita, žitni in pekovski izdelki).
2. Skupina: sadje in sadni izdelki (vse sveže in suho sadje, sadni izdelki, sadni sokovi in oreščki).
3. Skupina: zelenjava in rastlinski proizvodi (sveža, posušena in konzervirana zelenjava, krompir, gobe, soja in sojini izdelki).
4. Skupina: začimbe, olja, kisi (zelišča in dišavnice, olivno, bučno olje, vinski, balzamični in jabolčni kis, peteršilj, gorčica)
5. Skupina: ostala živila (kava, čokolada, izdelki iz kakava, med, čaj, vino).

3.2 KEMIJSKA ANALIZA URINA

Vzorci urina so se zbirali 22 zaporednih dni. Vsak delni vzorec se je izbral posamično, tako smo pridobili 117 vzorcev, ki smo jih hranili v hladilni omari pri temperaturi – 80 °C. Dnevno izločeno količino SFS smo preračunali z rezultati delnih vzorcev. Jutranji urin smo prištevali k prejšnjemu dnevu.

Drugi del raziskave je zajemal analizo skupnih fenolnih spojin v urinu.

3.2.1 Reagenti

- Folin-Ciocalteu fenolni reagent (Sigma, Nemčija)
- Metanol (Merck, Nemčija)
- Mravljična kislina (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Galna kislina (Merck, Nemčija)
- Natrijev karbonat (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Kalcijev klorid (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Magnezijev klorid (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Natrijev klorid (Carlo Erba reagents, Italija)
- Natrijev sulfat (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Natrijev oksalat (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Natrijev citrat (Sigma-Aldrich, Nemčija)

- Kalijev dihidrogenfosfat (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Kalijev klorid (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Amonijev klorid (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Urea (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Kreatinin (Sigma-Aldrich, Nemčija)

3.2.2 Pribor

- Avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija)
- Vakumska črpalka (Büchi, Švica)
- Tehtnica (Mettler Toledo, Švica)
- Spektrofotometer (Hewlett-Packard 8453, ZDA)
- Kolektor za ekstrakcijo na trdni fazi (Waters corporation, ZDA)
- Kartuše za ekstrakcijo na trdni fazi 3 ml (Waters corporation, ZDA)
- Ultrazvočna kopel
- Plastične kivete
- MilliQ sistem za čiščenje vode

3.2.3 Določanje skupnih fenolnih spojin v urinu

Folin-Ciocalteu (FC) kolorimetrija temelji na kemični redukciji reagenta, mešanica volframovih in molibdenovih oksidov. Produkt redukcije kovinskega oksida je modro obarvan in absorbira svetlobo pri 765 nm. Izmerjena absorbanca je premosorazmerna s koncentracijo fenolnih spojin v reakcijski zmesi (Waterhouse, 2002). S Folin-Ciocalteu reagentom poleg fenolnih spojin reagirajo tudi žveplov dioksid, askorbinska kislina, aromatični amini, sladkorji, organske kisline, Fe(II) in nefenolne organske snovi (Roura in sod., 2006).

Rezultat, ki ga dobimo s FC metodo zajema mnogo različnih substanc (pomislimo na obširnost skupine fenolnih spojin) zato je primeren standard le ena spojina. V primeru določanja SFS v vinu in čaju je bila sprejeta kot standard galna kislina. Galna kislina je primerna za uporabo kot standard saj je relativno poceni in je stabilna v "suhi"obliki (Waterhouse, 2002).

Reakcijski čas potreben za razvoj barve je precej dolg, vendar lahko ga skrajšamo s segrevanjem reakcijske mešanice. Velja približna ocena, da se reakcijski čas zmanjša na polovico pri dvigu temperature za 10 °C. Tako je pri 40 °C reakcijski čas 30 min. Višje temperature pridejo v poštev le pri avtomatiziranem delu saj so produkti reakcije, ki absorbirajo svetlobo pri 765 nm občutljivi pri višjih temperaturah (Waterhouse, 2002).

Uporabili smo modificirano metodo po Folin-Ciocalteu (Roura in sod., 2006). V urinu so raztopljene, poleg fenolnih spojin tudi druge spojine, ki reagirajo s Folin-Ciocalteu reagentom zaradi tega so se Roura in sod. (2006) odločili vključiti še prehodno ekstrakcijo na trdni fazi. Za našo raziskavo smo analizirali urin s predhodno ekstrakcijo in brez.

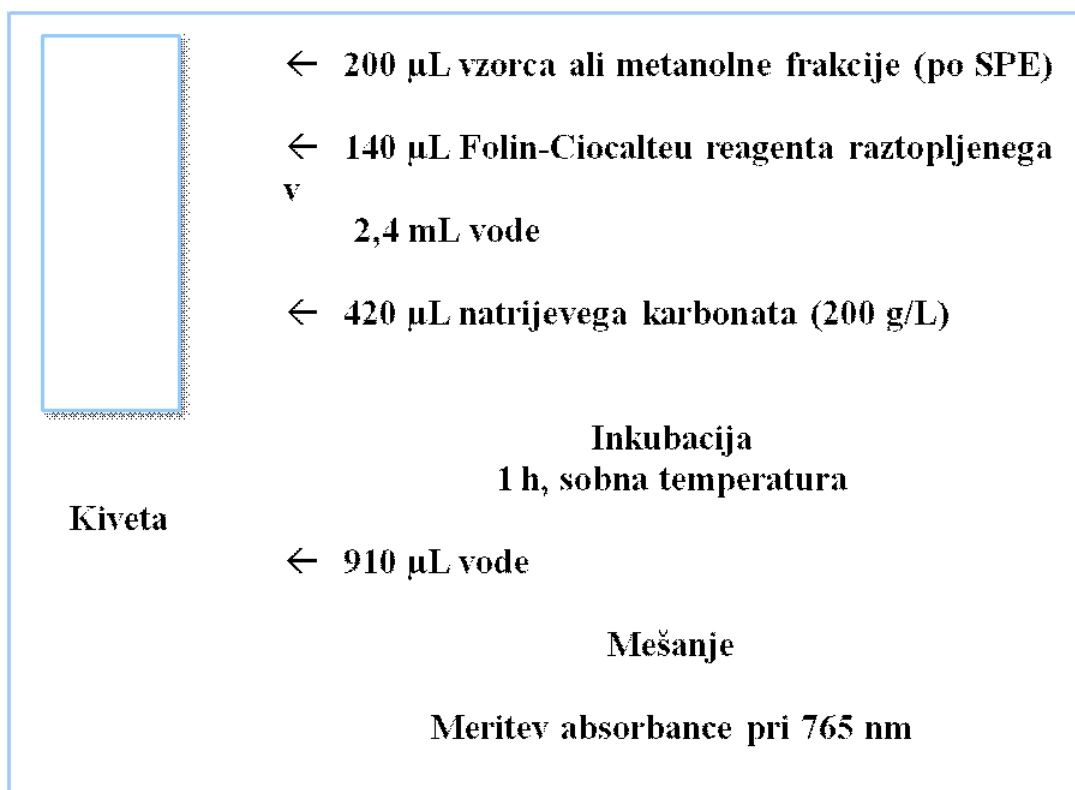
3.2.4 Ekstrakcija

Pripravili smo kolektor za ekstrakcijo na trdni fazi. Na pokrovu steklene posode smo namestili kartuše Waters Oasis HLB 3-mL za odstranitev ostalih spojin, ki reagirajo s FC reagentom. Za aktivacijo trdne faze smo spustili čez kartuše 2 mL 1,5 mol/L mravljične kisline in 2 ml vodno metanolne raztopine (95:5 volumskih deležev). Nato smo spustili še 1ml vzorca, skupne fenolne spojine pa smo eluirali z 1 mL metanola, ki je vseboval 1 mL/L mravljične kisline. Po istem postopku smo ekstrahirali tudi standardne raztopine umeritvene krivulje.



Slika 3: Prikaz kolektorja za ekstrakcijo na trdni fazi, kartuš za ekstrakcijo in vakuumske črpalke.

3.2.5 Modificirana Folin-Ciocalteu metoda (Roura in sod., 2006)



Slika 4: Shematski prikaz določanja skupnih fenolnih spojin (SFS) s Folin-Ciocalteu metodo (Roura in sod., 2006).

3.2.6 Priprava sintetičnega urina

Za pripravo slepega vzorca in standardnih raztopin smo uporabili sintetični urin. Uporabili smo navodila Griffith in sod. (1976), ki so pripravili sintetični urin tako, da je vseboval 11 topljencev v koncentracijah, ki se jih običajno najde v 24 urnem urinu povprečnega zdravega človeka. Raztopina je vsebovala $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,65 g/L), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,651 g/L), NaCl (4,6 g/L), Na_2SO_4 (0,651 g/L), Na_2 citrat $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,65 g/L), Na_2 oksalat (0,020 g/L), KH_2PO_4 (2,8 g/L), KCl (1,6 g/L), NH_4Cl (1,0 g/L), urea (25 g/L) in kreatinin (1,1 g/L).

3.2.7 Umeritvena krivulja

Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili galno kislino. Najprej smo pripravili izhodno raztopino tako, da smo natehtali v 10 ml bučko 3mg galne kisline in napolnili do oznake s sintetičnim urinom. Iz osnovne raztopine galne kisline smo pripravili z ustreznim razredčevanjem različne koncentracije standardnih raztopin (3, 15, 30, 75, 150 mg/L galne kisline). Pripraviti je potrebno dve različni umeritveni krivulji. Za prvo umeritveno krivuljo smo pripravili standardne raztopine, kot je opisano, nato je sledil postopek

določanja SFS enak kot za vzorce (Slika 4). Standardne raztopine druge umeritvene krivulje smo pa najprej ekstrahirali in šele nato določili SFS.

3.3 UREJANJE PODATKOV

Za urejanje podatkov smo uporabili računalniški program Excel, za statistično obdelavo podatkov smo uporabili računalniški program PASW 18. Statistična obdelava je vključevala:

- Aritmetično sredino, ki je najbolj pogosta srednja vrednost.
- Mediano, ki je srednja vrednost in je enaka vrednosti spremenljivke, ki je na sredini vseh po velikosti razvrščenih vrednosti, zato je polovica vrednosti nižjih ali enakih, polovica vrednosti pa višjih ali enakih od te srednje vrednosti.
- Kvantilni rang izračuna za vsako vrednost x_k delež frekvenčne porazdelitve, v katerem so vse vrednosti do x_{k-1} manjše od x_k . tiste vrednosti, ki delijo urejeno vrsto na k delov z enakim deležem enot, imenujemo kvantile. Kvartil je kvantil, ki zavzame tri vrednosti spremenljivke, s katero so opazovane enote, urejene v urejeno vrsto, razdeljene na štiri enake dele.
- Korelacijo smo določili s Pearsonovim koeficientom, ki zajema vrednosti na intervalu med -1 in 1, absolutna vrednost je povzetek moči povezave, predznak pa smer povezave. Regresijska premica grafično ponazarja korelacijo, za natančno mero povezanosti se uporablja koeficient korelacije (Košmelj, 2007).

4 REZULTATI

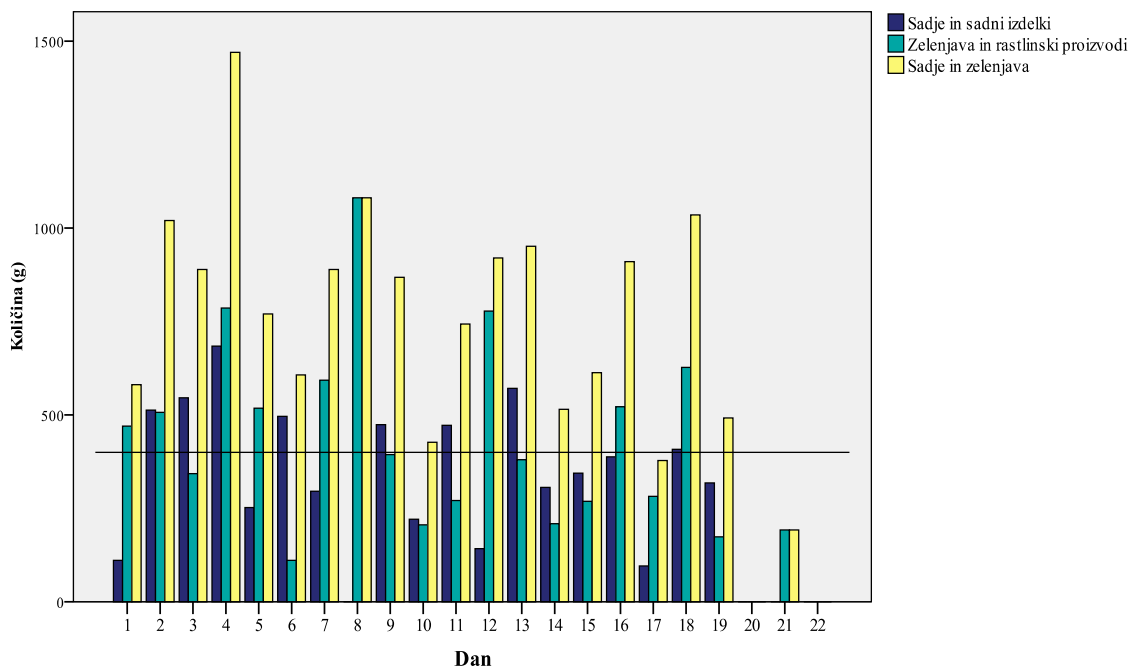
4.1 KOLIČINA ZAUŽITIH ŽIVIL

Preglednica 2 prikazuje povprečne dnevne vnose energije in makrohranil preiskovane osebe. Orientacijsko vrednost za priporočen vnos energije izračunamo tako, da pomnožimo bazalni metabolizem s PAL (povprečne dnevne potrebe po energiji za fizično aktivnost kot večkratnik bazalnega metabolizma). V našem primeru ima odrasla oseba ženskega spola, v starostni skupini od 25 do manj kot 51 let, potrebo po približno 2200 kcal na dan. Priporočen vnos beljakovin znaša 0,8 g/kg telesne teže na dan, ki v uravnoteženi mešani prehrani ustreza 8-10 % deležu prehranski beljakovin pri vnosu energije za odrasle (Referenčne vrednosti..., 2004). Preiskovana oseba tehta 55 kg in je zato zanj priporočeni dnevni vnos beljakovin 44 g/dan. Osebe z lahkim ali srednje težkim delom naj ne bi uživale več kot 30 % energije v obliki maščob, v primeru, da je vnos še nižji (okoli 25 %) je to kvečjemu ugodneje. Velja splošno priporočilo, da naj bi ogljikovi hidrati pokrili več kot 50 % dnevne potrebe po energiji. Pri odraslih velja kot orientacijska vrednost prehranske vlaknine količina 30 g na dan (Referenčne vrednosti..., 2004). V obdobju preiskave je bil vnos energije in prehranske vlaknine pod priporočeno vrednostjo. Količina zaužitih beljakovin je bila nad priporočili, delež, ki ga prispevajo beljakovine k dnevni vnosu je bil malo nad priporočili. Energijski delež maščob je bil nad priporočeno vrednostjo, delež, ki ga prispevajo ogljikovi hidrati pa ustrezen.

Preglednica 2: Opisna statistika zaužite energije in makrohranil na dan s povprečnimi energijskimi deleži.

| Dnevni vnos | Povprečje | Najnižja vrednost | Najvišja vrednost | Delež (%) |
|--------------------------------|-----------|-------------------|-------------------|-----------|
| Energija (kcal) | 1533 | 50 | 2263 | / |
| Beljakovine (g) | 52,6 | 2 | 93,1 | 14,6 |
| Maščobe (g) | 63,3 | 1 | 107 | 37,8 |
| Ogljikovi hidrati (g) | 175,2 | 7 | 259 | 49 |
| Prehranska vlaknina (g) | 23,7 | 0 | 40,4 | / |

Nedavno je svetovna zdravstvena organizacija WHO skupaj s FAO objavila priporočeno dnevno količino sadja in zelenjave, ki znaša 400 g (številka ne zajema krompirja in ostalih škrobnatih gomoljev) (WHO, 1990). Nekateri drugi avtorji priporočajo 500 g sadja in zelenjave dnevno, kar zajema približno 300 g sadja in 200 g zelenjave (Soerjomataram in sod., 2010).



Slika 5: Količina zaužitega sadja in sadnih izdelkov, zelenjave in rastlinskih proizvodov ter skupne količine zaužitega sadja in zelenjave v gramih na dan. Horizontalna črta označuje priporočeno vrednost (WHO, 1990).

Slika 5 prikazuje skupni dnevni vnos sadja in zelenjave. Količina zaužitega sadja tekom raziskave je bila v povprečju približno 302 g na dan, vrednosti pa so nihale med 0 in 684 g sadja dnevno. Vrednosti zaužite zelenjave so nihale med 0 in 1081g v povprečju 268 g. Vnos sadja in zelenjave je bil v povprečju 698 g kar presega priporočeno vrednost 400 gramov (WHO, 1990). Dvajseti, enaindvajseti in dvaindvajseti dan je bil vnos zelo nizek, vendar ti dnevi predstavljajo manj kot tretjino celotnega obdobja preiskave.

V skupino sadje in sadni izdelki smo vključili tudi sadne sokove in marmelade za katere smatramo, da imajo slabšo hranilno vrednost kot neobdelano sadje. Zaradi toplotne obdelave pride pri sadju in zelenjavi do izgub (Gayanthria in sod., 2004; Somsb in sod., 2008). V primeru, da izločimo sokove in džeme iz skupine sadja se vnos sadja zmanjša štiri dni. 2. dan se vnos zmanjša za skoraj 3 %, 3. dan se vnos zmanjša za 27 %, 14. in 19. dan se vnos sadja zmanjša za nekaj več kot 60 %. Zaradi nižje količine zaužitega sadja je skupni vnos sadja in zelenjave nižji od priporočenega samo 14. in 19. dan (WHO, 1990) v primerjavi s podatki, ki upoštevajo sokove v sadno skupino. V poprečju je vnos sadja in zelenjave v celotnem obdobju preiskave skoraj 7 % nižji v primerjavi s podatki pri katerih smo upoštevali sadne izdelke.

Poudariti je potrebno, da smo vključili škrobnata živila v skupino zelenjave, čeprav WHO priporočila ne vključujejo krompirja k priporočenemu vnosu sadja in zelenjave. V povprečju je vnos sadja in zelenjave, če ne upoštevamo krompirja, v obdobju preiskave nižji za 14 %. Krompir se je užival skupno 8 dni: 2., 3., 5., 7., 10., 16., 17., 18. dan. Vnos zelenjave je bil te dni nižji od 5 do 45 %. Vnos sadja in zelenjave je nižji od priporočenih

400 g (WHO, 1990) 10. in 17. dan v primerjavi s podatki, ki so upoštevali krompir med zelenjavo.

Vnos sadja in zelenjave bi bil nižji od priporočenega (WHO, 1990) 10., 14. in 19. dan, če bi se odločili izločiti iz skupine sadje in zelenjava sadne izdelke in krompir v primerjavi s podatki, ki upoštevajo sadne izdelke in krompir.

Žit in žitnih izdelkov je bilo zaužitih 180 g dnevno v razponu od 0 do 511 g. V 22 dneh raziskave je bilo zaužitih skupno 3967 g žitnih izdelkov, 32 % so predstavljale testenine in 55 % je zajemal kruh. Začimb, olj in kisov je bilo uporabljenih od 0 do 88 g dnevno, v povprečju 33 g. Skupno je bilo zaužitih 713 g živil iz te skupine, 53 % predstavljajo olja in 24 % kisi. V povprečju je bilo zaužitih dnevno 95 g živil iz skupine ostala živila v razponu od 0 do 646 g. V obdobju raziskave je preiskovana oseba zaužila 2048 g živil iz te skupine. 1 2% skupne količine je predstavljala čokolada, 10 % kava ostalo so bili čaji in vino.

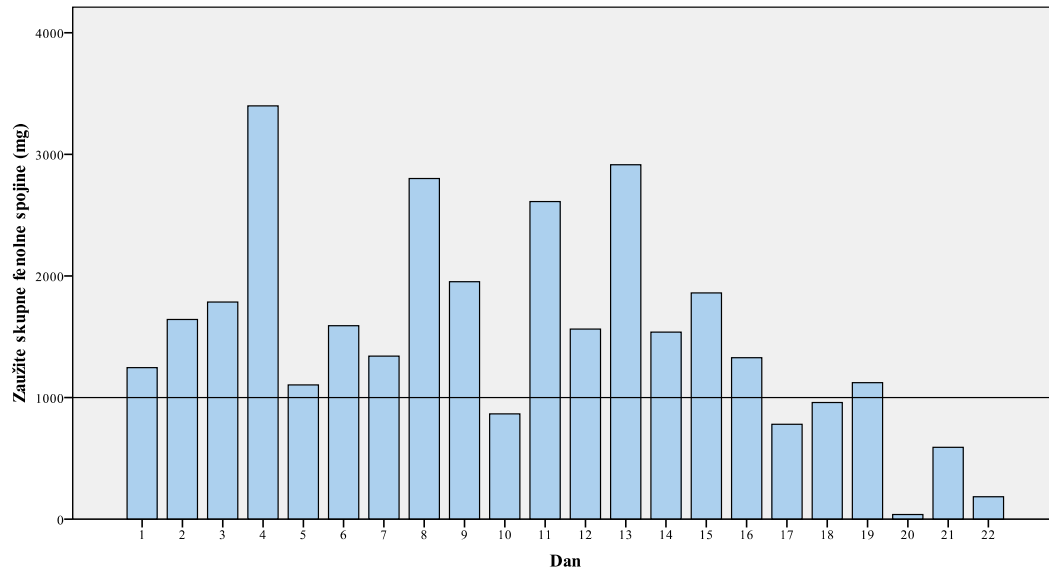
4.2 KOLIČINA ZAUŽITIH SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN

S pomočjo podatkov iz literature smo ocenili količino zaužitih SFS na podlagi prehranskega dnevnika, ki se je redno in natančno dopolnjeval 22 dni. Poleg internetne baze podatkov phenol-explorer (Neveu in sod., 2010), smo uporabili tudi druge vire (Priloga A) za pridobivanje podatkov o vsebnosti SFS v hrani in pijači.

Nekajkrat smo bili primorani sklepati kompromise pri računanju saj baze podatkov niso dovolj izpopolnjene, mnogokrat primanjkujejo podatki tudi za vsakodnevna živila. Primer so (toplotno) obdelana živila za katere ne vemo natančno, do kolikšnih izgub pride med obdelavo. Posledica tega je, da smo uporabili podatek, ki ni najbolj točen saj vemo, da pride do izgub med pripravo hrane (Mazzeo in sod., 2008). Drugi primer so živila, ki jih ne zaužijemo v naravnem stanju ampak so industrijsko predelana, vmešana z drugimi živila. V takih primerih smo ocenili delež polifenolov v živilu tako, da smo si pomagali z informacijo o sestavi izdelka (Priloga A).

Preglednica 3: Povprečna, minimalna, maksimalna vrednost zaužitih skupnih fenolnih spojin (SFS) na dan in standardna deviacija.

| | Najnižja vrednost | Najvišja vrednost | Povprečje | Standardna deviacija |
|--------------------------------|-------------------|-------------------|-----------|----------------------|
| Zaužiti SFS (mg) na dan | 38,4 | 3398,9 | 1510 | 853,7 |



Slika 6: Količina zaužitih skupnih fenolnih spojin v mg na dan.

Slika 6 prikazuje količino zaužitih SFS v mg na dan. Vrednosti nihajo od 38 do 3399 mg SFS, povprečna vrednost je 1510 mg (Preglednica 3). Trenutno ni na razpolago nobenih smernic o priporočljivi dnevni količini polifenolov, kot npr. za vitamine, vendar je v literaturi največkrat navedena količina 1 g dnevno ali več (Faller in Fialho, 2010; Williamson in Holst, 2008).

10., 17., 18., 20., 21., 22. dan so bile vrednosti nižje od 1 grama. Vrednosti so bile nizke predvsem, ko je bil vnos sadja in zelenjave nezadosten. Tiste dni, ko je bil vnos fenolnih spojin nad 1 gramom, je bilo zaužitih skoraj 2x več polifenolov od priporočene vrednosti (Faller in Fialho, 2010; Williamson in Holst, 2008).

20. in 21. dan so bile vrednosti nižje od 200 mg. V teh dveh dneh je bil vnos sadja in zelenjave ničeln, dvajseti dan je bil dnevni vnos energije le 50 kcal (210kJ), enaindvajseti pa 703kcal (2918 kJ) kar je za dnevne potrebe za odraslo osebo premalo. Mlada odrasla oseba ženskega spola potrebuje okoli 2200 kcal (Referenčne vrednosti..., 2004).

Preglednica 4: Prispevek posamezne skupine zaužitih živil v deležih k dnevni vnosu skupnih fenolnih spojin.

| Dan | Žita in žitni izdelki, riž (%) | Sadje in sadni izdelki (%) | Zelenjava in rastlinski proizvodi (%) | Začimbe, olja, kisi (%) | Ostala živila (%) |
|-----|--------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-------------------|
| 1 | 40,7 | 24,85 | 19,71 | 3,89 | 10,86 |
| 2 | 7,93 | 72,31 | 14,26 | 0,3 | 5,2 |
| 3 | 8,95 | 56,5 | 18,93 | 1,18 | 14,44 |
| 4 | 5,79 | 37,28 | 8,43 | 47,87 | 0,63 |
| 5 | 3,56 | 57,6 | 33,65 | 1,71 | 3,48 |
| 6 | 8,18 | 73,29 | 3,14 | 0 | 15,39 |
| 7 | 3,83 | 57,44 | 24,69 | 5,12 | 8,92 |
| 8 | 20,78 | 0 | 21,43 | 17,02 | 40,78 |
| 9 | 7,07 | 45,99 | 11,29 | 10,06 | 25,58 |
| 10 | 20,23 | 57,01 | 16,67 | 1,2 | 4,89 |
| 11 | 2 | 75,32 | 5,39 | 0,91 | 16,38 |
| 12 | 26,65 | 17,23 | 25,75 | 28,56 | 1,81 |
| 13 | 9,64 | 64,51 | 5,82 | 0,52 | 19,52 |
| 14 | 10,63 | 37,82 | 11,73 | 0,76 | 39,05 |
| 15 | 8,01 | 79,93 | 7,47 | 0 | 4,59 |
| 16 | 6,45 | 45,29 | 25,69 | 5,14 | 17,43 |
| 17 | 22,87 | 24,04 | 25,44 | 0,73 | 26,91 |
| 18 | 0,43 | 54,75 | 36,42 | 1,74 | 6,67 |
| 19 | 33,07 | 50,47 | 7,25 | 0,41 | 8,8 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |
| 21 | 0 | 0 | 21,2 | 78,8 | 0 |
| 22 | 0,42 | 0 | 0 | 0 | 99,58 |

Na dnevni bazi k skupni količini zaužitih polifenolov prispeva skupina sadja in sadnih izdelkov v povprečju 42 % SFS, vrednosti nihajo od 0 do 80 %. Znotraj te skupine je jagodičevje tisto, ki vsebuje največ fenolnih spojin, delež, ki so ga prispevale borovnice in robidnice je zelo visok.

Skupina zelenjave in rastlinskih proizvodov na dnevni bazi prispeva v povprečju 16 % skupnih polifenolov, vrednosti nihajo od 0 do 36 %.

Tekom raziskave je bilo zaužitih v povprečju 180 g žit in žitnih izdelkov na dan, kar je prispevalo k približno 11 % celotnemu dnevni vnosu SFS. Največ fenolnih spojin je bilo zaužitih s kruhom in testeninami kajti so se ta živila uživala pogosto in v večjih količinah.

Kisi, olja in začimbnice predstavljajo majhen delež zaužite hrane (povprečno 33 g/dan) vendar prispevajo v povprečju skoraj 9 % dnevni vnosa polifenolov.

V skupini ostalo so živila, ki vsebujejo velike količine polifenolov kot so kava, vino in kakavovi izdelki. V povprečju je bilo zaužitih nekaj manj kot 100 g živil, ki so prispevali 21 % dnevnega vnosa fenolnih spojin.

Hranilna gostota je definirana kot količina hranljive snovi (v gramih, miligramih, mikrogramih) na 1 MJ oz. 1 kcal, torej nam pove, kolikšno količino določenih hranil (ogljikovih hidratov, beljakovin, maščob, vitaminov ali elementov in drugih snovi) vsebuje določeno živilo ali določena vrsta hrane na enoto energije. Živila z visoko hranilno gostoto so v nasprotju z visoko kalorično hrano, ki vsebuje veliko "praznih" kalorij (Gabrijelčič Blenkuš in sod., 2005).

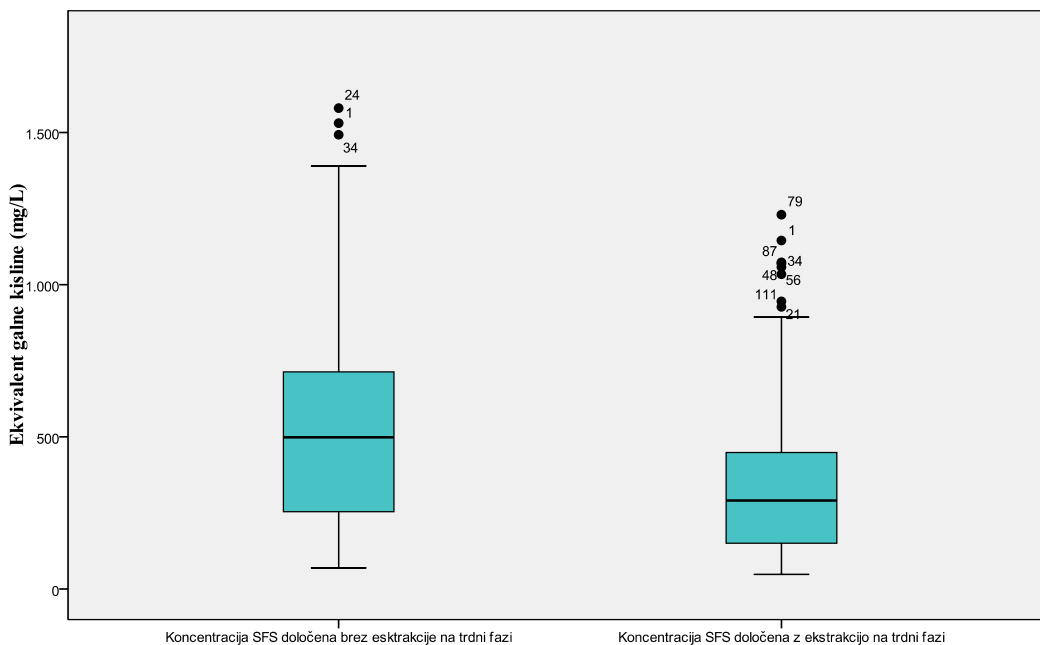
Preglednica 5: Gostota zaužitih skupnih fenolnih spojin (SFS) glede na skupino živil.

| | Gostota skupnih fenolnih spojin (mg SFS/g živila) | | | Gostota skupnih fenolnih spojin (mg SFS/ kcal živila) | | |
|--|---|-------------------|-------------------|---|-------------------|-------------------|
| | Povprečje | Najnižja vrednost | Najvišja vrednost | Povprečje | Najnižja vrednost | Najvišja vrednost |
| Žita in žitni izdelki, riž | 0,9 | 0,1 | 1,6 | 0,3 | 0 | 0,6 |
| Sadje in sadni izdelki | 3,4 | 0,5 | 12,0 | 5,3 | 0,7 | 19,1 |
| Zelenjava in rastlinski proizvodi | 1,6 | 0,2 | 15,8 | 3,1 | 0,2 | 9,1 |
| Začimbe, olja, kisi | 4,4 | 0 | 37,0 | 6,8 | 0 | 43,0 |
| Ostalo | 3,8 | 0,2 | 18,6 | 3,0 | 0,1 | 22,8 |

Vrednosti v preglednici 5 so bile preračunane na podlagi prehranskega dnevnika in iz podatkov iz literature (Neveu in sod., 2010). Skupina začimb z gostoto skoraj 7 mg SFS/kcal živila ima najvišjo povprečno vrednost med skupinami. Sledi skupina sadja in sadnih izdelkov z malo več kot 5 mg SFS/kcal živila, vrednosti gostote skupnih fenolnih spojin zelenjave in ostalih živil sta si podobni in sicer okoli 3 mg SFS/kcal živila. Žita in žitni izdelki imajo najnižjo povprečno vrednost 0,28 mg SFS/kcal živila. Skupina začimb ima prav tako najvišjo gostoto SFS (mg) na gram živila, sledijo skupina ostala živila, sadje in sadni izdelki, zelenjava in rastlinski proizvodi ter nazadnje žita in žitni izdelki (Preglednica 5).

4.3 KOLIČINA IZLOČENIH SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN

S Folin-Ciocalteu metodo smo določili koncentracijo skupnih fenolnih spojin v urinu. Vzorci so se zbirali 22 zaporednih dni in tako smo pridobili 117 vzorcev. Skupne fenolne spojine smo določevali brez predhodne ekstrakcije in z ekstrakcijo na trdni fazi. SFS smo določali v treh paralelkah, en rezultat smo izločili in preračunali povprečje ostalih dveh (Priloga B).



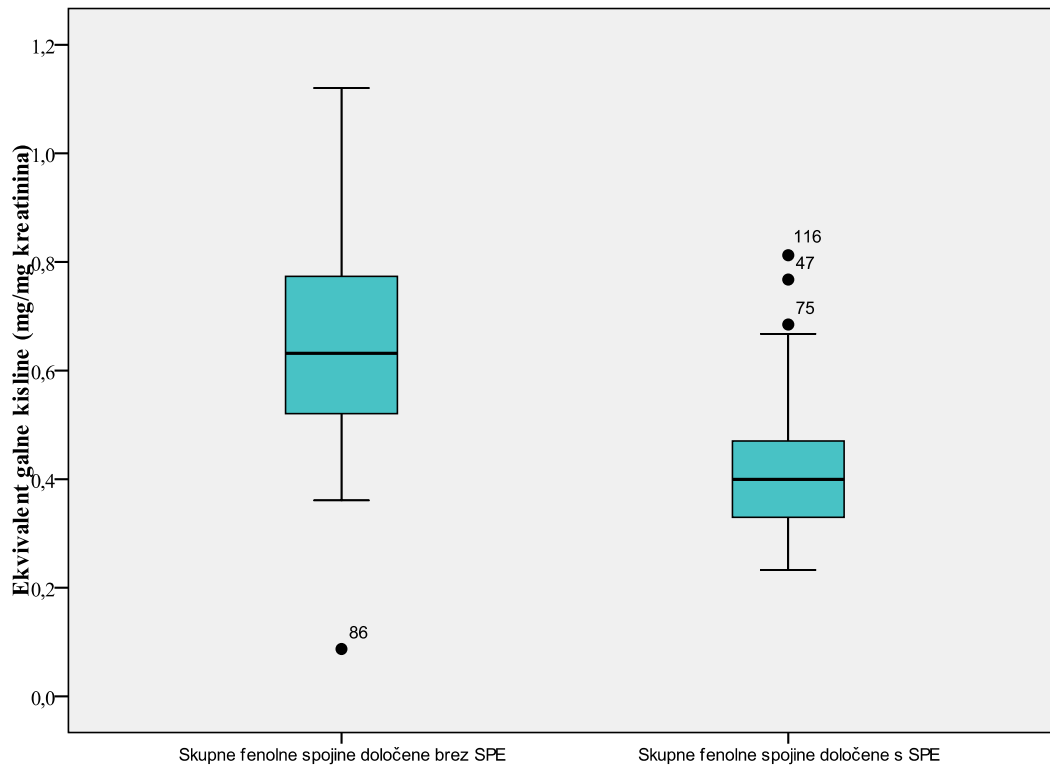
Slika 7: Kvartilni diagram razporeditve koncentracij določenih skupnih fenolnih spojin (SFS) brez predhodne ekstrakcije na trdni fazi in z ekstrakcijo. Prečna črta v vsakem okvirju prikazuje mediano, spodnji rob prvi kvartil, zgornji rob tretji kvartil, kljuki pa najnižjo in najvišjo vrednost. Vrednosti, ki so prikazane v obliki točk so t.i. osamelci.

Vrednosti skupnih fenolnih spojin brez ekstrakcije se gibljejo od 70 do 1580 mg (GAE)/L, povprečna vrednost je 532 mg (GAE)/L. Vrednosti skupnih fenolnih spojin z ekstrakcijo na trdni fazi se gibljejo od 49 do 1230 mg (GAE)/L, v poprečju 265 mg (GAE)/L.

Koncentracije SFS določene brez SPE (ekstrakcija na trdni fazi) so, kot predvideno višje od koncentracij SFS določenih z ekstrakcijo.

Z neodvisnim t testom smo potrdili hipotezo, da obstaja statistično značilna razlika med aritmetičnimi sredinami dveh skupin podatkov ($p = 0,000$).

Kreatinin je stranski produkt, ki nastaja iz razgradnje kreatina v mišičnem metabolizmu. Vsak dan se pretvori približno 2 % skupnega kreatina v kreatinin. Kreatinin se prenaša preko krvi v ledvice, slednje izločijo večino kreatinina v urin. Kreatinin ima pomembno diagnostično funkcijo. Ugotovljeno je bilo, da je kreatinin zanesljiv kazalec delovanja ledvic. Koncentracija kreatinina se prav tako preverja pri testiranju vzorcev urina za prisotnost prepovedanih substanc. Moški proizvedejo v povprečju 89,7 mg/dL, ženske pa 61,7 mg/dL, razlika je predvsem zaradi mišične mase. Koncentracija skupnih fenolnih spojin je bila odvisna od stopnje razredčitve urina zato smo uporabili koncentracijo kreatinina za normalizacijo rezultatov (Slika 8). Analizo koncentracije kreatinina so izvedeli na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo in biokemijo v Ljubljani. Uporabljena je bila metoda po Jaffeju. Kreatinin je bil določen samo v neobdelanih vzorcih urina (brez ekstrakcije).

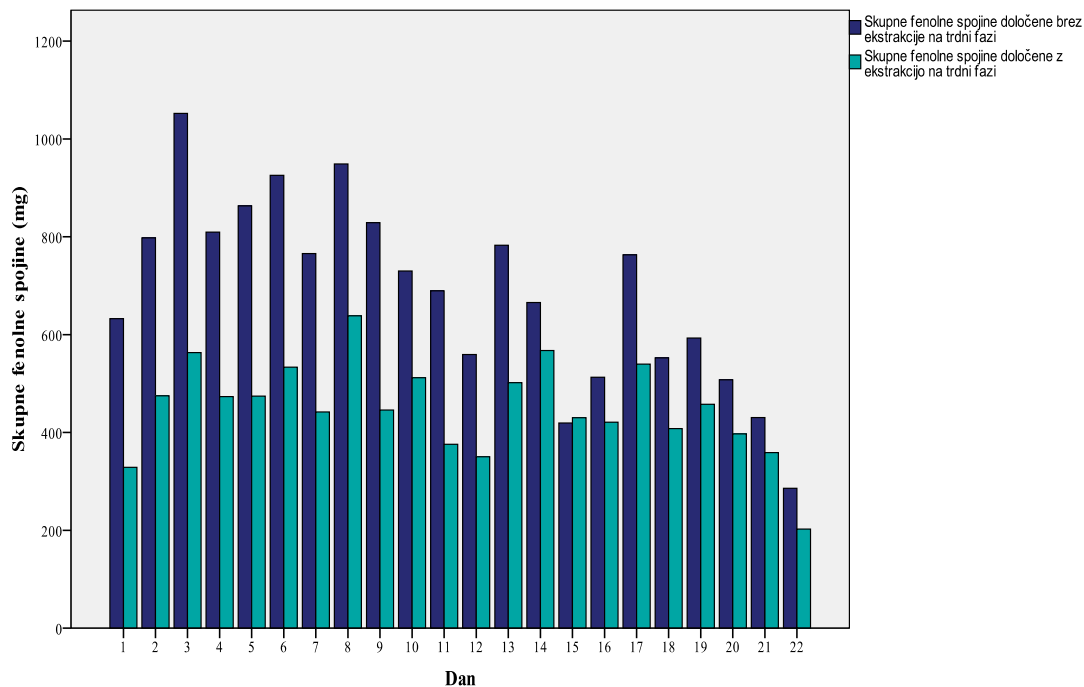


Slika 8: Normalizirane vrednosti določene koncentracije skupnih fenolnih spojin (SFS) v urinu brez in z ekstrakcijo na trdni fazi (SPE).

Po normalizaciji podatkov na kreatinin opazimo (Slika 8), da je število iztopajočih vrednosti manjše. Pri določenih SFS brez ekstrakcije opazimo eno vrednost, ki odstopa od ostalih (je veliko manjša), pri določenih SFS z ekstrakcijo pa imamo tri iztopajoče vrednosti.

Normalizirane vrednosti na kreatinin za določene SFS brez ekstrakcije nihajo od 0,09 do 1,12 GAE mg/mg kreatinina, v povprečju so 0,66 GAE mg/mg kreatinina. Normalizirane vrednosti na kreatinin za določene SFS z ekstrakcijo na trdni fazi nihajo od 0,23 GAE mg/mg kreatinina do 0,81 GAE mg/mg kreatinina, v poprečju so 0,41 GAE mg/mg kreatinina.

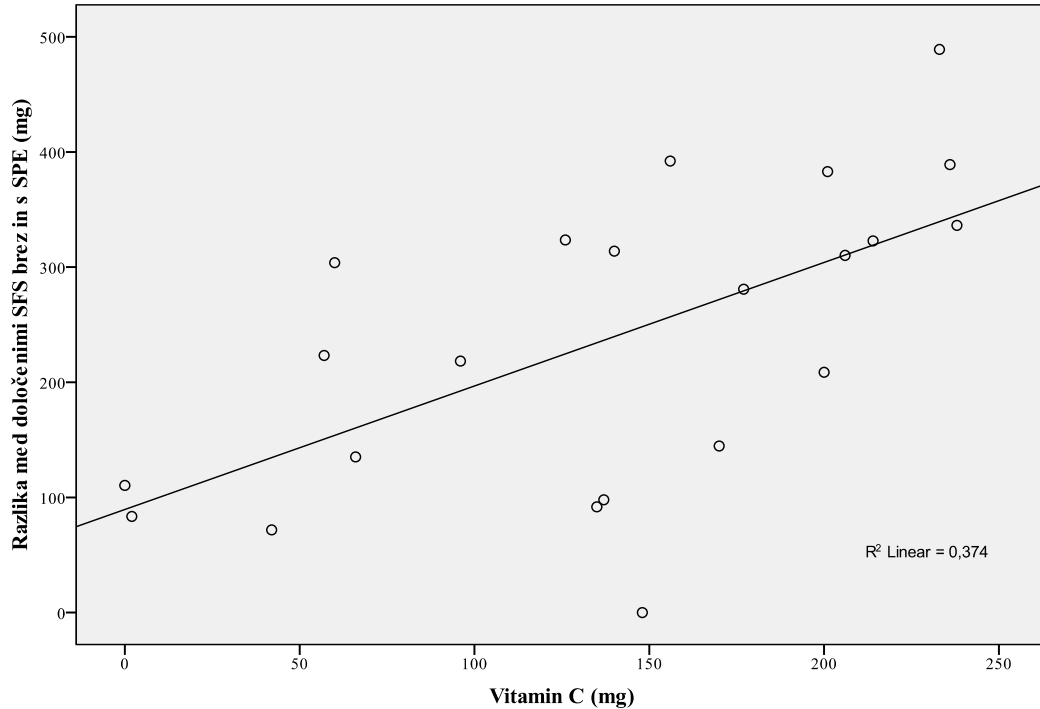
Za podatke iz Slika 8 smo z neodvisnim t testom potrdili, da obstaja statistično značilna razlika med njima ($p = 0,00$).



Slika 9: Količina izločenih skupnih fenolnih spojin v mg/dan določenih brez ekstrakcije na trdni fazi (SPE) in s SPE.

Slika 9 prikazuje vrednosti SFS, ki smo jih določili z ekstrakcijo in brez preračunani na dan. Vrednosti SFS, ki smo jih določili brez ekstrakcije so večje kot tiste z ekstrakcijo, izjema je 15. dan. Z uporabo Folin-Ciocalteu metode brez ekstrakcije smo določili poleg polifenolov tudi ostale spojine, ki so prisotne v urinu in ki reagirajo s Folin-Ciocalteu reagentom. Te spojine se ne izločajo v urin v istih koncentracijah zato ima razlika med določenimi SFS brez in z ekstrakcijo vsak dan drugačno vrednost.

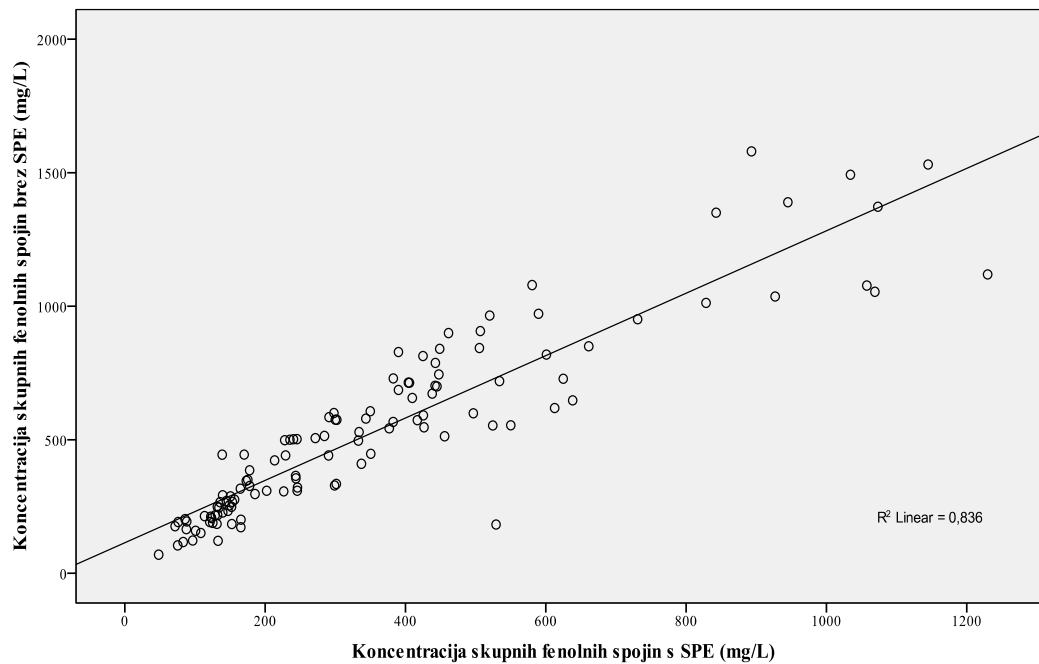
Vrednosti določenih SFS brez ekstrakcije na trdni fazi so v povprečju 687 mg/dan, nihajo od 286 do 1052 mg/dan. Vrednosti določenih SFS z ekstrakcijo nihajo od 203 do 639 mg/dan, v povprečju so 450 mg/dan.



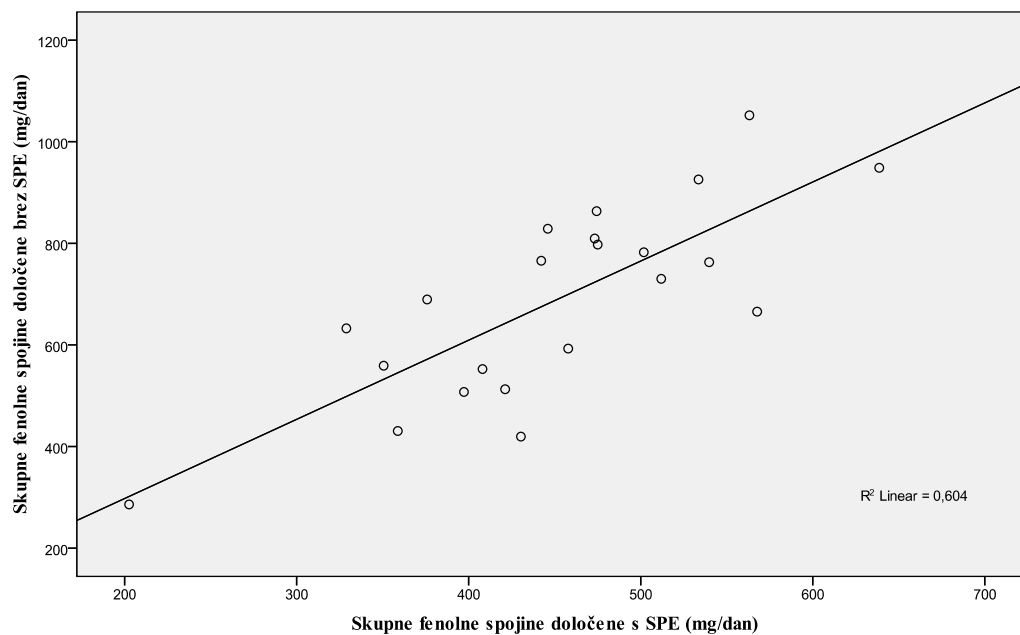
Slika 10: Korelacija med ocenjeno vrednostjo zaužite askorbinske kisline in razliko med določenimi skupnimi fenolnimi spojinami (SFS) brez in z ekstrakcijo na trdni fazi (SPE).

Literatura navaja, da poleg sladkorjev in organskih kislin tudi askorbinska kislina moti pravilno določitev skupnih fenolnih kislin s Folin-Ciocalteu metodo (Roura in sod., 2006). Količino askorbinske kisline smo preračunali iz prehranskega dnevnika. Razliko med določenimi SFS brez in z ekstrakcijo predstavljajo ostale spojine, ki so reagirale s Folin-Ciocalteu reagentom. Linearno korelacijo med vitaminom C in spojinami, ki so reagirale s Folin-Ciocalteu reagentom smo poiskali s Pearsonovim koeficientom korelacije, ki v tem primeru znaša 0,611 ($p = 0,002$). Z uporabo Folin-Ciocalteu reagenta za določevanje SFS v urinu brez ekstrakcije smo najverjetneje določili tudi askorbinsko kislino.

V povprečju je preiskovana oseba zaužila 138 mg askorbinske kisline dnevno, kar je več od priporočene vrednosti 100 g, v razponu od 0 do 238 mg (Referenčne vrednosti..., 2004).



Slika 11: Povezanost med koncentracijo izločenih skupnih fenolnih spojin v vzorcu urina, ki smo jo določili z ekstrakcijo na trdni fazi (SPE) in brez SPE.

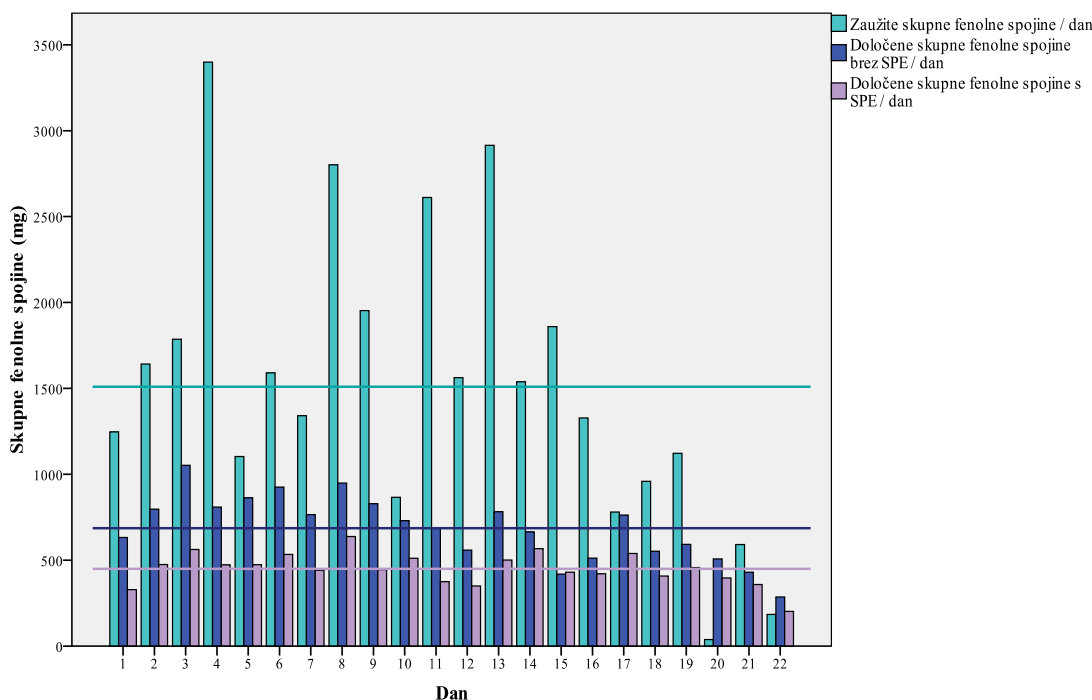


Slika 12: Korelacija med izločenimi skupnimi fenolnimi spojinami v urinu (mg /dan) določenih brez ekstrakcije na trdni fazi (SPE) in s SPE.

Slika 11 prikazuje povezanost med koncentracijo skupnih fenolnih spojin posamičnega vzorca, ki smo jih določili brez ekstrakcije in z ekstrakcijo na trdni fazi. Obstaja statistično značilna povezanost ($p = 0,00$) med SFS, ki smo jih določili brez ekstrakcije na trdni fazi in SFS, ki smo jih določili s SPE ekstrakcijo. Pearsonov koeficient korelacije za te podatke znaša 0,914.

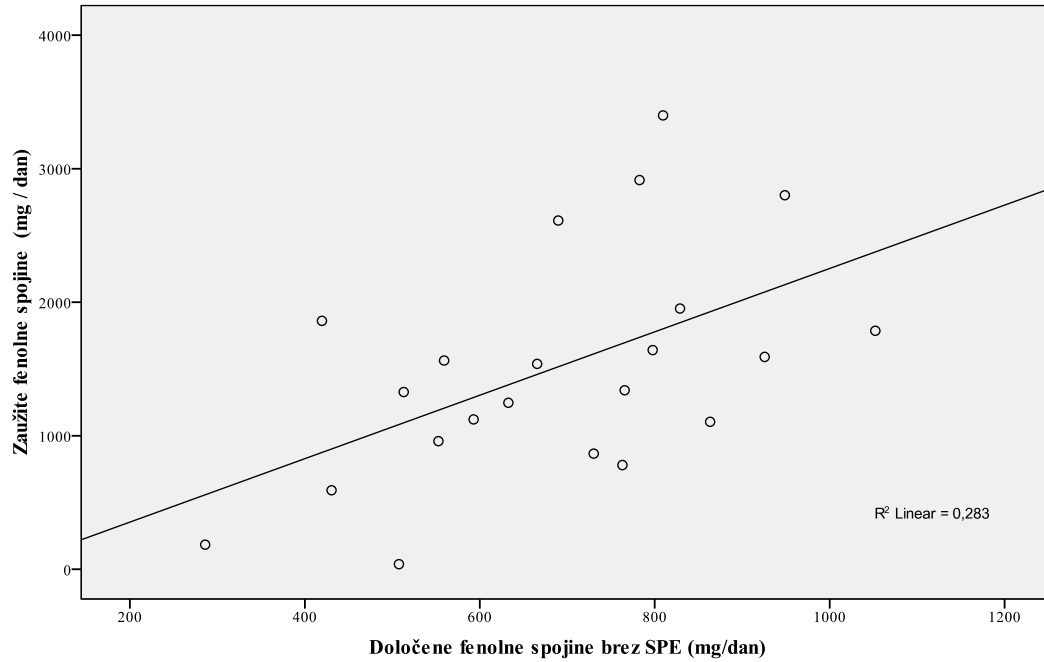
Slika 12 prikazuje korelacijo med količino (mg) izločenih skupnih fenolnih spojin na dan, ki smo jo določili s SPE in brez ekstrakcije. Potrdili smo statistično značilno korelacijo ($p = 0,00$) med povezavo določenih SFS na dan brez ekstrakcije in z ekstrakcijo. Pearsonov koeficient korelacije je $r = 0,777$.

4.4 PRIMERJAVA ZAUŽITIH IN IZLOČENIH SKUPNIH FENOLNIH SKUPIN

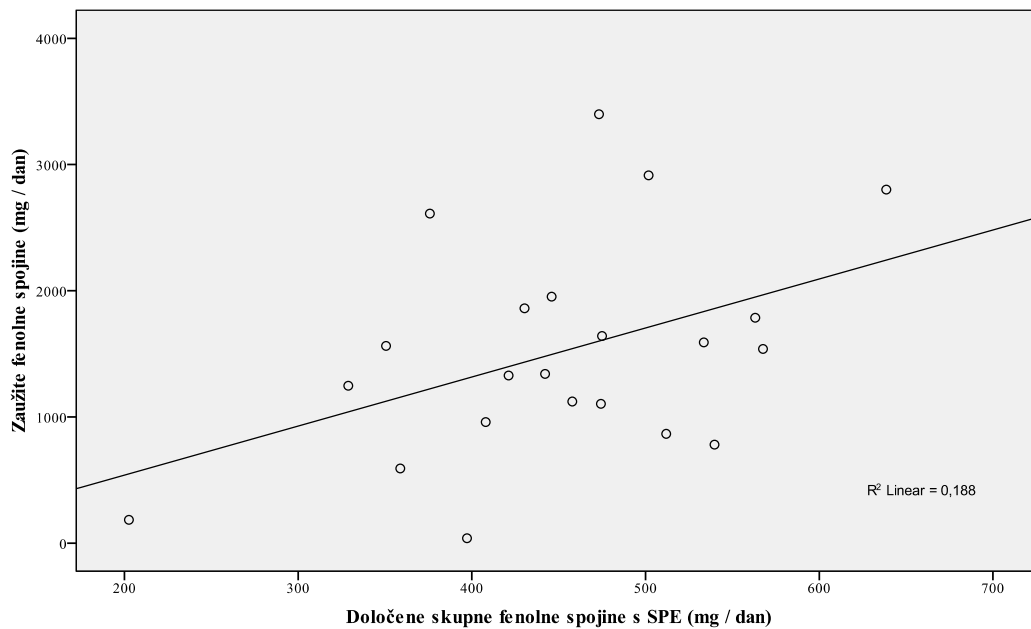


Slika 13: Količina zaužitih in določenih skupnih fenolnih spojin (SFS) brez ekstrakcije na trdni fazi (SPE) in z ekstrakcijo. Horizontalne črte predstavljajo povprečja.

Vrednosti zaužitih SFS na dan so bile višje od določenih skupnih fenolnih spojin, izjemi sta 20. in 22. dan. V povprečju je bila količina zaužitih SFS trikrat večja od določenih fenolnih spojin z ekstrakcijo.



Slika 14: Povezava med zaužitimi skupnimi fenolnimi spojinami (SFS) in izločenimi SFS določenimi brez ekstrakcije na trdni fazi (SPE).



Slika 15: Povezava med zaužitimi skupnimi fenolnimi spojinami (SFS) in izločenimi SFS določenimi z ekstrakcijo na trdni fazi (SPE).

Za določitev stopnje linearne korelacije med zaužitimi skupnimi fenolnimi spojinami in izločenimi smo uporabili Pearsonov koeficient korelacije. Pearsonov koeficient korelacije

kaže na zmerno, statistično značilno povezanost ($r = 0,532$, $p < 0,005$) med zaužitimi skupnimi fenolnimi spojinami na dan in izločenimi SFS določenimi brez ekstrakcije na trdni fazi (Slika 14). Prav tako obstaja zmerna, statistično značilna povezanost ($r = 0,434$, $p < 0,005$) med zaužitimi skupnimi fenolnimi spojinami na dan in izločenimi SFS določenimi z ekstrakcijo na trdni fazi (Slika 15).

Normalizirali smo celodnevni urin na celodnevni kreatinin. Zanimalo nas je ali tako dobimo boljšo korelacijo med podatki v primerjavi z nenormaliziranimi vrednostmi. Obstaja nizka ($r = 0,356$) statistično neznačilna ($p > 0,05$) korelacija med normaliziranimi določenimi skupnimi fenolnimi spojinami brez SPE (mg SFS/ mg kreatinina) na dan in zaužitimi fenolnimi spojinami. Korelacija med normaliziranimi določenimi skupnimi fenolnimi spojinami s SPE (mg SFS/ mg kreatinina) in zaužitimi fenolnimi spojinami je negativna, statistično neznačilna ($p > 0,05$; $r = -0,241$).

Iz Preglednica 6 je razvidna korelacija med zaužitimi skupinami živil na dan in določenimi skupnimi fenolnimi spojinami. Vse skupine imajo z določenimi SFS zmerno pozitivno korelacijo. Korelacija je najmočnejša pri sadju in zelenjavi.

Preglednica 6: Korelacija med skupinami živil (g) in izločenimi skupnimi fenolnimi spojinami (SFS) podana kot Pearsonov koeficient (r).

| | SFS določene brez ekstrakcije na trdni fazi | SFS določene z ekstrakcijo na trdni fazi |
|--|---|--|
| Sadje in sadni izdelki | $r = 0,465$ * | $r = 0,303$ |
| Zelenjava in rastlinski proizvodi | $r = 0,376$ | $r = 0,289$ |
| Sadje in zelenjava | $r = 0,549$ * | $r = 0,390$ |

* statistično značilno ($p < 0,05$)

Po zgledu Medina-Remón in sod. (2009) smo normalizirali podatke določenih SFS v jutranjem urinu in jih primerjali s količino zaužitega sadja in zelenjave. Količino zaužitega sadja in zelenjave smo primerjali z določenimi SFS v prvem urinu (jutranjem) naslednjega dne. Podatke smo vpisali v Preglednica 7. Korelacija je bila zmerna in statistično značilna med vnosom sadja in izločenimi SFS (mg SFS/g kreatinina) v jutranjem urinu. Korelacija med zelenjavo, seštevkom sadja in zelenjave in izločenimi SFS (mg SFS/g kreatinina) v jutranjem urinu je bila zelo nizka oz. negativna in v nobenem primeru statistično značilna.

Preglednica 7: Korelacija med skupinami živil (g) in izločenimi skupnimi fenolnimi spojinami (SFS) v jutranjem urinu normalizirana na kreatinin, podana kot Pearsonov koeficient (r).

| | SFS določene brez ekstrakcije na trdni fazi v jutranjem urinu (mg SFS/g kreatinina) | SFS določene z ekstrakcijo na trdni fazi v jutranjem urinu (mg SFS/g kreatinina) |
|--|---|--|
| Sadje in sadni izdelki | $r = 0,465$ * | $r = 0,409$ |
| Zelenjava in rastlinski proizvodi | $r = -0,108$ | $r = -0,211$ |
| Sadje in zelenjava | $r = 0,199$ | $r = 0,084$ |

* statistično značilno ($p < 0,05$)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Namen raziskave je bil ugotoviti ali obstaja povezava med količino zaužitih polifenolov in določenih skupnih fenolnih skupin v urinu. Za določitev količine zaužitih fenolnih spojin smo uporabili neposredno metodo ocene vnosa hranil in sicer metodo tehtanja. Mlada odrasla oseba ženskega spola je redno zapisovala količino zaužite hrane 22 dni.

Na začetku smo se osredotočili na vrsto in količino zaužite hrane. Uporabili računalniški program Prodi 5.7 (Kluthe in Kassel, 2010) in pridobljene podatke primerjali s priporočili Svetovne zdravstvene organizacije WHO (WHO, 1990) in Referenčnimi vrednostmi (2004).

Zanimal nas je povprečni dnevni vnos energije in makrohranil. Dnevni vnos energije je bil nižji od ocenjene potrebe. Razmerje med makrohranili ni ustrezalo priporočilom. Vnos prehranske vlaknine je bil pod priporočeno vrednostjo. Količina zaužitih beljakovin (g/ kg telesne teže) je presegla priporočila, delež dnevne potrebe po energiji, ki naj bi ga pokrivala beljakovine je bil nekoliko višji od priporočenega. Delež energije na dan, ki ga predstavljajo maščobe je bil nad priporočeno vrednostjo, delež, ki ga prispevajo ogljikovi hidrati pa ustrezen. (Referenčne vrednosti...2004).

Sadje in zelenjava sta pomembna sestavna dela zdrave prehrane. Zadosten vnos omenjenih živil lahko pomaga pri preprečevanju kroničnih bolezni. Ocenjeno je bilo, da nezadosten vnos sadja in zelenjave povzroči 14 % smrti zaradi raka prebavil, 11% smrti zaradi ishemične bolezni srca in okoli 9 % vseh smrtnih žrtev kapi (WHO, 1990). Ocenili smo, da je bil vnos sadja in zelenjave tekom raziskave zadosten z izjemo nekaj dni. Zanimalo nas je ali s tem, da izločimo sadne sokove in marmelade iz skupine sadja še vedno dosežemo priporočen vnos sadja in zelenjave. Preiskovana oseba je v obdobju beleženja dnevnika redko uživala sadne sokove zaradi tega nismo beležili večjih sprememb k dnevno zaužiti količini sadja in zelenjave. Samo v dveh dneh preiskave vnos sadja in zelenjave ni dosegel priporočenega (WHO, 1990) v primerjavi s podatki, ki upoštevajo sokove v sadno skupino. WHO priporočila ne štejejo krompirja med zelenjavo vendar smo ga vseeno vključili v to skupino. V primeru, da ga ne bi upoštevali ne bi prišlo, do večjih sprememb pri dnevnemu vnosu sadja in zelenjave. Če bi bil krompir bolj pogost na jedilniku preiskovane osebe bi izključili krompir iz skupine zelenjava.

Sledilo je ocenjevanje zaužitih SFS na dan. Prosto dostopnih baz podatkov je zelo malo in še te so nepopolne. Izziv ni predstavljal samo nam, težave imajo pogosto tudi drugi raziskovalci, ki ne morejo določiti povezavo med vnosem polifenolov in možen vpliv na zdravje človeka (Spencer in sod., 2008).

Večina literature navaja podatke o polifenolih, ki se topijo v vodnih organskih ekstraktih. Vendar polifenoli z visoko stopnjo polimerizacije in tisti z visoko molsko maso se lahko izognejo tej ekstrakcijski tehniki. Prav ta skupina polifenolov lahko postane aktivna v črevesju človeka po sprostitvi iz matriksa živil ob delovanju encimov in intestinalne mikroflore (Jenner in sod., 2005). Saura-Calixto in sod. (2007) so ugotovili, da je tako

pogosto uporabljena besedna zveza "skupne fenolne spojine" nepopolna saj zajema samo ekstrabilne polifenole. Dejanska vsebnost polifenolov v živilih je sestavljena iz ekstrabilnih in ne ekstrabilnih polifenolov.

V primeru, da upoštevamo 1g SFS na dan kot priporočen vnos (Faller in Fialho, 2010; Williamson in Holst, 2008) lahko trdimo, da je vnos skupnih fenolnih spojin zadosten. Vnos je bil nezadosten tiste dni, ko je količina zaužitega sadja in zelenjave nizka oz. pod priporočeno vrednostjo. Španski raziskovalci Saura-Calixto in sod. (2007) so navedli, da je vnos fenolnih spojin tamkajšnjih prebivalcev od 2590 to 3016 mg/dan, vendar so upoštevali tudi ne ekstrabilne fenolne spojine. Podatke o količini zaužitih SFS so pridobili tako, da so analizirali živila, v nasprotju smo mi uporabili baze podatkov.

K dnevni količini SFS, kot pričakovano, največ prispevajo sadje in zelenjava. Našteta živila so bogat vir polifenolov in običajno jih zaužijemo v večjih količinah. Ne smemo pozabiti še na nekatera druga živila, ki jih uživamo v manjših količinah vendar so prav tako pomembna in bogata s fenolnimi spojinami. Med slednje prištevamo olja, kise, kavo, čaje, kakavove izdelke, sveže začimbe, rdeče vino itd. Saura-Calixto in sod. (2007) so prav tako navedli, da so sadje, stročnice in oreščki tista živila, ki vsebujejo največ polifenolov. Skupina začimb, kisov in olj ima najvišjo gostoto skupnih fenolnih spojin izraženo v SFS/g živila in SFS/kcal. Gostota skupnih fenolnih spojin nam pove to, da z majhno količino živila vnesemo v telo visoko količino fenolnih spojin.

Odločili smo se, da bomo določali skupne fenolne spojine dvakrat, brez ekstrakcije in z ekstrakcijo na trdni fazi, tako kot so navedli Roura in sod. (2006) v njihovem članku. Zanimalo nas je do kakšnih razlik lahko pride, če predhodno ne ekstrahiramo vzorce urina.

Predhodno smo že omenili, da pri določanju skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu metodo moramo biti pozorni na določene snovi, ki prav tako reagirajo in pokažejo višje vrednosti kot je dejansko polifenolov v vzorcu. Poleg žveplovega dioksida, aromatskih aminov, sladkorjev, organskih kislin tudi askorbinska kislina reagira s FC reagentom (Roura in sod., 2006). Uporabili smo računalniški program Prodi 5.7 (Kluthe in Kassel, 2010) za pridobitev količine zaužitega vitamina C dnevno in statističnega programa SPSS za prikaz morebitne korelacije med vnosom vitamina C in ocenjeno količino spojin, ki reagirajo s FC reagentom. S Pearsonovim koeficientom smo določili, da obstaja zmerne povezanost med podatki ($r = 0,611$; $p = 0,002$). Prav tako, kot askorbinska kislina se tudi ostali sladkorji in organske kisline ne izločajo v isti meri vsak dan, odvisno je tudi od vsakega posameznika, njegovega metabolizma in zdravstvenega stanja v kakšnih količinah so te snovi prisotne v urinu.

Raziskali smo ali obstaja linearna povezava med vrednostmi, ki smo jih pridobili s SPE in tistimi brez SPE. Zanimalo nas je ali je mogoče s poznavanjem vrednosti ene spremenljivke določiti oz. oceniti vrednost druge. Odgovor na ta vprašanje nam pojasnjuje korelacijski koeficient. V našem primeru je $r = 0,914$ ($p = 0,00$), smer povezanosti je pozitivna. Ocenili smo, da obstaja zelo visoka povezanost med vrednostmi, ki jih določamo s SPE in tistimi, ki jih določamo brez. V zgornjem primeru smo iskali korelacijo med vsemi določenimi vzorci, zanimalo pa nas je tudi, če se ta korelacija spreminja, če preračunamo vrednosti SFS na dan. Pearsonov koeficient je v tem primeru $0,777$ ($p =$

0,00). Čeprav je tukaj vrednost korelacijskega koeficienta manjša kot v zgornjem primeru vseeno označuje visoko linearno povezanost med vrednosti dveh spremenljivk. S Pearsonovim korelacijskim koeficientom smo določili visoko povezanost med vrednosti, ki smo jih določili brez ekstrakcije in z ekstrakcijo. Vseeno pa ne moremo trditi, da ekstrakcija na trdni fazi ni potrebna prav zaradi tega, ker ostale raztopljene spojine, ki reagirajo s FC reagentom niso prisotne v stalnih koncentracijah. Prevelika so nihanja koncentracij spojin, ki reagirajo s FC reagentom, da bi poiskali faktor s katerim bi pomnožili količino SFS določenih brez SPE in tako ocenili vsebnost fenolnih spojin. Slaba stran uporabe kartuš za ekstrakcijo na trdni fazi je predvsem njihova cena. Potrebno bi bilo preveriti tudi ali so po ekstrakciji poleg fenolnih spojin v urinu prisotne tudi druge spojine, ki reagirajo s FC reagentom.

Skupne fenolne spojine v urinu so dober pokazatelj vnosa polifenolov. Ugotovili smo, da obstaja dobra korelacija med izločenimi SFS določenimi z Folin-Ciocalteu metodo in vnosom fenolnih spojin. $R = 0,532$ ($p = 0,011$) za določene SFS brez SPE in zaužitimi fenolnimi spojinami. $R = 0,434$ ($p < 0,05$) za določene SFS s SPE in zaužitimi polifenoli. Določili smo, da obstaja zmerna statistično značilna pozitivna korelacija med dnevnim vnosom sadja in zelenjave ter izločenimi skupnimi fenolnimi spojinami ($r = 0,549$). Korelacije so nizke in statistično neznačilne med določenimi SFS s SPE in sadjem, zelenjavo in seštevkom sadja in zelenjave.

Medina-Remón in sod. (2009) so analizirali SFS v jutranjem urinu in nato normalizirali podatke na kreatinin. Zanimala jih je korelacija med izločenimi SFS in vnosom sadja in zelenjave. Zaključili so da obstaja pozitivna korelacija med zaužitim sadjem in zelenjavo ter izločenimi SFS. Navedli so, da je koeficient korelacije med sadjem in zelenjavo in izločenimi SFS $r = 0,501$. Korelacije med vrednostmi, ki smo jih določali v jutranjem urinu so v vseh primerih slabše kot tiste določene v 24 urnem urinu. Korelacija med zaužitim sadjem in določenimi SFS/g kreatinina je $r = 0,465$ in je statistično značilna. Ostale korelacije so statistično neznačilne.

Flavonoidi so zelo razširjeni v sadju in zelenjavi zato bi se lahko odločili uporabiti te spojine kot biomarkerje za količino zaužitega sadja in zelenjave. Šest tedenska raziskava je vključevala obdobja z veliko zaužitega sadja, zelenjave in jagodičevja in obdobja brez živil bogatih s SFS. Nielsen in sod. (2002) so ugotovili, da meritev kvercetina, flavanononov in skupnih flavonoidov daje dobro korelacijo z vnosom sadja. Za analizo flavonoidov so uporabili tekočinsko kromatografijo z masno spektrometrijo, ki je bolj zahtevna za uporabo in tudi stroški so večji v primerjavi z Folin-Ciocalteu metodo.

Zamora-Ros in sod. (2001) so določili boljšo korelacijo med podatki, ki so jih pridobili iz 24 urnega urina ($r = 0,211$; $p < 0,001$), kot iz normaliziranih podatkov na kreatinin ($r = 0,014$; $p = 0,692$). Prav tako, smo tudi mi določili nizko, statistično neznačilno korelacijo med zaužitimi SFS in določenimi SFS/g kreatinina. $R = 0,356$ ($p < 0,05$) za normalizirane SFS določene brez ekstrakcije in $r = -0,241$ za SFS določene s SPE.

5.2 SKLEPI

- Povprečna zaužita energija in energijski deleži zaužitih mikrohranil preiskovane osebe v celodnevni prehrani so v manjši meri odstopali od priporočil (Referenčne vrednosti..., 2004).
- Tekom raziskave je bil vnos sadja in zelenjave preiskovane osebe nad priporočeno količino, pogosto tudi nekajkrat večji (WHO, 1990).
- Dnevni vnos ocenjenih skupnih fenolnih spojin je bil v povprečju večji od priporočenega (Faller in Fialho, 2010; Williamson in Holst, 2008). K zaužiti količini fenolnih spojin največ prispevajo sadje in zelenjava.
- Količina zaužite askorbinske kisline je v korelaciji z ocenjeno količino spojin, ki reagirajo s FC reagentom, ki jih določamo brez ekstrakcije na trdni fazi.
- Obstaja močna korelacija med koncentracijo skupnih fenolnih spojin, ki jih določamo brez ekstrakcije na trdni fazi in z ekstrakcijo. Vendar ne moremo zavrniti hipotezo, da je uporaba ekstrakcije na trdni fazi potrebna za določitev SFS s Folin-Ciocalteu metodo v urinu.
- Potrdili smo hipotezo, da je izmerjena količina skupnih fenolnih spojin v urinu v povezavi s količino zaužitih skupnih fenolnih spojin. Količina določenih skupnih fenolnih spojin v urinu je dober pokazatelj vnosa sadja in zelenjave.

6 POVZETEK

Namen diplomske naloge je bil ovrednotiti prehrano odrasle ženske osebe, ki je zapisovala prehranski dnevnik 22 dni z metodo tehtanja. Poleg tega smo zbirali 24 urni urin za določitev skupnih fenolnih spojin v urinu. Zanimalo nas je ali je količina skupnih fenolnih spojin prisotnih v urinu v povezavi z zaužitimi fenolnimi spojinami.

Pomemben del prehrane je vnos sadja in zelenjave. Osredotočili smo se na dnevno količino zaužitega sadja in zelenjave in podatke primerjali z Referenčnimi vrednostmi... (2004). Zaključili smo, da je vnos sadja in zelenjave zadovoljiv saj je v povprečju večji od priporočene dnevne vrednosti (WHO, 1990). Vnos sadnih sokov in krompirja v našem primeru nima večjega vpliva na skupno količino zaužitega sadja in zelenjave.

Sledila je ocena zaužitih skupnih fenolnih spojin na dan. Poleg internetne baze podatkov (Neveu in sod., 2010), smo uporabili tudi druge vire (Priloga A). Za količinsko ovrednotenje živil smo uporabili računalniški program Prodi 5.7 (Kluthe in Kassel, 2010). Vrednost zaužitih skupnih fenolnih spojin na dan je bila v povprečju nad priporočeno vrednostjo 1 grama (Faller in Fialho, 2010; Williamson in Holst, 2008). K dnevni količini SFS, kot pričakovano, največ prispevajo sadje, zelenjava, stročnice in oreški. Pomemben vir polifenolov so tudi začimbe, ki imajo najvišjo gostoto polifenolov izraženo v SFS/g in SFS/kcal.

Skupne fenolne spojine smo določili z modificirano Folin-Ciocalteu metodo, ki so jo objavili Roura in sod. (2006). Odločili smo se, da bomo določili skupne fenolne spojine v urinu brez in z ekstrakcijo na trdni fazi. Izkazalo se je, da obstaja visoka, statistično značilna korelacija ($r = 0,914$) med določenimi vrednostmi brez ekstrakcije in z ekstrakcijo. Prav tako obstaja visoka korelacija med določenimi SFS na dan brez ekstrakcije in z ekstrakcijo na trdni fazi ($r = 0,777$).

Potrdili smo hipotezo, da je bila izmerjena količina skupnih fenolnih spojin v urinu v povezavi s količino zaužitih fenolnih spojin. To smo tudi dokazali s Pearsonovim korelacijskim koeficientom, ki je $r = 0,532$ za določene skupne fenolne spojine brez ekstrakcije in $r = 0,434$ za določene skupne fenolne spojine z ekstrakcijo na trdni fazi. Močna je tudi povezava med količino zaužitega sadja in zelenjave ter izločenimi skupnimi fenolnimi spojinami. SFS so dober pokazatelj vnosa sadja in zelenjave.

7 VIRI

- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-31
- Beecher G. R. 2003. Overview of dietary flavonoids: Nomenclature, occurrence and intake. *Journal of Nutrition*, 33: 3248-3254
- Castaneda-Ovando A., de Lourdes Pacheco-Hernandez M., Paez-Hernandez M. E., Rodriguez J. A., Galan-Vidal C. A. 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113: 859-871
- Conquer J. A., Maiani G., Azzini E., Raguzzini A., Holub B. J. 1997. Supplementation with quercetin markedly increases plasma quercetin concentration without effect on selected risk factors for heart disease in healthy subjects. *Journal of Nutrition*, 98: 593-597
- Cooper K. A., Donovan J. L., Waterhouse A. L., Williamson G. 2008. Cocoa and health: a decade of research. *British Journal of Nutrition*, 99: 1-11
- Croizer A., Jaganath I. B., Clifford M. N. 2009. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26: 1001-1043
- De la Rosa L. A., Alvarez-Parrilla E., González-Aguilar G. A. 2010. Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry, nutritional value and stability. Ames, Wiley-Blackwell: 367 str.
- De Mira N. V. M., Massaretto I. L., de Simone Carlos Iglesias Pascual C., Lanfer Marquez U. M. 2009. Comparative study of phenolic compounds in different Brazilian rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22: 405-409
- De Simas K. N., Vieira L. N., Podestá R., Vieira M. A., Rockenbach I. I., Petkowicz C. L. O., de Deus Medeiros J., de Francisco A., Amante E. R., Amboni R. D. M. C. 2010. Microstructure, nutrient composition and antioxidant capacity of king palm flour: A new potential source of dietary fibre. *Bioresource Technology*, 101: 5701-5707
- Dohadwala M. M., Vita J. A. 2009. Grapes and cardiovascular disease. *Journal of Nutrition*, 139: 1788-1793
- Dragsted L. O., Pedersen A., Hermetter A., Basu S., Hansen M., Haren G. R., Kall M., Breinholt V., Castenmiller J. J. M., Stagsted J., Jakobsen J., Skibsted L., Rasmussen S. E., Loft S., Sandström B. 2004. The 6-a-day study: effects of fruit and vegetables on markers of oxidative stress and antioxidative defense in healthy nonsmokers. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79: 1060-1072

- Edwards R. L., Lyon T., Litwin S. E., Rabovsky A., Symons J. D., Jalili T. 2007. Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. *Journal of Nutrition*, 137: 2405-2411
- Egert S., Boesch-Saadatmandi C., Wolfram S., Rimbach G., Müller M. J. 2010. Serum lipid and blood pressure responses to quercetin vary in overweight patients by apolipoprotein E genotype. *Journal of Nutrition*, 140: 278-284
- Faller A. L. K., Fialho E. 2010. Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23: 561-568
- Gabrijelčič Blenkuš M., Pograjc L., Gregorič M., Adamič M., Čampa A. 2005. Smernice zdravega prehranjevanja v vzgojno-izobraževalnih ustanovah (od prvega leta starosti naprej). Ljubljana, Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije: 80 str.
- Gallegos-Infante J. A., Rocha-Guzman N. E., Gonzalez-Laredo R. F., Ochoa-Martínez L. A., Corzo N., Bello-Perez L. A., Medina-Torres L., Peralta-Alvarez L. E. 2010. Quality of spaghetti pasta containing Mexican common bean flour (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 119: 1544-1549
- Gayathria G. N., Platelb K., Prakasha J., Srinivasanb K. 2004. Influence of antioxidant spices on the retention of b-carotene in vegetables during domestic cooking processes. *Food Chemistry*, 84: 35-43
- Griffith D. P., Musher D. M., Itin C. 1976. Urease, the primary cause of infection-induced urinary stones. *Investigative Urology*, 13: 346-350
- Grün C. H., van Dorsten F. A., Jacobs D. M., Le Belleguic M., van Velzen E. J. J., Bingham M. O., Janssen H., van Duynhoven J. P. M. 2008. GC-MS methods for metabolic profiling of microbial fermentation products of dietary polyphenols in human and *in vitro* intervention studies. *Journal of Chromatography B*, 871: 212-219
- Halliwell B. 2007. Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovascular Research*, 73: 341-347
- Halliwell B. 2008. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476: 107-112
- Han X., Shen T., Lou H. 2007. Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 8: 950-988
- Ignat I., Volf I., Popa V. I. 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126: 1821-1835
- Jenner A. M., Rafter J., Halliwell B. 2005. Human fecal water content of phenolics: the extent of colonic exposure to aromatic compounds. *Free Radical Biology and Medicine*, 38: 763-772

- Kalogeropoulos N., Chiou A., Ioannou M., Karathanos V. T., Hassapidou M., Andrikopoulos N. K. 2010. Nutritional evaluation and bioactive microconstituents (phytosterols, tocopherols, polyphenols, triterpenic acids) in cooked dry legumes usually consumed in the Mediterranean countries. *Food Chemistry*, 121: 682-690
- Karapinar M., Sengun I. Y. 2007. Antimicrobial effect of koruk (unripe grape—*Vitis vinifera*) juice against *Salmonella typhimurium* on salad vegetables. *Food Control*, 18: 702-706
- Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-22
- Košmelj K. 2007. *Uporabna statistika (elektronski vir)*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 239 str.
http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2721/Uporabna_statistika_okt_2007/Uporabna_statistika_01.pdf (6. sept. 2011)
- Kluthe B., Kassel P. 2010. Prodi 5.7. Stuttgart, Nutri-Science: software.
- Lambert J. D., Elias R. J. 2010. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501: 65-72
- Leighton F., Cuevas A., Guasch V., Pérez D. D., Strobel P., San Martín A., Urzua U., Díez M. S., Foncea R., Castillo O., Mizón C., Espinoza M. A., Urquiaga I., Rozowski J., Maiz A., Germain A. 1999. Plasma polyphenols and antioxidants, oxidative DNA damage and endothelial function in a diet and wine intervention study in humans. *Drugs Under Experimental and Clinical Research*, 25: 133-141
- Loke W. M., Hodgson J. M., Proudfoot J. M., McKinley A. J., Puddey I. B., Croft K. D. 2008. Pure dietary flavonoids quercetin and (-)-epicatechin augment nitric oxide products and reduce endothelin-1 acutely in healthy men. *American Journal of Clinical Nutrition*, 88: 1018-1025
- Lunder M., Kuhar P., Drevenšek G. 2007. Ateroskleroza-dejavniki tveganja in zapleti. *Medicinski mesečnik*, julij-avgust: 235-240
- Manzi P., Marconi S., Aguzzi A., Pizzoferrato L. 2004. Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking. *Food Chemistry*, 84: 201-206
- Mazzeo T., N'Dri D., Chiavaro E., Visconti A., Fogliano V., Pellegrini N. 2011. Effect of two cooking procedures on phytochemical compounds, total antioxidant capacity and colour of selected frozen vegetables. *Food Chemistry*, 128: 627-633

- McDougall G., Martinussen I., Stewart D. 2008. Towards fruitful metabolomics: High throughput analyses of polyphenol composition in berries using direct infusion mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 871: 362-369
- Medina-Remón A., Barrionuevo-González A., Zamora-Ros R., Andres-Lacueva C., Estruch R., Martínez-González M., Diez-Espino J., Lamuela-Raventos R. 2009. Rapid Folin–Ciocalteu method using microtiter 96-well plate cartridges for solid phase extraction to assess urinary total phenolic compounds, as a biomarker of total polyphenols intake. *Analytica Chimica Acta*, 634: 54–60
- Mukhtar H., Ahmad N. 2000. Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71: 1698–1702
- Naczek M., Shahidi F. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1523-1542
- Neveu V., Perez-Jiménez J., Vos F., Crespy V., du Chaffaout L., Menner L., Knax C., Eisner R., Cruz J., Wishart D., Scalbert A. 2010. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in food. Ferrand, INRA: database <http://www.phenol-explorer.eu/> (12. April. 2011)
- Nielsen S. E., Freese R., Kleemola P., Mutanen M. 2002. Flavonoids in human urine as biomarkers for intake of fruits and vegetables. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 11: 459-466.
- Owen R. W., Haubner R., Hull W. E., Erben G., Spiegelhalter B., Bartsch H., Haber B. 2003. Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food and Chemical Toxicology*, 41: 1727-1738
- Pawliszyn J. 1997. Solid phase microextraction: Theory and practice. New York, Wiley-VCH, 247 str.
- Rechner A. R., Smith M. A., Kuhnle G., Gibson G. R., Debnam E. S., Srai S. K. S., Moore K. P., Rice-Evans C. A. 2004. Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biology & Medicine*, 36: 212-225
- Referenčne vrednosti za vnos hranil. 2004. 1. izd. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije: 215 str.
- Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20: 933-956
- Robards K., Prenzler P. D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66: 401-436

- Rodrigo R., Miranda A., Vergara L. 2001. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta*, 412: 410-424
- Roura E., Andre's-Lacueva C., Estruch R., Lamuela-Raventó's R. M. 2006. Total polyphenol intake estimated by a modified Folin-Ciocalteu assay of urin. *American Association for Clinical Chemistry*, 52: 749-752
- Ruiz M. J., Fernández M., Picó Y., Mañez J., Asensi M., Carda C., Asensio G., Estrela J. M. 2009. Dietary administration of high doses of pterostilbene and quercetin to mice is not toxic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 3180-3186
- Saiko P., Szakmary A., Jaeger W., Szekeres T. 2008 Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutation Research*, 658: 68-94
- Sanchez-Moreno C., Pilar Canob M., de Ancos B., Plaza L., Olmedilla B., Granado F., Martín A. 2006. Mediterranean vegetable soup consumption increases plasma vitamin C and decreases F2-isoprostanes, prostaglandin E2 and monocyte chemotactic protein-1 in healthy humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17: 183-189
- Saura-Calixto F., Serrano J., Goñ I. 2007. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101: 492-501
- Scalbert A., Johnson I. T, Saltmarsh M. 2005. Polyphenols: antioxidants and beyond. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81: 215-217
- Servilia M., Selvaggina R., Espostoa S., Taticchia A., Montedoroa G., Morozzib G. 2004. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*, 1054: 113-127
- Shahidi F., Ho C. 2005. Phenolics in foods and natural health products: An overview. V: Phenolic compounds in foods and natural health products. Shahidi F., Ho C. (eds.). Washington, American Chemical Society: 1-8
- Shahidi F., Wanasundara P. K. P. D. 1992. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32: 67-103
- Simčič M. 2005. Sledljivost in ocena vnosa hranil. V: Sledljivost živil. 23. Bitenčevi živilski dnevi. Ljubljana, 31. marec in 1. april. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 159-165
- Soerjomataram I., Oomen D., Lemmens V., Oenema A., Benetou V., Trichopoulou A., Coebergh J. W., Barendregt J., de Vries E. 2010. Increased consumption of fruit and vegetables and future cancer incidence in selected European countries. *European Journal of Cancer*, 46: 2563-2580

- Somsub W., Kongkachuichai R., Sungpuag P., Charoensiri R. 2008. Effects of three conventional cooking methods on vitamin C, tannin, myo-inositol phosphates contents in selected Thai vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21: 187-197
- Spencer J. P. E., Abd El Mohsen M. M., Minihane A., Mathers J. C. 2008. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *British Journal of Nutrition*, 99: 12-22
- Spierto F. W., Hannon W. H., Gunter E. W., Smith S.J. 1997. Stability of urine creatinine. *Clinica Chimica Acta*, 264: 227-232
- Steffen Y., Wiswedel I., Peter D., Schewe T., Sies H. 2006. Cytotoxicity of myeloperoxidase/nitrite-oxidized low-density lipoprotein toward endothelial cells is due to a high 7 β -hydroxycholesterol to 7-ketocholesterol ratio. *Free Radical Biology & Medicine*, 41: 1139-1150
- Stewart C. P. 1946. Loss of nutrients in cooking. *Proceedings of the Nutrition Society*, 4: 164-171
- Stoclet J., Chataigneau T., Ndiaye M., Oak M., El Bedoui J., Chataigneau M., Schini-Kerth V. B. 2004. Vascular protection by dietary polyphenols. *European Journal of Pharmacology*, 500: 299-313
- Ubeda C., Hidalgo C., Torija M. J., Masb A., Troncoso A. M., Morales M. L. 2011. Evaluation of antioxidant activity and total phenols index in persimmon vinegars produced by different processes. *LWT - Food Science and Technology*, 44: 1591-1596
- USDA. 2007. Database for the flavonoid content of selected foods. Beltsville, US Departement for agriculture: 131 str.
<http://www.ars.usda.gov/nutrientdata>
- Vinson J. A., Proch J., Bose P., Munchler S., Taffera P., Shuta D., Samman N., Agbor G. A. 2006. Chocolate is a powerful *ex vivo* and *in vivo* antioxidant, an antiatherosclerotic agent in an animal model, and a significant contributor to antioxidants in the European and American diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 8071-8076
- Vita J. A. 2005. Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81: 292-297
- Wang Y., Lee W. K., Chan F. L., Chen S., Leung. 2006. The red wine polyphenol resveratrol displays bilevel inhibition on aromatase in breast cancer cells. *Toxicological Sciences*, 92: 71-77
- Waterhouse A. L. 2002. Determination of total phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 6 : 1-8

Wilks R., Bennett F., Forrester T., McFarlane-Anderson N. 1998. Chronic diseases: the new epidemic. *West Indian Medical Journal*, 47: 40-44

Williamson G., Holst B. 2008. Dietary reference intake (DRI) value for dietary polyphenols: are we heading in the right direction? *British Journal of Nutrition*, 99: 55-58

Xu G., Liu D., Chen J., Ye X., Maa Y., Shi J. 2008. Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chemistry*, 106: 545–551

Zamora-Ros R., Rabassa M., Cherubini A., Urpi-Sarda M., Llorach R., Bandinelli S., Ferrucci L., Andres-Lacueva C. 2011. Comparison of 24-h volume and creatinine-corrected total urinary polyphenol as a biomarker of total dietary polyphenols in the Invecchiare InCHIANTI study. *Analytica Chimica Acta*, 704:110–115

WHO. 1990. Diet, nutrition, and the preservation of the chronic diseases.. WHO technical report series 797. Geneva, World Health Organisation: 203 str.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Marjanu Simčiču za strokovno mentorstvo in predloge pri sestavljanju diplomskega dela. Zahvaljujem se tudi doc. dr. Blaž Cigiću za hitro recenzijo diplomskega dela.

Hvala Kseniji Podgrajšek za pomoč pri laboratorijskem delu, za koristne nasvete in prijaznost.

Posebna zahvala gre mojim staršem in bratu za podporo tekom študija. Hvala Marku za potrpežljivost in razumevanje.

Hvala tudi vsem tistim, ki so prispevali k temu, da mi ni bilo nikoli dolgčas v Ljubljani.

PRILOGE

PRILOGA A: Količina skupnih fenolnih spojin v 100 g živila. Izpisana so živila, za katera vsebnost fenolnih spojin ni bila dostopna na phenol-explorer (Neveu in sod., 2010).

| Živilo | Skupne fenolne spojine mg SFS/ 100 g izdelka | Vir |
|---|---|--|
| Testenine | 133 | Gallegos-Infante in sod., 2010 |
| Riž | 10,72 | de Mira in sod., 2009 |
| Jurčki | 21,42 | Manzi in sod., 2004 |
| Kokosova moka | 127 | de Simas in sod., 2010 |
| Vinski kis, beli | 13,7 | Ubeda in sod., 2011 |
| Balzamični kis | 253,9 | Ubeda in sod., 2011 |
| Puding z vaniljo in čokolado | 39,97 | Za oceno vsebnosti fenolnih spojin za industrijski čokoladni puding smo predpostavili, da puding vsebuje 3 % kakava in 10 % škroba oz. moke. |
| Listnato testo | 25,32 | Za izračun fenolnih spojin smo uporabili recept za listnato testo. Iz posameznik sestavin smo sešteli predvideno skupno število polifenolov. (Recept: 250 g masla, 250 g moke, 50 g jajce, 125 ml vode) |
| Masleni piškoti | 30,49 | Za izračun fenolnih spojin smo uporabili recept za listnato testo. Iz posameznik sestavin smo sešteli predvideno skupno število polifenolov. (Recept: 250 g masla, 250 g moke, 50 g jajce, 125 ml vode) |
| Rogljček | 25,32 | Za oceno fenolnih spojin v rogljičku smo upoštevali približno vsebnost polifenolov listnatega testa in čokoladne kreme |
| Piškoti | 30,49 | Za izračun fenolnih spojin smo se uporabili recept za maslene piškote. Iz posameznik sestavin smo sešteli predvideno skupno število polifenolov. (Recept: 250 g maslo, 300 g moka, 125 g sladkor, 2,5 g pecilni prašek) |
| Mlečna čokolada z lešniki (9 % lešnikov) | 839,2 | Fenolne spojine v čokoladi z lešniki (9 %) smo ocenili na ta način, da smo izračunali polifenole v lešnikih in čokoladi ter jih sešteli skupaj tako, da smo upoštevali pravilno razmerje. |
| Limonin sok sveže stisnjen | 75,2 | Xu in sod., 2008 |
| Med, mešan | 350 | Kalogeropoulos in sod., 2010 |
| Rjavi fižol v konzervi | 18,1 | USDA zbirka podatkov za flavonoidno vsebnost izbranih živil (USDA, 2007) |

PRILOGA B: Določena koncentracija izločenih skupnih fenolnih spojin (SFS) v urinu s Folin-Ciocalteu metodo (Roura in sod., 2006) brez ekstrakcije na trdni fazi in z ekstrakcijo.

| Št. vzorca | Koncentracija SFS brez ekstrakcije na trdni fazi | Koncentracija SFS z ekstrakcijo na trdni fazi |
|------------|--|---|
| 1 | 1530,6 | 1145,0 |
| 2 | 579,0 | 343,7 |
| 3 | 500,0 | 235,4 |
| 4 | 292,3 | 139,5 |
| 5 | 441,3 | 229,2 |
| 6 | 349,9 | 175,4 |
| 7 | 104,4 | 75,4 |
| 8 | 316,9 | 164,7 |
| 9 | 117,0 | 83,3 |
| 10 | 498,4 | 228,0 |
| 11 | 266,1 | 135,9 |
| 12 | 573,4 | 417,0 |
| 13 | 502,3 | 245,5 |
| 14 | 566,8 | 382,6 |
| 15 | 606,8 | 349,9 |
| 16 | 574,7 | 302,1 |
| 17 | 385,6 | 177,9 |
| 18 | 444,1 | 138,8 |
| 19 | 249,2 | 131,9 |
| 20 | 672,5 | 438,2 |
| 21 | 1389,4 | 945,2 |
| 22 | 346,0 | 173,1 |
| 23 | 813,5 | 425,0 |
| 24 | 1579,9 | 893,2 |
| 25 | 1350,1 | 842,8 |
| 26 | 840,4 | 448,8 |
| 27 | 501,8 | 240,4 |
| 28 | 217,4 | 128,9 |
| 29 | 699,8 | 444,9 |
| 30 | 270,6 | 144,8 |
| 31 | 964,9 | 520,1 |
| 32 | 686,4 | 390,1 |
| 33 | 444,4 | 170,2 |
| 34 | 1492,3 | 1034,3 |
| 35 | 422,7 | 213,6 |
| 36 | 542,5 | 377,0 |
| 37 | 744,6 | 447,6 |
| 38 | 246,3 | 134,3 |

Se nadaljuje

Nadaljevanje PRILOGA B: Določena koncentracija izločenih skupnih fenolnih spojin (SFS) v urinu s Folin-Ciocalteu metodo (Roura in sod., 2006) brez ekstrakcije na trdni fazi in z ekstrakcijo.

| Št. vzorca | Koncentracija SFS brez ekstrakcije na trdni fazi | Koncentracija SFS z ekstrakcijo na trdni fazi |
|-------------------|---|--|
| 39 | 248,8 | 152,1 |
| 40 | 233,6 | 147,1 |
| 41 | 506,1 | 271,6 |
| 42 | 713,9 | 404,1 |
| 43 | 656,5 | 409,8 |
| 44 | 218,3 | 132,4 |
| 45 | 575,0 | 300,1 |
| 46 | 275,8 | 156,5 |
| 47 | 591,2 | 425,5 |
| 48 | 1372,5 | 1073,5 |
| 49 | 600,1 | 298,1 |
| 50 | 176,0 | 71,7 |
| 51 | 496,8 | 332,9 |
| 52 | 787,6 | 442,7 |
| 53 | 184,8 | 131,3 |
| 54 | 194,0 | 88,3 |
| 55 | 599,1 | 496,8 |
| 56 | 1077,4 | 1057,7 |
| 57 | 200,7 | 165,5 |
| 58 | 971,6 | 589,7 |
| 59 | 165,0 | 87,7 |
| 60 | 327,0 | 177,9 |
| 61 | 849,9 | 661,3 |
| 62 | 899,4 | 461,5 |
| 63 | 191,9 | 76,1 |
| 64 | 828,5 | 390,1 |
| 65 | 191,5 | 121,3 |
| 66 | 206,6 | 123,7 |
| 67 | 702,2 | 442,3 |
| 68 | 1079,2 | 580,6 |
| 69 | 546,6 | 426,5 |
| 70 | 159,4 | 100,9 |
| 71 | 843,5 | 505,5 |
| 72 | 528,7 | 333,9 |
| 73 | 212,0 | 122,6 |
| 74 | 267,3 | 153,3 |
| 75 | 150,7 | 108,4 |
| 76 | 253,9 | 148,8 |
| 77 | 306,6 | 226,6 |

Se nadaljuje

Nadaljevanje PRILOGA B: Določena koncentracija izločenih skupnih fenolnih spojin (SFS) v urinu s Folin-Ciocalteu metodo (Roura in sod., 2006) brez ekstrakcije na trdni fazi in z ekstrakcijo.

| Št. vzorca | Koncentracija SFS brez ekstrakcije na trdni fazi | Koncentracija SFS z ekstrakcijo na trdni fazi |
|-------------------|---|--|
| 78 | 441,1 | 290,4 |
| 79 | 1119,1 | 1229,9 |
| 80 | 906,8 | 506,8 |
| 81 | 288,3 | 150,7 |
| 82 | 554,2 | 550,2 |
| 83 | 719,5 | 534,1 |
| 84 | 553,4 | 524,5 |
| 85 | 818,9 | 601,0 |
| 86 | 182,5 | 529,2 |
| 87 | 1054,0 | 1069,2 |
| 88 | 447,3 | 350,6 |
| 89 | 409,9 | 337,2 |
| 90 | 321,2 | 246,1 |
| 91 | 334,5 | 301,4 |
| 92 | 121,5 | 133,0 |
| 93 | 729,7 | 382,7 |
| 94 | 951,1 | 731,0 |
| 95 | 713,3 | 405,7 |
| 96 | 309,0 | 245,8 |
| 97 | 203,0 | 86,0 |
| 98 | 188,9 | 125,4 |
| 99 | 227,4 | 139,7 |
| 100 | 184,4 | 152,6 |
| 101 | 728,3 | 625,0 |
| 102 | 514,2 | 284,6 |
| 103 | 69,6 | 48,3 |
| 104 | 296,8 | 185,6 |
| 105 | 122,5 | 96,8 |
| 106 | 308,9 | 202,2 |
| 107 | 328,6 | 299,0 |
| 108 | 618,6 | 612,7 |
| 109 | 512,9 | 455,8 |
| 110 | 584,6 | 291,1 |
| 111 | 1036,5 | 926,9 |
| 112 | 364,8 | 243,5 |
| 113 | 647,3 | 638,4 |
| 114 | 1012,5 | 828,5 |
| 115 | 355,4 | 243,9 |
| 116 | 172,3 | 165,4 |

Se nadaljuje

Nadaljevanje PRILOGA B: Določena koncentracija izločenih skupnih fenolnih spojin (SFS) v urinu s Folin-Ciocalteu metodo (Roura in sod., 2006) brez ekstrakcije na trdni fazi in z ekstrakcijo.

| Št. vzorca | Koncentracija SFS brez ekstrakcije na trdni fazi | Koncentracija SFS z ekstrakcijo na trdni fazi |
|-------------------|---|--|
| 117 | 214,1 | 113,7 |