

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Sandra POTOČNIK

**VPLIV ZORENJA NA VSEBNOST ANTIOKSIDANTOV  
V PLODOVIH ŠIPKA**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**THE IMPACT OF RIPENING ON ANTIOXIDATIVE  
ACTIVITY OF DOG-ROSE BERRIES**

GRADUATION THESIS  
University studies

**Ljubljana, 2009**

Potočnik S. Vpliv zorenja na vsebnost antioksidantov v plodovih šipka.

Dipl. delo. Ljubljana. Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za živilstvo, 2009

---

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

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Leo Pogačnik in za recenzentko prof. dr. Tatjano Košmerl.

Mentorica: doc. dr. Lea Pogačnik

Recenzentka: prof. dr. Tatjana Košmerl

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Sandra Potočnik

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

ŠD	Dn
DK	UDK 633.88:577.164.2:547.56(043)=163.6
KG	antioksidativna aktivnost/fenolne spojine/polarnost topil/stopnja zrelosti/vitamin C/kvercetin/kamferol/naringenin/luteolin/krizin/apigenin/galangin/pinocembrin/elaginska kislina/šipek/ <i>Rosa canina</i>
AV	POTOČNIK, Sandra
SA	POGAČNIK, Lea (mentorica)/KOŠMERL, Tatjana (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2009
IN	VPLIV ZORENJA NA VSEBNOST ANTIOKSIDANTOV V PLODOVIH ŠIPKA
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 68 str., 5 pregl., 58 sl., 70 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V okviru diplomskega dela smo spremljali antioksidativni potencial (AOP), skupne in posamezne fenolne spojine ter vitamin C v plodovih šipka, obranih na severni in južni strani grma, ki raste za Biotehniško fakulteto v Ljubljani, med septembrom in decembrom 2008. Zanimalo nas je, kako zorenje in lega plodov na grmu (sever in jug) vplivata na omenjene parametre. Antioksidativni potencial v vzorcih, ekstrahiranih z 2 % metafosforno kislino (MFK), in v vzorcih, ekstrahiranih z metanolom, smo določali z metodo DPPH <sup>•</sup> in luminescenčno metodo. Skupne fenolne spojine smo prav tako določali v vzorcih, ekstrahiranih z 2 % MFK in v vzorcih, ekstrahiranih z metanolom, s Folin-Ciocalteaujevo (F-C) metodo. AOP in vsebnost skupnih fenolov se v plodovih šipka od septembra do novembra povečuje, v začetku decembra pa se njihova vsebnost ponovno začne zniževati. Vsebnost antioksidantov je v plodovih, obranih na južni strani, višja kot v plodovih, obranih na severni strani. Vse tri metode za določanje antioksidantov so v visoki korelacji, saj so Pearsonovi korelacijski koeficienti: ( $r_{F-C, DPPH^{\bullet}}$ ) 0,73, ( $r_{F-C, \text{luminol}}$ ) 0,71 in ( $r_{DPPH^{\bullet}, \text{luminol}}$ ) 0,71. Ugotovili smo tudi, da metanolni in vodni ekstrakti vsebujejo podobne količine antioksidantov. Posamezne fenolne spojine smo kvantificirali in identificirali s tehniko HPLC-MS. Analizirali smo dva metanolna ekstrakta, ki sta vsebovala zelo različni količini skupnih fenolov, določenih z metodo F-C. Vzorca je bil potrebno dodatno očistiti s pomočjo ekstrakcije na trdni fazi (SPE) in ju pustiti en mesec v kislem mediju, da je potekla hidroliza. Plodovi šipka vsebujejo največ naringenina (od 5 mg/100 g do 8 mg/100 g), katerega vsebnost se med zorenjem poveča za kar 60 %, in najmanj apigenina (od 0,2 mg/100 g do 0,3 mg/100 g). Askorbinska kislina in skupni vitamin C smo določili s tehniko HPLC. Vsebnost obeh se med zorenjem spreminja. V zgodnji jeseni se vsebnost povečuje, v pozni jeseni pa se začne zniževati. Šipek vsebuje od 227 do 463 mg/100 g vitamina C. Od tega dehidroaskorbinska kislina predstavlja od 3 do 116 mg/100 g. Vsebnost vitamina C je v plodovih, obranih na severni strani, višja kot v plodovih, obranih na južni strani.

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

DN Dn  
DC UDC 633.88:577.164.2:547.56(043)=163.6  
CX antioxidative activity/phenols/polar of dissolovers/stage of ripening/vitamin C/quercetin/kampherol/naringenin/luteolin/chrysin/apigenin/galangin/pinocembrin/ellagic acid/dog rose/*Rosa canina*  
AU POTOČNIK, Sandra  
AA POGAČNIK, Lea (supervisor)/ KOŠMERL, Tatjana (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology  
PY 2009  
TI THE IMPACT OF RIPENING ON ANTIOXIDATIVE ACTIVITY IN DOG-ROSE BERRIES  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO XI, 68 p., 5 tab., 58 fig., 70 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The diploma paper research is based on the determination of antioxidative potential (AOP), total and individual phenols, and the content of vitamin C in dog-rose berries. The fruits were harvested weekly from September to December 2008 in the north and the south side of the bush growing next to Biotechnical Faculty. The main objective was to follow the changes in antioxidant content during the ripening of dog-rose berries and to check for the possible influence of their position on the bush (north and south side) to same parameters. The AOP of samples extracted with 2 % metaphosphoric acid (MFK) and methanol was determined with DPPH<sup>•</sup> method and luminescent method, whereas the total phenols were determined by Folin-Ciocalteau's (F-C) method. It was found out that the AOP and the total phenols content increase during the ripening from September to November, however, at the beginning of December their content starts to decrease. In general the AOP and total phenols are higher in dog-rose berries harvested in the south side of the bush than in dog-rose berries harvested in the north side. All three methods for determination of antioxidants are in good correlation; Pearson correlation coefficients were as follows: ( $r_{F-C, DPPH^{\bullet}}$ ) 0.73, ( $r_{F-C, \text{luminol}}$ ) 0.71 and ( $r_{DPPH^{\bullet}, \text{luminol}}$ ) 0.71. According to our findings, methanol and water extracts content contain similar levels of antioxidants. Individual phenols were quantified and identified with HPLC-MS technique in two methanol extracts containing considerably different levels of total phenols determined by F-C method. The samples were extra purified with solid phase extraction (SPE) and left for a month in acidic solution in order to complete the hydrolysis. The dog-rose berries contain in the highest quantity naringenin (from 5 mg/100 g to 8 mg/100 g), which during the ripening period increases up to 60 %, and in the lowest quantity apigenin (from 0.2 mg/100 g to 0.3 mg/100 g). The content of ascorbic acid and vitamin C quantified by HPLC method vary during the ripening period. In the early autumn, the contents increase and in the late autumn they start to decrease. Dog-rose berries contain from 227 to 463 mg/100 g of total vitamin C. Within this quantity from 3 to 116 mg/100 g of dehydroascorbic acid was determined. The contents of vitamin C in dog-rose berries, harvested in the north side of the bush are generally higher than in dog-rose berries harvested in the south side.

**KAZALO VSEBINE**

<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA .....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	1
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 ZDRAVILNE RASTLINE .....	3
<b>2.1.1 Šipek (<i>Rosa Canina L.</i>).....</b>	<b>3</b>
2.2 ANTIOKSIDANTI .....	5
<b>2.2.1 Prosti radikali .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2.2 Oksidativni stres .....</b>	<b>6</b>
<b>2.2.3 Delitev antioksidantov.....</b>	<b>6</b>
<b>2.2.4 Lastnosti in mehanizem antioksidativnega delovanja .....</b>	<b>7</b>
<b>2.2.5 Viri in vrste antioksidantov.....</b>	<b>7</b>
2.2.5.1 Vitamin C .....	8
2.2.5.2 Karotenoidi in vitamin A .....	9
2.2.5.3 Tokoferoli .....	10
2.2.5.4 Polifenoli .....	10
2.3 METODE ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDANTOV .....	15
<b>2.3.1 Določanje skupne antioksidativne aktivnosti .....</b>	<b>15</b>
2.3.1.1 Indirektna metoda z radikalom DPPH' .....	15
2.3.1.2 Luminescenčna metoda.....	16
<b>2.3.2 Določanje skupnih fenolnih spojin.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3.3 Določanje posameznih antioksidantov .....</b>	<b>18</b>
2.3.3.1 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti .....	18
2.3.3.2 HPLC-MS .....	21
2.3.3.3 Ekstrakcija na trdni fazi (SPE) .....	22
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>25</b>
3.1 MATERIALI .....	25
3.2 METODE DELA .....	25
<b>3.2.1 Ekstrakcija .....</b>	<b>25</b>
3.2.1.1 Ekstrakcija z 2 % vodno raztopino metafosforne kisline.....	25
3.2.1.2 Ekstrakcija z metanolom.....	26
<b>3.2.2 Antioksidativna aktivnost.....</b>	<b>26</b>
3.2.2.1 Določanje skupnih fenolnih spojin .....	26
3.2.2.2 Določanje antioksidacijskega potenciala z radikalom DPPH' .....	27
3.2.2.3 Določanje antioksidativne aktivnosti z luminescenčno metodo .....	28
<b>3.2.3 Spektrofotometrično določanje vsebnosti askorbinske kisline na sistemu HPLC.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.4 Identifikacija in kvantifikacija polifenolov na sistemu HPLC-MS .....</b>	<b>30</b>
3.2.4.1 Ekstrakcija na trdni fazi (SPE).....	30
3.2.4.2 Določanje polifenolov s HPLC-MS .....	30
<b>4 REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>32</b>
4.1. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST PLODOV ŠIPKA .....	33
<b>4.1.1 Spektrofotometrična metoda za določanje skupnih fenolnih spojin .....</b>	<b>33</b>
4.1.1.1 Umeritvena krivulja .....	33
4.1.1.2 Vzorci, ekstrahirani z 2 % metafosforno kislino .....	34
4.1.1.3 Vzorci, ekstrahirani z metanolom .....	35
4.1.1.4 Primerjava vodnih in metanolnih ekstraktov .....	36
<b>4.1.2 Metoda z radikalom DPPH' .....</b>	<b>37</b>

4.1.2.1	Umeritvene krivulje.....	37
4.1.2.2	Vzorci, ekstrahirani z 2 % metafosforno kislino.....	39
4.1.2.3	Vzorci, ekstrahirani z metanolom .....	40
4.1.2.4	Primerjava vodnih in metanolnih ekstraktov .....	40
<b>4.1.3</b>	<b>Luminescenčna metoda.....</b>	<b>42</b>
4.1.3.1	Umeritvena krivulja.....	42
4.1.3.2	Vzorci, ekstrahirani z 2 % metafosforno kislino.....	43
4.1.3.3	Vzorci, ekstrahirani z metanolom .....	44
4.1.3.4	Primerjava vodnih in metanolnih ekstraktov .....	45
<b>4.1.4</b>	<b>Primerjava metod za določanje antioksidativne aktivnosti .....</b>	<b>46</b>
4.2	VSEBNOST POSAMEZNIH FENOLNIH KISLIN IN FLAVONOIDOV V PLODOVIH ŠIPKA.....	48
4.2.1	Umeritvene krivulje .....	49
4.2.2	Analiza vzorcev.....	54
4.3	VSEBNOST VITAMINA C V PLODOVIH ŠIPKA.....	56
4.3.1	Umeritvena krivulja.....	56
4.3.2	Askorbinska kislina.....	57
4.3.3	Skupni vitamin C.....	58
4.3.4	Primerjava vsebnosti AA in skupnega vitamina C v plodovih šipka .....	59
<b>5</b>	<b>SKLEPI .....</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>VIRI.....</b>	<b>64</b>
<b>ZAHVALA</b>		

**KAZALO PREGLEDNIC**

<b>Preglednica 1:</b> Vsebnost skupnih fenolov vzorcev šipka, izmerjena s spektrofotometrično metodo za določanje skupnih fenolnih spojin s Folin–Ciocalteaujev (F–C) reagentom, v plodovih šipka, obranih med 25.9. in 1.12. 2008 s severne in južne strani grma in ekstrahiranih v različnih topilih.....	37
<b>Preglednica 2:</b> Antioksidativna aktivnost (AOP), izmerjena z metodo za določanje antioksidativne aktivnosti z radikalom DPPH•, v plodovih šipka, obranih med 25.9. in 1.12. 2008 s severne in južne strani grma in ekstrahiranih v različnih topilih.....	42
<b>Preglednica 3:</b> Antioksidativna aktivnost (AOP), izmerjena z luminescenčno metodo, v plodovih šipka, obranih med 25.9. in 1.12. 2008 s severne in južne strani grma in ekstrahiranih v različnih topilih.....	46
<b>Preglednica 4:</b> Retencijski časi, molske mase in m/z vrednosti posameznih fenolnih spojin	49
<b>Preglednica 5:</b> Vsebnost askorbinske kisline in skupnega vitamina C (AA+ DHA) v plodovih šipka, izmerjena z metodo HPLC, obranih med 25.9. in 1.12. 2008 s severne in južne strani grma.....	60

**KAZALO SLIK**

<b>Slika 1:</b> Primer cveta šipka (Johnson in Campbell, 2007).....	4
<b>Slika 2:</b> Plodovi šipka (Whittle, 2008) .....	5
<b>Slika 3:</b> Strukturna formula askorbinske kisline (Linster in Van Schaftingen, 2007).....	9
<b>Slika 4:</b> Strukturna formula $\beta$ -karotena (Kiokias in sod., 2008) .....	9
<b>Slika 5:</b> Strukturna formula $\alpha$ -tokoferola (vitamin E) (Schröter in sod., 1993) .....	10
<b>Slika 6:</b> Osnovna strukturna formula flavonoidov (Robards, 2003) .....	11
<b>Slika 7:</b> Osnovna strukturna formula antocianidinov (Robards, 2003) .....	11
<b>Slika 8:</b> Osnovna strukturna formula flavonolov (Robards, 2003) .....	12
<b>Slika 9:</b> Strukturna formula elaginske kisline (Sekiguchi in sod., 2009) .....	12
<b>Slika 10:</b> Strukturna formula kvercetina (Zhang in sod., 2008) .....	13
<b>Slika 11:</b> Strukturna formula luteolina (Zhang in sod., 2008).....	13
<b>Slika 12:</b> Strukturna formula kamferola (Zhang in sod., 2008).....	13
<b>Slika 13:</b> Strukturna formula naringenina (4',5,7-trihidroksiflavanon) (Fuhr in sod., 1993) ..	14
<b>Slika 14:</b> Strukturna formula apigenina (Gupta in sod., 2001).....	14
<b>Slika 15:</b> Strukturna formula galangina (Heo in sod., 2001).....	14
<b>Slika 16:</b> Strukturna formula pinocembrina (Yang in sod., 2009) .....	15
<b>Slika 17:</b> Strukturna formula luminola (Voicescu in sod., 2006).....	17
<b>Slika 18:</b> Kemijska reakcija luminola s superoksidnim radikalnim anionom (Voicescu in sod., 2006).....	17
<b>Slika 19:</b> Sestavni deli aparata HPLC (Sepčić in sod, 1997).....	20
<b>Slika 20:</b> Princip delovanja HPLC (Sepčić in sod, 1997).....	20
<b>Slika 21:</b> Reverzna faza; HPLC-ESI-MS (Aldstadt in Ammerman, 2005) .....	22
<b>Slika 22:</b> Naprava za izvajanje SPE (Supelco, 1998).....	23
<b>Slika 23:</b> Plodovi šipka, obrani 25.09.2008 na severni (levo) in južni (desno) strani grma....	32
<b>Slika 24:</b> Plodovi šipka, obrani 27.10.2008 na severni (levo) in južni (desno) strani grma....	32
<b>Slika 25:</b> Plodovi šipka, obrani 01.12.2008 na severni (levo) in južni (desno) strani grma....	33
<b>Slika 26:</b> Odvisnost absorbance ( $\lambda=746$ nm) od koncentracije klorogenske kisline, raztopljene v 2 % metafosforni kislini (MFK), ob prisotnosti F-C reagenta .....	34
<b>Slika 27:</b> Koncentracija skupnih fenolov v plodovih šipka, obranih na severni in južni strani grma in ekstrahiranih v 2 % metafosforni kislini (MFK).....	34
<b>Slika 28:</b> Koncentracija skupnih fenolov v plodovih šipka, obranih na severni in južni strani grma in ekstrahiranih v metanolu.....	35
<b>Slika 29:</b> Koncentracija skupnih fenolov v plodovih šipka, obranih na severni in južni strani grma ter ekstrahiranih v 2 % metafosforni kislini (MFK) in v metanolu .....	36
<b>Slika 30:</b> Odvisnost absorbance ( $\lambda=517$ nm) od koncentracije klorogenske kisline, raztopljene v 2 % metafosforni kislini (MFK), ob prisotnosti radikala DPPH' .....	38
<b>Slika 31:</b> Odvisnost absorbance ( $\lambda=517$ nm) od koncentracije klorogenske kisline, raztopljene v metanolu, ob prisotnosti radikala DPPH' .....	38
<b>Slika 32:</b> Antioksidativni potencial (AOP), izmerjen z metodo za določanje antioksidativnega potenciala z radikalom DPPH', v plodovih šipka, obranih na severni in južni strani grma in ekstrahiranih v 2 % metafosforni kislini (MFK) .....	39
<b>Slika 33:</b> Antioksidativni potencial (AOP), izmerjen z metodo za določanje antioksidativnega potenciala z radikalom DPPH', v plodovih šipka, obranih na severni in južni strani grma in ekstrahiranih v metanolu .....	40
<b>Slika 34:</b> Antioksidativni potencial (AOP), izmerjen z metodo za določanje antioksidativnega potenciala z radikalom DPPH', v plodovih šipka, obranih na severni in južni strani grma ter ekstrahiranih v 2 % metafosforni kislini (MFK) in v metanolu .....	41

<b>Slika 35:</b> Odvisnost časa inhibicije luminescence od koncentracije klorogenske kisline, raztopljene v 2 % metafosforni kislini (MFK) .....	43
<b>Slika 36:</b> Antioksidativni potencial (AOP), izmerjen z luminescenčno metodo, v plodovih šipka, obranih na severni in južni strani grma in ekstrahiranih v 2 % metafosforni kislini (MFK).....	43
<b>Slika 37:</b> Antioksidativni potencial (AOP) v plodovih šipka, izmerjen z luminescenčno metodo, obranih na severni in južni strani grma in ekstrahiranih v metanolu .....	44
<b>Slika 38:</b> Antioksidativni potencial (AOP) v plodovih šipka, izmerjen z luminescenčno metodo, obranih na severni in južni strani grma ter ekstrahiranih v 2 % metafosforni kislini (MFK) in v metanolu.....	45
<b>Slika 39:</b> Zveza med skupnimi fenoli, določenimi s spektrofotometrično metodo s Folin-Ciocalteaujevim reagentom ( $c_{F-C}$ ) in antioksidativnim potencialom, izmerjenim z metodo za določanje antioksidativnega potenciala z radikalom DPPH <sup>•</sup> ( $AOP_{DPPH}^{\bullet}$ ) v vzorcih, ekstrahiranih v 2 % metafosforni kislini (MFK) in v metanolu.....	47
<b>Slika 40:</b> Zveza med skupnimi fenoli, določenimi s spektrofotometrično metodo s Folin-Ciocalteaujevim reagentom ( $c_{F-C}$ ), in antioksidativnim potencialom, izmerjenim z luminescenčno metodo ( $AOP_{luminol}$ ) v vzorcih, ekstrahiranih v 2 % metafosforni kislini (MFK) in v metanolu.....	47
<b>Slika 41:</b> Zveza med antioksidativnim potencialom, izmerjenim z metodo za določanje antioksidativnega potenciala z radikalom DPPH <sup>•</sup> ( $AOP_{DPPH}^{\bullet}$ ), in antioksidativnim potencialom, izmerjenim z luminescenčno metodo ( $AOP_{luminol}$ ) v vzorcih, ekstrahiranih v 2 % metafosforni kislini (MFK) in v metanolu .....	48
<b>Slika 42:</b> HPLC/ESI(–)/MS kromatogram standardne raztopine mešanice fenolnih spojin ...	49
<b>Slika 43:</b> Signal elaginske kisline v odvisnosti od njene koncentracije .....	50
<b>Slika 44:</b> Signal luteolina v odvisnosti od njegove koncentracije .....	50
<b>Slika 45:</b> Signal naringenina v odvisnosti od njegove koncentracije .....	51
<b>Slika 46:</b> Signal galangina v odvisnosti od njegove koncentracije .....	51
<b>Slika 47:</b> Signal krizina v odvisnosti od njegove koncentracije .....	52
<b>Slika 48:</b> Signal kvercetina v odvisnosti od njegove koncentracije .....	52
<b>Slika 49:</b> Signal kamferola v odvisnosti od njegove koncentracije .....	53
<b>Slika 50:</b> Signal apigenina v odvisnosti od njegove koncentracije .....	53
<b>Slika 51:</b> Signal pinocembrina v odvisnosti od njegove koncentracije .....	54
<b>Slika 52:</b> HPLC/ESI(–)/MS kromatogram plodov šipka, obranih 25.09.2008 na severni strani grma. Za identifikacijo vrhov glej preglednico 4 .....	54
<b>Slika 53:</b> HPLC/ESI(–)/MS kromatogram plodov šipka, obranih 27.10.2008 na severni strani grma. Za identifikacijo vrhov glej preglednico 4 .....	55
<b>Slika 54:</b> Masni delež posameznih fenolnih kislin in flavonoidov v plodovih šipka, obranih na severni strani grma in ekstrahiranih v metanolu .....	56
<b>Slika 55:</b> Odvisnost površine vrha od koncentracije askorbinske kisline, raztopljene v 2 % metafosforni kislini (MFK) .....	57
<b>Slika 56:</b> Vsebnost AA v plodovih šipka, obranih na severni in južni strani grma in ekstrahiranih v 2 % metafosforni kislini (MFK).....	58
<b>Slika 57:</b> Vsebnost skupnega vitamina C (AA+DHA) v plodovih šipka, obranih na severni in južni strani grma in ekstrahiranih v 2 % metafosforni kislini (MFK) in dodanim TCEP.....	58
<b>Slika 58:</b> Vsebnost askorbinske kisline (AA) in skupnega vitamina C (AA+DHA) v plodovih šipka, obranih na severni in južni strani grma in ekstrahiranih v 2 % metafosforni kislini (MFK).....	59

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AA	askorbinska kislina
AOP	antioksidativna aktivnost
APCI	kemijska ionizacija pri atmosferskem tlaku
APPI	fotonizacija pri atmosferskem tlaku
ArO <sup>•</sup>	fenoksil
BHA	3-terciarni butil-4-hidroksi anizol
BHT	6-diterciarni butil-p-hidroksi toluen
DHA	dehidroaskorbinska kislina
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DPPH <sup>•</sup>	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
EC <sub>50</sub>	koncentracija učinkovitosti
ESI	ionizacija z razprševanjem
F-C	Folin-Ciocalteau
HO <sup>•</sup>	hidroksil
HO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	hidroperoksil
HO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	peroksidni ion
HRP	hrenova peroksidaza
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HPLC/MS	visokotlačna tekočinska kromatografija/masna spektrometrija
MFK	metafosforna kislina
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	superoksidni anion
PG	propil galat
RO <sup>•</sup>	alkoksil
ROO <sup>•</sup>	alkilperoksil
SPE	ekstrakcija na trdni fazni
TBHQ	2-terciarni butil-hidrokinon
TCEP	tris (2-karboksietil) fosfin

t-RNA      transkripcijska ribonukleinska kislina

## 1 UVOD

V organizmu nastajajo zelo škodljivi prosti radikali, ki uničujejo encime, beljakovinske molekule in celo celice. Nastanek prostih radikalov se poveča ob večjih obremenitvah, stresih ali kadar zaužijemo veliko maščob. Iz okolja pa prihajajo v organizem tudi z onesnaženo vodo, zrakom in hrano, z zdravili, sevanji itn.

S hrano in pijačo prispeje v organizem tudi antioksidanti, ki skupaj z zaščitnimi encimi v telesu (superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza) oblikujejo učinkovit sistem zaščite organizma pred aterosklerozo, rakom, katarakto, artritisom, pred drugimi kroničnimi boleznimi in pred pospešenim staranjem (Pokorn, 2003).

Antioksidativni potencial sadja, zelenjave in zelišč je seštevek sinergističnih prispevkov posameznih antioksidantov, kot sta vitamin C in E, polifenoli, karotenoidi, terpenoidi, sledovi mineralov (Zn, Cu, Se).

Z dietetičnega vidika so količinsko najpomembnejši polifenoli, sledijo jim vitamini in karotenoidi. Priporočen dnevni vnos polifenolov je približno 1 g, vitaminov 110 mg in 9,4 mg karotenoidov.

Med zorenjem se vsebnost antioksidantov v živilu spreminja. To je posledica lege, podnebnih sprememb (Pérez-Jiménez, 2008).

Šipek (*Rosa canina* L.) je znan po visoki vsebnosti polifenolnih komponent, ki so najbolj razširjeni antioksidanti v naši prehrani. Dobro je poznan tudi po zelo visoki vsebnosti vitamina C (300-4000mg/100g) (Ercisli, 2007).

Ker zaenkrat ni narejenih sistematičnih analiz vpliva zorenja in lege šipkovih plodov na vsebnost antioksidantov, je bil to osnovni cilj diplomskega dela.

### 1.1 NAMEN DELA

- ugotoviti vpliv zorenja (med septembrom in decembrom) in položaja plodov na grmu (sever in jug) na antioksidativni potencial (AOP) in vsebnost skupnih fenolov v plodovih šipka z uporabo treh metod (luminescenčna, DPPH<sup>•</sup>, Folin-Ciocalteau)
- določiti vsebnosti vitamina C (tako askorbinske kisline kot dehidroaskorbinske kisline) v vseh vzorcih s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC)
- opraviti kvalitativno in kvantitativno določitev polifenolov v vseh vzorcih s sistemom HPLC, sklopljenim z masnim spektrometrom (MS)
- ugotoviti, kako način ekstrakcije (ekstrakcija z 2 % metafosforno kislino (MFK) in z metanolom) vpliva na določitev AOP

### 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- pričakujemo, da se bo AOP, vsebnost skupnih fenolov, vitamina C in posameznih polifenolnih spojin v plodovih šipka med zorenjem od septembra do decembra spreminala
- pričakujemo, da bodo vsebnosti posameznih in skupnih antioksidantov v plodovih šipka pri zadnjem obiranju višje kot pri prvem obiranju

- pričakujemo, da na vsebnosti posameznih in skupnih antioksidantov poleg zorenja vpliva tudi položaj plodov na grmu (severna in južna stran)
- pričakujemo, da zorenje in položaj plodov na grmu vplivata na vsebnost bolj polarnih (ekstrakcija z 2 % MFK) in manj polarnih (ekstrakcija z metanolom) antioksidantov v plodovih šipka

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ZDRAVILNE RASTLINE

Zdravljenje bolezni z uporabo zdravilnih rastlin sega daleč v začetke človeške civilizacije. Tudi danes so zdravilne rastline za zdravljenje zelo priljubljene, saj uporaba alternativnih metod zdravljenja po svetu narašča (Kac in Mlinarič, 2004).

Zdravilne rastline so pomožna zdravilna sredstva. Mednje ne uvrščamo zgolj tistih nekaj zelišč, ki jih kupimo v lekarni in iz njih naredimo čaje. V Sloveniji velja, da so zdravilne rastline zdravila, ki so izključno rastlinskega izvora in ki učinkovino vsebujejo v nadzemnih ali podzemnih delih rastlin ali drugem rastlinskem materialu ali v njihovi kombinaciji v surovem ali predelanem stanju v ustrezni farmacevtski obliki (Klemenc-Ketiš in Verovnik, 2004).

Znano je, da sta rast in razvoj vseh rastlin odvisna od trajanja osvetljevanja ter od kvalitete in kvantitete svetlobe, ki ji je rastlina izpostavljena. Vsebnost antioksidantov v rastlinah je zelo odvisna tudi od spremjanja temperatur med zorenjem rastline. Prav tako so tudi po žetvi oz. obiranju rastlin, zelo pomembni pogoji skladiščenja (čas, temperatura, atmosfera) in obdelava (rezanje, čas in temperatura izpostavljenosti dela rastline zunanjim dejavnikom) (Pérez-Jiménez in sod., 2008).

#### 2.1.1 Šipek (*Rosa Canina* L.)

##### Zgodovina

V literaturi se za poimenovanje divjega šipka pogosto uporablja kar ime vrtnica. Vrtnice verjetno izvirajo iz Perzije in so v 7. st. pr. n. št. prišle v Grčijo in Italijo. Germani so poznali samo divje šipke. že od antike pa so bile vrtnice simbol ljubezni in prispodoba ženske in v umetnosti ter literaturi široko razširjene. V sr. Evropi je bil šipek najprej zdravilna rastlina. že od 10. ali 11. st. pa je bil znan tudi kot vrtna okrasna rastlina. Rožna voda je bila v zgodnjem sr. veku eden od prvih destilacijskih produktov. Rožne ekstrakte so uporabljali za mazila, parfume, sirupe in slaščice.

Število vzgojenih oblik vrtnic se je od štirih sort v 13. st. povečalo na okoli 5000 sort na koncu 19. st.

##### Klasifikacija

Šipek uvrščamo v rod iz družine višjih rožnic (Rosaceae) z več kot 100 vrstami v mnogih oblikah.

Med najvažnejše domače divje vrste (v Sloveniji jih je 22) spadajo: bodičasti šipek (*Rosa pimpinellifolia*), njivni šipek (*Rosa arvensis*), hostni šipek (*Rosa dumetorum*), navadni šipek (*Rosa canina*), žametni šipek (*Rosa sherardii*), rjasto rdeči šipek (*Rosa rubiginosa*), cimetov šipek (*Rosa majalis*) in francoski šipek (*Rosa gallica*) (Praprotnik, 2002).

##### Opis

Šipek je do 3 metre visok bodičast grm. Njegove veje so sprva pokončne, nato pa se kmalu povesijo. Na vseh poganjkih so številne ostre in nazaj upognjene bodice. Listi imajo nazobčan rob in so neporno pernato deljeni, največkrat v 5 do 7 lističev. Spodnji del listnega peclja je

dvostransko krilato razširjen. Šipek običajno bogato cveti belo ali v različnih rdečih odtenkih. Cvetovi se nahajajo na koncih kratkih stranskih vej, posamično ali v socvetjih in imajo rahel, a prijeten vonj. Po oploditvi se cvetišče (cvetna os) mesnato odebeli in postane bleščeče rdeče. V notranjosti te mesnate tvorbe se razvijejo številni oreškasti plodiči, porasli z bodečimi, ščetinastimi dlačicami. Zrel šipek je torej navidezen birni plod, sestavljen iz omesenelega cvetišča (meso šipka) in drobnih plodov, ki jih imajo nestrokovnjaki za semena.

Cvetenje: Od junija do julija.

Nahajališča: Šipek uspeva v suhih gozdovih, na kamnitih pobočjih, med grmovjem, v živih mejah, ob poteh in po gozdnih obronkih.

Nabiranje: Šipek zori od septembra dalje in takrat nabiramo rdeče plodove, ki jih moramo pred sušenjem razrezati. Če želimo, lahko plodiče ločimo od mesnatega dela, vendar moramo oboje kar najhitreje posušiti. To lahko opravimo tudi z umetno toploto, vendar temperatura ne sme biti prek 40 °C. Posušene dele shranimo v neprodušno zaprtih posodah, sicer se učinkovine hitro razgradijo (Pahlow, 1987).



Slika 1: Primer cveta šipka (Johnson in Campbell, 2007)

## Zdravilnost

Šipek je znan po visoki vsebnosti polifenolnih komponent, ki so najbolj razširjeni antioksidanti v naši prehrani in delujejo antioksidativno, antimutageno, antikarcinogeno. Temno obarvani plodovi, so torej dober vir fenolov, kot so flavonoidi, antocianini in karotenidi.

Naslednja zdravilna lastnost šipka je, da vsebuje esencialne maščobne kisline, ki jih človeško telo ne more sintetizirati. Izvor dolgih polinenasičenih maščobnih kislin so linolenske, linolne in oleinske maščobne kisline. Le-te regulirajo številne telesne funkcije, kot so krvni tlak, viskoznost krvi, imunska odzivnost. Glavna maščobna kislina v šipku je α-linolenska, sledita palmitinska in linolna kislina.

Šipek je dobro poznan tudi po najvišji vsebnosti vitamina C (300-4000 mg/100 g). Poleg slednjega vsebuje tudi ostale vitamine (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, K, P) in minerale, karotenoide (provitamin A), tokoferole, bioflavonoide, sadne kisline, tanine, pektin, sladkorje, organske kisline, aminokisline in esencialna olja. Te komponente igrajo pomembno vlogo pri določanju kvalitete šipka in njegove hrnilne vrednosti (Ercisli, 2007).

## Uporaba

Šipek ima številne protivnetne in terapevtske učinke zoper številne bolezni, kot so artritis, revmatizem, vnetje sklepov in išias. Blagodejno deluje pri vročinskih boleznih, pri mrzlici in infekcijskih boleznih (gripi). Pomaga pri gastrointestinalnih težavah, in sicer ureja prebavo, preprečuje vnetje črevesne sluznice in pojav črevesnega ulkusa ter hemeroidov. Pomaga tudi pri boleznih ledvic in urinarnega trakta. Korenine in liste rastline pa uporabljajo za zdravljenje bronhitisa (Orhan in sod., 2007).

Zaradi številnih vitaminov in drugih učinkov je šipek zelo uporabna zdravilna rastlina. Šipkov čaj ni le okusen, ampak je zelo koristen kot preventivno sredstvo, ker poveča obrambne sposobnosti organizma. To je predvsem zasluga vitamina C, ker ima le-ta odločilno vlogo pri delovanju imunskega sistema. Poleg tega je vitamin C nujno potreben za pravilno delovanje nadledvičnih žlez, ki so življenjsko pomemben proizvajalec različnih hormonov. Pomanjkanje tega vitamina pa upočasni tudi celjenje ran (Pahlow, 1987). Pomaga tudi pri odpravljanju menstrualnih težav in uravnava periode menstrualnega ciklusa (Nojavan in sod., 2008).

Zaradi omenjenih razlogov je zelo priporočljivo uživanje šipkovega čaja, saj telesu pomaga premagati zlasti splošno oslabelost ter razne infekcijske in vročinske bolezni. Šipek vsebuje tudi dosti sadnih kislin in pektine. Zaradi teh snovi deluje tudi blago odvajalno, zato ga mnogi priporočajo kot dodatek raznim čajem (Pahlow, 1987).



Slika 2: Plodovi šipka (Whittle, 2008)

## 2.2 ANTIOKSIDANTI

### 2.2.1 Prosti radikali

Prosti radikali so nestabilne in zelo reaktivne oblike spojin, ki vključujejo enega ali več neparnih elektronov. V celici nastajajo v normalnih metaboličnih procesih in pri izpostavitvi zunanjim virom oksidacije, kot je npr. cigaretni dim, različni polutanti – organska topila, pesticidi in UV svetloba (Batič in Raspor, 2000).

Pomembna je njihova vloga pri staranju, degenerativnih boleznih, raku, ishemiji, kardiovaskularnih boleznih, aterosklerozi, zmanjšani imunski odzivnosti, Alzheimerjevi, Parkinsonovi in Chronovi bolezni, pri sladkorni bolezni, katarakti, bolezni jeter in ledvic, pri zastrupitvah, pri fizičnih obremenitvah in pri prehrani, v kateri primanjkuje naravnih antioksidantov (vitaminov A, C, E,  $\beta$ -karotena, flavonoidov, itd.), aminokislin (cistina, cisteina, glutationa) ter elementov v sledovih (Se, Zn, Mn, Cu) (Korošec, 2000).

Veliko molekularnega kisika, ki se porablja med aerobnim intracelularnim metabolizmom celice reducirajo do  $H_2O$ . Ta redukcija poteka v mitohondriju, kjer citokrom oksidaza prenaša štiri elektrone  $O_2$ , kar vodi v nastanek reaktivnih kisikovih spojin – prostih radikalov: superoksidnega aniona,  $O_2^{\cdot-}$ , hidroperoksil radikala,  $HO_2^{\cdot}$ , peroksidnega iona,  $HO_2^-$ , vodikovega peroksiда,  $H_2O_2$ , hidroksil radikala,  $HO^{\cdot}$ , alkoksilnega radikala,  $RO^{\cdot}$ , alkilperoksilnega radikala,  $ROO^{\cdot}$ , fenoksilnega radikala,  $ArO^{\cdot}$  in drugih. Slednji delujejo znotraj celice in tudi zunajcelično in povzročajo različne poškodbe DNA, proteinov, lipidov in celičnih membran (Batič in Raspor, 2000).

## 2.2.2 Oksidativni stres

Človeške, živalske in rastlinske celice so venomer izpostavljene različnim spremembam, ki povzročijo oksidativni stres. Take spremembe so endogenega in eksogenega izvora. Oksidativni stres se v bioloških sistemih pokaže potem, če je bil sistem dalj časa izpostavljen oksidantom ali če je prišlo do zmanjšanja antioksidativne sposobnosti organizma ali obeh (Abram, 2000).

V teh procesih kisikove molekule izgubljajo elektrone, kar povzroči nestabilno molekulo (prosti radikal) in s tem oksidativni stres. Prosti radikali napadejo zdrave celice v telesu, da bi našle prosti elektron za svojo stabilizacijo. Ta proces lahko povzroči okvare v zdravih celicah (Raspor in sod., 2000).

Oksidativni stres je večkrat povezan ali pa vodi v nastanek reaktivnih zvrsti kisika – prostih radikalov, opisanih v poglavju 2.2.1.

Oksidativni stres preprečujejo antioksidanti z lovljenjem prostih radikalov, s keliranjem kovinskih ionov, z odstranjevanjem in/ali popravilom oksidativno poškodovanih biomolekul (Korošec, 2000).

## 2.2.3 Delitev antioksidantov

V našem organizmu sta po izvoru dve vrsti antioksidantov: endogeni in eksogeni. Endogene antioksidante tvori naš organizem, eksogene pa dobimo s hrano. Meja med obojimi ni ostra, saj moramo tudi nekatere esencialne elemente kot endogene antioksidante, na primer selen, dobiti s hrano. Ugotovljena je povezava med eksogenimi antioksidanti hrane in med zaščito pred boleznimi srca in ožilja, nastankom raka in drugimi boleznimi, povezanimi z oksidativnim stresom v organizmu (Kreft in sod., 2000).

Druga, bolj specifična delitev, pa deli antioksidante na primarne, sekundarne in terciarne.

Primarni antioksidanti nastajajo v organizmu ali jih tvorijo mikroorganizmi, to so predvsem encimi, superoksid mutaza, glutation peroksidaza, caeruloplazmin. Njihova vloga je preprečevanje tvorbe prostih radikalov.

Sekundarni antioksidanti nevtralizirajo novotvorjene proste radikale in preprečujejo, da bi vstopali v verižne reakcije in tvorili nove proste radikale. Skupina je zelo obsežna, sem spadajo vitamini C, E, karoten, albumini, polifenoli, nekateri mikrobeni polisaharidi, nekateri flavoni in flavonoidi. Z ustreznim uživanjem le-teh lahko vzpostavimo ravnotežje v organizmu in preprečimo nastanek s tem povezanih bolezni. Hrana s prisotnimi naravnimi antioksidanti predstavlja stalno zaščito organizma pred oksidacijskimi procesi.

Tertiarni antioksidanti so snovi, ki popravljajo poškodbe, ki jih povzročajo prosti radikali v strukturi celice (encimi, ki »popravljajo« poškodbe DNA; metionin sulfoksid reduktaza) (Kovač in sod., 2000).

#### **2.2.4 Lastnosti in mehanizem antioksidativnega delovanja**

Spojine, ki so antioksidanti, preprečujejo oksidacijo snovi. Oksidacijo, ki je verižna reakcija, povzročajo oksidanti in radikali. Kako preprečujejo antioksidanti oksidacijo, je odvisno od vrste antioksidanta. Antioksidanti so lahko encimski ali neencimski sistemi, topni v vodi ali maščobah. Pri oksidaciji lahko odigrajo preventivno vlogo na dva načina (Abram, 2000).

- Najpogosteje antioksidant poseže v reakcijo avtooksidacije s tem, da hitro odda vodikov atom radikalu, ki bi sicer omogočil tvorbo peroksidnih radikalov. Nastali produkt mora biti bolj stabilen kot sam radikal (Raspor in sod., 2000).
- Antioksidant pa lahko onesposobi prosti radikal tudi s prenosom posameznega elektrona.

Prenos vodikovega atoma in prenos posameznega elektrona morata vedno nastopiti paralelno, a z različno hitrostjo (Wright in sod., 2001).

Učinkovitost antioksidantov je odvisna od redukcijskega potenciala radikala z enim elektronom manj kot starševska spojina. Čeprav je redukcijski potencial glavni faktor pri tem, kako učinkovita bo neka spojina kot antioksidant, se je pokazalo, da k celotni učinkovitosti prispevajo tudi druge fizikalnokemijske značilnosti. Tako je važna polarnost ali nepolarnost same spojine in iz tega izvirajoča porazdelitev antioksidanta med polarnim in nepolarnim medijem in kako dobro se določen antioksidant absorbira v organizmu. Učinkovitost antioksidantov je tem večja, čim manjša je jakost vezi A-H. Pri tem nastali radikal ne sme sprožiti novih radikalnih reakcij, niti se hitro oksidirati (Abram, 2000).

#### **2.2.5 Viri in vrste antioksidantov**

Največja in najnatančnejša analiza vsebnosti antioksidantov, opravljena v običajnih hranih, kot sta sadje in zelenjava, sedaj kaže, da antioksidante najdemo tudi v manj običajnih živilih, kot so razne vrste fižola, artičoke in celo v krompirju.

Študija nadalje razkriva, da so oreški in začimbe, kot so strte nageljne žbice, cimet in origano, bogate z antioksidanti, čeprav jih na splošno uživamo v manjših količinah kot sadje in zelenjavno.

Najvišje med preiskovanimi vrstami sadja so se uvrstile brusnice, borovnice in robide. Med proučevano zelenjavno pa imajo najvišjo vsebnost antioksidantov fižol, artičoke in krompir.

Prvi trije v kategoriji oreškov so bili pekan oreški, orehi in lešniki. Zdrobljene nageljne žbice, cimet in origano pa med začimbami (Wu, 2004).

Glede na izvor delimo antioksidante na naravne in sintetične.

Najpomembnejši naravni antioksidanti so fenolne spojine, askorbinska kislina, citronska kislina, tokoferoli, flavonoidi, karotenoidi, ekstrakti nekaterih začimb (žajbelj, rožmarin) in drugi.

Najpogosteji sintetični fenolni antioksidanti so: butil hidroksi anisol (BHA, E320), butil hidroksi toluen (BHT, E321), propil galat (PG, E310), terc-butil hidrokinon (TBHQ) in drugi.

BHA in BHT sta si zelo podobna in sta dobra antioksidanta za živalske maščobe, manj učinkovita sta v rastlinskih oljih. Stabilna sta v procesih obdelave živil.

Propil galat je učinkovit antioksidant za rastlinske in živalske maščobe, za mesne izdelke, t.i. snack proizvode in drugo.

TBHQ je novejši antioksidant in je zelo učinkovit v rastlinskih oljih.

Sintetični antioksidanti se običajno uporabljajo v kombinaciji, saj se tako njihov učinek še poveča. So mnogo cenejši, vendar je zaradi toksičnosti nekaterih pri uporabi potrebna pazljivost. Butil hidroksi toluen (BHT) in butil hidroksi anizol (BHA) sta močna sintetična antioksidanta, vendar obstaja sum, da vsebujejo določene substance, ki povzročajo raka (Skvarča, 2000).

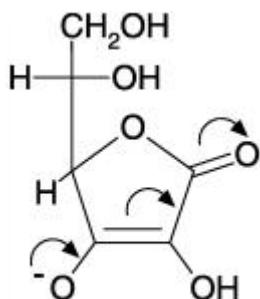
V današnjem času prihajajo v ospredje naravni antioksidanti, predvsem zaradi zdravstvene oporečnosti in toksičnosti nekaterih sintetičnih antioksidantov.

#### 2.2.5.1 Vitamin C

Vitamin C ali askorbinska kislina (AA) je vodotopen vitamin, brez vonja, s kemijsko formulo  $C_6H_8O_6$ . V reverzibilni reakciji se lahko oksidira in tvori dehidroaskorbinsko kislino (DHA).

Pomembnost vitamina C so prvič odkrili leta 1747. Je zelo pomemben vodotopen antioksidant v človeškem organizmu. Poleg nekaj ostalih vrst tudi ljudje potrebujemo encim, ki pretvori glukozo v vitamin C. Vitamin oddaja elektrone in s tem prekine verižno reakcijo maščobno peroksidacijo. Vodotopne lastnosti vitamina »ustavijo« proste radikale še preden ti prispejo do celičnih membran. Vitamin C je pomemben pri kolagenski tvorbi in posledično pri stabilizaciji peptidov. Neposredno ima AA pomembno regulacijsko vlogo skozi celo telo in je vključena v sintezo hormonov, hormon-sproščajočih faktorjev in nevrotransmiterjev.

Izbor živil, ki vsebujejo vitamin C, je zelo obsežen. Splošno je znano, da so najboljši vir vitamina C citrusi, kot so pomaranče in njihovi sokovi. Širok izbor ostalih živil prav tako vsebuje zadosten delež vitamina C, na primer ananas, sladka paprika, brokoli, brstični ohrov, cvetača, črni ribez, in šipek. Od naštetih živil vsebuje šipek največ vitamina C, torej plodove grma uporabljam v različne preventivne namene (Nojavan, 2008).



Slika 3: Strukturna formula askorbinske kisline (Linster in Van Schaftingen, 2007)

#### 2.2.5.2 Karotenoidi in vitamin A

Karotenoidi so zelo razširjeni rastlinski pigmenti. Najdemo jih v membranah kloroplastov v vseh zelenih tkivih in v stromi kromoplastov v rumeno, oranžno in rdeče obarvanih tkivih. Karotenoidi v kromoplastih služijo za privabljanje oprševalcev in raznašalcev semen in plodov. V kloroplastu pa imajo pomembno vlogo pri fotosintezi. Najdemo pa jih tudi v živalskem tkivu, kjer imajo vlogo antioksidantov ali imunomodulatorjev, antimutagenih in tumor-preprečevalnih agensov. Karotenoide uporabljajo v medicini in kozmetiki, prav tako pa je dobro poznana tudi njihova uporaba v živilstvu (barvila, antioksidanti) (Hodisan in sod., 1997).

Večina višje razvitih rastlin vsebuje naslednje karotenoide:  $\beta$ -karoten, lutein, violaksantin in neoksantin, ter manjše količine zeaksantina, anteraksantina in  $\alpha$ -karotena (Šircelj, 2008).

Karotenoidi so močno nenasičeni derivati izoprena. Ker se na dvojnih vezeh lahko pojavi cis-trans izomerija, so možne številne oblike. Navadno imajo obliko izomerov, v katerih imajo vse dvojne vezi trans-konfiguracijo.

Pravi karotenoidi in ksantofili imajo 40 ogljikovih atomov: to ustreza 8 izoprenovim ostanikom. Odkrili so, da je mevalonska kislina važen prekurzor. Rastlinski encimi jo spremene v karotenoide (Karlson, 1980).

Za nas je eden najpomembnejših oranžnih karotenoidov  $\beta$ -karoten in se nahaja npr. v kromoplastih v korenini korenja in je prekurzor vitamina A. Med presnovo v človeškem organizmu molekula  $\beta$ -karotena razпадa na dve enaki polovici, ki se imenujeta vitamin A ali retinol. Z oksidacijo se retinol pretvori v retinal. Retinal se v očesni mrežnici vgradi v protein, s katerim zaznavamo svetlobo (Vilhar, 2005).

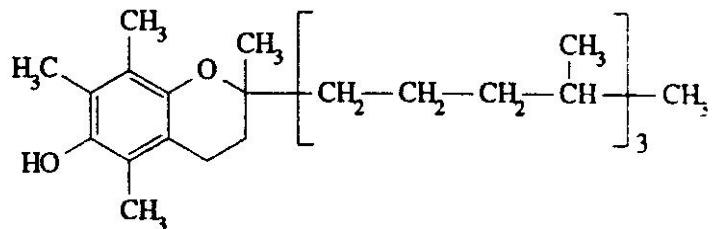
Slika 4: Strukturna formula  $\beta$ -karotena (Kiokias in sod., 2008)

### 2.2.5.3 Tokoferoli

Tokoferoli se nahajajo v bioloških materialih, živilih in živalski krmi. Prisotni so v različnih oblikah (alfa, beta, delta, gama tokoferol) in imajo vitaminsko in antioksidacijsko delovanje. Obstajajo različni tokoferoli, ki se razlikujejo po številu metilnih skupin. Najboljše antioksidacijsko delovanje ima delta-tokoferol, najboljše vitaminsko pa  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E).

Naravni tokoferoli se nahajajo v rastlinskih tkivih, zlasti veliko jih vsebujejo rastlinska olja (več kot 3000 ppm). Dober vir tokoferolov so predvsem sojino in palmino olje ter olje pšeničnih kalčkov.

Poleg tega, da vitamin E preprečuje oksidativno poškodbo celičnih membran, pomaga tudi pri zaščiti drugih aktivnih komponent, npr. vitamina A, hormonov, ubikinona, encimov (Belitz in sod., 1999). Antioksidativno delovanje tokoferolov je odvisno od temperature, saj je pri nižjih temperaturah (20 do 60 °C) učinkovito pri alfa tokoferolu, temu sledijo gama > beta > delta tokoferol. Medtem ko je pri višjih temperaturah (80 do 120 °C) učinkovitost naslednja: delta > gama > alfa > beta tokoferol. Negativne posledice na antioksidativno delovanje imata visoka temperatura in prisotnost kisika ter kovin (Skvarča, 2000).



Slika 5: Strukturna formula  $\alpha$ -tokoferola (vitamin E) (Schröter in sod., 1993)

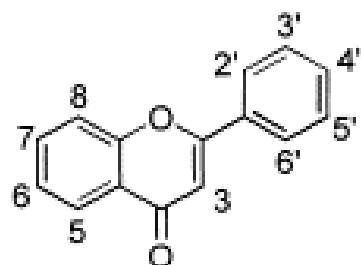
### 2.2.5.4 Polifenoli

Polifenoli vsebujejo več  $-\text{OH}$  skupin, ki so vezane neposredno na aromatsko jedro. Na aromatskem jedru so lahko poleg  $-\text{OH}$ -skupin vezane tudi stranske verige (Schröter in sod., 1993). Polifenoli so sekundarni rastlinski metaboliti, poznamo jih več vrst (Hribar in sod., 2001):

- hidroksibenzojske kislina (klorogenska kislina v aroniji in slivah ter elagična kislina v jagodah),
- flavani (catehin in epicatehin v zelenem čaju in jabolkih),
- antocianidini (cianidin v križancih med malino in robido in v bezgovih jagodah, malvidin v rdečem grozdju),
- dihidrokalkoni (floridzin v jabolkih),
- flavononi (hesperidin, naringin, eriocitrin v citrusih),
- flavonoli (kvercetin v kutini in bezgu, miricetin v brusnicah),
- resveratrol, ki se nahaja v rdečih vinih in grozdnem soku.

Zaradi pestrosti in razširjenosti so rastlinski fenoli ena izmed najpomembnejših skupin naravnih antioksidantov. Imajo veliko skupnih bioloških in kemijskih lastnosti, imenovane antioksidativna aktivnost. Imajo sposobnost razvrščanja aktivnih kisikovih vrst in elektrofilov. Ovirajo tudi nitrozaminacijo in kelacijo kovinskih ionov, ki so potencialni za pojav avtooksidacije in imajo sposobnost prilagajati encimsko aktivnost posameznih celic (Robards in sod., 1999).

Ena najpomembnejših funkcij polifenolov je, da v večji koncentraciji lahko ščitijo rastline pred napadi virusov, bakterij, kvasovk in tudi rastlinojedih organizmov. Zaradi njihovega grenkega okusa izbiramo med različnimi rastlinami in med deli rastlin take, pri katerih je le-ta manj izrazit (Kreft in sod., 2000).

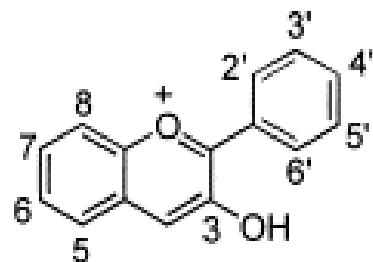


Slika 6: Osnovna struktura flavonoidov (Robards, 2003)

### Antocianidini

Antocianidine najdemo v različnih vrstah sadja in zelenjave ter zeliščih, npr. češnjah jagodah, grozdu, višnjah, jabolkih, hruškah, breskvah, rdečem in črnem ribezu, pomarančah, šipku, rdečem zelju, rdeči čebuli,... Dajejo modro, rdečo in vijoličasto barvo. Najpomembnejši in najpogostejsi med njimi so: pelargonidin, cianidin in delfinidin (Belitz in sod., 1999). Posamezni glavni tipi antocianidinov se ločijo le po številu -OH skupin na aromatskem obroču B. Antocianidini preidejo z vezavo sladkorjev na mestu 3 v antocianine (Abram in Simčič, 1997).

Barva antocianinov je odvisna od vrednosti pH medija (Belitz in sod., 1999). Občutljivi so tudi na svetlobo. Nestabilni so pod vplivom UV in vidnega dela spektra ali kateregakoli drugega ionizacijskega sevanja. Na njihovo razgradnjo v rastlinskem tkivu in spremembo barve vplivajo tudi encimi, ki se imenujejo antocianaze (glikozidaze in polifenoloksidaze) (Hendry in Houghton, 1996).



Slika 7: Osnovna struktura antocianidinov (Robards, 2003)

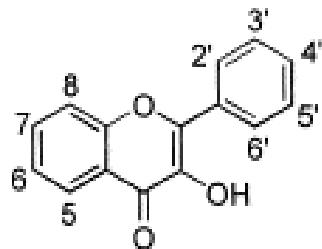
## Flavonoli in flavoni

Flavonoidi, kot predstavniki kondenziranih taninov, so kompleksne strukture, katerih temelj so enostavni fenoli oz. hidrolizabilni tanini. Osnova hidrolizabilnih taninov je galna kislina in njeni dimeri (digalna in elagova kislina), ki z esterifikacijo tvorijo kompleksnejše spojine. Flavonoidi so široko razširjeni v rastlinskem svetu, saj jih poleg v plodu najdemo tudi v lupini, listih rastlin. Izhajajo iz flavonov (2-fenilbenzopironi), derivati pa so številni, kot denimo flavanoni, izoflavanonji, kalkoni, auroni ter njihove variacije (Straže, 2000).

Pomembnejši flavonoidi v hrani so kvercetin, miricetin, kamferol, apigenin in luteolin. Od tega so prvi trije flavonoli, apigenin in luteolin pa sta flavona (Caballero in sod., 2003). Predstavljajo bledo rumene komponente rastlin (Belitz in sod.cisli, 1999).

Poleg naštetih fenolnih spojin pa pomemben delež prispevajo tudi elaginska kislina, naringenin, galangin, pinocembrin in krizin.

Dnevni vnos flavonoidov v človeški organizem v dieti zahodnoevropskih dežel je bil ocenjen na nekaj 100 mg/dan. Zato je pomembno, da uživamo te spojine vsak dan, saj je samo na ta način možno zagotoviti učinkovito zaščito pred prostimi radikali (Vrhovšek, 2001).

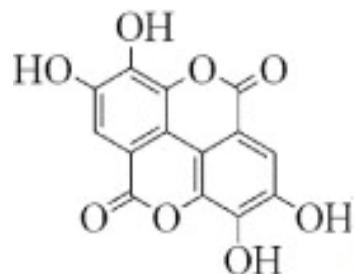


Slika 8: Osnovna struktura formula flavonolov (Robards, 2003)

## Elaginska kislina

Elaginska kislina je fenolna spojina. Številne raziskave so potrdile njeno antioksidativno, antimikrobeno, protivirozno, protivnetno in protitumororno delovanje. Njen biološki izkoristek je odvisen od njene oblike, v kateri se nahaja v organizmu, katero celica prepozna in jo uporabi. To je lahko prosta kemijska oblika ali v kombinaciji z drugo biomolekuljo. Običajno pa se elaginska kislina spoji z molekuljo sladkorja.

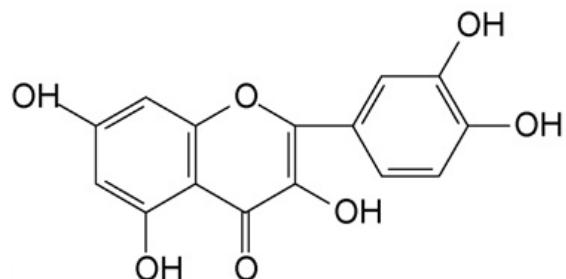
Nahaja se v grozdju, jagodah, robidah, borovnicah, šipku, orehih,... (Saucedo-Pompa in sod., 2009).



Slika 9: Struktura formula elaginske kisline (Sekiguchi in sod., 2009)

### Kvercetin

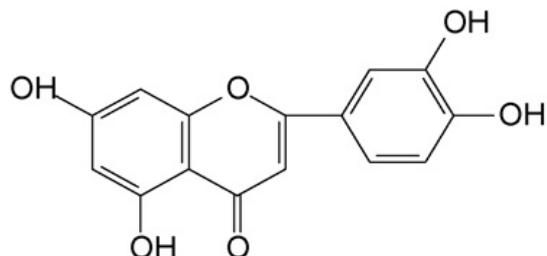
V študijah je bilo ugotovljeno, da ima kvercetin izmed vseh flavonoidov največjo aktivnost. Učinkovito delovanje mnogih zdravilnih rastlin je posledica visoke vsebnosti kvercetina. Deluje protivnetno, pri čemer inhibira začetne vnetne procese. Poleg tega je tudi močan antioksidant. Dokazano pa je bilo tudi protitumorno delovanje (Hwang in sod., 2009).



Slika 10: Strukturna formula kvercetina (Zhang in sod., 2008)

### Luteolin

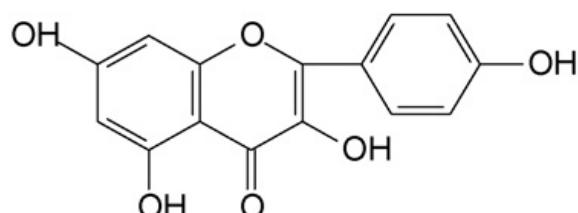
Luteolin uvrščamo v podskupino flavonov in se običajno pojavlja v glikolizirani obliki v zeleni, zeleni papriki, kamiličnem čaju,... Raziskave so potrdile njegovo antimutageno, protitumorno, protivnetno in protialergijsko delovanje. Pripisujejo mu tudi lovljenje prostih radikalov in oviranje protein kinaze C (Shimoi in sod., 1998).



Slika 11: Strukturna formula luteolina (Zhang in sod., 2008)

### Kamferol

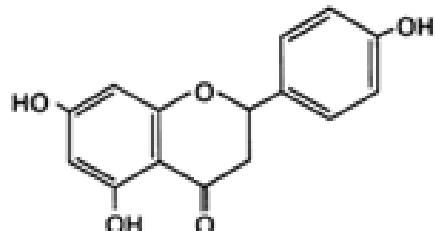
Kamferol uvrščamo v skupino flavonolov in se pojavlja v dveh oblikah in sicer glikozidni ali aglikonski. Vendar pa absorpcija te fenolne spojine v človeškem organizmu ni odvisna od njene oblike. Kemijska struktura kamferola je zelo podobna kvercetinovi in se razlikuje le po eni hidroksilni skupini v B-obroču (Ciolino in sod., 1999).



Slika 12: Strukturna formula kamferola (Zhang in sod., 2008)

### Naringenin

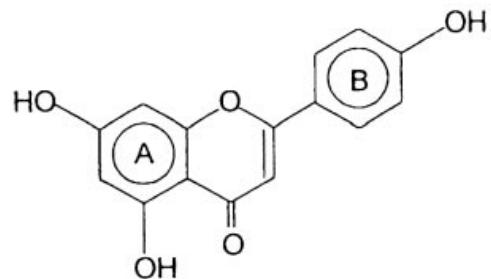
Flavanon naringenin ima antikarcinogene in antioksidativne lastnosti. Velik delež le-tega vsebujeta pomarančni sok in sok grenivke (Erlund in sod., 2001).



Slika 13: Strukturna formula naringenina (4',5,7-trihidroksiflavanon) (Fuhr in sod., 1993)

### Apigenin

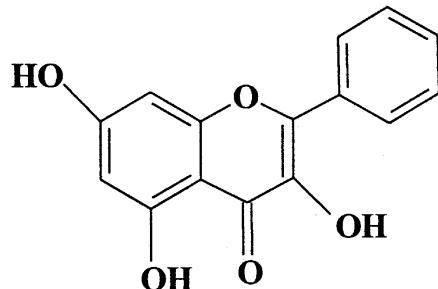
Apigenin (4',5,7-trihidroksiflavon) se nahaja v različnem sadju in zelenjavni, kot so peteršilj, čebula, pomaranče, čaji, kamilice, pšenični poganci in nekaterem sezonskem rastlinju. Raziskave so pokazale, da deluje protivnetno, antikarcinogeno in antioksidativno (Gupta in sod., 2001).



Slika 14: Strukturna formula apigenina (Gupta in sod., 2001)

### Galangin

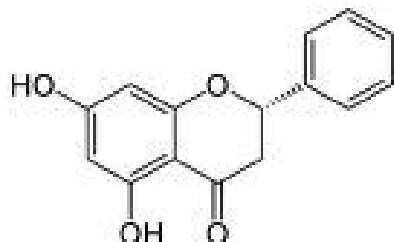
Galanginu pripisujejo številne biološke aktivnosti, kot so antimutageno, anti-klastogeno, antioksidativno delovanje in uravnavanje aktivnosti metaboličnih encimov. Raziskave so pokazale tudi njegovo antigenotoksično delovanje, kar pomeni, da bi ga lahko uporabili pri zdravljenju raka oz. že kot preventivni agens (Heo in sod., 2001).



Slika 15: Strukturna formula galangina (Heo in sod., 2001)

## Pinocembrin

Pinocembrin je tudi eden od flavonoidov kateremu posvečamo več pozornosti zaradi njegovega pozitivnega učinka na človeški organizem. Deluje protivnetno, antioksidativno, protitrombotično, antimikrobeno, protialergijsko, protivirusno, protiasmatično in kot agens proti razvoju raka (Guang in Du, 2006).



Slika 16: Strukturna formula pinocembrina (Yang in sod., 2009)

## 2.3 METODE ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDANTOV

### 2.3.1 Določanje skupne antioksidativne aktivnosti

#### 2.3.1.1 Indirektna metoda z radikalom DPPH<sup>•</sup>

Metodo z radikalom DPPH<sup>•</sup> je prvič predstavil Marsden Blois pred približno petdesetimi leti. V svojem modelu je prikazal reakcijo ene molekule DPPH<sup>•</sup> z eno molekuljo antioksidanta, kar pomeni, da je stehiometrija reakcije 1:1. Primer reakcije med radikalom DPPH<sup>•</sup> in molekuljo cisteina (RSH):



Prosti radikal RS<sup>•</sup> potem reagira z drugo molekulo iste vrste, ki je nastala z vzporedno reakcijo:



Torej sta za redukcijo dveh molekul DPPH<sup>•</sup> potrebni dve molekuli cisteina.

Metoda DPPH<sup>•</sup> je ena izmed metod za spektrofotometrično določanje antioksidativne aktivnosti in temelji na uporabi stabilnega prostega radikala difenilpikrilhidrazila (DPPH<sup>•</sup>) ( $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$ .  $M_r = 394,33$ ). Molekula 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil je karakterizirana kot stabilni prosti radikal, ki zaradi delokalizacije prostega elektrona ne tvori dimer, kot bi jih molekule v primeru z mnogimi ostalimi prostimi radikali. Kot posledica delokalizacije je tudi močna vijolična barva raztopine DPPH<sup>•</sup> v metanolu oziroma etanolu in ima absorpcijski maksimum pri približno 515 nm - 520 nm.

Ko raztopino DPPH<sup>•</sup> zmešamo s snovjo, ki lahko odda vodikov atom, se ta pretvori v reducirano obliko in obenem izgubi vijolično barvo, ostane pa bledo rumena barva zaradi prisotnosti pikrilne kisline. Če predstavimo radikal DPPH<sup>•</sup> kot Z<sup>•</sup> in donorsko molekulo kot AH, je primarna reakcija naslednja:



pri čemer je ZH reducirana oblika, A<sup>•</sup> pa je prosti radikal, ki je nastal v prvem koraku.

Eden od parametrov, ki je pomemben pri interpretaciji rezultatov, je tako imenovana koncentracija učinkovitosti oziroma EC<sub>50</sub> ali IC<sub>50</sub>. Definirana je kot koncentracija substrata, ki povzroči 50 % izgubo aktivnosti DPPH<sup>•</sup> (Molyneux, 2004). Rezultate lahko interpretiramo tudi s pomočjo umeritvene krivulje, pri čemer pazimo, da nam izmerjene absorbance vzorcev približno ustrezajo sredinskim vrednostim na umeritveni krivulji.

Metoda deluje enako, ne glede na to ali uporabljamo kot topilo etanol ali metanol. Priporočena vrednost pH prvotnih virov je bila v območju od 5,0 do 6,5, vendar je praksa pokazala, da vrednost pH nima posebne vloge pri reakciji. Koncentracijo DPPH<sup>•</sup> v kivetih izberemo v območju od 50 µM do 100 µM, da je absorbanca manj kot ena. Priporočen reakcijski čas metode je 30 minut oziroma si ga prilagodimo sami in je odvisen tudi od vsebnosti antioksidantov v našem vzorcu (Molyneux, 2004).

### 2.3.1.2 Luminescenčna metoda

Naziv luminescencija je leta 1888 vpeljal E. Wiedemann in je veljal za vse »svetlobne pojave, ki jih ne povzroča le višanje temperature«, kar je bila že uveljavljena definicija fosforescence (Gribkovskii, 1998).

Luminescencija je posledica emisije UV, vidnega ali infra-rdečega sevanja molekul ali atomov in je rezultat prehajanja elektronov iz vzbujenega stanja v nižji energetski nivo, običajno v osnovno stanje (Jimenez in Navas, 2002).

Poznamo več vrst luminescence (Atari, 1982):

Povezane s toploto:

- kandoluminescencija
- piroluminescencija
- termoluminescencija

Povezane z radiacijo:

- fotoluminescencija
- katodoluminescencija
- anodoluminescencija
- radioluminescencija

Povezane z električnim pojavom:

- elektroluminescencija in piezoluminescencija
- galvanoluminescencija
- sonoluminescencija

Povezane s strukturnimi preureditvami trdnin:

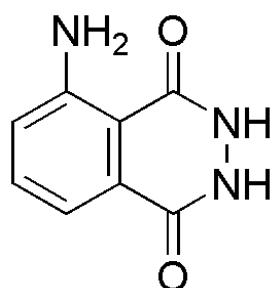
- triboluminescencija
- kristaloluminescencija
- lioluminescencija

Povezane s kemijskimi reakcijami:

- kemiluminescencija
- bioluminescencija

Pri naših eksperimentih smo merili kemiluminescenco, ki je definirana kot emisija svetlobe, ki se sprosti ob kemijski reakciji pri normalni temperaturi. O fenomenu hladne svetlobe lahko govorimo, kadar rahlo eksotermna reakcija proizvaja molekule v elektronsko vzbujenem stanju. Ko se te molekule vračajo v osnovno stanje, sprostijo fotone (energijo v obliki svetlobe). To se dogaja v tekočih, trdnih in plinastih agregatnih stanjih.

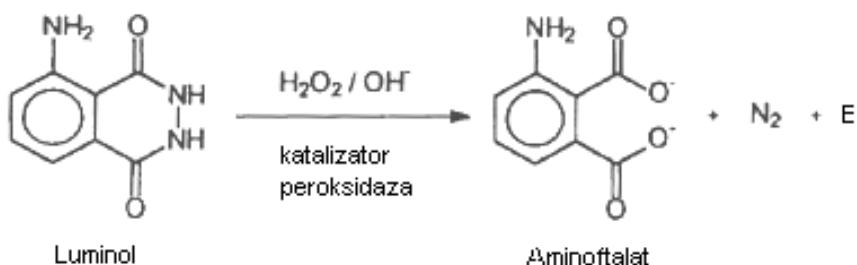
V literaturi najdemo veliko podatkov, ki govorijo o uporabnosti kemiluminescenčne metode v zdravstvu, živilstvu, okoljski ali analizni kemiji (Jimenez in Navas, 2002).



Slika 17: Strukturna formula luminola (Voicescu in sod., 2006)

#### Metoda hrenova peroksidaza-luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Raziskave so pokazale splošno uporabo kemiluminescenčne metode, pri kateri uporabljam hrenova peroksidaza-luminol-hidrogen peroksidni sistem (HRP-luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) kot občutljivo metodo za opazovanje prostih radikalov in prostih reaktivnih metabolitov, encimov, celic, oziroma organskih sistemov in za opazovanje antioksidativne aktivnosti. Encim peroksidaza reagira s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in pri tem nastane oksidirana peroksidaza, ki reagira naprej z anionom luminola, tako da nastanejo njegovi radikali. Le-ti reagirajo v nadalnjih reakcijah, pri čemer nastaja endoperoksid, ki se kasneje razgradi v elektronsko vzbujeni dianion 3-aminoftalat, ki je najprej v energetsko bogatejšem stanju (vzbujeno stanje), nato pa preide v osnovno stanje, pri čemer se presežek energije sprosti kot svetloba (luminescencija). Ker je pojav posledica kemične reakcije, govorimo o kemiluminescenci (Georgetti in sod., 2003). Reakcija je inhibirana, dokler so antioksidanti na voljo. Ko se le-ti porabijo, ponovno poteka oksidacija luminola, kar povrne intenzitetu luminescence na prvotno vrednost. AOP je povezan s časom zakasnitve luminescence in na ta način lahko posredno ugotavljamo AOP vzorca (Klepac, 2008).



Slika 18: Kemijska reakcija luminola s superoksidnim radikalnim anionom (Voicescu in sod., 2006)

### **2.3.2 Določanje skupnih fenolnih spojin**

Skupne fenolne spojine določamo z uporabo Folin-Ciocalteau-jevega (F-C) reagenta. Točna kemijska sestava le-tega ni znana, je pa sprejeto, da vsebuje fosfomolibdenski/fosfovolframov kislinski kompleks. Metoda F-C temelji na prenosu elektronov iz fenolnih komponent in ostalih reduciranih vrst na molibden v alkalmem mediju, pri čemer se fenolne spojine oksidirajo in obarvajo modro. Absorbanco obarvanih kompleksov izmerimo spektrofotometrično pri valovni dolžini 746 nm.

Slabost metode je, da je potrebno opraviti meritve absorbance po točno določenem času, kar včasih predstavlja problem pri rutinskih analizah. Poleg tega, pa predstavlja problem tudi njena zasnova na vodni fazi, zato ni primerna za lipofilne komponente oz. matrikse. Poleg tega reagent F-C ni specifičen samo za fenolne spojine, temveč lahko z njim reagirajo tudi druge, ne-fenolne komponente (npr. aromatični amini, antioksidanti (askorbinska kislina,...), Cu(I), Fe(II), itn.), kar moramo pri analizah upoštevati (Magalhães in sod., 2008).

### **2.3.3 Določanje posameznih antioksidantov**

#### **2.3.3.1 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti**

HPLC ali tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (high performance liquid chromatography) omogoča ločevanje snovi na osnovi adsorbcije, porazdelitve, ionske izmenjave, velikosti molekul in biološke afinitete na nosilcih in v kolonah, ki zdrže velike delovne tlake. Pri običajnih kolonskih izvedbah omenjene kromatografije je za ločevanje pomembna predvsem dolžina kolone, ki odreja število teoretičnih porazdelitvenih podov v koloni. Večje kot je to število, več je možnosti za porazdelitev različnih molekul in boljša je njihova ločitev. Število teoretičnih porazdelitvenih podov narašča, kadar se delci nosilca manjšajo (veča se razmerje med površino in volumnom). Po drugi strani pa se manjša pretok mobilne faze skozi kolono, kar privede do nezaželenih difuzijskih pojavov, ki ločevanje poslabšajo. Učinkov difuzije se lahko znebimo tako, da skrajšamo čas zadrževanja mobilne faze v koloni, kar lahko dosežemo z zvišanjem delovnega tlaka. Pri normalnih kromatografskih izvedbah to dosežemo z razliko tlaka med vrhom in dnem kolone. HPLC se odlikuje z izredno veliko ločljivostjo in občutljivostjo. Ker je ničeln volumen med delci nosilca izredno majhen, prepreči velike razredčitve komponent vzorca, ki ga ločujemo.

Zaradi velikega števila teoretičnih podov v kolonah HPLC, je resolucija molekul v takih kolonah zelo velika. Ob ustreznih izbiri metode so molekule iz vzorca ostro ločene, kar se odraža v zelo ozkih vrhovih. Položaj posameznega vrha opredeljujejo zadrževalni časi, ki nam povedo, koliko časa se je neka snov v koloni zadrževala in kakšni so pogoji, pri kateri se snov spere iz kolone. Če HPLC deluje pravilno, morajo biti zadrževalni časi (pod enakimi pogoji) za isto snov vedno enaki ali vsaj zelo podobni. Za neko snov lahko predvidevamo, da je čista takrat, kadar je njen vrh simetričen in dobro ločen od drugih vrhov. Vsaka druga oblika vrha zahteva ustrezeno spremembo metode (kolone, mobilne faze, temperature, itd.).

#### **Stacionarna faza (nosilci)**

Nosilci (stacionarna faza), ki se uporabljam v kolonah HPLC, so narejeni na osnovi silikagela. Nemedificiran silikagel predstavlja polarno stacionarno fazo, ki se v tehnikah HPLC ne uporablja veliko, razen za ločevanje močno polarnih organskih molekul. Večino nosilcev za kolone HPLC pripravijo tako, da silikagel kemično modificirajo, s čimer dobimo t.i. reverzno (obrnjeno) fazo (nepolarna stacionarna faza) ali nosilce, ki delujejo kot ionski izmenjevalci.

Silikagel spremenimo tako, da nanj vežemo silanolne skupine (Si-OH), preko teh pa različne dolge alifatske verige ( $C_2 C_4 C_8 C_{18}$ ) ali fenilne, ciano, nitro skupine, ki dajejo nosilcu bolj ali manj nepolaren značaj. Lahko vežemo tudi skupine, ki delujejo kot ionski izmenjevalci, kot so amino, dimetilamino, sulfonska ali kvartarna amonijeva skupina. Delci, ki sestavljajo nosilec, so lahko sferični ali nepravilnih oblik in imajo večinoma velikost od 3-10  $\mu\text{m}$  s porami, velikimi od 5 do 400 nm (Sepčić in sod., 1997).

### Mobilna faza

Mobilna faza se nanaša na stacionarno fazo. Ima vlogo nosilca posamezne raztopine vzorca, ki se nanese nanjo s pomočjo injektorja. Nato raztopina vzorca potuje skozi kolono z mobilno fazo, komponente raztopine pa migrirajo po koloni glede na nekovalentne interakcije s stacionarno fazo. Stopnja migracij in separacij komponent vzorca je odvisna od kemijskih interakcij mobilne faze in vzorca s stacionarno fazo. Na primer, tisti vzorci, ki bolje reagirajo z mobilno fazo, se bodo hitreje eluirali iz kolone in imajo posledično krajiši zadrževalni čas. Mobilno fazo je zato potrebno prilagoditi glede na interakcije vzorca s stacionarno fazo (Synder in sod., 1983).

### Tipi kolon

Kolone, ki se uporabljajo v tehniki HPLC, morajo biti mehansko odporne zaradi visokih delovnih pritiskov in so zato večinoma narejene iz nerjavečega jekla. Analitske kolone HPLC so relativno majhne, večinoma od 5 do 25 cm z notranjim premerom med 0,4 in 0,6 cm. Semi-preparativne kolone so nekoliko debelejše z notranjim premerom med 1 in 2,5 cm. Prenesejo delovni tlak od 5 do 20 kg/cm<sup>2</sup>. Navadno so industrijsko napolnjene z ustreznim nosilcem.

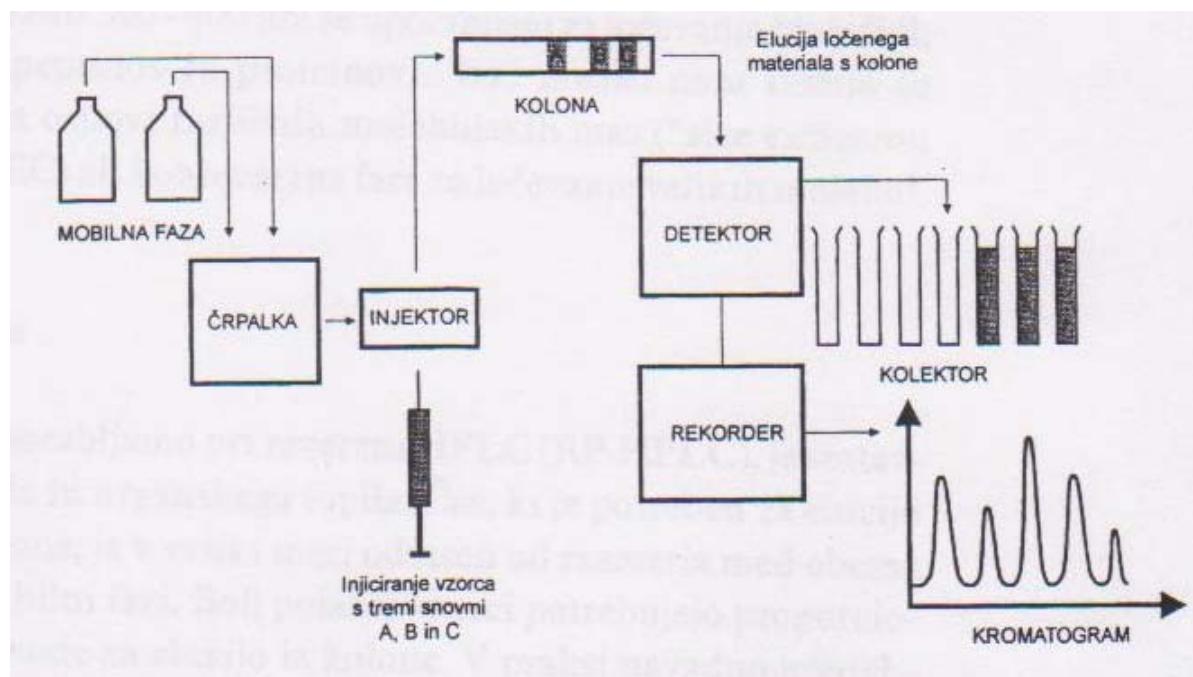
Srce vsakega sistema HPLC je črpalka, ki ustvarja delovni pritisk med 250 in 400 bari. Črpalka poganja mobilno fazo skozi kolono, eluirane frakcije pa analiziramo z ustreznim detektorjem. Črpalka je lahko izokratska, tako kot v našem primeru, kar pomeni, da črpa skozi kolono le eno mobilno fazo s konstantnim razmerjem topil, ali binarna, terciarna ali kvartarna, kar nam omogoča gradientno elucijo snovi iz kolone. Vzorec se vbrizga na kolono preko posebne zanke z injekcijsko iglo (navadno od 15  $\mu\text{l}$  do 1 mL), ki je vtaknjena v poseben ventil – injektor (Sepčić in sod., 1997).

Eluirane frakcije analiziramo z raznimi tipi detektorjev. Meritev poteka kontinuirano, ker je prav čas zadrževanja na koloni oz.  $V_e$  karakterističen za snov. Detektorji lahko merijo razlike v fizikalnih lastnostih mobilne faze in v njej raztopljenih snovi, npr. z merjenjem lomnega količnika (RIC), gostote, dielektrične konstante, električne prevodnosti (konduktometrični detektorji). Lahko pa merijo lastnosti topljenca, npr. absorpcijo svetlobe (UV-, IR-detektor), fluorescenco (fluorescenčni detektor), elektrokemijske lastnosti analita (amperometrični, polarografski in kulometrični detektorji), detektorji za radioaktivnost itd. Izbera detektorja je odvisna od komponent, ki jih želimo določati, vezana pa je tudi na poznavanje osnovnih lastnosti samega detektorja, med katerimi so najpomembnejši parametri linearnost, občutljivost in šum. V zadnjem času se vse bolj uveljavljajo tudi »diode-array« in »fast-scan« detektorji, ki so v principu UV-VIS detektorji, le da omogočajo trodimenzionalno sliko (čas, intenziteta, valovna dolžina) (Rudan-Tasič in sod., 2007).

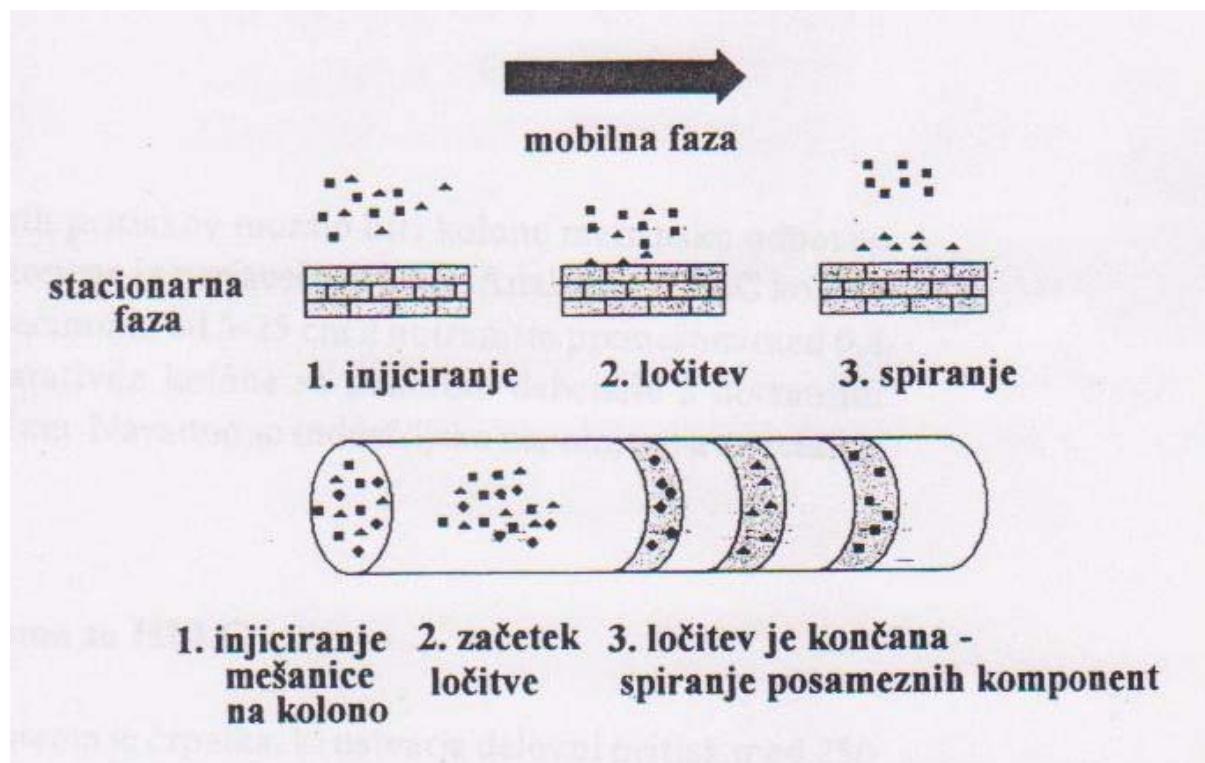
Večino sistemov HPLC vodi računalnik, preko katerega uravnavamo vse parametre. Z njegovo pomočjo tudi ovrednotimo rezultate.

HPLC se v glavnem uporablja kot absorpcijska in ionsko izmenjevalna kromatografija za ločevanje majhnih molekul (peptidov, aminokislin, ogljikovih hidratov, t-RNA, vitaminov ter drugih organskih molekul).

Prednost analitskih in separacijskih tehnik HPLC pred klasično kromatografijo je v kratkih časih ločitve, veliki ponovljivosti in visoki občutljivosti detekcije (Sepčić in sod, 1997).



Slika 19: Sestavni deli aparata HPLC (Sepčić in sod, 1997)



Slika 20: Princip delovanja HPLC (Sepčić in sod, 1997)

### Določanje askorbinske kisline

Za določanje vsebnosti askorbinske kisline (AA) v različnih vzorcih so bile razvite številne metode. Vključujejo spektrofotometrijo, kalorimetrijo, kemiluminiscenco, voltametrijo, encimske analize in amperometrične metode. Metode so sicer relativno enostavne, a imajo tudi slabe strani, kot so na primer slaba občutljivost, selektivnost, stabilnost in priprava posameznih vzorcev. Danes sta najbolj uporabni tehniki za analizo AA v različnih vzorcih HPLC in kapilarna elektroforeza (Nojavan, 2008).

Za šipek velja, da vsebuje visoke vrednosti AA, ki ima absorpcijski maximum pri okoli 240-250 nm (Salminen in sod., 2005).

Določitev obeh oblik vitamina C; askorbinske kisline (AA) in dehidroaskorbinske kisline (DHA), ni enostavna. AA in DHA sta slabo stabilni. Najuspešnejšo ekstrakcijo v vzorcih živil zagotovi metafosforna kislina zato, ker prepreči oksidacijo AA bolje kot ostale kisline (Iglesias in sod., 2006).

#### 2.3.3.2 HPLC-MS

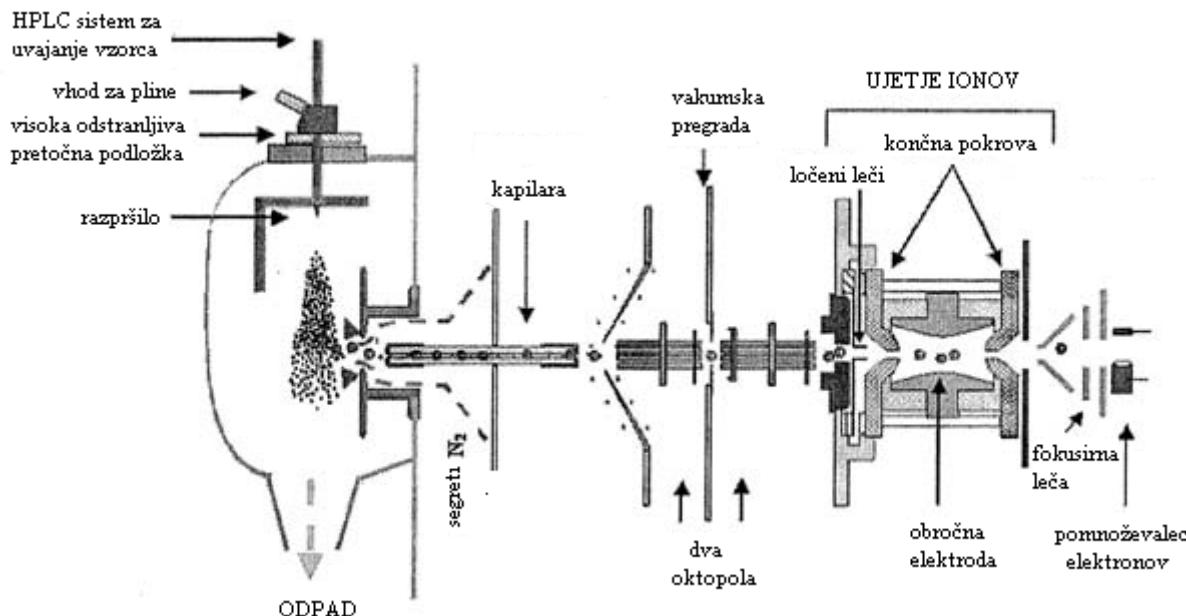
Masni spektrometer (MS) je naprava, v kateri nastanejo iz molekul spojin v plinski fazi ioni, ki jih aparat nato loči po razmerju masa/naboj. Pomembnejše komponente MS so sistem za uvajanje vzorca, izvor ionov, masni analizator, detektor, obdelava signala in zapis. Z MS dobimo poleg jakosti signala tudi spektralne podatke, ki dajo podatke o molski masi, strukturi, identiteti, količini in čistosti vzorca. Za večino spojin je masni spektrometer bolj občutljiv in dosti bolj specifičen kot vsi drugi detektorji, ki se uporablajo pri tekočinski kromatografiji. Z njim lahko identificiramo komponente v kromatografskih vrhovih, ki se sicer niso dobro ločili.

Dve spojini imata lahko enak UV spekter ali enak masni spekter, skoraj nemogoče pa je, da sta oba spektra enaka. Zato pri povezavi HPLC-MS ni potrebno poskrbeti za boljšo kromatografsko ločbo. HPLC omogoči kromatografsko ločevanje analitov pred MS analizo. Pri tem je pomembno vedeti, da imata HPLC in MS različne pogoje delovanja. HPLC deluje pri velikih hitrostih pretoka in tlakih ter večinoma sobni temperaturi. Vzorec in topila so v tekočem agregatnem stanju. MS pa deluje pri majhnih pretokih, velikem vakuumu in vzorec je v plinasti fazi pri višji temperaturi. Največji problem pri tej povezavi je odstranjevanje topila, ki ga uporabljamo pri HPLC. Najboljše rezultate pri povezavi HPLC in MS omogočajo inštrumenti z ionizacijo z elektrorazprševanjem (ESI) in s kemijsko ionizacijo pri atmosferskem tlaku (APCI) in fotonizacijo pri atmosferskem tlaku (APPI).

#### Ionizacija z elektrorazprševanjem (ESI)

ESI temelji na tem, da so v eluatu že ioni analita preden ta doseže masni spekter. Eluat, ki pride iz HPLC kolone, razpršimo v komori pri atmosferskem tlaku v prisotnosti močnega elektrostatičnega polja in vročega nosilnega plina. Elektrostatično polje povzroči nadaljnjo ionizacijo molekul analita, segret nosilni plin pa povzroči evaporacijo topila iz kapljic. Kapljice se zaradi tega zmanjšajo, koncentracija nabojev v kapljicah pa poveča. Zaradi skrajšane razdalje med ioni pride do odboja med istoimenskimi ioni in njihovega sproščanja v plinski fazo. Nastale ione pritegne vzorčna kapilara in jih nato usmeri v masni analizator. Med tem časom, ko so ioni prešli v plinsko fazo in časom, ko so dosegli masni analizator, lahko pride tudi do prenosa protonov ali izmenjave naboja. Ionizacija z elektrorazprševanjem je

dobra za velike molekule, kot so peptidi in proteini ter oligonukleotidi in tudi manjše molekule (Abram in sod., 2001).



Slika 21: Reverzna faza; HPLC-ESI-MS (Aldstadt in Ammerman, 2005)

#### Analiza polifenolnih spojin s HPLC-MS

Polifenolne spojine so pomembni antioksidanti in sodelujejo pri različnih fizioloških in bioloških aktivnostih v procesu človeškega metabolizma. Zato je identifikacija antioksidantov, polifenolnih spojin ter produktov njihove razgradnje zelo pomembna (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007).

Rastlinski polifenoli so lahko enostavne molekule, kot so na primer fenolne kisline, ali pa zelo razvejane molekule (tanini). Pojavljajo se v konjugirani obliki z enim ali več slatkornih ostankov, vezanih na hidroksilne skupine. Prav tako pa obstajajo tudi polifenoli, ki imajo slatkorno komponento direktno vezano na ogljikov atom v aromatskem obroču. V različnih rastlinah pa so našli tudi nekonjugirane polifenole (Hvattum, 2002).

Ker se polifenolne substance običajno nahajajo v rastlinah kot kompleksne zmesi, so v splošnem potrebne sklopljene tehnike. V te namene se uspešno uporablja HPLC-MS, MALDI-TOF-MS in GC-MS (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007).

Za določanje polifenolov so pri tehniki HPLC-MS najbolj uporabni instrumenti z ionizacijo z elektrorazprševanjem (ESI) in s kemijsko ionizacijo pri atmosferskem tlaku (APCI). Pri teh dveh načinih ionizacije dobimo podatek o  $[M-H]^+$  ali  $[M-H]^-$  ionih, ki so v procesu ionizacije nastali iz polifenolnih spojin. Posamezne polifenole potem lahko identificiramo in kvantificiramo s primerjavo spektrov standardnih raztopin (Hvattum, 2002).

#### 2.3.3.3 Ekstrakcija na trdni fazi (SPE)

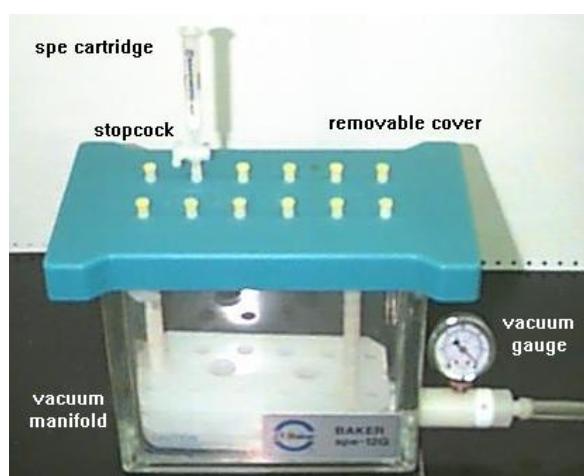
Ekstrakcija na trdni fazi (SPE) je tehnika, pri kateri z uporabo trdne in tekoče faze izoliramo eno komponento ali eno vrsto komponent iz raztopine oz. vzorca. Torej je pri SPE komponenta razdeljena med trdno in tekočo fazo. Pogosto se uporablja za čiščenje vzorca, v katerem imamo kasneje namen določiti posamezne komponente s pomočjo različnih

kromatografskih tehnik ali kake druge analizne metode. V našem primeru smo iz ekstrakta izolirali polifenole in jih kasneje določili s HPLC-MS tehniko.

Pri SPE separacijskem procesu se vzorec prefiltrira skozi trdno fazo, ki zadrži raztopljenе snovi, ki niso zaželene in jih kasneje eluiramo z majhnim volumnom (Supelco, 1998).

#### Princip ekstrakcije SPE:

- Aktivacija kolone; v tej stopnji aktiviramo površino polnila, da dosežemo boljšo vezavo merjene komponente. Aktivacijo izvedemo s prehajanjem primerenega topila, npr. z acetonitrilom ali s čistim metanolom.
- Ekvilibracija kolone; odstranitev aktivacijskega topila izvedemo s tekočino, ki ima podobno sestavo kot matriks. Polnilo običajno speremo z vodo ali s pufrom pri pH-ju, pri katerem poteka ekstrakcija merjene komponente.
- Nanos vzorca; polnilo bo zadržalo merjeno komponento. Volumen vzorca igra pomembno vlogo pri izkoristku ekstrakcije. Pomembna je tudi hitrost pretoka vzorca, saj je od nje odvisna kvantitativnost vezave analita na polnilu.
- Spiranje neželenih komponent in sušenje polnila; neželene komponente odstranimo iz kolone s spiranjem z vodo ali s primernim pufrom. Pri tem pazimo, da ne izpiramo tudi iskane komponente. Sledi sušenje polnila z zrakom ali s prepihovanjem s suhim dušikom, kar običajno traja nekaj minut.
- Elucija analita; analit speremo s polnila s primernim organskim topilom. Pomembno je, da elucija poteka počasi, največkrat topilo samo teče skozi kolono. Izkoristek ekstrakcije je močno odvisen od hitrosti pretoka (Brodnjak Vončina, 2006).



Slika 22: Naprava za izvajanje SPE (Supelco, 1998)

Pri SPE se največkrat uporablajo trije ekstrakcijski mehanizmi: normalni, reverzni in ionsko izmenjevalni. Izbira mehanizma polnila je odvisna od polarnosti merjene komponente. Pri normalni fazi gre za ekstrakcijo polarnih spojin iz nepolarnih topil. Pri reverzni fazi poteka ekstrakcija polarnih ali hidrofobnih spojin iz vodnih matrikov. Pri ionsko izmenjevalni SPE pa poteka ekstrakcija nabitih spojin iz vodnih in nepolarnih organskih vzorcev (Supelco, 1998).

SPE ima nekaj prednosti pred običajno tekočo-tekočo ekstrakcijo, npr. efektivnejše koncentracije, dobro ponovljivost, manjšo porabo organskih topil, krajsi čas priprave vzorca, enostavno delovanje, ni težav s penjenjem, visok izkoristek ekstrakcije za analizirano spojino, možnost avtomatizacije procesa (Brodnjak Vončina, 2006).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

Šipek

Plodove šipka (*Rosa canina* L.), ki smo jih uporabili za analize, smo nabirali deset zaporednih tednov med septembrom in decembrom 2008 na severni in južni strani grma, ki raste za Biotehniško fakulteto. Plodove smo ekstrahirali s polarnim topilom (ekstrakcija z 2 % vodno raztopino metafosforne kisline) in manj polarnim topilom (ekstrakcija s 95 % metanolom, nakisanim s 5 % mravljično kislino). Ekstrakte smo do analize shranjevali v zamrzovalniku pri -20 °C.

Reagenti

Pri delu smo uporabljali analitsko čiste reagente in kemikalije podjetij Merck, Aldrich, Sigma in Fluka. Kemikalije, ki smo jih uporabljali pri posameznih eksperimentih, so navedene v opisu različnih eksperimentalnih metod.

#### 3.2 METODE DELA

##### Priprava 2 % vodne raztopine metafosforne kisline (MFK)

Zatehtali smo 20 g kristalov MFK, jih zdrobili v terilnici in jih kvantitativno prenesli v 1000 mL bučko, dopolnili z 980 g vode miliQ in dobro premešali, da so se kristali raztopili.

###### 3.2.1 Ekstrakcija

Ekstrakcija je metoda, s katero ekstrahiramo želene snovi iz trdne zmesi ali raztopine. Ekstrakcija iz trdnih snovi temelji na različni topnosti posameznih spojin v ekstrakcijskem topilu. Ekstrakcija iz raztopin pa temelji na različni topnosti in porazdeljevanju spojin iz zmesi v dveh topilih, ki se med seboj ne mešata.

Topnost neke spojine je odvisna od lastnosti molekul oz. njihove sposobnosti tvorjenja vezi s topilom. Polarne spojine so praviloma dobro topne v polarnih topilih, nepolarne pa v nepolarnih topilih.

###### 3.2.1.1 Ekstrakcija z 2 % vodno raztopino metafosforne kisline

6 g plodov šipka smo zatehtali v 50 mL centrifugirke. Plodove smo zaradi lažje homogenizacije sproti rezali s škarjami. V centrifugirke smo dolili 18 g 2 % vodne raztopine MFK ter homogenizirali toliko časa, da je zmes postala homogena. Za vsak vzorec smo pripravili po štiri homogenate, in sicer po dva iz šipka, ki je bil nabran na severni strani grma in po dva iz šipka, ki je bil nabran na južni strani grma. Homogenate smo nato filtrirali skozi celulozni filter papir. V prvo polovico mikrocentrifugirk smo odpipetirali 1200 µL filtrata ekstrakta, v drugo polovico pa 600 µL filtrata ekstrakta in 600 µL tris (2-karboksietil) fosfina (TCEP). Raztopino TCEP smo predhodno pripravili tako, da smo zatehtali 28,7 mg TCEP, prenesli v 10 mL bučko, in do oznake dopolnili z 2 % MFK. Vsebino mikrocentrifugirk smo premešali in centrifugirali pet minut pri 14000 g. Potem smo supernatante s pomočjo injekcij prefiltrirali skozi CA filtre Millipore (0,45 µm) v nove mikrocentrifugirke. Vzorce smo do analize shranjevali v zamrzovalniku pri -20 °C.

### 3.2.1.2 Ekstrakcija z metanolom

Postopek ekstrakcije je enak, kot je opisano v poglavju 3.2.1.1, le da smo namesto 2 % MFK uporabili 95 % metanol, nakisan s 5 % mravljično kislino. Filtratu tudi nismo dodajali reducenta TCEP. Vzorce pa smo do analize ravno tako shranjevali v zamrzovalniku pri -20 °C.

Reagenti:

- metafosforna kislina (MFK) (Sigma, Nemčija)
- metanol (Merck, Nemčija)
- mravljična kislina (Kemika, Zagreb)
- tris (2-karboksietil) fosfin (TCEP) (Sigma, Nemčija)

Aparature:

- homogenizator ULTR-TURRAX T 25 (Janke&Kunkel IKA® - Labortechnik)
- centrifugator Eppendorf 5415C

## 3.2.2 Antioksidativna aktivnost

### 3.2.2.1 Določanje skupnih fenolnih spojin

Skupne fenolne spojine v vzorcu lahko določamo spektrofotometrično z uporabo Folin-Ciocalteau-jevega (F-C) reagenta. Določene komponente le-tega v reducirani obliki absorbirajo pri valovni dolžini 746 nm. Njihova koncentracija je prenosorazmerna s koncentracijo oksidiranih fenolov v vzorcu.

Reagenti:

- etanol (Merck, Nemčija)
- Folin-Ciocalteau reagent (Fluka, Nemčija)
- 20 % raztopina Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Merck, Nemčija)
- klorogenska kislina (Sigma, Nemčija)
- metafosforna kislina (MFK) (Sigma, Nemčija)

Aparature:

- spektrofotometer Hewlet-Packard, model HP-8453, ZDA
- mešalo za epruvete Železniki, Slovenija
- tehnicka Železniki, model Exacta 2200 EB, Slovenija

Umeritvena krivulja:

Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili standardno raztopino klorogenske kisline, ki smo jo pripravili tako, da smo 3,5 mg klorogenske kisline raztopili v 100 mL 2 % MFK, tako da je bila koncentracija standardne raztopine 0,099 mM. V centrifugirke smo nato odpipetirali od 25 µL do 425 µL te raztopine in dodali 2 % MFK do končnega volumena 725 µL, dobro premešali in dodali 125 µL F-C reagenta, predhodno razredčenega z vodo v volumskem razmerju 1:2, ter točno po petih minutah dodali še 125 µL 20 % raztopine Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Raztopine smo sproti premešali in po eni uri izmerili absorbanco obarvanih raztopin pri 746 nm. Slepi

vzorec smo pripravili tako, da smo namesto standardne raztopine odpipetirali 725 µL 2 % MFK in ga pripravili kot ostale vzorce. Meritve smo izvedli v dveh paralelkah.

Analiza vzorcev:

Na osnovi predposkusov smo ugotovili, kakšen volumen ekstrakta moramo odpipetirati, da signali padejo v območje umeritvene krivulje. V centrifugirke smo tako vedno odpipetirali po 1 µL šipkovega ekstrakta, do končnega volumna 725 µL dopolnili z 2 % MFK, dodali 125 µL razredčenega (1:2) F–C reagenta in dobro premešali, ter točno po petih minutah dodali 125 µL 20 % raztopine Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in še enkrat premešali. Reakcijsko mešanico smo nato pustili na sobni temperaturi in točno po eni uri izmerili absorbanco pri 746 nm. Meritve smo izvedli v dveh paralelkah.

### 3.2.2.2 Določanje antioksidacijskega potenciala z radikalom DPPH<sup>•</sup>

Za merjenje antioksidacijskega potenciala vzorca se uporablja primerjalno fotometrično sledenje izginjanja barve (stopnje bledenja) stabilnega prostega radikala 2,2 difenil-1-pikril-hidrazil (DPPH<sup>•</sup>). Radikal DPPH<sup>•</sup> absorbira pri 517 nm, v reakciji z antioksidantom (redukcija) razpada in absorbcija se zmanjša.

Reagenti:

- 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil (DPPH<sup>•</sup>) (Sigma, Nemčija)
- metanol (Merck, Nemčija)
- klorogenska kislina (Sigma, Nemčija)
- metafosforna kislina (MFK) (Sigma, Nemčija)

Aparature:

- magnetno mešalo IKA WERKE RCT basic
- spektrofotometer Hewlet-Packard, model HP-8453, ZDA

0,081 mM raztopino radikala DPPH<sup>•</sup> smo pripravili vsak dan sproti in sicer tako, da smo 3 mg radikala raztopili v 60 mL metanola in vse skupaj z magnetnim mešalom mešali 20 minut.

Umeritvena krivulja:

Naredili smo dve umeritveni krivulji, posebej za vzorce, ekstrahirane z 2 % MFK in posebej za vzorce, ekstrahirane z metanolom. Pri obeh smo kot standardno raztopino uporabili klorogensko kislino, katere smo zatehtali 32 mg in v 100 mL bučki dopolnili do oznake z 2 % MFK, tako da je bila koncentracija 0,90 mM. Od 10 µL do 70 µL standardne raztopine smo nato odpipetirali v centrifugirke in jih dopolnili z 2 % MFK oziroma z metanolom do končnega volumna 70 µL. V tako pripravljene standardne raztopine smo odpipetirali po 1 mL 0,081 mM metanolne raztopine DPPH<sup>•</sup> in dobro premešali. Po 1 uri smo merili absorbanco vzorca pri 517 nm. Slepi vzorec smo pripravili po istem postopku, le da smo v mešanico namesto standardne raztopine dodali samo 2 % MFK oziroma metanol. Absorbanca slepega vzorca je bila okrog ena, tako pri umeritveni krivulji z 2 % MFK kot tudi pri umeritveni krivulji z metanolom. Meritve smo izvedli v dveh paralelkah.

Analiza vzorcev:

Na osnovi predposkusov smo ocenili, koliko je potrebno vzorce razredčiti, da pridemo v območje absorbance približno 0,5. 15 µL vzorca, ekstrahiranega z 2 % MFK, smo razredčili z 2 % MFK do skupnega volumna 500 µL. 15 µL vzorca, ekstrahiranega z metanolom, pa smo z istim topilom prav tako razredčili do skupnega volumna 500 µL. Vse razredčene vzorce smo dobro premešali in odpipetirali po 70 µL, dodali 1 mL raztopine DPPH<sup>•</sup> in po 1 uri izmerili absorbanco pri 517 nm. Meritve smo izvedli v dveh paralelkah.

### 3.2.2.3 Določanje antioksidativne aktivnosti z luminescenčno metodo

Kemiluminescenčna metoda, pri kateri uporabljamo sistem hrenova peroksidaza-luminol-hidrogen peroksid (HRP-luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), je občutljiva metoda za opazovanje antioksidativnega potenciala. Luminescencija, ki je posledica reakcije med luminolom in kisikom, je inhibirana, dokler so antioksidanti na voljo. Ko se le-ti porabijo, ponovno poteka oksidacija luminola, kar povrne intenzitetu luminescence na prvotno vrednost. AOP je povezan s časom zakasnitve luminescence in na ta način lahko posredno ugotavljam AOP vzorca.

Pomembno je, da je koncentracija encima takšna, da je začetni signal pripravljene mešanice luminola, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in encima HRP blizu 600 a.u. Zato je potrebno pripravljen encim, če smo ga imeli v hladilniku, dati na sobno temperaturo približno 45 min pred meritvijo.

S fluorimetrom smo merili emisijo svetlobe pri 420 nm.

Reagenti:

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck, Nemčija)
- luminol (Fluka, Nemčija)
- dimetilsulfoksid (DMSO) (Merck, Nemčija)
- vodikov peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Merck, Nemčija)
- hrenova peroksidaza (HRP) (Sigma, Nemčija)
- klorogenska kislina (Sigma, Nemčija)

Aparature:

- pH-meter (MA 5705, Iskra, Slovenija)
- tehnicka – model Exacta 2200 EB (Železniki, Slovenija)
- ultrazvočna kopel (Bandelin, Namčija)
- fluorimeter (Cary Eclipse, Varian, Avstrija)

Umeritvena krivulja:

Pripravili smo standardno raztopino klorogenske kisline, katere smo zatehtali 10 mg in ji dodali 1 mL 0,1 M fosfatnega pufra (pH=7,4), tako da je bila njena koncentracija 28 mM. Nato smo pripravili raztopino luminola, pri čemer smo zatehtali 50 mg luminola in mu dodali 1,5 mL DMSO ter dobro premešali. V 10 mL bučko smo odpipetirali 100 µL raztopine luminola in s pufrom dopolnili do oznake ter postavili za nekaj minut v ultrazvočno kopel. Reakcijsko mešanico smo pripravili tako, da smo odpipetirali 4,5 mL 1,88 mM raztopine

luminola in dodali 0,5 mL 75 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ki smo ga predhodno pripravili, in sicer, v 10 mL bučko smo odpipetirali 75 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in do oznake dopolnili s pufrom. 2,1 mL tako pripravljene reakcijske mešanice smo odpipetirali v kiveto in dodali 17 µL encima ter takoj pričeli z analizo. Encim smo predhodno pripravili tako, da smo ga zatehtali 0,19 mg in dodali 1,8 mL pufra. Njegova koncentracija je bila takšna, da je bil signal vedno od 500 do 600 a.u. Po približno 30 sekundah smo dodali od 1,0 µL do 9,0 µL standardne raztopine klorogenske kislina. Ob dodatku standardne raztopine je bil signal inhibiran in se je po določenem času vrnil v prvotno stanje. Nas je zanimal čas od dodatka standarda do tedaj, ko se je signal povrnil na osnovno vrednost. Mešanico reagentov smo vedno pripravili sproti. Meritve smo izvedli v dveh paralelkah.

Analiza vzorcev:

Raztopine smo pripravili po enakem postopku kot pri umeritveni krivulji. Analiza vzorcev je prav tako potekala enako, le da smo namesto standarda v kiveto odpipetirali po 4 µL šipkovega ekstrakta. Meritve smo izvedli v dveh paralelkah.

### **3.2.3 Spektrofotometrično določanje vsebnosti askorbinske kislina na sistemu HPLC**

Tehnika HPLC je danes ena izmed najpogosteje uporabljenih metod za določanje AA v različnih vzorcih. Njena prednost je v kratkih časih ločitve, veliki ponovljivosti in visoki občutljivosti detekcije. Eluirane frakcije detektiramo s spektrofotometričnem UV-VIS detektorjem. AA ima absorpcijski maximum pri 250 nm. Tehnika je natančneje opisana v poglavju 2.3.3.1.

Reagenti:

- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck, Nemčija)
- metafosforna kislina (MFK) (Sigma, Nemčija)
- askorbinska kislina (AA) (standard: 99,7 %; Sigma, Nemčija)

Kromatografski pogoji:

- mobilna faza: 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- pretok mobilne faze: 1 mL/min
- kolona: Synergie C<sub>18</sub> HYDRO-RP 80A 250 mm × 4,60 mm
- avtomatski vzorčevalnik (Spark Holland, Marathon XT)
- detektor: spektrofotometrični UV-VIS detektor KNAUER
- tlak: 15 Pa
- valovna dolžina: 250 nm
- čas analize: 10 min

Umeritvena krivulja:

Kolona Synergie C<sub>18</sub> HYDRO-RP 80A 250 mm × 4,60 mm za določanje vitamina C je bila napolnjena z delci stacionarne faze dimenzije 4 µm. Pred analizami smo vsak dan kolono spirali 30 min z mobilno fazo. Meritve smo izvedli v dveh paralelkah.

Standardno raztopino AA smo pripravili v 2 % MFK s koncentracijo 5,66 mM. V steklene viale smo odpipetirali od 20 µL do 240 µL standardne raztopine in jih dopolnili z 2 % MFK do skupnega volumna 1 mL in dobro premešali. Viale smo pravilno postavili v avtomatski

vzorcevalnik, podatke pa vnesli v računalnik, ki je povezan s sistemom in pričeli z analizo. Eluirane komponente smo spektrofotometrično detektirali z UV-VIS detektorjem pri 250 nm. Rezultate smo dobivali v obliki vrhov, pod katerimi smo odčitali površino. Meritve smo izvedli v dveh paralelkah.

Analiza vzorcev:

Na sistemu HPLC smo analizirali vzorce šipka, ki so bili ekstrahirani z 2 % MFK z dodatkom TCEP, ki reducira DHA v AA, in tiste brez TCEP. Vzorce z dodatkom TCEP smo pripravili tako, da smo v viale odpipetirali po 200 µL vzorca in mu dodali 600 µL 2 % MFK. Pri vzorcih brez dodanega TCEP, pa smo v viale odpipetirali po 150 µL vzorca in mu dodali 650 µL 2 % MFK. Določali smo koncentracijo AA v ekstraktu, zato nas je tako kot pri umeritveni krivulji, tudi tu zanimala površina pod pikom posameznega vzorca. Meritve smo izvedli v dveh paralelkah.

### **3.2.4 Identifikacija in kvantifikacija polifenolov na sistemu HPLC-MS**

#### **3.2.4.1 Ekstrakcija na trdni fazi (SPE)**

SPE je tehnika, ki se pogosto uporablja za čiščenje vzorca, v katerem kasneje določamo posamezne komponente s pomočjo kromatografskih tehnik. Ta metoda je hitra, prilagodljiva, selektivna, dobro ponovljiva in omogoča ekstrakcije z majhno porabo organskih topil. Pri SPE separacijskem procesu se vzorec prefiltrira skozi trdno fazo, ki zadrži raztopljene snovi, ki niso zaželene in jih kasneje eluiramo z majhnim volumnom.

Reagenti:

- metanol (Merck, Nemčija)
- pufer: amonijev formiat
- acetonitril (Merck, Nemčija)

Kromatografski pogoji:

- kolona Strata X (Phenomenex, ZDA)

Postopek:

Glede na prej opravljene meritve smo se odločili, da bomo polifenole določili v dveh ekstraktih, ki sta se med seboj razlikovala v vsebnosti skupnih fenolov. Najprej smo aktivirali kolono z 2 mL metanola. Metanol smo skozi kolono spuščali po kapljicah in pri tem pazili, da se ni izsušila. Za tem smo skozi kolono spustili 2 mL pufra in s tem uravnotežili kolono. Sledil je nanos vzorca. Nanesli smo ga 250 µL in počakali približno 5 minut. Sledilo je spiranje s 15 % metanolom. Nato smo prestavili kolono na drugo epruveto in na kolono nanesli mešanico metanol:acetonitril v razmerju 2:1. Eluata smo nato prelili v viali, ju dali v hladilnik in po štirih dneh analizirali.

#### **3.2.4.2 Določanje polifenolov s HPLC-MS**

Vsebnost polifenolov smo določali s HPLC sistemom Agilent 1100. Kot detektor smo uporabili masni spektrometer (Micromass Quattro micro® API, Waters, ZDA) z elektrorazpršilno ionizacijo (electrospray ionization-ESI), kot je natančneje opisano v poglavju 2.3.3.2.

Pripravljeni vzorce smo imeli v hladilniku 1 mesec pri 4 °C. Medtem je v kislem mediju potekla cepitev sladkornih ostankov, vezanih na hidroksilne skupine oz. direktno vezanih na ogljikov atom v aromatskem obroču. Brez tega postopka ni bilo mogoče identificirati in kvantificirati fenolnih spojin v vzorcih, ker so le-ti vsebovali preveč motečih komponent.

Reagenti:

- acetonitril (Merck, Nemčija)
- metanol (Merck, Nemčija)
- standardi:  
kavna kislina, elaginska kislina, kvercetin, luteolin, naringenin, galangin, pinocembrin (Sigma-Aldrich, Nemčija), apigenin, krizin, kamferol (Fluka, Švica)

Kromatografski pogoji pri HPLC:

- binarna gradientna črpalka (Agilent 1100, G1312A)
- vakuumski razplinjevalnik (Agilent 1100, G1379A)
- avtomatski podajalnik (Agilent 1100, G1330B)
- termostat za kolono (Agilent 1100, G1316A)
- predkolona: Gemini C<sub>18</sub> (4,0 mm × 2,0 mm) (Phenomenex, ZDA)
- kolona: Luna C<sub>18</sub>(2) (3µm, 150 mm × 2 mm i.d.) (Phenomenex, ZDA)
- mobilna faza: mobilna faza A: 1% HCOOH (Merck, Nemčija)  
mobilna faza B: acetonitril, LC/MS grade (Merck, Nemčija)
- pretok: 0,25 mL/min
- temperatura kolone: 25 °C
- volumen injiciranja: 10 µL
- čas analize: 55 minut
- gradient:

t (min)	A	B
0	90 %	10 %
4	90 %	10%
40	40 %	60 %
41	20 %	80 %
45	20 %	80 %
47	90 %	10 %
55	90 %	10 %

Kromatografski pogoji pri MS:

- napetost vhodne leče: 30 V
- temperatura izvora: 100 °C
- napetost kapilare: 3,5 kV
- temperatura razpršilnega plina dušika: 350 °C
- pretok razpršilnega plina dušika: 400 L/h
- pretok plina vhodne leče (dušik): 70 L/h

#### 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Eksperimentalni del diplomske naloge je obsegal kvantitativno ovrednotenje antioksidantov, askorbinske kisline ter skupnih kot tudi individualnih fenolnih spojin v vzorcih plodov šipka, obranih deset zaporednih tednov od septembra do decembra na severni in južni strani grma, ki raste za Biotehniško fakulteto v Ljubljani. Zanimalo nas je tudi, kako različni topili vplivata na že prej omenjene parametre v plodovih šipka, zato smo za ekstrakcijo plodov uporabili dve različni topili, in sicer 2 % vodno raztopino metafosforne kisline in 95 % metanol z dodatkom 5 % mravljične kisline.

Na sliki 23 (prvo obiranje), 24 (peto obiranje) in 25 (zadnje obiranje) vidimo, da se je med zorenjem spreminja barva in velikost šipkovih plodov.



Slika 23: Plodovi šipka, obrani 25.09.2008 na severni (levo) in južni (desno) strani grma  
(Foto: Sandra Potočnik)



Slika 24: Plodovi šipka, obrani 27.10.2008 na severni (levo) in južni (desno) strani grma  
(Foto: Sandra Potočnik)



Slika 25: Plodovi šipka, obrani 01.12.2008 na severni (levo) in južni (desno) strani grma  
(Foto: Sandra Potočnik)

Plodovi šipka, ki smo jih nabrali pri prvem obiranju, 25.09.2008, so še zelo majhni in zelo svetlo rdeče barve, kot vidimo na sliki 23. Plodovi, obrani 27.10.2008 (peto obiranje od desetih), pa so zelo močno rdeče obarvani in veliki, kar smo pri kasnejših analizah potrdili z rezultati. Pri zadnjem obiranju 01.12.2008 so plodovi manjši glede na peto obiranje, a večji kot pri prvem obiranju. Barva plodov je še za odtenek temnejša.

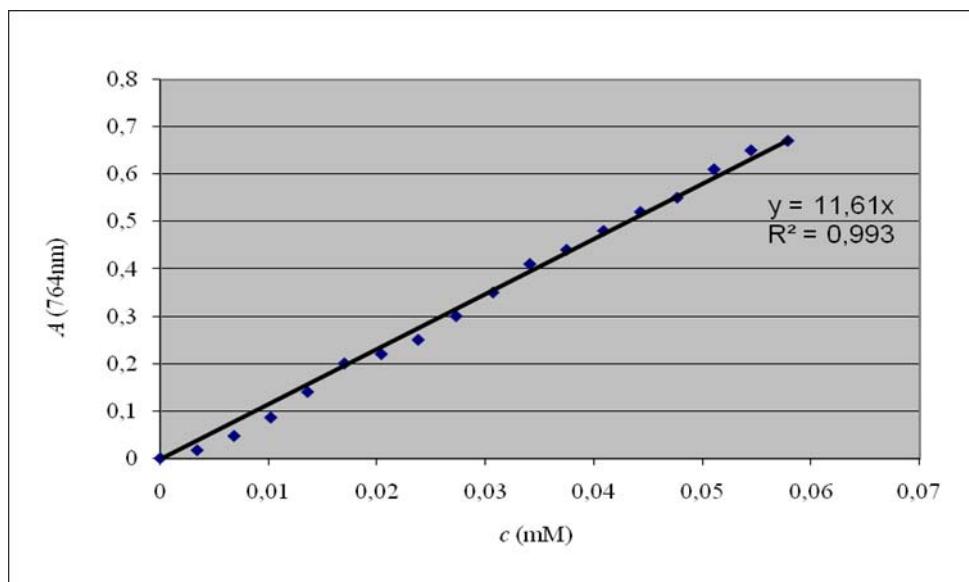
#### 4.1. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST PLODOV ŠIPKA

##### 4.1.1 Spektrofotometrična metoda za določanje skupnih fenolnih spojin

Vsebnost skupnih fenolov v vzorcih šipka smo določali s Folin-Ciocalteaujev (F-C) reagentom, pri čemer smo merili absorbanco pri valovni dolžini 746 nm. Izmerjena absorbanca je premosorazmerna količini skupnih fenolov v vzorcu.

###### 4.1.1.1 Umeritvena krivulja

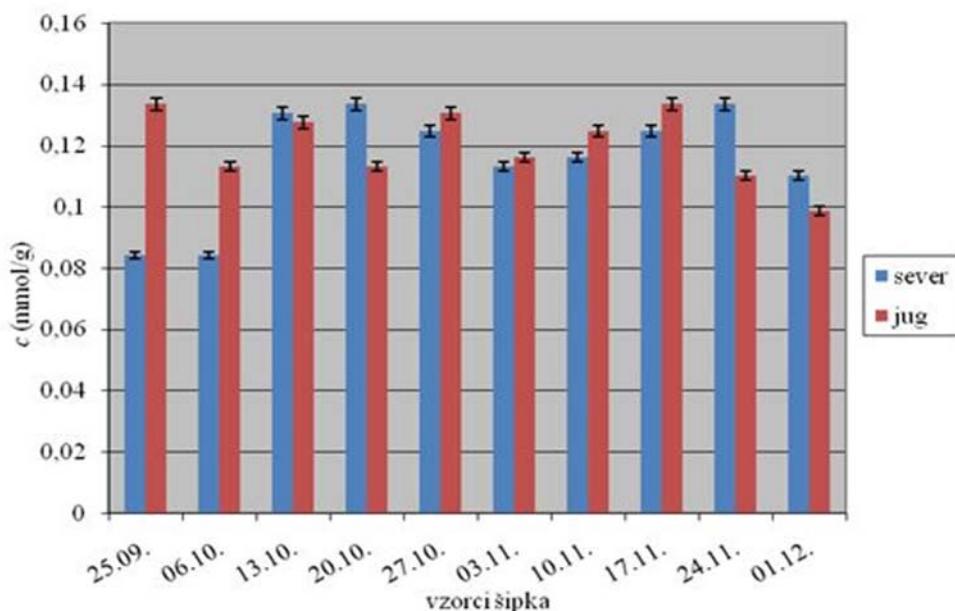
Najprej smo naredili umeritveno krivuljo za klorogensko kislino, pri čemer smo kot topilo uporabili 2 % MFK. Kljub temu, da smo plodove šipka ekstrahirali z dvema različnima topiloma; 2 % MFK in 95 % metanolom, nakisanim s 5 % mravljično kislino, smo uporabili za vse vzorce isto umeritveno krivuljo, ki je prikazana na sliki 23. Kot je razvidno iz predhodnih analiz (Pregelj, 2009) je naklon umeritvene krivulje pri uporabi obeh topil skoraj identičen.



Slika 26: Odvisnost absorbance ( $\lambda=746$  nm) od koncentracije klorogenske kisline, raztopljene v 2 % metafosforni kislini (MFK), ob prisotnosti F–C reagenta

Absorbanca, izmerjena pri 746 nm, se linearno povečuje s količino dodane klorogenske kisline, kar je razvidno iz slike 26. S pomočjo umeritvene krivulje smo določili vsebnost skupnih fenolov v vzorcih šipka in jih izrazili kot ekvivalent klorogenske kisline.

#### 4.1.1.2 Vzorci, ekstrahirani z 2 % metafosforno kislino

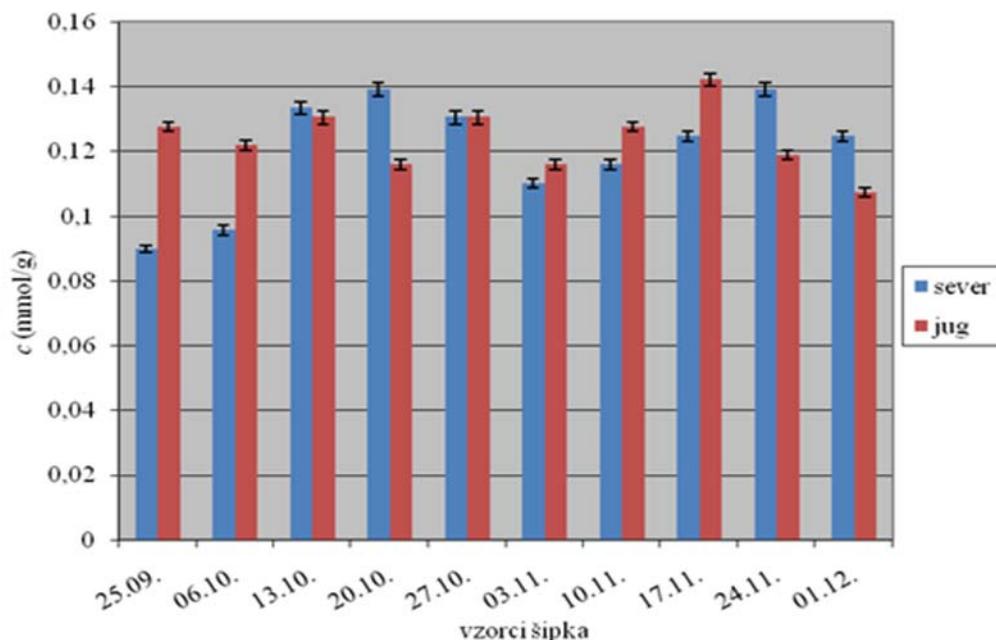


Slika 27: Koncentracija skupnih fenolov v plodovih šipka, obranih na severni in južni strani grma in ekstrahiranih v 2 % metafosforni kislini (MFK)

Iz slike 27 in preglednice 1 je razvidno, da se vsebnost skupnih fenolov med zorenjem spreminja. Največ skupnih fenolov so vsebovali vzorci, obrani na severni strani grma, in sicer 20.10.2008 in 24.11.2008, ter vzorca, ki sta bila 25.09.2008 in 17.11.2008 obrana na južni strani grma. Vsebnost skupnih fenolnih spojin je bila v teh vzorcih okrog 0,135 mmol/g. Najmanj skupnih fenolnih spojin sta vsebovala vzorca, obrana na severni strani grma, in sicer 25.09.2008 in 06.10.2008. Vsebnost skupnih fenolnih spojin je bila 0,084 mmol/g. Opazimo, da je bila vsebnost skupnih fenolov konec septembra in v začetku oktobra veliko nižja (od 26 % do 37 %) na severni – osojni strani grma kot pa na južni – prisojni strani, kar je lahko verjetno posledica različno obarvanih plodov, kar kaže na različno vsebnost barvil. Pri kasnejših obiranjih razlika skoraj izgine, pri zadnjih dveh pa so vrednosti skupnih fenolov na jugu celo nižje kot na severu. Razvidno je tudi, da je vsebnost skupnih fenolov na severni strani grma pri zadnjem decembrskem obiranju višja za 31 %, kot je bila pri prvem obiranju. Enako pa ne drži za južno stran grma, saj je vsebnost skupnih fenolov nižja za približno 26 % pri zadnjem obiranju, glede na prvo obiranje.

Rezultati kažejo, da se vsebnost skupnih fenolov v zgodnji jeseni (od septembra do novembra) povečuje, v pozni jeseni (začetek decembra) pa se njihova vsebnost ponovno začne zniževati. Nihanje skupnih fenolov je verjetno posledica zelo spremenljivega vremena v jeseni 2008.

#### 4.1.1.3 Vzorci, ekstrahirani z metanolom

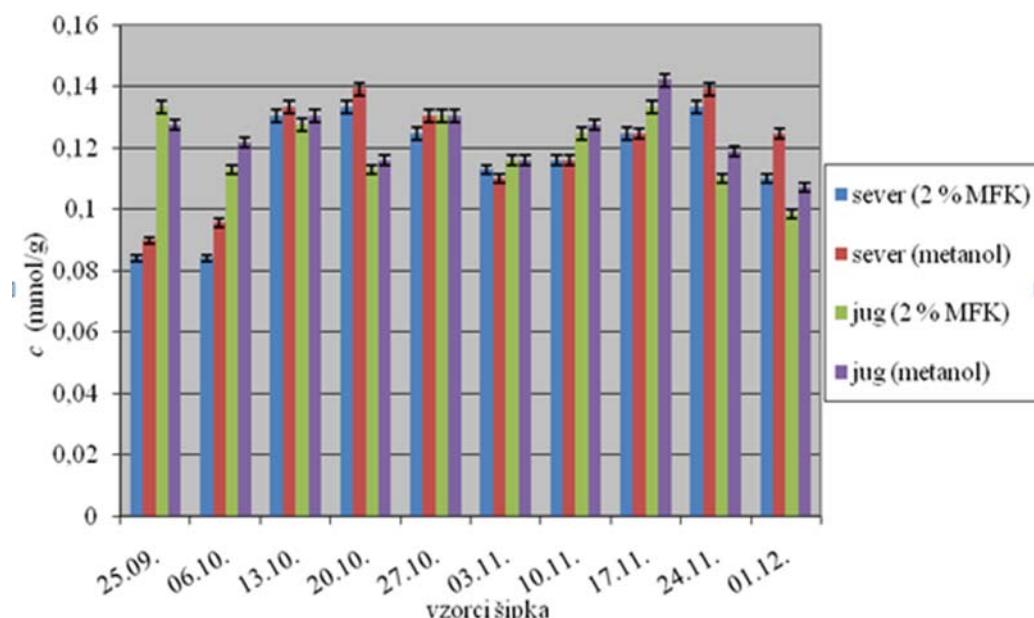


Slika 28: Koncentracija skupnih fenolov v plodovih šipka, obranih na severni in južni strani grma in ekstrahiranih v metanolu

Tudi metanolni ekstrakti vsebujejo različno količino skupnih fenolov. Največ skupnih fenolov je vseboval vzorec, obran na južni strani grma 17.11.2008, in sicer 0,142 mmol/g, najmanj pa vzorec, obran na severni strani grma 25.09.2008, in sicer 0,090 mmol/g. Iz slike 28 in preglednice 1 je razvidno, da je v prvih dveh tednih vsebnost skupnih fenolov v plodovih,

obranih na južni - prisojni strani grma, dosti višja kot v plodovih, nabranih na severni strani grma. V naslednjih tednih razlika skoraj izgine, v pozni jeseni pa je vsebnost skupnih fenolov v plodovih, obranih na južni strani grma nižja glede na plodove, obrane na severni strani grma. Iz slike 28 in preglednice 1 je razvidno tudi, da je pri zadnjem obiranju vrednost v plodovih, obranih na severni strani grma, višja za 39 % od prvega obiranja. V plodovih, obranih na južni strani grma, pa je vsebnost skupnih fenolov pri zadnjem obiranju nekoliko nižja, in sicer za približno 16 % v primerjavi s prvim obiranjem. Nihanje vrednosti je verjetno posledica nihanja temperatur in spremenljivo vreme v jeseni 2008, saj je vsebnost skupnih fenolov v toplejših tednih nekoliko višja.

#### 4.1.1.4 Primerjava vodnih in metanolnih ekstraktov



Slika 29: Koncentracija skupnih fenolov v plodovih šipka, obranih na severni in južni strani grma ter ekstrahiranih v 2 % metafosforni kislini (MFK) in v metanolu

Zanimalo nas je tudi, kako polarnost različnih topil vpliva na vsebnost skupnih fenolov v šipkovih ekstraktih.

Kot polarno topilo smo uporabili 2 % vodno raztopino MFK, kot manj polarno pa 95 % metanol, ki je vseboval 5 % mravljično kislino. Ugotovili smo, da med vzorci, ekstrahiranimi z bolj polarnim topilom in med vzorci, ekstrahiranimi z manj polarnim metanolom, ni prišlo do bistvenih razlik, kar je razvidno iz slike 29 in preglednice 1. Vsebnost skupnih fenolov v naših vzorcih je od 0,084 mmol/g do 0,139 mmol/g. Ker pa je vsebnost skupnih fenolov v vzorcih, ekstrahiranih v metanolu, v večini primerov nekoliko višja, in sicer do 14 % v plodovih, obranih na severni strani grma, in do 6,8 % v plodovih, obranih na južni strani grma, lahko rečemo, da plodovi našega šipka vsebujejo nekaj več manj polarnih skupnih fenolov kot polarnih.

Preglednica 1: Vsebnost skupnih fenolov vzorcev šipka, izmerjena s spektrofotometrično metodo za določanje skupnih fenolnih spojin s Folin–Ciocalteaujev (F–C) reagentom, v plodovih šipka, obranih med 25.09.2008 in 01.12.2008 s severne in južne strani grma in ekstrahiranih v različnih topilih

Vsebnost skupnih fenolov (mmol/g)				
Datum obiranja	2 % MFK		95 % metanol + 5 % mravljična kislina	
	SEVER	JUG	SEVER	JUG
25.09.2008	0,084±0,002	0,133±0,004	0,090±0,002	0,128±0,003
06.10.2008	0,084±0,002	0,113±0,003	0,096±0,003	0,122±0,003
13.10.2008	0,131±0,004	0,128±0,004	0,133±0,004	0,131±0,004
20.10.2008	0,133±0,004	0,113±0,003	0,139±0,004	0,116±0,003
27.10.2008	0,125±0,004	0,131±0,004	0,131±0,004	0,131±0,004
03.11.2008	0,113±0,003	0,116±0,003	0,110±0,003	0,116±0,003
10.11.2008	0,116±0,003	0,125±0,004	0,116±0,003	0,128±0,003
17.11.2008	0,125±0,004	0,133±0,004	0,125±0,003	0,142±0,004
24.11.2008	0,133±0,004	0,110±0,003	0,139±0,004	0,119±0,003
01.12.2008	0,110±0,003	0,099±0,003	0,125±0,003	0,107±0,003

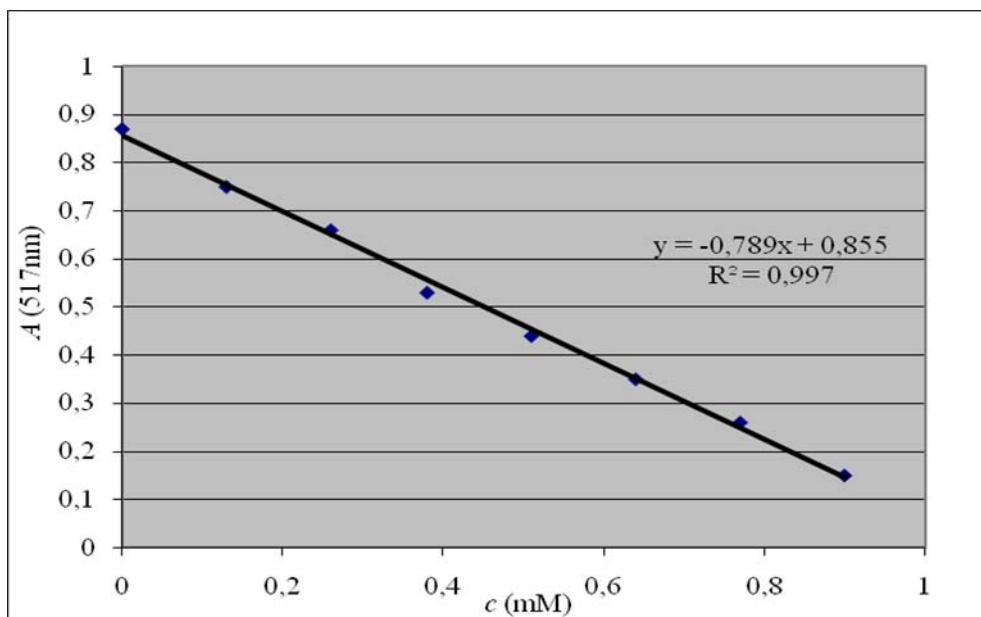
#### 4.1.2 Metoda z radikalom DPPH<sup>•</sup>

Antioksidacijski potencial vzorcev (AOP) smo določali z metodo, ki temelji na reakciji stabilnega radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH<sup>•</sup>) v raztopini 2 % MFK ali metanola z antioksidanti iz vzorca. Rezultat smo podali kot koncentracijo antioksidantov v plodovih šipka, izraženo kot ekvivalent klorogenske kislino.

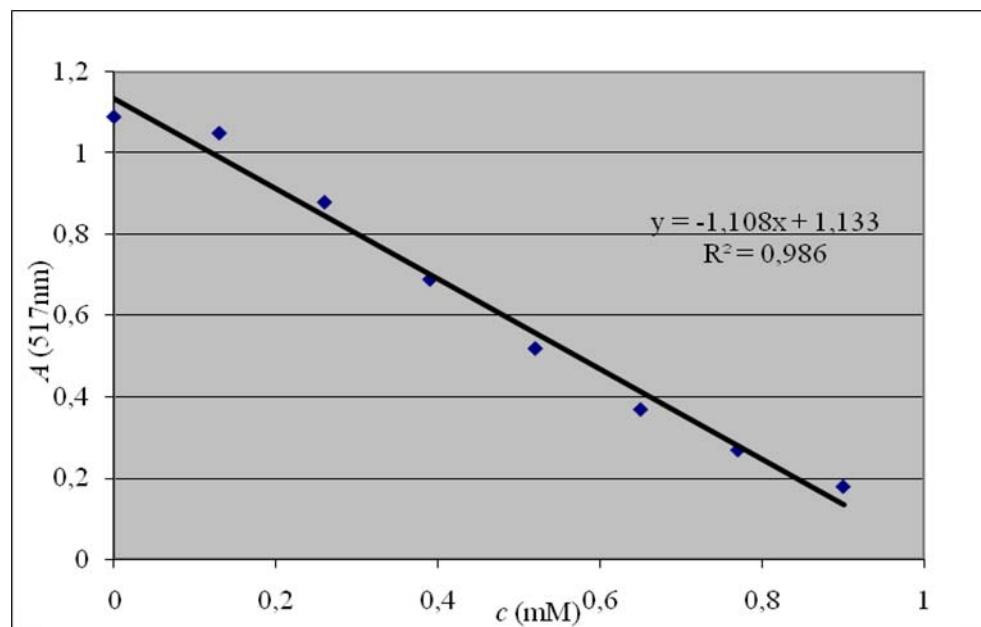
##### 4.1.2.1 Umeritvene krivulje

Najprej smo naredili umeritveni krivulji za klorogensko kislino, pri čemer smo kot topilo uporabili 2 % MFK (slika 30) in metanol (slika 31).

Absorbanca, izmerjena pri valovni dolžini 517 nm, linearno pada s količino dodane klorogenske kislino, kar je razvidno iz slik 30 in slike 31. S pomočjo umeritvene krivulje, prikazane na sliki 30, smo določili vsebnost antioksidantov v vzorcih šipka, ekstrahiranih z 2 % MFK. Vsebnost antioksidantov v vzorcih, ekstrahiranih z metanolom, pa smo določili s pomočjo umeritvene krivulje na sliki 31. AOP smo v vseh primerih izrazili kot ekvivalent klorogenske kislino.

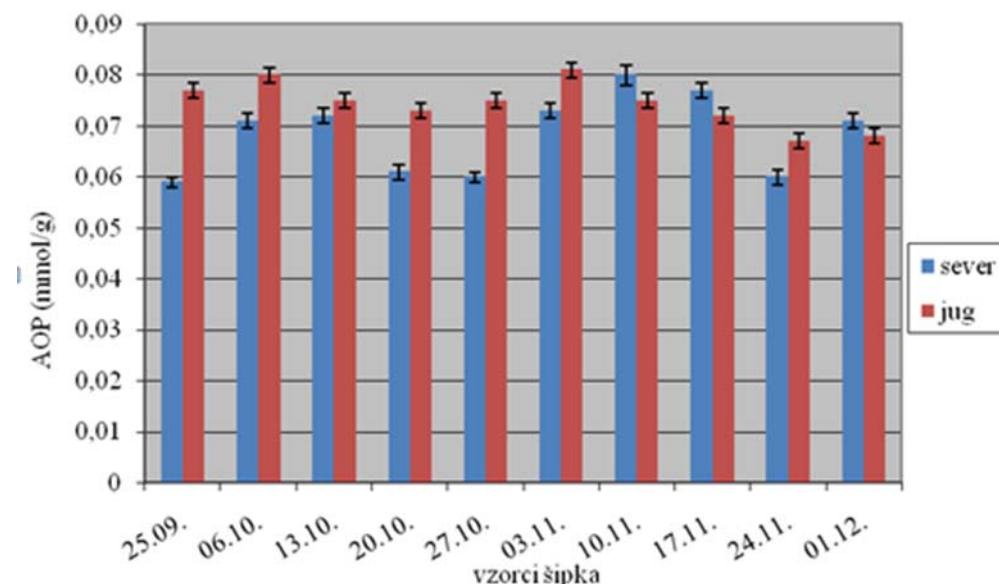


Slika 30: Odvisnost absorbance ( $\lambda=517$  nm) od koncentracije klorogenske kisline, raztopljene v 2 % metafosforni kislini (MFK), ob prisotnosti radikala DPPH<sup>•</sup>



Slika 31: Odvisnost absorbance ( $\lambda=517$  nm) od koncentracije klorogenske kisline, raztopljene v metanolu, ob prisotnosti radikala DPPH<sup>•</sup>

#### 4.1.2.2 Vzorci, ekstrahirani z 2 % metafosforno kislino

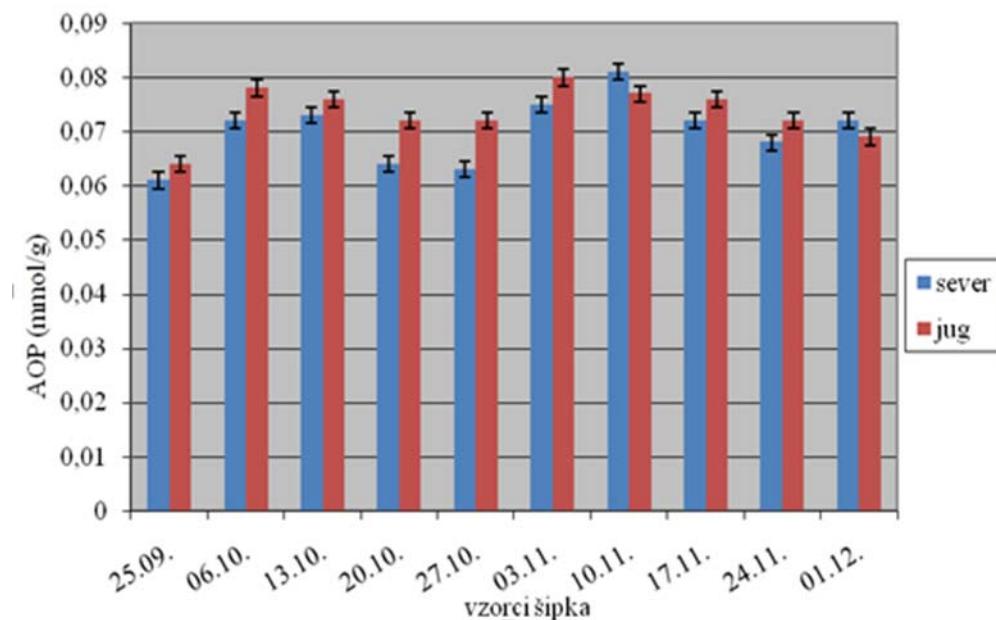


Slika 32: Antioksidativni potencial (AOP), izmerjen z metodo za določanje antioksidativnega potenciala z radikalom DPPH<sup>•</sup>, v plodovih šipka, obranih na severni in južni strani grma in ekstrahiranih v 2 % metafosforni kislini (MFK)

Iz slike 32 in preglednice 2 je razvidno, da se AOP plodov šipka med zorenjem med septembrom in decembrom spreminja. Najvišjo AOP smo določili vzorcu, obranemu 03.11.2008 na južni strani grma, in sicer 0,081 mmol/g, najnižjo AOP pa vzorcu, obranemu 25.09.2008 na severni strani grma, in sicer 0,059 mmol/g. Opazimo, da je AOP v plodovih šipka, obranih na južni strani grma od septembra do začetka novembra, višja do 30,5 % kot v plodovih, obranih na severni strani grma, kar je verjetno posledica južne, prisojne lege plodov, ki so v tem času bolj intenzivno obarvani kot tisti na severni strani. Kasneje pa se razmerje obrne. Torej je AOP v plodovih, obranih na južni strani grma od 10.11.2008 do 01.12.2008 nižja do 6,25 %, kot v plodovih, obranih na severni strani grma. Izjema je le vzorec, obran 24.11.2008.

Rezultati nam kažejo tudi, da se med zorenjem AOP v plodovih šipka, obranih na južni strani grma, manj spreminja (od 0,067 mmol/g do 0,081 mmol/g), medtem ko so v plodovih, obranih na severni strani grma, razlike večje (od 0,059 mmol/g do 0,080 mmol/g). AOP v plodovih, obranih na severni strani grma, v preiskovanem obdobju naraste za približno 20 %. Po drugi strani pa se v plodovih, obranih na južni strani, AOP celo malo zmanjša, in sicer za približno 8 %. Podoben trend smo opazili tudi pri vsebnosti skupnih fenolov.

#### 4.1.2.3 Vzorci, ekstrahirani z metanolom



Slika 33: Antioksidativni potencial (AOP), izmerjen z metodo za določanje antioksidativnega potenciala z radikalom DPPH<sup>•</sup>, v plodovih šipka, obranih na severni in južni strani grma in ekstrahiranih v metanolu

Iz slike 33 in preglednice 2 je razvidno, da ni večjih razlik v vsebnosti antioksidantov v plodovih, obranih na severni in južni strani grma. Razen v dveh primerih je vsebnost antioksidantov v plodovih, obranih na južni strani grma, vedno nekoliko višja kot v vzorcih s severne strani grma. Najvišjo AOP je vseboval vzorec, obran 10.11.2008 na severni strani grma, in sicer 0,081 mmol/g, najnižjo AOP pa vzorec, obran 25.09.2008 prav tako na severni strani grma, in sicer 0,061 mmol/g. Na koncu obiranja je bila AOP v plodovih, obranih na obeh straneh grma višja glede na prvo obiranje. V plodovih, obranih na severni strani grma, se je AOP povišala za približno 18 %, v plodovih, obranih na južni strani grma, pa se je AOP povišala manj – le za 8 %.

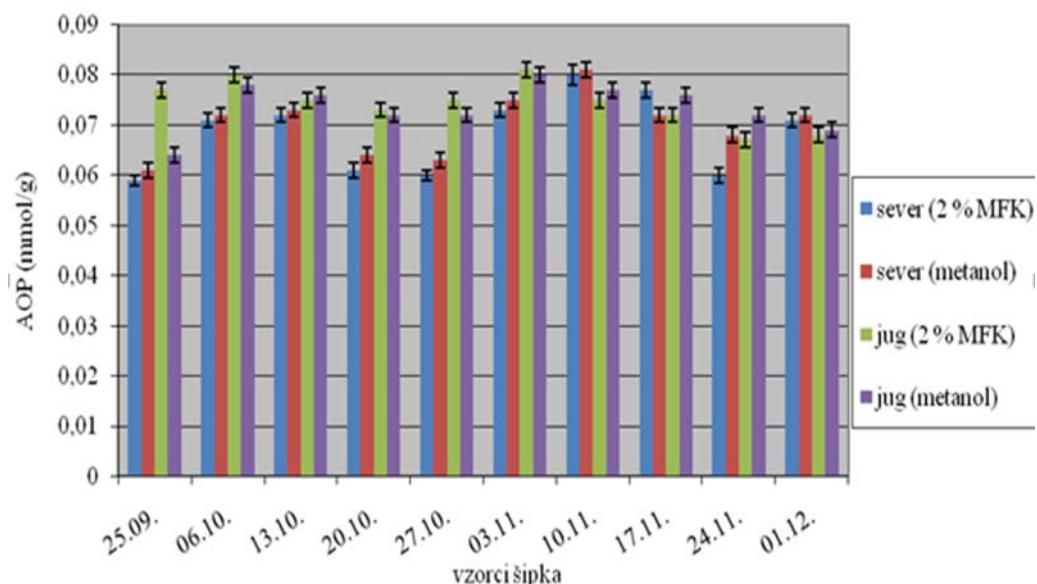
#### 4.1.2.4 Primerjava vodnih in metanolnih ekstraktov

Iz slike 34 in preglednice 2 je razvidno, da se koncentracija antioksidantov v šipku v preiskovanem obdobju (od septembra do decembra) spreminja, in sicer od 0,059 mmol/g do 0,081 mmol/g. AOP v vodnih (2 % MFK) in v metanolnih ekstraktih je v skoraj vseh vzorcih skoraj enaka, kar pomeni, da je vsebnost polarnih in manj polarnih antioksidantov v plodovih šipka približno enaka, kar je veljalo tudi za skupne polifenole. Do večjega odstopanja pride le pri prvem obiranju, kjer je vsebnost antioksidantov, ki se topijo v bolj polarnem topilu (2 % MFK) v plodovih, obranih na južni strani grma, višja za približno 20 %. V ostalih vzorcih so odstopanja majhna. Pri prvih šestih obiranjih v plodovih, obranih na južni strani grma (izjema je le tretje obiranje – 13.10.2008), smo določili več antioksidantov, ki se topijo v bolj polarnem topilu (2 % MFK). Če izpustimo prvo obiranje, pri katerem so razlike med antioksidanti, ki se topijo v bolj polarnih in tistimi, ki se topijo v manj polarnih topilih večje, in upoštevamo ostalih pet obiranj na južni strani grma, so odstopanja majhna, le od 1 % do

4 %. V plodovih, obranih na severni strani grma, pa je vsebnost le-teh nekoliko višja pri obiranju dne 17.11.2008, in sicer za približno 7 %.

Rezultati kažejo, da polovico vzorcev šipka, obranih na južni strani grma, vsebuje od 1 % do 20 % več antioksidantov, ki se topijo v bolj polarnem topilu (prvih šest obiranj, razen obiranje dne 13.10.2008) in polovico tistih, ki se topijo v manj polarnem metanolu (zadnja štiri obiranja in obiranje dne 13.10.2008), med katerimi so odstopanja od 1 % do 8 %. Vzorci, obrani na severni strani grma, pa vsebujejo od 1 % do 13 % več antioksidantov, ki se bolje topijo v manj polarnem topilu metanolu. Izjema je le vzorec, obran 17.11.2008.

Na podlagi analiz vodnih in metanolnih ekstraktov lahko zaključimo, da se AOP šipka med zorenjem spreminja, pri čemer je najnižja septembra, najvišja v začetku novembra, kasneje pa začne zopet padati.



Slika 34: Antioksidativni potencial (AOP), izmerjen z metodo za določanje antioksidativnega potenciala z radikalom DPPH<sup>•</sup>, v plodovih šipka, obranih na severni in južni strani grma ter ekstrahiranih v 2 % metafosforni kislini (MFK) in v metanolu

Preglednica 2: Antioksidativni potencial (AOP), izmerjen z metodo za določanje antioksidativnega potenciala z radikalom DPPH<sup>•</sup>, v plodovih šipka, obranih med 25.09.2008 in 01.12.2008 s severne in južne strani grma in ekstrahiranih v različnih topilih

Datum obiranja	AOP (mmol/g)			
	2 % MFK		95 % metanol + 5 % mravljična kislina	
	SEVER	JUG	SEVER	JUG
25.09.2008	0,059±0,002	0,077±0,003	0,061±0,003	0,064±0,003
06.10.2008	0,071±0,003	0,08±0,003	0,072±0,003	0,078±0,003
13.10.2008	0,072±0,003	0,075±0,003	0,073±0,003	0,076±0,003
20.10.2008	0,061±0,003	0,073±0,003	0,064±0,003	0,072±0,003
27.10.2008	0,06±0,025	0,075±0,003	0,063±0,003	0,072±0,003
03.11.2008	0,073±0,031	0,081±0,003	0,075±0,003	0,08±0,003
10.11.2008	0,08±0,004	0,075±0,003	0,081±0,003	0,077±0,003
17.11.2008	0,077±0,003	0,072±0,003	0,072±0,003	0,076±0,003
24.11.2008	0,06±0,003	0,067±0,003	0,068±0,003	0,072±0,003
01.12.2008	0,071±0,003	0,068±0,003	0,072±0,003	0,069±0,003

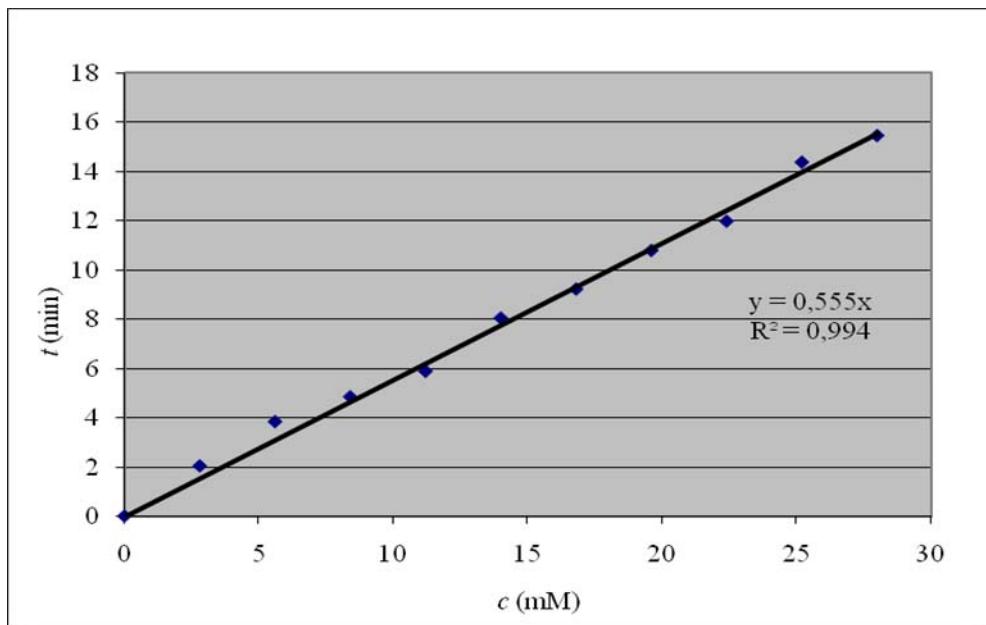
#### 4.1.3 Luminescenčna metoda

Z optimizirano luminescenčno metodo smo merili AOP v vzorcih šipka. Pri tej metodi je reakcija med kisikom in luminolom inhibirana dokler so antioksidanti na voljo. AOP je premosorazmerna času inhibicije luminescence. Metoda je natančneje opisana v poglavju 2.3.1.2.

S fluorimetrom smo merili emisijo svetlobe pri 420 nm. Prilagoditi je bilo potrebno tudi koncentracijo dodanega encima, ki je bila takšna, da je bil začetni signal luminescence vedno približno 600 a.u.

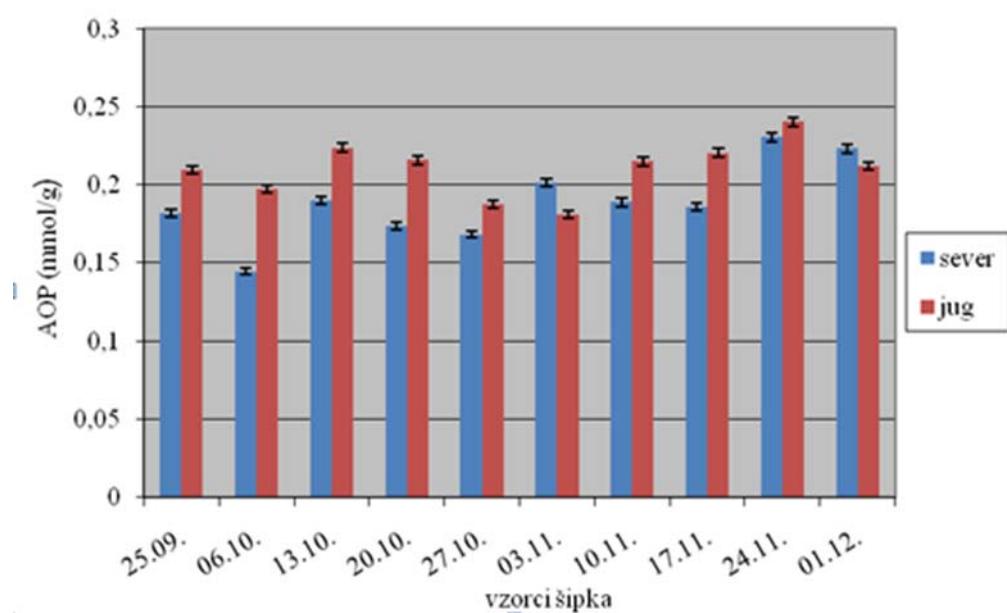
##### 4.1.3.1 Umeritvena krivulja

Naredili smo umeritveno krivuljo za klorogensko kislino, pri čemer smo kot topilo uporabili 2 % MFK. Tudi pri luminescenčni metodi je umeritvena krivulja standardne raztopine klorogenske kisline linearна. Čas inhibicije luminescence linearно narašča s količino dodane klorogenske kisline, kar je razvidno iz slike 35. S pomočjo te umeritvene krivulje smo določili AOP v vzorcih šipka, ekstrahiranih tako z 2 % MFK kot z metanolom, saj so bile količine dodanega metanolnega ekstrakta majhne (4 µL) in je zato topilo le malo vplivalo na naklon umeritvene krivulje.



Slika 35: Odvisnost časa inhibicije luminescence od koncentracije klorogenske kisline, raztopljene v 2 % metafosforni kislini (MFK)

#### 4.1.3.2 Vzorci, ekstrahirani z 2 % metafosforno kislino

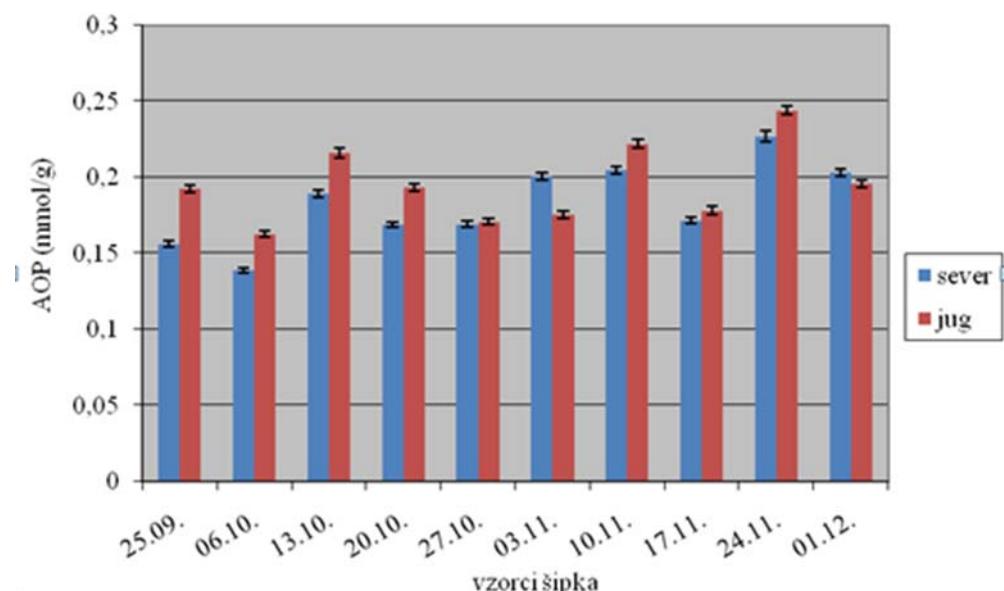


Slika 36: Antioksidativni potencial (AOP), izmerjen z luminescenčno metodo, v plodovih šipka, obranih na severni in južni strani grma in ekstrahiranih v 2 % metafosforni kislini (MFK)

Iz slike 36 in preglednice 3 je razvidno, da se AOP, določena z luminescenčno metodo, prav tako spreminja v času zorenja med septembrom in decembrom. Podobno kot pri ostalih dveh

metodah je bila izmerjena AOP v plodovih šipka, ki so bili obrani na južni-prisojni strani grma, skoraj vedno višja (od 4 % do 37,5 %) kot v plodovih s severne strani grma. Izjema sta vzorca, obrana 03.11.2008 in 01.12.2008. Pri prvem je bila AOP v vzorcu, obranem na južni strani grma, za 10 % nižja glede na vzorec, obran na severni strani grma. Pri drugem pa je bila razlika AOP vzorcev 5 %. Najvišjo AOP je vseboval vzorec, obran 24.11.2008 na južni strani grma, in sicer 0,240 mmol/g, najnižjo AOP pa vzorec, obran 06.10.2008 na severni strani grma, in sicer 0,144 mmol/g. AOP se v plodovih šipka, obranih na južni strani grma, med zorenjem spreminja manj (od 0,144 mmol/g do 0,230 mmol/g), kot v plodovih, ki so bili obrani na severni strani grma (od 0,181 mmol/d do 0,240 mmol/g). Če primerjamo prvo in zadnje obiranje se je AOP v plodovih, obranih na južni strani grma, povišala le za 1,4 %. V plodovih, obranih na severni strani grma, pa se je AOP povišala za 22,5 %.

#### 4.1.3.3 Vzorci, ekstrahirani z metanolom

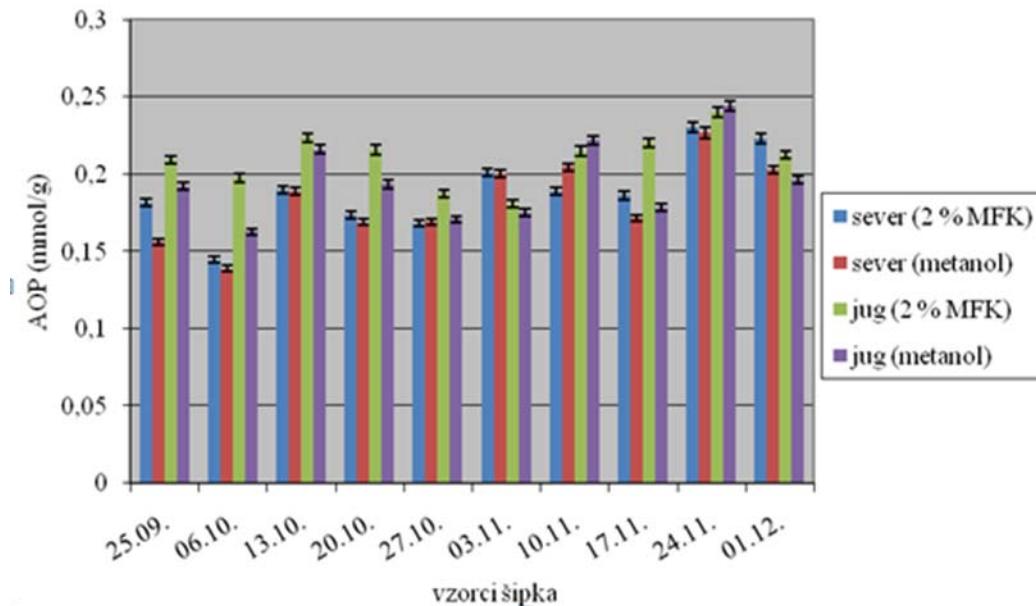


Slika 37: Antioksidativni potencial (AOP) v plodovih šipka, izmerjen z luminescenčno metodo, obranih na severni in južni strani grma in ekstrahiranih v metanolu

Iz slike 37 in preglednice 3 je razvidno, da je tudi pri vzorcih, ekstrahiranih z metanolom, izmerjena AOP skoraj vedno višja (od 1 % do 23 %) v tistih, ki so bili obrani na južni strani grma. Izjema sta vzorca, nabранa 03.11.2008 in 01.12.2008, pri katerih je AOP na južni strani pri prvem nižja za 12,5 %, pri drugem vzorcu pa za 3,4 %. Med zorenjem je AOP nihala, kar je verjetno posledica spremenljivega jesenskega vremena. Najvišjo AOP je vseboval vzorec, obran 24.11.2008 na južni strani grma, in sicer 0,244 mmol/g, najnižjo AOP pa vzorec, obran 06.10.2008 na severni strani grma, in sicer 0,139 mmol/g. Pri obiranjih 27.10.2008 in 17.11.2008 sta se AOP vzorcev, obranih na obeh straneh grma zelo približali. Razlika AOP med vzorcem, obranim na severni, in vzorcem, obranim na južni strani grma, je dne 27.10.2008 le 1,2 %. Pri vzorcih, obranih 17.11.2008, pa je razlika v AOP 3,5 %. Pri zadnjem obiranju je bila AOP v plodovih, obranih na severni in južni strani grma višja kot pri prvem obiranju. Pri vzorcih, obranih na severni strani grma je bila AOP višja za 30 % pri zadnjem

obiranju glede na prvo obiranje. Pri vzorcih, obranih na južni strani grma, pa se je AOP povišala le za 2 %.

#### 4.1.3.4 Primerjava vodnih in metanolnih ekstraktov



Slika 38: Antioksidativni potencial (AOP) v plodovih šipka, izmerjen z luminescenčno metodo, obranih na severni in južni strani grma ter ekstrahiranih v 2 % metafosforni kislini (MFK) in v metanolu

Iz preglednice 3 in slike 38 je razvidno, da je AOP šipka od 0,139 mmol/g do 0,224 mmol/g. Vidimo tudi, da smo z luminescenčno metodo v naših vzorcih določili več antioksidantov, ki se topijo v bolj polarnem topilu (2 % MFK). Vendar smo zasledili tudi izjeme, kot je vzorec, obran 27.10.2008 na severni strani grma, vzorec, obran 10.11.2008 na severni in južni strani grma, in vzorec, obran 24.11.2008 na južni strani grma. Za preostale vzorce pa lahko ugotovimo, da je pri vzorcih, obranih na severni strani grma in ekstrahiranih v različnih topilih, vrednost AOP od 0,5 % do 14 % nižja v vzorcih, ekstrahiranih v metanolu. Pri vzorcih, obranih na južni strani grma in ekstrahiranih v različnih topilih, pa je vrednost AOP od 4 % do 19 % nižja prav tako v vzorcih, ekstrahiranih v metanolu. Rezultati kažejo, da so bile zaradi različne polarnosti topil večje razlike (od 9 % do 24 %) pri petih vzorcih, obranih 25.09.2008 (severna stran grma), 06.10.2008 (južna stran grma), 20.10.2008 (južna stran grma), 27.10.2008 (južna stran grma) in 17.11.2008 (južna stran grma). Omenjeni vzorci so vsebovali več antioksidantov, topnih v bolj polarnem topilu.

Tudi za AOP v plodovih šipka, izmerjeno z luminescenčno metodo velja, da se od septembra do novembra povečuje, v začetku decembra pa se ponovno začne zniževati. Nihanje AOP je verjetno zopet posledica spremenljivega jesenskega vremena.

Preglednica 3: Antioksidativni potencial (AOP), izmerjen z luminescenčno metodo, v plodovih šipka, obranih med 25.9.2008 in 01.12. 2008 s severne in južne strani grma in ekstrahiranih v različnih topilih

Datum obiranja	AOP (mmol/g)			
	2 % MFK		95 % metanol + 5 % mravljična kislina	
	SEVER	JUG	SEVER	JUG
25.09.2008	0,182±0,005	0,209±0,005	0,156±0,004	0,192±0,005
06.10.2008	0,144±0,004	0,198±0,005	0,139±0,004	0,163±0,004
13.10.2008	0,190±0,005	0,224±0,006	0,189±0,005	0,216±0,006
20.10.2008	0,174±0,005	0,216±0,006	0,169±0,004	0,193±0,005
27.10.2008	0,168±0,004	0,187±0,005	0,169±0,004	0,171±0,004
03.11.2008	0,201±0,005	0,181±0,005	0,200±0,005	0,175±0,005
10.11.2008	0,189±0,005	0,215±0,006	0,205±0,005	0,222±0,006
17.11.2008	0,186±0,005	0,220±0,006	0,172±0,004	0,178±0,005
24.11.2008	0,230±0,006	0,240±0,006	0,227±0,007	0,244±0,006
01.12.2008	0,223±0,006	0,212±0,005	0,203±0,005	0,196±0,005

#### 4.1.4 Primerjava metod za določanje antioksidativne aktivnosti

Zanimalo nas je, kako različne metode za določanje AOP in skupnih fenolov korelirajo med seboj.

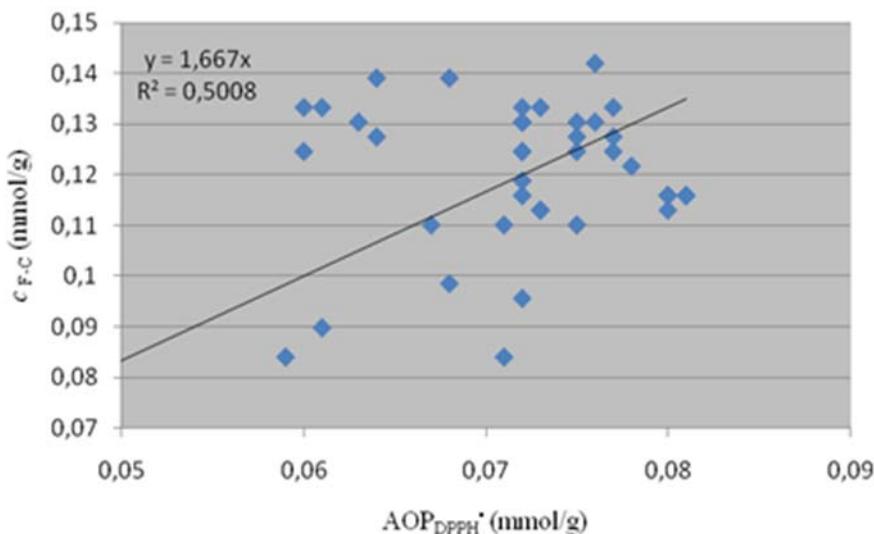
Na sliki 39 lahko vidimo korelacijo med skupnimi fenoli, določenimi v šipkovih ekstraktih z metodo F-C ( $c_{F-C}$ ), in AOP, izmerjeno z metodo za določanje AOP z radikalom DPPH<sup>•</sup> ( $AOP_{DPPH}^{\bullet}$ ). Pearsonov korelacijski koeficient ( $r$ ) je 0,73 ( $\alpha<0,01$ ), kar pomeni, da je korelacija med temi metodama visoka.

Na sliki 40 je prikazana primerjava rezultatov skupnih fenolov v šipkovih ekstraktih, izmerjenih z metodo F-C ( $c_{F-C}$ ), in AOP, določena z luminescenčno metodo ( $AOP_{luminol}$ ), ki nam pokaže, da je zveza med vrednostmi AOP in skupnih fenolov, izmerjena s temi dvema metodama visoka, saj je Pearsonov korelacijski koeficient ( $r$ ) 0,71 ( $\alpha<0,01$ ).

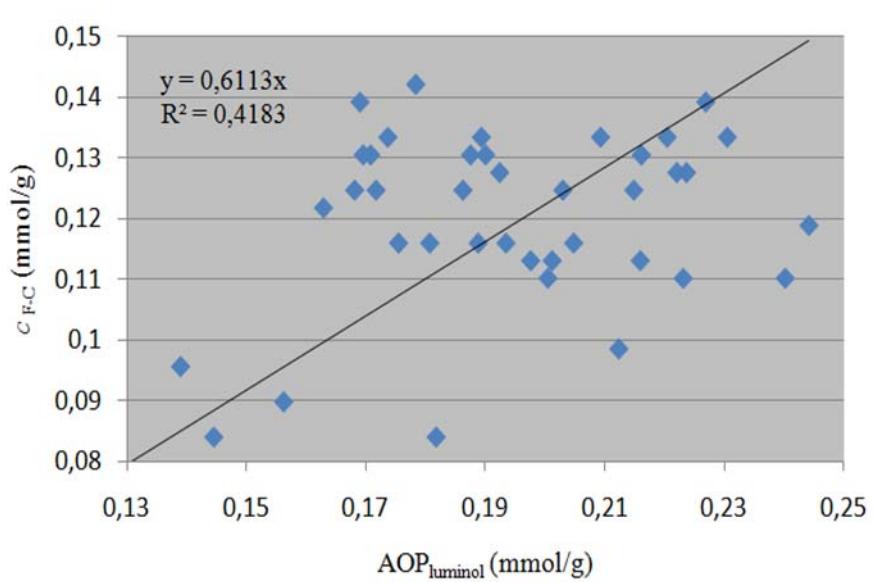
Slika 41 prikazuje korelacijo med metodo za določanje AOP z radikalom DPPH<sup>•</sup> ( $AOP_{DPPH}^{\bullet}$ ) in luminescenčno metodo ( $AOP_{luminol}$ ), pri čemer je Pearsonov korelacijski koeficient ( $r$ ) 0,71, kar kaže na visoko korelacijo obeh metod za določanje AOP v analiziranih šipkovih ekstraktih.

Na podlagi dobljenih rezultatov, ki so prikazani na slikah 39, 40 in 41, lahko zaključimo, da so vse tri metode med seboj v visoki korelaciji za določanje AOP v ekstraktih, pridobljenih iz šipkovih plodov. Opazimo tudi, da so izmerjene vrednosti najnižje pri metodi za določanje skupnih fenolov, medtem ko nam daje luminescenčna metoda vedno najvišje vrednosti. Do

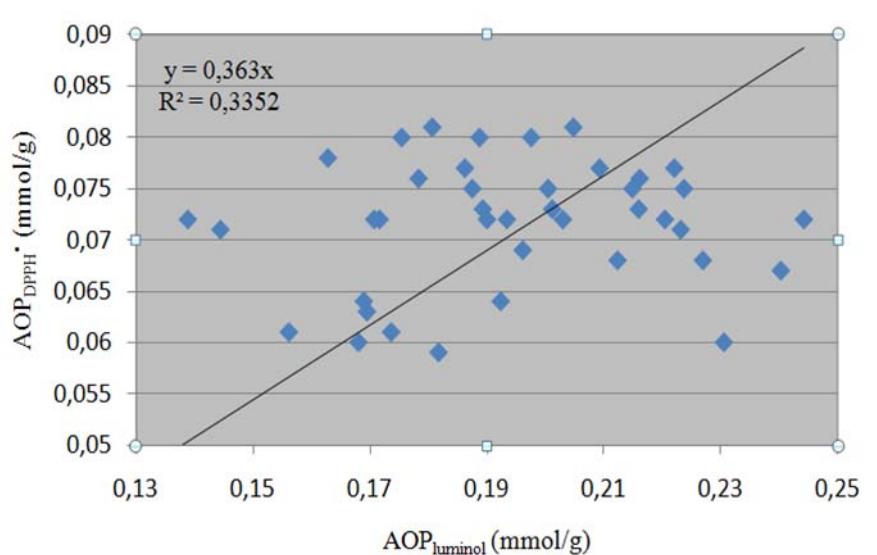
razlik pride kljub temu, da smo pri vseh metodah uporabljali isti standard, klorogensko kislino. Kot kaže, so metode različno občutljive za posamezne antioksidante.



Slika 39: Zveza med skupnimi fenoli, določenimi s spektrofotometrično metodo s Folin–Ciocalteaujevim reagentom ( $c_{F-C}$ ) in antioksidativnim potencialom, izmerjenim z metodo za določanje antioksidativnega potenciala z radikalom DPPH $^\bullet$  ( $AOP_{DPPH}^\bullet$ ) v vzorcih, ekstrahiranih v 2 % metafosforni kislini (MFK) in v metanolu



Slika 40: Zveza med skupnimi fenoli, določenimi s spektrofotometrično metodo s Folin–Ciocalteaujevim reagentom ( $c_{F-C}$ ), in antioksidativnim potencialom, izmerjenim z luminescenčno metodo (AOP<sub>luminol</sub>) v vzorcih, ekstrahiranih v 2 % metafosforni kislini (MFK) in v metanolu



Slika 41: Zveza med antioksidativnim potencialom, izmerjenim z metodo za določanje antioksidativnega potenciala z radikalom DPPH<sup>•</sup> (AOP<sub>DPPH'</sub>), in antioksidativnim potencialom, izmerjenim z luminescenčno metodo (AOP<sub>luminol</sub>) v vzorcih, ekstrahiranih v 2 % metafosformi kislini (MFK) in v metanolu

#### 4.2 VSEBNOST POSAMEZNIH FENOLNIH KISLIN IN FLAVONOIDOV V PLODOVIH ŠIPKA

Spektrofotometrična metoda F–C podaja samo okvirne vrednosti o skupni vsebnosti fenolnih spojin, medtem ko lahko s HPLC-MS metodo določamo tudi vsebnosti posameznih fenolnih spojin.

Direktna analiza neprečiščenih metanolnih ekstraktov šipka ni bila mogoča, saj so vsebovali preveč nečistoč, ki so motile analizo. Zato smo uporabili SPE in na ta način odstranili moteče komponente, ki jih šipek vsebuje veliko. Ekstrakcijo smo izvedli s SPE kolonami Strata-X, ker po podatkih iz literature zagotavljajo dobre izkoristke.

Tudi tako prečiščeni ekstrakti niso dali zadovoljivih rezultatov, zato smo vzorce pustiti v hladilniku 1 mesec pri 4 °C. V tem času je v kislem mediju po vsej verjetnosti potekla cepitev sladkornih ostankov, vezanih na hidroksilne skupine oz. direktno vezanih na ogljikov atom v aromatskem obroču. Brez tega postopka ni bilo mogoče identificirati in kvantificirati fenolnih spojin v vzorcih, ker so le-ti vsebovali preveč motečih komponent.

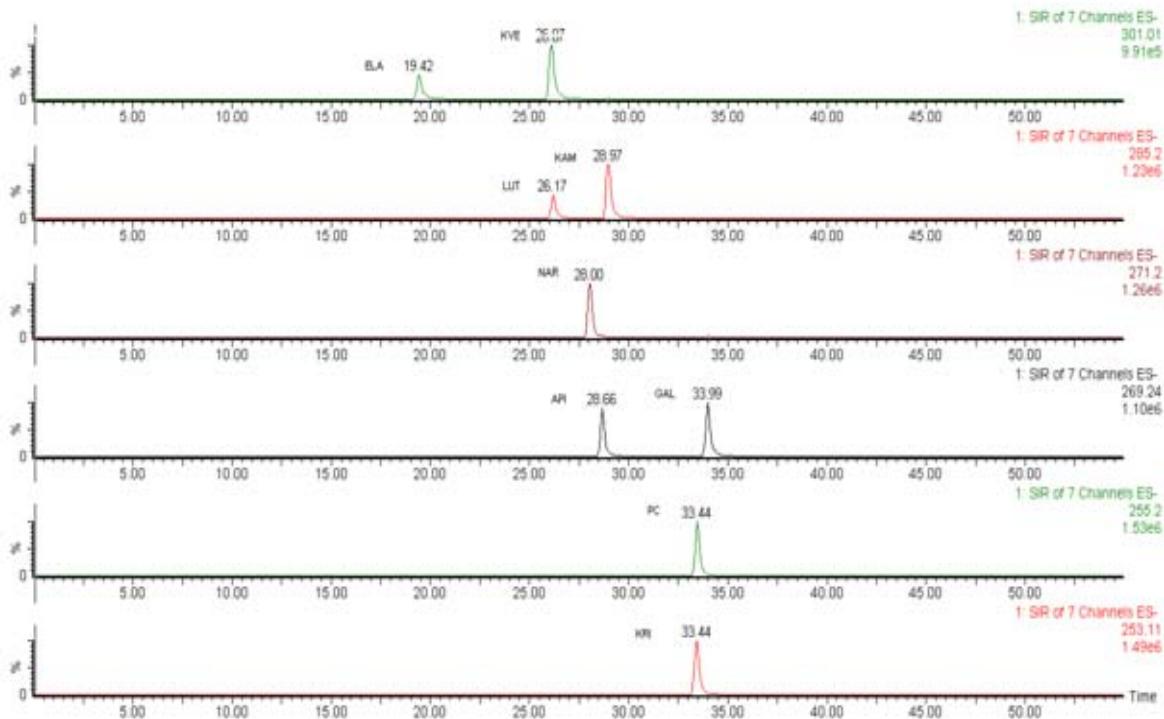
Fenolne spojine (flavonoide in fenolne kisline) smo določili s primerjavo retencijskih časov in molskih mas oz. m/z vrednosti standardov – mase molekulskih negativno nabitih ionov (preglednica 4).

Preglednica 4: Retencijski časi, molske mase in m/z vrednosti posameznih fenolnih spojin

Spojina	Oznaka	Rt (min)	M (g/mol)	m/z vrednost [M-H] <sup>-</sup>
elaginska kislina	ELA	19,42	302,19	300,91
kvercetin	KVE	26,07	302,23	301,01
luteolin	LUT	26,17	286,26	258,20
kamferol	KAM	28,97	286,24	285,20
naringenin	NAR	28,00	272,26	271,20
apigenin	API	28,66	270,24	269,24
galangin	GAL	33,99	270,24	269,24
pinocembrin	PC	33,44	256,25	255,20
krizin	KRI	33,44	254,24	253,11

Rt: retencijski čas; M: molska masa

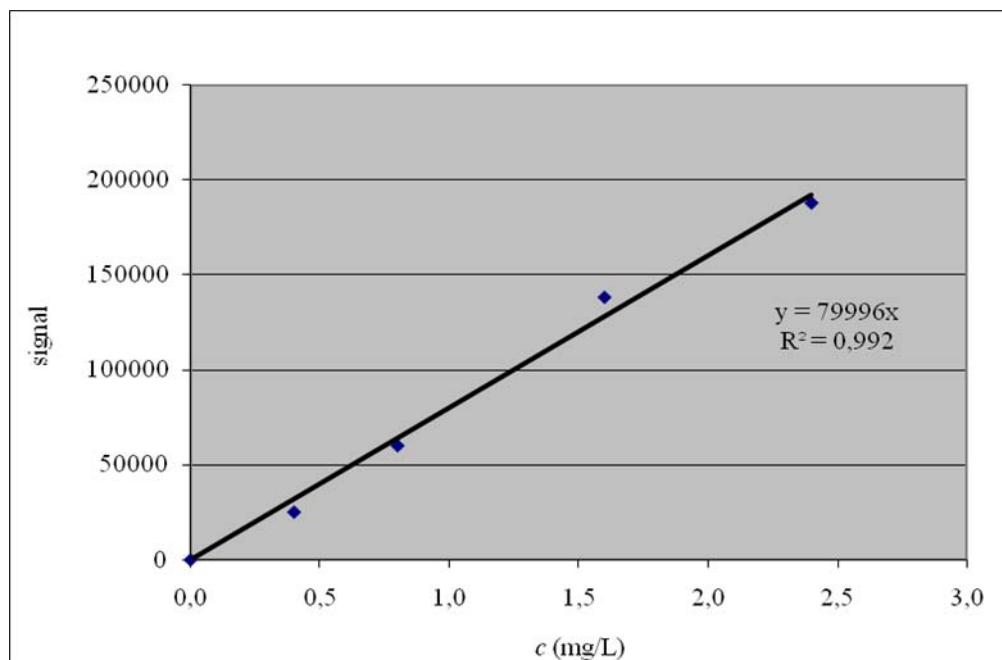
#### 4.2.1 Umeritvene krivulje



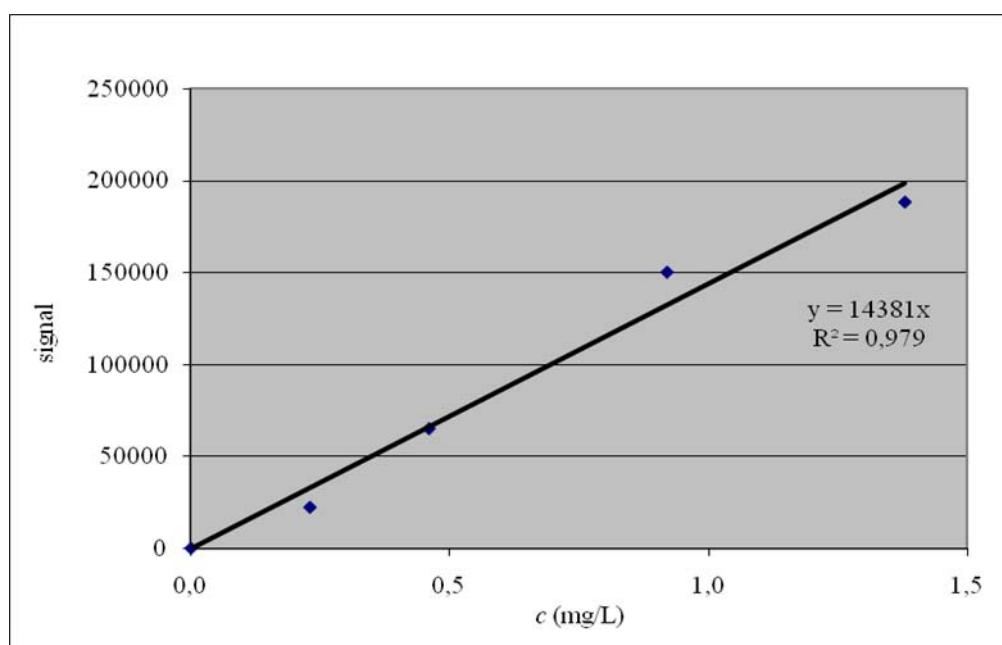
Slika 42: HPLC/ESI(-)/MS kromatogram standardne raztopine mešanice fenolnih spojin

Iz preglednice 4 je razvidno, da se nekatere spojine iz kolone eluirajo skoraj istočasno. To so kvercetin, luteolin, kamferol, naringenin in apigenin, ter galangin, pinocembrin in krizin. Zato smo uporabili HPLC v povezavi z MS detektorjem, kjer spojine z podobnimi retencijskimi časi lahko obravnavamo v ločenih kanalih glede na njihove odgovarjajoče m/z vrednosti. Le na ta način smo lahko prepričani, da smo identificirali pravo spojino. Za devet fenolnih spojin, za katere smo imeli na voljo standarde, smo pripravili umeritvene krivulje, tako da smo identificirane fenolne spojine v šipku lahko tudi kvantificirali.

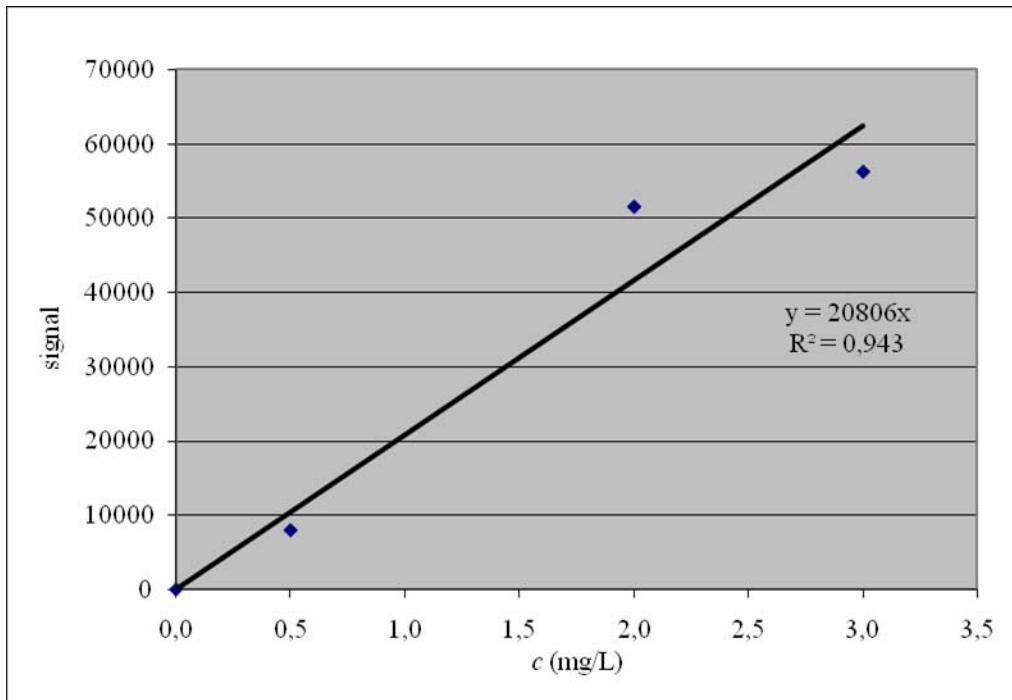
S pomočjo umeritvenih krivulj smo določili koncentracijo posamezne fenolne spojine v dveh vzorcih, ki sta imela glede na predhodne meritve s F-C, DPPH<sup>•</sup> in luminescenčno metodo najbolj različno vsebnost antioksidantov.



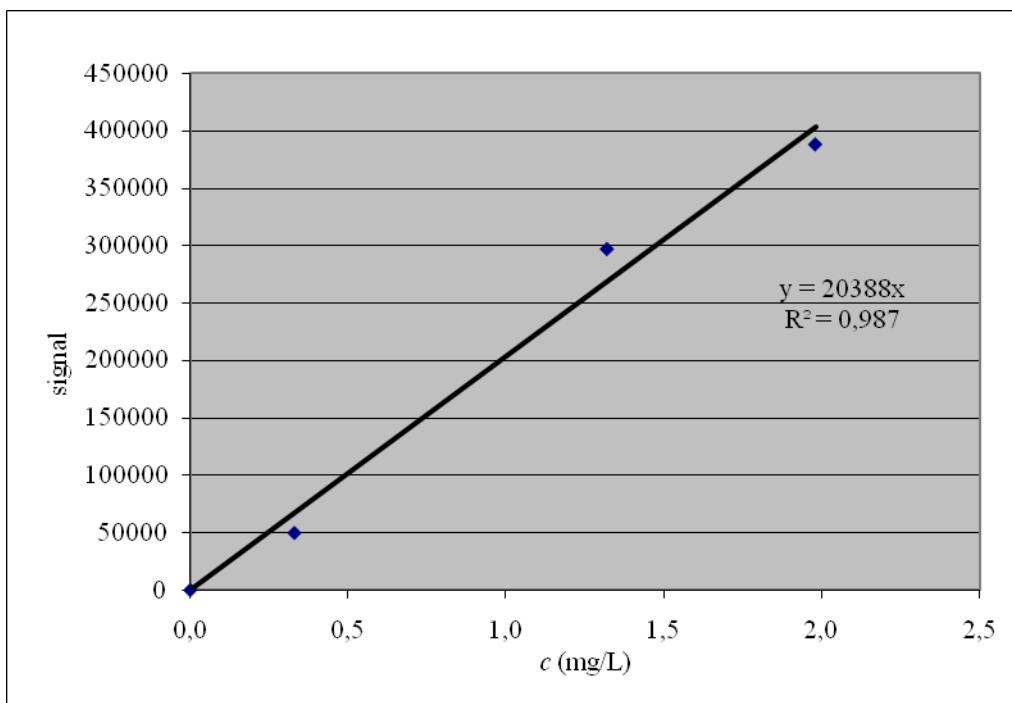
Slika 43: Signal elaginske kisline v odvisnosti od njene koncentracije



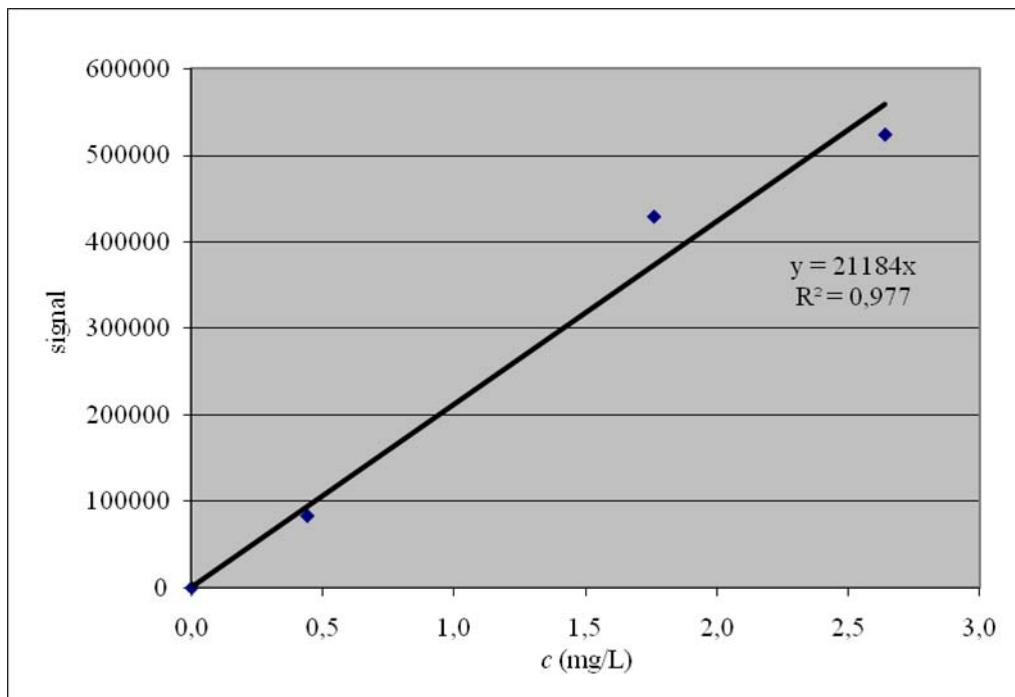
Slika 44: Signal luteolina v odvisnosti od njegove koncentracije



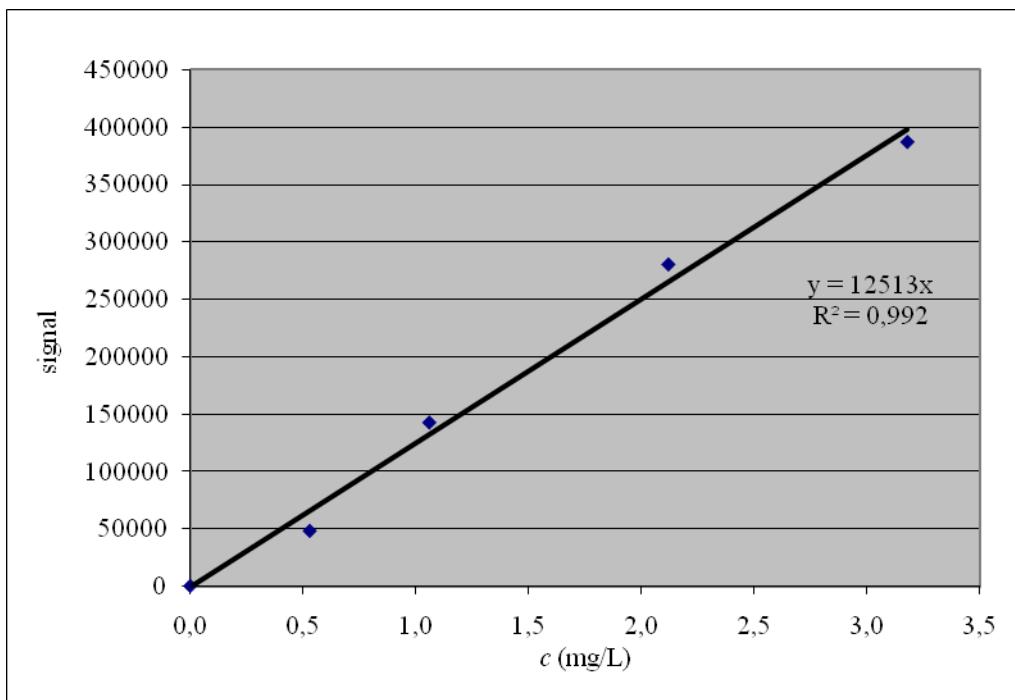
Slika 45: Signal naringenina v odvisnosti od njegove koncentracije



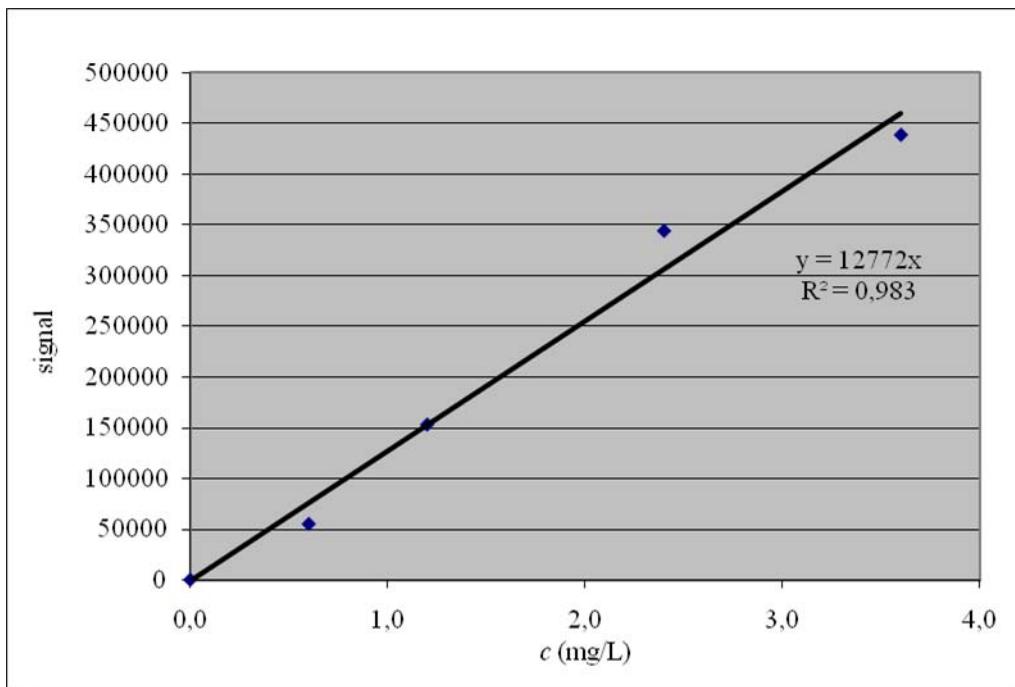
Slika 46: Signal galangina v odvisnosti od njegove koncentracije



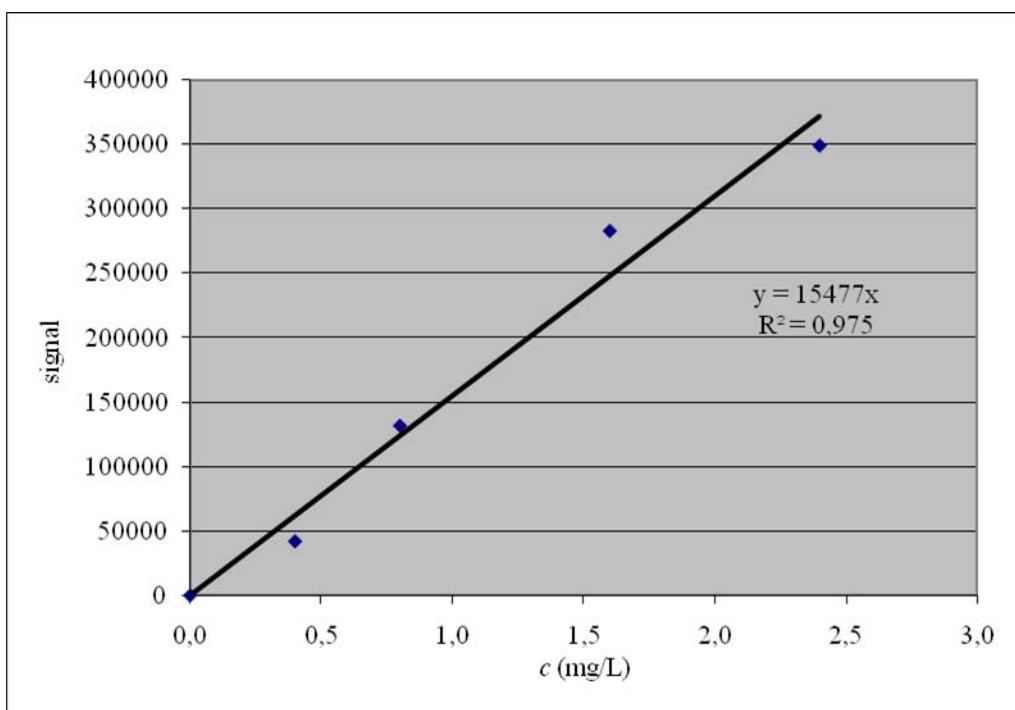
Slika 47: Signal krizina v odvisnosti od njegove koncentracije



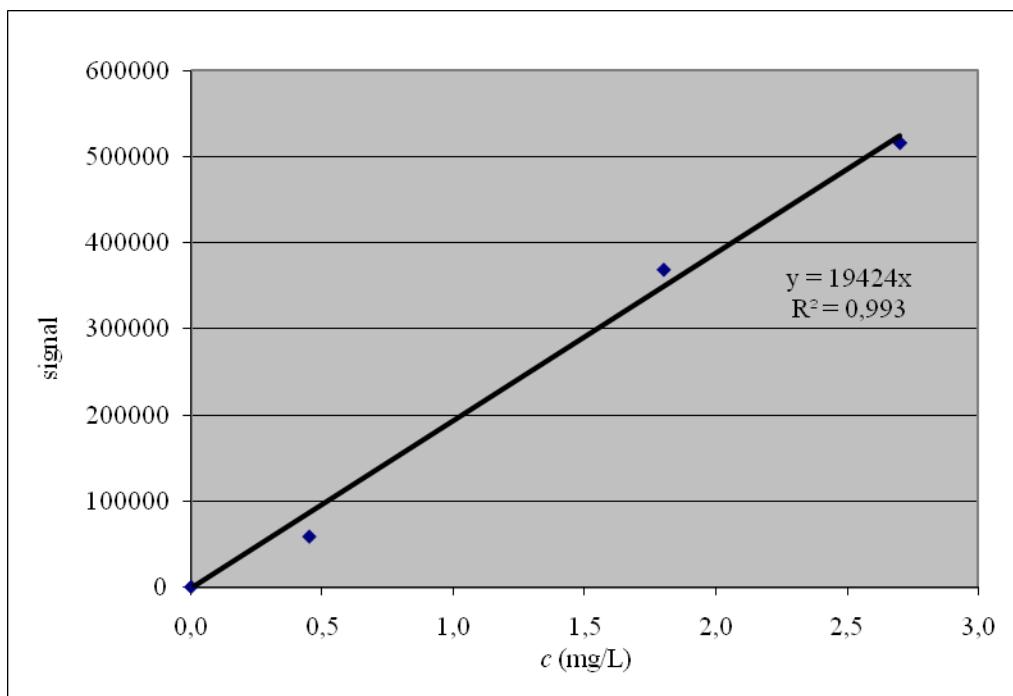
Slika 48: Signal kvercetina v odvisnosti od njegove koncentracije



Slika 49: Signal kamferola v odvisnosti od njegove koncentracije

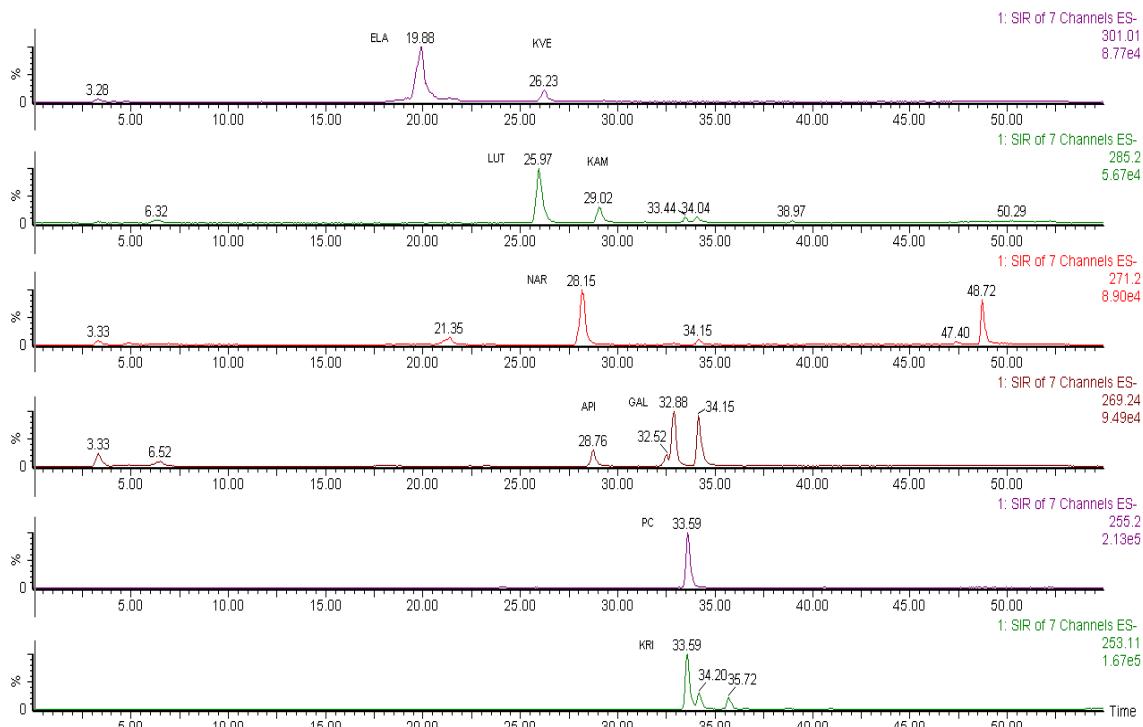


Slika 50: Signal apigenina v odvisnosti od njegove koncentracije

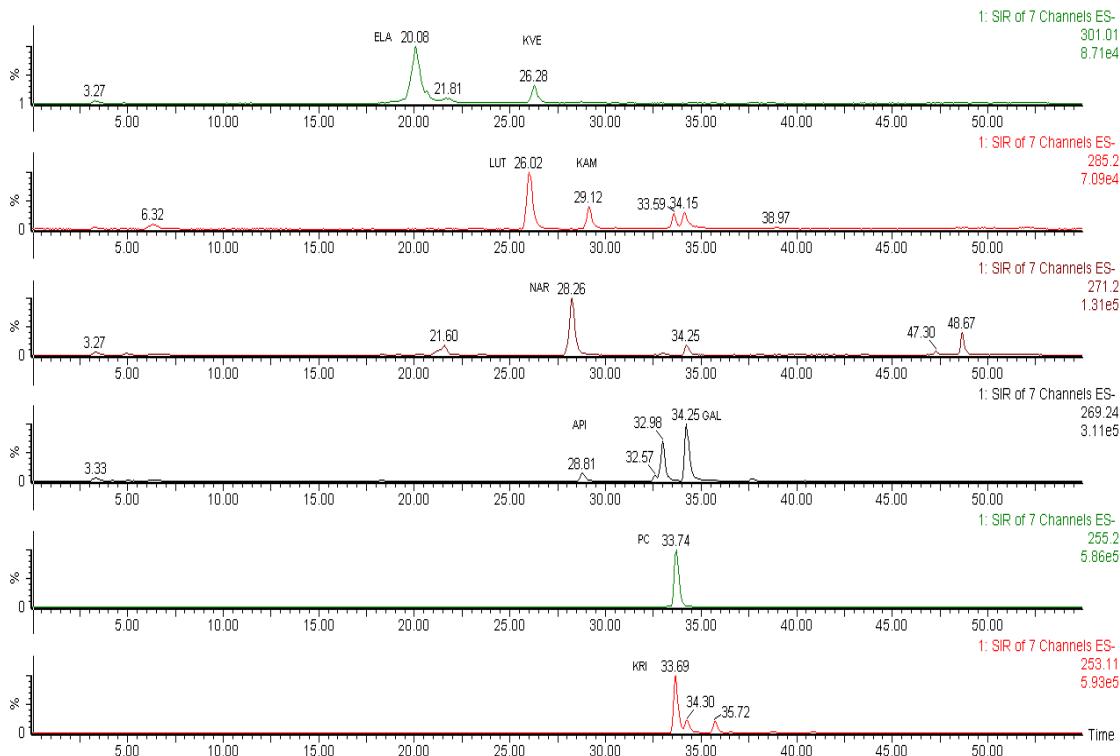


Slika 51: Signal pinocembrina v odvisnosti od njegove koncentracije

#### 4.2.2 Analiza vzorcev



Slika 52: HPLC/ESI(-)/MS kromatogram plodov šipka, obranih 25.09.2008 na severni strani grma. Za identifikacijo vrhov glej preglednico 4

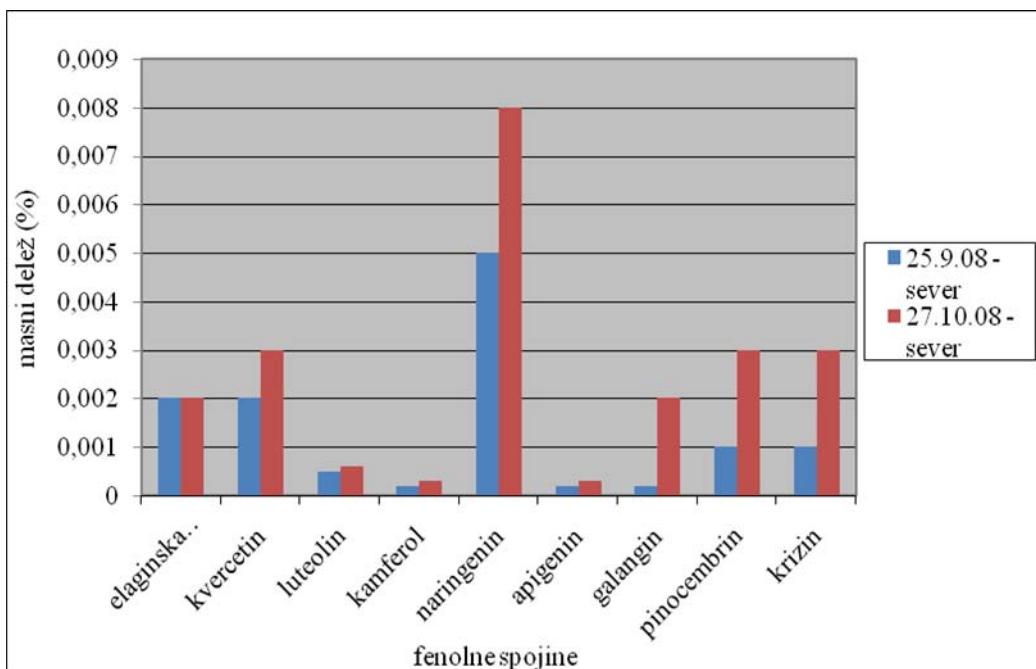


Slika 53: HPLC/ESI(–)/MS kromatogram plodov šipka, obranih 27.10.2008 na severni strani grma. Za identifikacijo vrhov glej preglednico 4

Na HPLC/ESI(–)/MS kromatogramu smo analizirali dva različna metanolna ekstrakta, ki smo ju izbrali na podlagi vsebnosti skupnih fenolov, izmerjenih z metodo F–C, kot je opisano v poglavju 2.3.2. Izbrali smo vzorca, obrana 25.09.2008 in 27.10.2008 na severni strani grma. Prvi vzorec je vseboval 0,090 mmol/g, drugi pa 0,131 mmol/g skupnih fenolov, izraženih v ekvivalentih klorogenske kisline.

Iz slike 54 je razvidno, da je vsebnost vseh identificiranih in kvantificiranih fenolnih spojin v plodovih, obranih 27.10.2008, višja, kot v plodovih, obranih 25.09.2008. To se ujema tudi z analizo skupnih fenolov, saj smo v prvem vzorcu določili več skupnih fenolov kot v drugem vzorcu. Oba analizirana vzorca vsebujejo največ naringenina. Vzorec, obran 25.09.2008, vsebuje 0,005 % le-tega, vzorec, obran 27.10.2008 pa 0,008 %. Drugi vzorec tako vsebuje kar 60 % več naringenina kot prvi vzorec. V plodovih, obranih 25.09.2008, mu sledita elaginska kislina in kvercetin z vrednostima 0,002 %. Nekaj manj je pinocembrina in krizina, 0,001 %. Sledijo pa še luteolin (0,0005 %), kamferol (0,0002 %), apigenin (0,0002 %) in galangin (0,0002 %). To razmerje je nekoliko drugačno v plodovih, obranih 27.10.2008, kjer naringeninu (0,008 %) sledijo kvercetin, pinocembrin in krzin z 0,003 %. Nekaj manj je galangina in elaginske kisline, in sicer 0,002 %. V najnižji koncentraciji pa so prisotni luteolin (0,0006 %), kamferol (0,0003 %) in apigenin (0,0003 %).

Kot kažejo rezultati, se med zorenjem najbolj poveča vsebnost naringenina (za 60 %), najmanj pa vsebnost elaginske kisline, ki se ne spremeni.



Slika 54: Masni delež posameznih fenolnih kislin in flavonoidov v plodovih šipka, obranih na severni strani grma in ekstrahiranih v metanolu

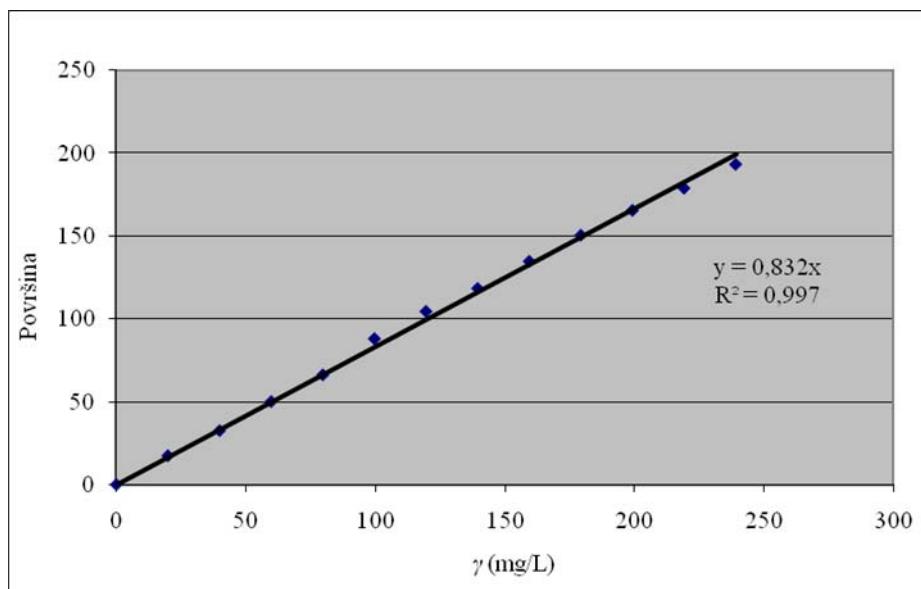
#### 4.3 VSEBNOST VITAMINA C V PLODOVIH ŠIPKA

Vitamin C v plodovih šipka smo določali z metodo HPLC s spektrofotometričnim UV-VIS detektorjem. Absorbanco smo merili pri valovni dolžini 250 nm. Metoda je natančneje opisana v poglavju 2.3.3.1.

Zanimal nas je masni delež askorbinske kisline in masni delež celotnega vitamina C, ki smo ga določalo po dodatku reducenta TCEP, ki oksidirano obliko askorbinske kisline (DHA) reducira. Analizirali smo vzorce, ekstrahirane z 2 % MFK z dodanim TCEP-jem in tiste brez dodanega TCEP-ja.

##### 4.3.1 Umeritvena krivulja

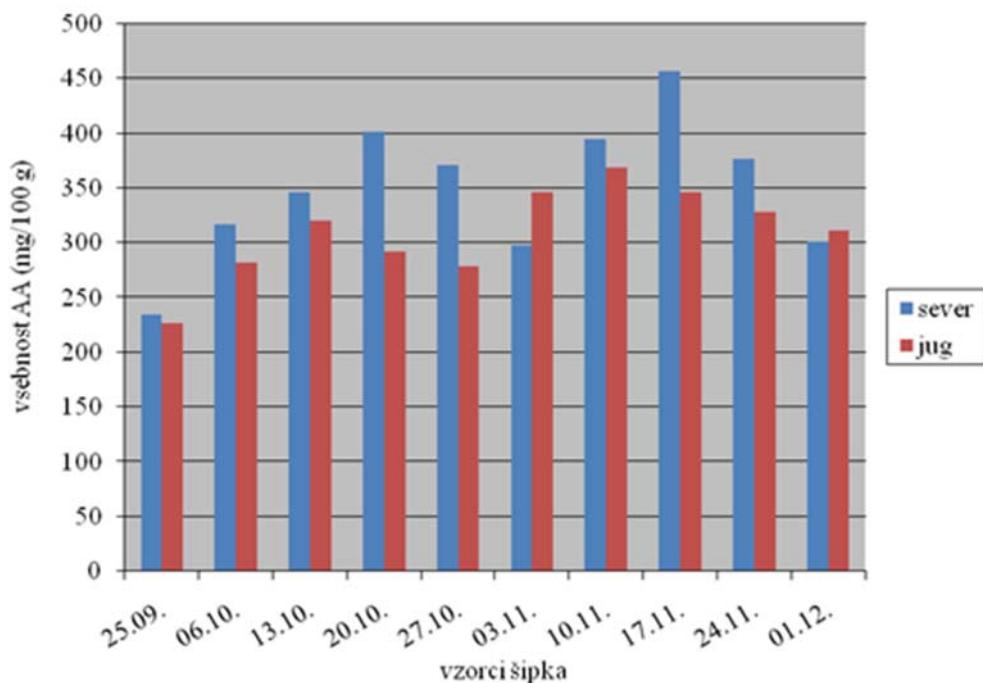
Naredili smo umeritveno krivuljo, ki je prikazana na sliki 55. Površine vrhov linearne naraščajo z večanjem koncentracije AA. S pomočjo umeritvene krivulje smo kasneje izračunali koncentracijo AA in celotnega vitamina C v šipku.



Slika 55: Odvisnost površine vrha od koncentracije askorbinske kisline, raztopljene v 2 % metafosforni kislini (MFK)

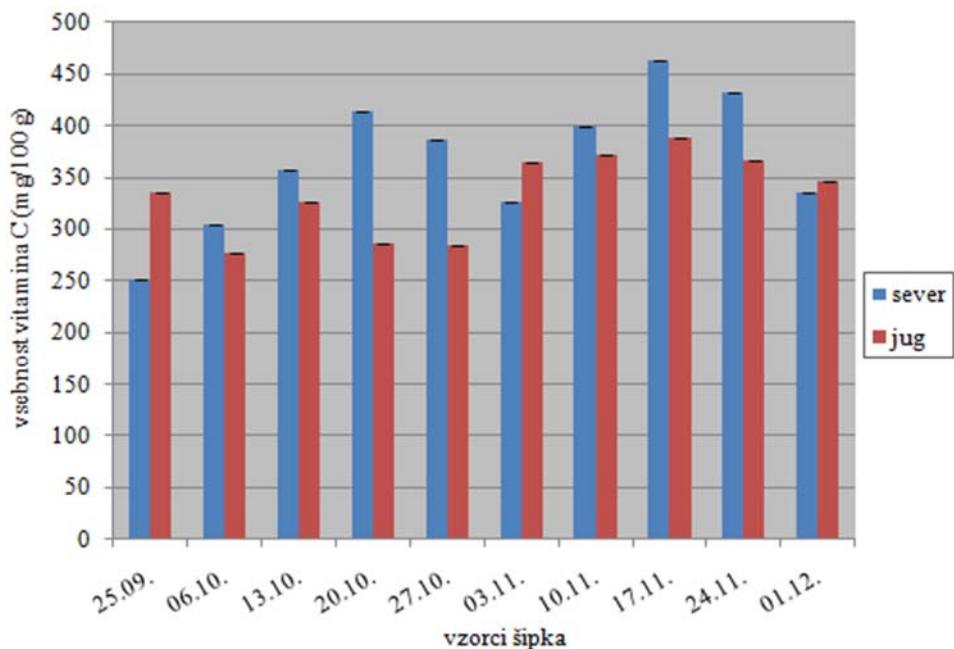
#### 4.3.2 Askorbinska kislina

Iz slike 56 je razvidno, da se vsebnost AA v času zorenja med septembrom in decembrom spreminja. Vsebnost AA je skoraj v vseh primerih večja v plodovih, ki so bili obrani na severni strani grma v primerjavi s plodovi, obranimi na južni strani grma. Izjemni sta le vzorca, obrana 25.09.2008 in 01.12.2008, ko sta vsebnosti skoraj enaki, pri vzorcu, obranem 03.11.2008 pa je količina AA v plodovih, obranih na severni strani, nižja kot v plodovih, obranih na južni strani. Iz rezultatov vidimo tudi, da je vsebnost AA v plodovih, obranih pri zadnjem obiranju večja, kot pri prvem obiranju, in sicer v plodovih, obranih na severni strani grma za 28 %, v plodovih, obranih na južni strani grma pa za 37 %. Najvišjo vsebnost AA imajo plodovi, ki so bili obrani 17.11.2008 na severni strani grma (457 mg/100 g). V plodovih, obranih na južni strani grma, pa smo določili najvišjo vsebnost AA v tistih, ki so bili obrani en teden prej (369 mg/100 g). Od sredine novembra vsebnost AA začne zopet padati. Najnižjo vsebnost AA vsebujejo plodovi, obrani 25.09.2008 na severni (235 mg/100g) in južni strani grma (227 mg/100 g). Največji razlici med plodovi, obranimi na severni in južni strani grma, sta se pojavili sredi oktobra (20.10.2008) in nato zopet sredi novembra (17.11.2008) in sta bili 110 (mg/100 g).



Slika 56: Vsebnost AA v plodovih šipka, obranih na severni in južni strani grma in ekstrahiranih v 2 % metafotoforni kislini (MFK)

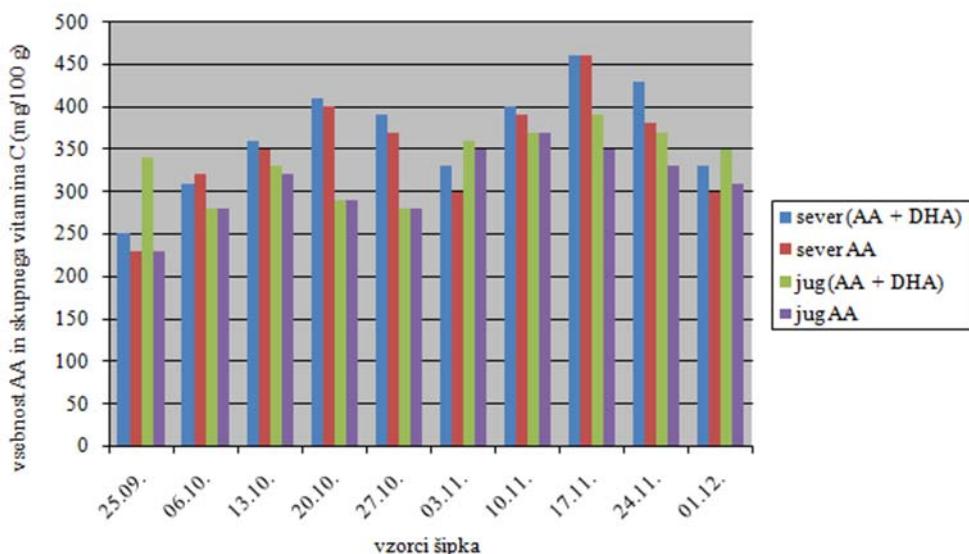
#### 4.3.3 Skupni vitamin C



Slika 57: Vsebnost skupnega vitamina C (AA+DHA) v plodovih šipka, obranih na severni in južni strani grma in ekstrahiranih v 2 % metafotoforni kislini (MFK) in dodanim TCEP

Znano je, da ob dodatku reducenta TCEP poteče redukcija DHA v AA. Torej smo s pomočjo reducenta lahko izmerili skupni vitamin C v plodovih šipka, kar je razvidno tudi iz slike 57 in preglednice 5. Vsebnost vitamina C se med zorenjem spreminja, vendar je pri zadnjem obiranju v plodovih, obranih na severni strani grma, večja za 34 %. V plodovih, obranih na južni strani grma, pa le za 4 % večja, glede na prvo obiranje. Najvišjo vsebnost vitamina C v plodovih, obranih na severni in južni strani grma, smo izmerili v plodovih, obranih 17.11.2008, in sicer na severni strani znaša 463 mg/100 g, na južni strani pa 389 mg/100 g. Najnižjo vsebnost vitamina C vsebujejo plodovi prvega obiranja na severni strani grma (251 mg/100 g). Največja razlika med plodovi, obranimi na severni in južni strani grma, se je pojavila sredi oktobra (20.10.2008) in znaša 128 mg/100 g. Pri zadnjem obiranju razlike med severnimi in južnimi plodovi skoraj ni.

#### 4.3.4 Primerjava vsebnosti askorbinske kisline in skupnega vitamina C v plodovih šipka



Slika 58: Vsebnost askorbinske kisline (AA) in skupnega vitamina C (AA+DHA) v plodovih šipka, obranih na severni in južni strani grma in ekstrahiranih v 2 % metafosforni kislini (MFK)

Iz slike 58 in preglednice 5 je razvidno, da šipek vsebuje od 227 do 463 mg/100 g vitamina C. V literaturi različni avtorji navajajo različne vsebnosti AA v šipku. Uggla (2004) navaja, da je v šipku od 130 do 6694 mg/100 g AA. Ercisli (2007) navaja, da je v šipku od 300 do 4000 mg/100 g AA. Naši rezultati so tako znotraj teh vrednosti, čeprav ekstremno visokih vrednosti v naših vzorcih nismo izmerili. To je verjetno posledica sorte in lokacije zorenja šipka.

Podobno kot za AOP in vsebnost skupnih fenolov velja, da tudi vsebnost AA in skupnega vitamina C v plodovih šipka do sredine novembra narašča, nato pa začne padati.

Rezultati kažejo tudi, da je vsebnost DHA v skoraj vseh vzorcih majhna v primerjavi z AA, saj je le od 3 do 116 mg/100 g. Nekoliko večjo vsebnost smo izmerili le pri sedmih od dvajsetih vzorcev, in sicer v vzorcih, obranih 25.09.2008 na južni strani grma (48 %), 03.11.2008 na severni strani grma (10 %), 17.11.2008 na južni strani grma (12 %), 24.11.2008 na severni (15 %) in južni (12 %) strani grma in 01.12.2008 na severni (11 %) in

južni (12 %) strani grma. Iz tega lahko sklepamo, da ti vzorci vsebujejo nekaj več oksidirane oblike vitamina C, dehidroaskorbinske kisline, ki je manj stabilna. Večina analiziranih vzorcev pa vsebuje predvsem bolj stabilno reducirano obliko vitamina C. Iz slike 58 in preglednice 5 je razvidno tudi, da je največja razlika med severnimi in južnimi plodovi izmerjena v vzorcih, obranih 20.10.2008 in 27.10.2008. 20.10.2008 je vsebnost AA višja za 38 %, vsebnost celotnega vitamina C pa za 45 % v plodovih, obranih na severni strani grma, glede na plodove, obrane na južni strani grma. 27.10.2008 je vsebnost AA višja za 33 %, vsebnost celotnega vitamina C pa za 35 % v plodovih, obranih na severni strani grma, glede na plodove, obrane na južni strani grma.

Preglednica 5: Vsebnost askorbinske kisline in skupnega vitamina C (AA+DHA) v plodovih šipka, izmerjena z metodo HPLC, obranih med 25.9.2008 in 01.12.2008 s severne in južne strani grma

Datum obiranja	askorbinska kislina (mg/100 g)		skupni vitamin C (mg/100 g)	
	SEVER	JUG	SEVER	JUG
25.09.2008	235±0,004	227±0,004	251±0,004	335±0,005
06.10.2008	317±0,006	282±0,005	305±0,005	277±0,004
13.10.2008	346±0,006	320±0,006	357±0,006	327±0,005
20.10.2008	402±0,007	292±0,005	414±0,006	286±0,005
27.10.2008	371±0,007	279±0,005	386±0,006	285±0,004
03.11.2008	298±0,005	346±0,006	327±0,005	365±0,006
10.11.2008	395±0,007	369±0,007	400±0,006	372±0,006
17.11.2008	457±0,008	347±0,006	463±0,007	389±0,006
24.11.2008	377±0,007	329±0,006	433±0,007	367±0,006
01.12.2008	301±0,005	311±0,006	335±0,005	347±0,005

## 5 SKLEPI

Glede na rezultate opravljenih analiz smo prišli do naslednjih zaključkov:

- Vsebnosti skupnih fenolnih spojin, posameznih fenolih spojin, antioksidantov in vitamina C se v plodovih šipka spreminja med septembrom in decembrom, kar je verjetno posledica zorenja in spremenljivega jesenskega vremena.
- Vsebnost skupnih fenolov, AOP in vitamina C v plodovih šipka se v zgodnji jeseni (od septembra do novembra) povečuje, v pozni jeseni (začetek decembra) pa se njihova vsebnost ponovno začne zniževati.
- Na vsebnost skupnih fenolnih spojin, posameznih fenolih spojin, antioksidantov in vitamina C vpliva lega plodov na grmu. AOP in vsebnost skupnih fenolov sta v južnih plodovih višja kot v severnih. Pri vitaminu C je ravno obratno.
- Vodni ekstrakti in metanolni ekstrakti vsebujejo podobne količine antioksidantov in skupnih fenolov.
- Metode F-C, DPPH<sup>•</sup> in luminescenčna so različno občutljive na različne antioksidante, a so v dobri korelaciji, saj so Pearsonovi koeficienti: ( $r_{F-C, DPPH^{\bullet}}$ ) 0,73, ( $r_{F-C, \text{luminol}}$ ) 0,71 in ( $r_{DPPH^{\bullet}, \text{luminol}}$ ) 0,71.
- Koncentracija skupnih fenolov v šipku, izmerjena z metodo F-C je od 0,084 do 0,139 mmol/g.
- Vsebnost skupnih fenolov v plodovih šipka je najvišja od sredine do konca oktobra in znaša od 0,131 mmol/g do 0,139 mmol/g, ter od sredine do konca novembra in znaša od 0,139 mmol/g do 0,142 mmol/g.
- Vsebnost skupnih fenolov v plodovih je najnižja konec septembra in začetek oktobra, in sicer 0,084 mmol/g.
- AOP, izmerjena z metodo DPPH<sup>•</sup> v šipku, je od 0,059 do 0,081 mmol/g.
- AOP, določena z metodo DPPH<sup>•</sup> v plodovih šipka, je najvišja v začetku oktobra, in sicer 0,08 mmol/g ter v začetku novembra, in sicer 0,081 mmol/g.
- AOP, določena z metodo DPPH<sup>•</sup> v plodovih šipka, je najnižja konec septembra, in sicer 0,059 mmol/g.
- AOP, izmerjena z luminescenčno metodo v šipku, je od 0,139 do 0,244 mmol/g.
- AOP, določena z luminescenčno metodo v plodovih šipka, je najvišja sredi oktobra in konec novembra in znaša od 0,224 mmol/g do 0,244 mmol/g.

- AOP, določena z luminescenčno metodo v plodovih šipka, je najnižja v začetku oktobra, in sicer 0,139 mmol/g.
- AOP, izmerjena z luminescenčno metodo v šipku, je od 36 % do 200 % višja od AOP, izmerjene z metodo DPPH<sup>•</sup>.
- Vsebnosti skupnih fenolov in AOP sta skoraj vedno za malenkost višji v plodovih, obranih na južni strani grma, kar je posledica intenzivnejše obarvanosti plodov na južni prisojni legi.
- Šipek vsebuje od 227 do 463 mg/100 g vitamina C. Od tega DHA predstavlja od 3 do 116 mg/100 g.
- Šipek vsebuje veliko motečih komponent, zato je pred analizo posameznih fenolnih spojin nujno potrebno izvesti ekstrakcijo na trdni fazi in vzorec pustiti v kislem mediju določen čas, da poteče hidroliza.
- Od fenolnih spojin je v šipku največ naringenina (od 5 mg/100 g do 8 mg/100 g), sledijo mu pinocembrin (od 1 mg/100 g do 3 mg/100 g), krizin (od 1 mg/100g do 3 mg/100g), kvercetin (od 2 mg/100 g do 3 mg/100 g), elaginska kislina (2 mg/100 g), galangin (od 0,2 mg/100 g do 2 mg/100 g), luteolin (od 0,5 mg/100 g do 0,6 mg/100 g), kamferol (od 0,2 mg/100 g do 0,3 mg/100 g) in apigenin (od 0,2 mg/100 g do 0,3 mg/100 g).
- Med zorenjem se najbolj poveča vsebnost naringenina (za 60 %), najmanj pa vsebnost elaginske kisline, ki se ne spremeni.

## 6 POVZETEK

V okviru diplomske naloge smo žeeli ugotoviti vpliv zorenja (med septembrom in decembrom) in položaja plodov na grmu (sever in jug) na AOP, vsebnosti vitamina C in polifenolnih spojin v plodovih šipka, ki raste za Biotehniško fakulteto v Ljubljani. Zanimalo nas je tudi, kako zorenje in položaj plodov na grmu (sever in jug) vplivata na vsebnost bolj polarnih in manj polarnih antioksidantov v šipku.

Plodove šipka je bilo potrebno predhodno pripraviti, zato smo jih takoj po obiranju homogenizirali in ekstrahirali, ter do analize shranjevali v zmrzovalniku pri -20 °C. Za ekstrakcijo smo uporabili polarno topilo 2 % MFK, manj polarno topilo metanol z dodatkom 5 % mravljične kisline in 2 % MFK z dodatkom reducenta TCEP.

Skupne fenolne spojine smo določali s spektrofotometrično metodo z uporabo F-C reagenta. AOP smo določali z metodo DPPH<sup>•</sup> in luminescenčno metodo. Pri vseh metodah smo analizirali vzorce, ekstrahirane z 2 % MFK in metanolom. Izkazalo se je, da z različnimi metodami reagirajo različni antioksidanti. Pri metodi za določanje skupnih fenolov so izmerjene vrednosti najnižje, medtem ko nam daje luminescenčna metoda vedno najvišje vrednosti. Vse tri metode pa so med seboj v dobri korelaciji za določanje AOP v ekstraktih, pridobljenih iz šipkovih plodov, saj so Pearsonovi koeficienti: ( $r_{F-C, DPPH^{\bullet}}$ ) 0,73, ( $r_{F-C, \text{luminol}}$ ) 0,71 in ( $r_{DPPH^{\bullet}, \text{luminol}}$ ) 0,71.

Posamezne fenolne spojine v vzorcih smo določali s sistemom HPLC, sklopljene z masnim spektrometrom (MS). Pred izvedbo HPLC-MS analiz smo iz vzorcev odstranili moteče komponente s pomočjo SPE s kolonami Strata-X in jih pustili en mesec v kislem mediju, da je potekla cepitev sladkornih ostankov, vezanih na hidroksilne skupine oz. direktno vezanih na ogljikov atom v aromatskem obroču. Posamezne fenolne spojine smo identificirali in kvantificirali na podlagi molskih mas oz. m/z vrednosti in s pomočjo standardov. Analizirali smo dva vzorca, ekstrahirana v metanolu, ki smo ju izbrali s pomočjo predhodnih analiz opravljenih z metodo F-C. Prišli smo do zaključka, da se vsebnost flavonoidov in fenolnih kislin med zorenjem poveča. Najbolj se poveča vsebnost naringenina, najmanj pa vsebnost elaginske kisline, ki se ne spremeni.

Vitamin C smo določili s tehniko HPLC. Analizirali smo vzorce, ekstrahirane z 2 % MFK in 2 % MFK z dodatkom reducenta TCEP. Kot smo pričakovali, smo izmerili višje vrednosti v vzorcih z dodanim reducentom, ker je potekla redukcija DHA v AA.

Polarnost topil ni bistveno vplivala na rezultate. Lahko pa zaključimo, da so različne metode občutljive na različne antioksidante. Z metodo F-C smo določili več manj polarnih skupnih fenolov. Z metodo DPPH<sup>•</sup> smo v polovici plodov šipka, obranih na južni strani grma, določili več antioksidantov, ki se bolje topijo v polarnem topilu in polovico tistih, ki se bolje topijo v manj polarnem topilu. V plodovih, obranih na severni strani grma, pa smo določili več manj polarnih antioksidantov. Z luminescenčno metodo smo določili več polarnih antioksidantov.

Vsebnost skupnih fenolnih spojin, vitamina C in AOP je v plodovih šipka med zorenjem nihala. In sicer, od septembra do novembra se je povečevala, v začetku decembra pa se je njihova vsebnost ponovno začela zniževati. Znotraj posamezne meritve smo primerjali tudi vsebnost skupnih fenolov, vitamina C in AOP, v plodovih, obranih na severni in južni strani grma. Ugotovili smo, da so vsebnosti antioksidantov pri večini vzorcev, obranih z južne strani grma, višji kot pri tistih, ki so bili obrani na severni strani grma. Pri vitaminu C so bili rezultati ravno obratni.

## 7 VIRI

Abram V., Šegatin N. 2001. Moderne fizikalno-kemiske metode, ki omogočajo ugotavljanje funkcionalnih sestavin. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi 2001, Portorož, 8-9. nov. 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 193-206.

Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. Farmacevtski vestnik, 48: 573-589.

Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26-27. okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32.

Aldstadt J., Ammerman J. 2005. Comprehensive development and application to the identification of biotoxins. V: A chemical microcontaminant database. Milwaukee, University of Wisconsin-Milwaukee.

<http://www.gliw.uwm.edu/centers/cws/projects/aldstadt.php> (March 2009): 1 str.

Atari N. A. 1982. Piezoluminescence phenomenon. Physics Letters A, 90, 1/2: 93-96.

Batič M., Raspor P. 2000. Kvasna biomasa kot vir antioksidativnih snovi. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26-27. okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 67-76.

Belitz H.D., Grosch W., Schieberle P. 2007. Food chemistry. 3<sup>rd</sup> ed. Berlin, Springer Verlag: 378-394, 748-800.

Brodnjak Vončina D. 2006. Analizna kemija II. Zbrano gradivo. Maribor, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 109-111.

Ciolino H., Daschner P., Yeh G. 1999. Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. Biochemistry Journal, 340: 715-722.

Ekstrakcija in ločevanje naravnih barvil. 2003. Projekt Timko. Ljubljana, Gimnazija Vič, (december 2006)

[http://www.gimvic.org/projekti/timko/2003/2c/naravnabarvila/ekstrakcija\\_in\\_locitev.htm](http://www.gimvic.org/projekti/timko/2003/2c/naravnabarvila/ekstrakcija_in_locitev.htm) (marec 2009): 2 str.

Ercisli S. 2007. Chemical composition of fruits in some rose (*Rosa* spp.) species. Food Chemistry, 104: 1379-1384.

Erlund I., Meririnne E., Alftan G., Aro A. 2001. Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. Journal of Nutrition, 131: 235-241.

Fuhr U., Klittich K., Staib H. 1993. Inhibitory effect of grapefruit juice and its bitter principal, naringenin, on CYP1A2 dependent metabolism of caffeine in man. British Pharmacological Society, 35: 431-436.

Georgetti S. R., Casagrande R., Di Mambro V. M., Azzolini A., Fonesca M. 2003. Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSci, 5, 2: 1-5.

Gribkovskii, 1998V. P. 1998. Theory of luminescence. V: Luminescence of solids. Vij D.R.(ed.). New York, Plenum Press: 1-3.

Guang H. M., Du G. H. 2006. Protections of pinocembrin on brain mitochondria contribute to cognitive improvement in chronic cerebral hypoperfused rats. European Journal of Pharmacology, 542: 77-83.

Gupta S., Afaq F., Mukhtar H. 2001. Selective growth-inhibitory, cell-cycle deregulatory and apoptotic response of apigenin in normal versus human prostate carcinoma cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 287: 914-920.

Hendry G. A. F., Houghton J. D. 1996. Natural food colorants. 2<sup>nd</sup> ed. London, Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall: 244-309.

Heo M. Y., Sohn S. J., Au W. W. 2001. Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. Mutation Research Reviews in Mutation Research, 488, 2: 135-150.

Hodisan T., Socaciu C., Ropan I., Neamtu G. 1997. Carotenoid composition of *Rosa canina* fruits determined by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 16: 521-528.

Hribar J., Vidrih R. 2001. Sadje, zelenjava – funkcionalna živila. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi 2001, Portorož, 8-9. nov. 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 231-236.

Hvattum E. 2002. Determination of phenolic compounds in rose hip (*Rosa canina*) using liquid chromatography coupled to electrospray ionisation tandem mass spectrometry and diode-array detection. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 16: 655-662.

Hwang M. K., Song N. R., Kang J. K., Lee K. W., Lee H. J. 2009. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is required for tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced upregulation of matrix metalloproteinase-9: Its direct inhibition by quercetin. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 41: 1592-1600.

Iglesias J., Gonz M. J., Medina I. 2006. Determination of ascorbic and dehydroascorbic acid in lean and fatty fish species by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. European Food Research and Technology, 223: 781-786.

Jimenez A. M., Navas M. J. 2002. Chemiluminiscence methods (present and future). Grasas y Acetos, 53,1: 64-75.

The Hawk Conservancy Trust. 2007. Everything's coming up roses. Hampshire, The Hawk Conservancy Trust. (marec 2008)

<http://accipiter.hawk-conservancy.org/MeadowMuses/200710.shtml> (October 2007): 1 str.

Kac J., Mlinarič A. 2004. Pomembne interakcije nekaterih zdravilnih rastlin z zdravili. Zdravstveni vestnik, 73: 667-671.

Potočnik S. Vpliv zorenja na vsebnost antioksidantov v plodovih šipka.

Dipl. delo. Ljubljana. Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za živilstvo, 2009

---

Karlson P. 1980. Biokemija. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 247-250.

Kiokias S., Dimakon C., Oreopoulou V. 2008. Activity of natural carotenoid preparations against the autoxidative deterioration of sunflower oil-in-water emulsions. Food Chemistry, 114: 1278-1284.

Klemenc-Ketiš Z., Verovnik F. 2004. Uporaba zdravilnih rastlin med prebivalci Velenja. Zdravstveni vestnik, 73: 59-62.

Klepac T. 2008. Optimizacija luminiscenčne metode za določanje antioksidantov v rastlinskih ekstraktih. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 15-15 str.

Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26-27. okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-22.

Kovač B., Raspor P. 2000. Določanje antioksidativnega potenciala biomase filamentoznih gliv. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26-27. okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 93-100.

Kreft I., Škrabanja V., Bonafaccia G. 2000. Temelji prehranskih in biotskih vplivov antioksidantov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26-27. okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 33-38.

Lee-Hilz Y., Stolaki M., Berkel W., Aarts J., Rietjens I. 2008. Activation of EpRE-mediated gene transcription by quercetin glucuronides depends on their deconjugation. Food and Chemical Toxicology, 46: 2128-2134.

Linster C. L., Van Schaftingen E. 2007. Vitamin C: Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. FEBS Journal, 274, 1: 1-22.

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

Molineux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity. Journal of Science and Technology, 26, 2: 211-219.

Nojavan S., Khaliliana F., Kiaiec F. M., Rahimic A., Arabanianc A., Chalavia S. 2008. Extraction and quantitative determination of ascorbic acid during different maturity stages of *Rosa canina* L. fruit. Journal of Food Composition and Analysis, 21: 300–305.

Orhan D. D. Hartevioğlu A., Küpeli E., Yesilada E. 2007. In vivo anti-inflammatory and antinociceptive activity of the crude extract and fractions from *Rosa canina* L. fruits. Journal of Ethnopharmacology, 112: 394-400.

Pahlow M. 1987. Velika knjiga o zdravilnih rastlinah. Ljubljana, Cankarjeva založba: 303-304.

Pérez-Jiménez J., Arranz A., Tabernero M., Díaz-Rubio M., Serrano J., Goñi I., Saura-Calixto F. 2008. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and

beverages: Extraction, measurement and expression of results. Food Research International, 41: 274-285.

Pokorn D. 2003. Prehrana v različnih življenskih obdobjih: prehranska dopolnila v prehrani. Ljubljana, Marbona: 124-125.

Praprotnik N. 2002. Rastline: Tematski leksikon. Tržič, Učila International: 313-315.

Pregelj T. 2009. Določanje antioksidantov v zdravilnih zeliščih. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 42-42.

Raspor P., Kovač B., Batič M., Berglez D. 2000. Bioprocesi pridobivanja antioksidantov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26-27. okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 53-66.

Robards K. 2003. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. Journal of Chromatography A, 1000: 657-691.

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.

Rudan-Tasič D., Klofutar C. 2007. Fizikalnokemijske metode v živilstvu. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 24-50, 53-86.

Salminen J. P., Karonen M., Lempa K., Liimatainen J., Sinkkonen J., Lukkarinen M., Pihlaja K. 2005. Characterisation of proanthocyanidin aglycones and glycosides from rose hips by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, and their rapid quantification together with vitamin C. Journal of Chromatography A, 1077, 2: 170-180.

Saucedo-Pompa S., Rojas-Molina R., Aguilera-Carbó A., Saenz-Galindo A., La Garza H., Jasso-Cantú D., Aguilar C. 2009. Edible film based on candelilla wax to improve the shelf life and quality of avocado. Food Research International, 42: 511-515.

Schröter W., Lautenschlager K.-H., Bibrack H., Schnabel A. 1993. Kemija. Splošni priročnik. Brenčič J., Kočevar M. (ur.). Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 576-580, 608.

Sekiguchi Y., Nakaniwa T., Kinoshita T., Nakanishi I., Kitaura K., Hirasawa A., Tsujimoto G., Tada T. 2009. Structural insight into human CK2 $\alpha$  in complex with the potent inhibitor ellagic acid. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 19: 2920-2923.

Sepčić K., Anderluh A., Turk T., Maček P. 1997. Biokemijski praktikum. Resinovič B. (ur.). Ljubljana, Študentska organizacija univerze: 56-59.

Shimoji K., Okada H., Furugori M., Goda T., Takase S., Suzuki M., Hara Y., Yamamoto H., Kinae N. 1998. Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-β-glucoside in rats and humans. FEBS Letters, 438: 220-224.

Skvarča M. 2000. Učinek antioksidantov na kakovost maščob. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26-27. okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 179-190.

Straže A. 2000. Vpliv sušilnih parametrov na hitrost in intenzivnostobarvanja jesenovine in bukovine. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 10-10.

Potočnik S. Vpliv zorenja na vsebnost antioksidantov v plodovih šipka.

Dipl. delo. Ljubljana. Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za živilstvo, 2009

---

Supelco. 1998. Guide to solid phase extraction. Poole, Sigma-Aldrich Company (January 1998)

<http://209.85.129.132/search?q=cache:7pAdscDPg9sJ:www.sigmaaldrich.com/Graphics/Superlco/objects/4600/4538.pdf+Guide+to+solid+phase+extraction&cd=1&hl=en&ct=clnk> (April 2008): 12 str.

Synder L. R., Stadalius M. A., Quarry M.A. 1983. High performance liquid chromatography (HPLC). Analytical Chemistry, 55: 1412-1430.

Šircelj H. 2008. Karotenoidi v fotosinteznem aparatu in odziv na stres. Acta Agriculturae Slovenica, 91-1: 271-282.

Uggla M. 2004. Domestication of wild roses for fruit production. Doctoral thesis. Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences: 8-8.

Vilhar B. 2005. Biologija rastlinske celice. Delovni zvezek. Vaje pri predmetu Biologija celice. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 7-7.

Voicescu M., Ionita G., Vasilescu M., Meghea A. 2006. The effect of cyclodextrins in the luminol-hydrogen peroxide chemiluminescence. Journal of Inclusion Phenomena and Macroyclic Chemistry, 54: 217-219.

Vrhovšek U. 2001. Flavonoidi kot predstavniki antioksidantov. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi 2001, Portorož, 8-9. nov. 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 97-107.

Whittle A. 2008. Rose hip oil benefits. Houston, Herbal Healthcare (February 2008) <http://herbal-healthcare.blogspot.com/2008/02/rose-hip.html> (March 2008): 1 str.

Wright J.S., Johnson E.R., DiLabio G. 2001. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effect, and application to major families of antioxidants. Journal of the American Chemical Society, 123: 1173-1183.

Wu X. 2004. Bogastvo antioksidantov odkrito v nepričakovanih živilih. Ljubljana, Založba Louisa (junij 2004) [http://vsi-zdravi.org/index.php?option=com\\_content&task=view&id=654&Itemid=695](http://vsi-zdravi.org/index.php?option=com_content&task=view&id=654&Itemid=695) (marec 2009): 1 str.

Yang Z., Liu R., Li X., Tian S., Liu Q., Du G. 2009. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for determination of pinocembrin in rat plasma: Application to pharmacokinetic study. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 49: 1277-1281.

Zhang S., Dong S., Chi L., He P., Wang Q., Fang Y. 2008. Simultaneous determination of flavonoids in chrysanthemum by capillary zone electrophoresis with running buffer modifiers. Talanta, 76: 780-784.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Lei Pogačnik za vse nasvete, strokovno in tehnično pomoč pri izvedbi diplomskega dela.

Najlepša hvala recenzentki prof. dr. Tatjani Košmerl za strokoven pregled diplomskega dela.

Hvala dr. Tomažu Polaku za pomoč pri določanju posameznih fenolnih spojin.

Hvala Ivici Hočevar, uni. dipl. inž. živ. tehnol., za pomoč pri urejanju literature.

Hvala tudi vsem zaposlenim na Katedri za kemijo, ki ste mi kakorkoli priskočili na pomoč pri delu v laboratoriju.

Zahvaljujem se tudi vsem ostalim, ki ste mi kakorkoli pomagali pri nastanku diplomskega dela in tudi pri samem študiju.