

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Nika VRAČAR

**ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST FENOLNIH SPOJIN V
KOŽICAH GROZDNIH JAGOD IN LISTIH VINSKE TRTE**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM
GRAPE SKINS AND GRAPEVINE LEAVES**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2011

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

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

Mentorica: doc. dr. Helena Abramovič

Recenzentka: prof. dr. Tatjana Košmerl

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Nika Vračar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
 DK UDK 547.56+547.9:634.8: 577.1(043)=163.6
 KG fenolne spojine/antioksidativna učinkovitost/rastlinski ekstrakti/vinska trta/*Vitis vinifera* L./ekstrakti iz kožic grozdnih jagod/ekstrakti iz listov vinske trte/metanolni ekstrakti/
 AV VRAČAR, Nika
 SA ABRAMOVIČ, Helena (mentorica)/ KOŠMERL, Tatjana (recenzentka)
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
 LI 2011
 IN ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST FENOLNIH SPOJIN V KOŽICAH GROZDNIH JAGOD IN LISTIH VINSKE TRTE
 TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
 OP XII, 65 str., 14 pregl., 24 sl., 52 vir.
 IJ sl
 JI sl/en
 AI V okviru diplomske naloge smo v ekstraktih listov vinske trte in kožic grozdnih jagod določili koncentracijo skupnih fenolnih spojin ter njihovo antioksidativno učinkovitost. Podali smo tudi primerjavo z antioksidativno učinkovitostjo komercialno dostopnega ekstrakta listov rožmarina. Koncentracijo skupnih fenolnih spojin v ekstraktih smo določili spektrofotometrično, s pomočjo Folin-Ciocalteu metode. Antioksidativno učinkovitost fenolnih spojin v ekstraktih listov vinske trte in kožicah grozdnih jagod ter komercialno dostopnem ekstraktu listov rožmarina smo raziskali s pomočjo štirih različnih metod: določitev sposobnosti lovljenja prostega 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil (DPPH•) radikala, določitev sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala ($O_2^{\cdot-}$), beljenje β -karotena (učinkovitost zaviranja oksidacije linolne kisline v emulziji) in analiza sposobnosti redukcije. Vsi ekstrakti so pokazali antioksidativno učinkovitost. Fenolne spojine pridobljene iz listov vinske trte so pokazale boljšo sposobnost lovljenja DPPH• in $O_2^{\cdot-}$ v primerjavi s fenolnimi spojinami iz kožic grozdnih jagod iste sorte. Fenolne spojine v komercialno dostopnem ekstraktu iz listov rožmarina so pokazale najslabšo sposobnost lovljenja radikalov DPPH• in $O_2^{\cdot-}$ in pri metodi beljenja β -karotena najboljšo antioksidativno učinkovitost med preiskovanimi vzorci. Ugotovili smo, da se antioksidativna učinkovitost fenolnih spojin v listih vinske trte spreminja s stopnjo vegetacije oz. z zorenjem ter da se antioksidativna učinkovitost fenolnih spojin kožic grozdnih jagod rdečih sort razlikuje od belih sort.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 547.56+547.9:634.8: 577.1(043)=163.6
 CX phenolic compounds/antioxidant activity/plant extracts/grapevine/*Vitis vinifera* L./extracts from grape skins/extracts from grapevine leaves/methanol extracts/
 AU VRAČAR, Nika
 AA ABRAMOVIČ, Helena (supervisor)/ KOŠMERL, Tatjana (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
 PY 2011
 TI ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PHONOLIC COMPOUNDS FROM GRAPE SKINS AND GRAPEVINE LEAVES
 DT Graduation thesis (University studies)
 NO XII, 65 p., 14 tab., 24 fig., 52 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB In graduation thesis we have determined the total phenols content and antioxidant activity of grapevine leave and grape skin extracts. We also compared the antioxidant activity to commercially available rosemary leave extract. The total phenols concentration in extracts was determined spectrophotometrically by Folin-Ciocalteu method. Antioxidant activity of rosemary extract, grapevine leave and grape skin extracts were determined using four different methods: ability to scavenge the free 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) radical, superoxide anion scavenging activity ($O_2^{\cdot-}$), β -carotene bleaching (efficiency of the inhibition of linoleic acid oxidation in the emulsion) and reducing power assay. All extracts have shown antioxidant activity. Phenols from the grapevine leaves extracts have shown a better ability to scavenge DPPH• and $O_2^{\cdot-}$ radicals in comparison to phenols from grape skins of the same grape variety. Phenols in commercially available rosemary extract have shown the lowest ability to scavenge DPPH• and $O_2^{\cdot-}$ radicals among all analysed samples and the best antioxidant activity determined with β -carotene bleaching method. We have found out that the antioxidant activity of phenols in grapevine leaves varied with the vegetation or maturation and that the antioxidant activity of phenols of red grape skin extracts varieties differed from white varieties.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 VINSKA TRTA	3
2.1.1 Debit	4
2.1.2 Kujundžuša.....	4
2.1.3 Lasin	5
2.1.4 Pošip	5
2.1.5 Syrah	6
2.1.6 Trnjak	7
2.1.7 Vranac.....	7
2.1.8 Zlatarica.....	8
2.2 FENOLNE SPOJINE.....	8
2.2.1 Flavonoidi	9
2.2.2 Pomen fenolnih spojin	10
2.2.3 Fenolne spojine vinske trte.....	11
2.3 STRANSKI PROIZVODI VINOGRADNIŠTVA	12
2.4 ANTIOKSIDANTI	13
2.4.1 Mehanizem delovanja antioksidantov	14
2.4.2 Antioksidanti v živilih in njihov vpliv na zdravje.....	15
3 MATERIALI IN METODE DELA.....	17
3.1 MATERIALI	17

3.1.1	Ekstrakti kožic grozdnih jagod in listov vinske trte	17
3.1.2	Rožmarin	17
3.1.3	Reagenti in pribor	17
3.2	METODE	19
3.2.1	Določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin v ekstraktih kožic grozdnih jagod in listov vinske trte	19
3.2.2	Analiza sposobnosti redukcije	20
3.2.3	Metoda z radikalom DPPH•	21
3.2.4	Beljenje β-karotena	21
3.2.5	Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala	21
3.2.6	Statistična analiza	22
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	23
4.1	SKUPNE FENOLNE SPOJINE	23
4.1.1	Vpliv stopnje vegetacije na vsebnost fenolnih spojin v ekstraktih listov vinske trte	25
4.1.2	Primerjava vsebnosti fenolnih spojin v ekstraktih kožic grozdnih jagod belih in rdečih sort	26
4.2	ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST FENOLNIH SPOJIN	28
4.2.1	Metoda z radikalom DPPH•	28
4.2.1.1	Vpliv stopnje vegetacije listov vinske trte na sposobnost lovljenja prostega radikala DPPH•	33
4.2.1.2	Primerjava sposobnosti lovljenja prostega radikala DPPH• med fenolnimi spojinami v ekstraktih kožic grozdnih jagod belih in rdečih sort	34
4.2.1.3	Primerjava sposobnosti lovljenja prostega radikala DPPH• med fenolnimi spojinami v ekstraktih iz kožic grozdnih jagod, listov vinske trte in listov rožmarina	35
4.2.2	Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala	35
4.2.2.1	Vpliv stopnje vegetacije listov vinske trte na sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala	43
4.2.2.2	Primerjava sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala med kožicami grozdnih jagod belih in rdečih sort	44
4.2.2.3	Primerjava sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala med kožicami grozdnih jagod, listi vinske trte in rožmarinom	44
4.2.3	Beljenje β-karotena	45

4.2.3.1	Vpliv stopnje vegetacije listov vinske trte na antioksidativno učinkovitost ekstrakta v emulziji linolne kisline v vodi.....	49
4.2.3.2	Primerjava antioksidativne učinkovitosti fenolnih spojin ekstraktov iz kožic grozdnih jagod belih in rdečih sort v emulziji linolne kisline v vodi.....	50
4.2.3.3	Primerjava antioksidativne učinkovitosti fenolnih spojin v ekstraktu listov rožmarina s fenolnimi spojinami ekstraktov kožic grozdnih jagod in listov vinske trte.....	51
4.2.4	Analiza sposobnosti redukcije	51
4.2.5	Primerjava metod določanja antioksidativne učinkovitosti fenolnih spojin.	54
5	SKLEPI.....	58
6	POVZETEK	59
7	VIRI.....	61

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Razvrstitev fenolnih spojin (Abram in Simčič, 1997)	8
Preglednica 2: Strukturne formule nekaterih flavonoidov (Birt in sod., 2001)	10
Preglednica 3: Mesta delovanja in učinki prostih radikalov (Korošec, 2000)	14
Preglednica 4: Vrednosti masne koncentracije galne kisline v reakcijski zmesi (γ_{RZ}) in povprečne vrednosti absorbance (A_{765}).....	19
Preglednica 5: Vsebnost fenolnih spojin (γ) v ekstraktih listov vinske trte, zbranih v maju (5), avgustu (8) in septembru (9), kožic grozdnih jagod in listov rožmarina, izražena v mg galne kisline na L ekstrakta, ter vrednosti izmerjene absorbance (A_{765}).	24
Preglednica 6: Koncentracije fenolnih spojin ekstraktov iz listov vinske trte, zbranih v maju (5), avgustu (8) in septembru (9), v reakcijski zmesi (γ_{RM}), vrednosti izmerjene absorbance (A_{vz}) in delež preostalega DPPH• po 30 minutah inkubacije	29
Preglednica 7: Koncentracije fenolnih spojin ekstraktov iz kožic grozdnih jagod in listov rožmarina v reakcijski zmesi (γ_{RZ}), vrednosti izmerjene absorbance (A_{vz}) in delež preostalega DPPH• po 30 minutah inkubacije.....	30
Preglednica 8: Nakloni linearnega dela krivulj (k) in koncentracije fenolnih spojin ekstraktov iz listov vinske trte, zbranih v maju (5), avgustu (8) in septembru (9), kožic grozdnih jagod in listov rožmarina, ki so potrebne za 50 % zmanjšanje začetne vsebnosti DPPH• (EC_{50})	32
Preglednica 9: Koncentracije fenolnih spojin ekstraktov iz listov vinske trte, zbranih v maju (5), avgustu (8) in septembru (9), kožic grozdnih jagod in listov rožmarina v reakcijski zmesi (γ_{RZ}) in vrednosti izmerjene absorbance (A_{765}).....	36
Preglednica 10: Koncentracije fenolnih spojin ekstraktov iz listov vinske trte, zbranih v maju (5), avgustu (8) in septembru (9), kožic grozdnih jagod in listov rožmarina v reakcijski zmesi (γ_{RZ}) in sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala (SASA)	39
Preglednica 11: Vrednosti izmerjenih absorbanc (A_{470}) v emulziji za ekstrakte iz listov vinske trte, zbrane v maju (5), avgustu (8) in septembru (9), kožic grozdnih jagod in listov rožmarina pri različnih časih (t)	45

Preglednica 12: Vrednosti koeficientov antioksidativne učinkovitosti (C_{AA}) ekstraktov iz listov vinske trte, zbranih v maju (5), avgustu (8) in septembru (9), kožic grozdnih jagod in listov rožmarina v emulziji po 120 minutah inkubacije pri koncentraciji fenolnih spojin 1,04 mg/L 48

Preglednica 13: Koncentracije fenolnih (mg/L) spojin ekstraktov listov vinske trte, zbranih v septembru (9), in listov rožmarina v reakcijski zmesi (γ_{RZ}) ter vrednosti izmerjene absorbance (A_{740}) 52

Preglednica 14: Sposobnost redukcije oz. naklon premic (k), ki podaja koncentracijsko odvisnost A_{740} za ekstrakte listov vinske trte, zbrane v septembru (9), in listov rožmarina 53

KAZALO SLIK

Slika 1: Vinska trta (<i>Vitis vinifera</i> L.) (Vernik, 2010).....	3
Slika 2: Debit (Zdunič, 2008)	4
Slika 3: Kujundžuša (Zdunič, 2008)	4
Slika 4: Lasin (Zdunič, 2009)	5
Slika 5: Pošip (Turkovič, 2008).....	6
Slika 6: Syrah (Mirošević in Turkovič, 2003)	6
Slika 7: Trnjak (Zdunič, 2009)	7
Slika 8: Vranac (Gropuzzo, 2008)	7
Slika 9: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Balasundram in sod., 2006)	9
Slika 10: Umeritvena krivulja z galno kislino	20
Slika 11: Koncentracija fenolnih spojin (mg/L) v ekstraktih listov vinske trte, zbranih v maju (5), avgustu (8) in septembru (9).....	26
Slika 12: Koncentracija fenolnih spojin (mg/L) v ekstraktih kožic grozdnih jagod belih sort (■) in rdečih sort (■).....	27
Slika 13: Delež DPPH• (%), ki je preostal v reakcijski zmesi po 30 minutah inkubacije v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin (mg/L) v reakcijski zmesi, za tri ekstrakte iz listov vinske trte, zbrane v maju (5), avgustu (8) in septembru (9).....	31
Slika 14: Koncentracije fenolnih spojin ekstraktov listov vinske trte (■,■,■), zbranih v maju (5), avgustu (8) in septembru (9), kožic grozdnih jagod (■- bele sorte, ■- rdeče sorte) in listov rožmarina (■), ki so potrebne za 50 % zmanjšanje začetne vsebnosti DPPH• (EC_{50}).....	33
Slika 15: Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala (SASA) v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi za dva ekstrakta listov vinske trte, zbrane v maju (5) in septembru (9), in ekstrakt kože grozdnih jagod	42

- Slika 16:** Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala (SASA) za ekstrakte listov vinske trte (■,■,■), zbrane v maju (5), avgustu (8) in septembru (9), kožic grozdnih jagod (■- bele sorte, ■- rdeče sorte) in listov rožmarina (■), pri koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski zmesi 3 mg/L 43
- Slika 17:** Koeficient antioksidativne učinkovitosti (C_{AA}) ekstraktov listov vinske trte, zbranih v maju (5), avgustu (8) in septembru (9), v emulziji v odvisnosti od časa inkubacije (t) 47
- Slika 18:** Koeficient antioksidativne učinkovitosti (C_{AA}) ekstraktov kožic grozdnih jagod (■- bele sorte, ■- rdeče sorte) in listov rožmarina (■) v emulziji v odvisnosti od časa inkubacije (t) 48
- Slika 19:** Vrednosti koeficientov antioksidativne učinkovitosti (C_{AA}) za ekstrakte listov vinske trte (■,■,■), zbrane v maju (5), avgustu (8) in septembru (9), kožice grozdnih jagod (■- bele sorte, ■- rdeče sorte) in listov rožmarina (■), v emulziji po 120 minutah inkubacije pri koncentraciji fenolnih spojin 0,05 mg/L 49
- Slika 20:** Odvisnost A_{740} od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi za ekstrakte listov vinske trte, zbrane v septembru (9), in listov rožmarina 53
- Slika 21:** Sposobnost redukcije oz. naklon premic (k), ki podaja koncentracijsko odvisnost A_{740} za ekstrakte listov vinske trte, zbrane v septembru (9), in listov rožmarina 54
- Slika 22:** Koncentracije fenolnih spojin ekstraktov listov vinske trte, zbranih v maju (■), avgustu (■) in septembru (■), kožic grozdnih jagod (■- bele sorte, ■- rdeče sorte) in listov rožmarina (■), ki so potrebne za 50 % zmanjšanje začetne vsebnosti DPPH• (EC_{50}) 56
- Slika 23:** Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala (SASA) za ekstrakte listov vinske trte, zbrane v maju (■), avgustu (■) in septembru (■), kožic grozdnih jagod (■- bele sorte, ■- rdeče sorte) in listov rožmarina (■), pri koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski zmesi 3 mg/L 57
- Slika 24:** Vrednosti koeficientov antioksidativne učinkovitosti (C_{AA}) za ekstrakte listov vinske trte, zbrane v maju (■), avgustu (■) in septembru (■), kožic grozdnih jagod (■- bele sorte, ■- rdeče sorte) in listov rožmarina (■), v emulziji po 120 minutah inkubacije pri koncentraciji fenolnih spojin 1,04 mg/L 57

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AH – antioksidant

BHA – butiliran hidroksianizol

BHT – butiliran hidroksitoulen

TBHQ – 2-terciarni-butil-hidrokinon

C_{AA} – koeficient antioksidativne učinkovitosti

C_R – koeficient redukcije

DPPH• – 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil

FS – fenolne spojine

FC – Folin-Ciocalteu

EC_{50} – koncentracija fenolnih spojin, potrebna za 50 % zmanjšanje začetne količine DPPH

MetOH – metanol

NADH – nikotinamid adenin dinukleotid

NBT – nitro tetrazol modro

$O_2^{\bullet-}$ – superoksidni anionski radikal

PG – propilgalat

PMS – fenazin metasulfat

$R^{\bullet}$ – prosti radikal

RH – maščobna kislina

$ROO^{\bullet}$ – peroksilni radikal

ROOH – peroksid

ROS – reaktivne kisikove zvrsti

SASA (%) – sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala

γ – masna koncentracija

1 UVOD

Kultura vinske trte je stara že več tisoč let. Izvira iz dežel srednjega vzhoda, kjer so pričeli vzgajati sorte, ki so bile namenjene za pripravo soka in vina. Vzgojo plemenite vinske trte so Feničani, Grki in Rimljani razširili po Sredozemlju. Danes je vzgoja vinske trte ena od najbolj zastopanih panog v kmetijstvu po celem svetu. Obstajajo različne vrste vinske trte, ki se gojijo za pridelavo grozdja za hrano ali za proizvodnjo vina. Pri pridelavi in predelavi grozdja ter pri proizvodnji vina ostajajo kožice grozdnih jagod, pečke ter listi kot stranski proizvodi, ki so bogati z bioaktivnimi spojinami, predvsem fenolnimi spojinami.

Fenolne spojine so sekundarni metaboliti rastlin. Prepoznamo jih po aromatskem obroču z eno ali več hidroksilnimi skupinami. So nujne za rast in razmnoževanje rastlin in pogosto ščitijo ostale biološko pomembne molekule pred oksidacijo. Imajo varovalni učinek pri poškodbi rastlinskega tkiva. Vplivajo na vonj, okus in hranilno vrednost svežih in predelanih rastlinskih živil.

Fenolne spojine imajo pomembno vlogo tudi v prehrani človeka, saj delujejo antioksidativno in preprečujejo porušenje ravnotežja med prostimi radikali in antioksidanti, čemur pravimo oksidativni stres. Prosti radikali so visoko reaktivne molekule, ki reagirajo z molekulami v svoji okolici in poškodujejo celice. V celicah sprožajo tvorbo novih prostih radikalov, ki reagirajo naprej, kar vodi v verižno reakcijo.

Prosti radikali in prooksidanti, kot so kovinski ioni in encimi, največkrat povzročajo oksidativne spremembe bioloških molekul tako v telesu kot v živilih. V telesu lahko sprožijo nastanek raka ali pa dednih napak, so posredno ali neposredno vpleteni pri aterosklerozi, srčnem infarktu, revmatoidnem artritisu in drugih boleznih. Oksidativne spremembe povzročijo v živilih kvar in poslabšajo organoleptične lastnosti (videz, barva, vonj, okus in tekstura). Lahko tudi zmanjšajo hranilno vrednost in varnost živil.

Dodajanje antioksidantov živilom podaljša njihovo obstojnost in jih konzervira. Taka živila pa imajo ob zaužitju ugoden učinek tudi na telo, saj vsebujejo več antioksidantov. Uživanje živil, bogatih z antioksidanti, namreč pozitivno vpliva na naše zdravje. Antioksidante ločimo na naravne in sintetične. V današnjih časih prihaja v ospredje uporaba antioksidantov iz naravnih virov, predvsem zaradi zdravstvene oporečnosti in toksičnosti nekaterih sintetičnih antioksidantov. Listi vinske trte in kožice grozdnih jagod predstavljajo pomemben alternativni vir naravnih antioksidantov z možnostjo uporabe v humani prehrani kot prehranska dopolnila ali funkcionalna živila in v živilski industriji pri proizvodnji hrane in pijač.

1.1 NAMEN NALOGE

V okviru diplomske naloge smo želeli določiti antioksidativne učinkovitosti fenolnih spojin, pridobljenih iz kožic grozdnih jagod in listov vinske trte, v različnih modelnih sistemih. Prav tako smo želeli podati primerjavo z antioksidativno učinkovitostjo nekaterih rastlinskih ekstraktov in komercialno dostopnih antioksidantov.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pričakujemo, da:

- fenolne spojine v izbranih ekstraktih pokažejo antioksidativno učinkovitost
- na antioksidativno učinkovitost vpliva izbrana metoda določitve
- se antioksidativna učinkovitost kožic grozdnih jagod rdečih sort razlikuje od antioksidativne učinkovitosti belih sort
- bo z obdobjem vegetacije naraščala antioksidativna učinkovitost fenolnih spojin v listih vinske trte

2 PREGLED OBJAV

2.1 VINSKA TRTA

Vinska trta (*Vitis vinifera* L.) spada v družino *VITACEAE*, ki zajema 11 rodov s približno 600 vrstami. Od teh se le 20 vrst izkorišča za pridelavo ploda ali kot podlaga vinske trte in vse pripadajo rodu *Vitis*. *Vitis vinifera* L. ali evropsko-azijska kulturna trta je širše znana pod imenom vinska trta. Odlikuje jo visoko kakovostno grozdje, ki je namenjeno za prehrano ali nadaljnjo predelavo. Vinska trta zajema nekaj tisoč sort.



Slika 1: Vinska trta (*Vitis vinifera* L.) (Vernik, 2010)

Vinska trta ima večnamenske koristi. Goji se za pridelavo grozdja, ki ima v človeški prehrani visoko hranilno, prehransko in zdravilno vrednost. Približno 1 kg grozdja, s povprečno vsebnostjo sladkorja, lahko zadovolji 30 % dnevne potrebe organizma po energiji. Grozdje vsebuje številne prehransko pomembne snovi, kot so sladkor, kisline, številni minerali in vitamini ter fenolne spojine (Burić, 1985).

2.1.1 Debit

Sinonimi: bilina, čarapar, debić, dobit, pagadebit, pagadebić, puljižanac.

Debit (slika 2) je bela vinska sorta, ki domnevno izvira iz Italije in je razširjena v srednji in severni Dalmaciji ter v Dalmatinski zagori. Najboljše uspeva v izrazito topli klimi in na toplih, zmerno plodnih tleh (Burić, 1985; Mirošević in Turkovič, 2003).



Slika 2: Debit (Zdunić, 2008a)

2.1.2 Kujundžuša

Sinonimi: kojundžuša, tvrdac, tvrdorijez, žutac, ruderuša bijela.

Kujundžuša (slika 3) je bela vinska sorta z neznanim poreklom. Je vodilna bela sorta na področju Imotski. Poleg tega, da je zelo rodovitna sorta, jo odlikuje še nežen in nevtralen vonj. Na trgu se pojavlja kot kvalitetno sortno vino z vinorodnega okoliša Imotski. Nahaja se med priporočenimi sortami za celotno podregijo Dalmatinska zagora (Burić, 1985).



Slika 3: Kujundžuša (Zdunić, 2008b)

2.1.3 Lasin

Sinonimi: lasin, vlasina, kutlarica, slast, pažanin, ruža, šljiva, zlarinka.

Lasin (slika 4) je rdeča vinska sorta z neznanim poreklom. Domneva se, da gre za staro avtohtono sorto Severne Dalmacije in je najbolj razširjena kot posamezna trta v vinogradu. Ta sorta ima močno in bujno rast (Burić, 1985; Mirošević in Turkovič, 2003).



Slika 4: Lasin (Zdunić, 2009a)

2.1.4 Pošip

Sinonimi: pošipak, pošipica.

Pošip (slika 5) je bela vinska sorta, ki izvira z otoka Korčule. Nastala je spontano s križanjem dveh sort bratkovine bijele in zlatarice blatske bijele. Pošip je ena najstarejših in najbolj cenjenih avtohtonih sort belega grozdja. Od leta 1967 je (Pošip letnik 1965) z geografskim poreklom zaščitena kot prvo hrvaško vrhunsko belo vino. Razširjena je v manjši meri na otokih Mljet, Lastovo, Hvar, Brač, polotoku Pelješacu in na nekaterih področjih v severni Dalmaciji (Mirošević in Turkovič, 2003).



Slika 5: Pošip (Turković, 2008)

2.1.5 Syrah

Sinonimi: sirah, sirac, schiraz, balsamina.

Syrah (slika 6) je rdeča vinska sorta z neznanim poreklom. Domneva se, da je njena pradomovina Iran, od koder so jo na Sicilijo prinesli rimski legionarji, od tam pa se je širila še naprej. Danes je zelo razširjena na mnogih vinorodnih področjih Francije, Španije, Portugalske, Italije, Grčije, Avstralije, Kalifornije, Argentine in v južni Afriki (Mirošević in Turković, 2003).



Slika 6: Syrah (Mirošević in Turković, 2003)

2.1.6 Trnjak

Sinonimi: rudežuša.

Trnjak (slika 7) je rdeča vinska sorta z neznanim poreklom. Uvršča se med priporočene sorte. Največ je gojijo na vinorodnem področju Imotski in nekaj tudi na področjih Split-Omiš-Makarska, Neretva in Vrgorac.



Slika 7: Trnjak (Zdunić, 2009b)

2.1.7 Vranac

Sinonimi: crmnička loza, crmnički vranac.

Vranac (slika 8) je rdeča vinska sorta. Je avtohtona črnogorska sorta in je uvrščena med priporočene sorte v podregiji Severna Dalmacija. Ime je dobila po izraziti črni (vranje črni) barvi grozdja (Mirošević in Turković, 2003).



Slika 8: Vranac (Gropuzzo, 2008)

2.1.8 Zlatarica

Sinonimi: zlatarica bijela, bila loza, dračkinja, plavka.

Zlatarica je bela vinska sorta z neznanim poreklom. Je priporočena sorta grozdja na področju Dalmatinska zagora. Gojijo jo na področjih Dubrovnika, Metkoviča in na otoku Korčula (Burić, 1985).

2.2 FENOLNE SPOJINE

Rastline sintetizirajo na tisoče aromatskih spojin, ki vsebujejo eno ali več fenolnih skupin. Fenolne spojine ali polifenoli so sekundarni metaboliti, ki so derivati pentoza fosfatne, šikimatne in fenilpropanoidne poti v rastlinah. Te spojine so fiziološkega in morfološkega pomena za rastline. Zaradi svojih antioksidativnih lastnosti, so bistvene v prehrani človeka (Balasundram in sod., 2006).

Kemijsko lahko fenolne spojine definiramo kot spojine, ki imajo na aromatski obroč vezanih eno ali več hidroksilnih skupin (Shahidi in Naczki, 2003).

Preglednica 1: Razvrstitev fenolnih spojin (Abram in Simčič, 1997)

Št. C-atomov	Struktura	Skupina
6	C ₆	Fenoli
7	C ₆ -C ₁	Fenolne kisline
8	C ₆ -C ₂	Fenilacetne kisline
9	C ₆ -C ₃	Hidroksicimetne kisline, fenilpropani, kumarini, izokumarini, kromoni
10	C ₆ -C ₄	Naftokinoni
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Ksantoni
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbeni, antrakinoni
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoidi
18	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignani, neolignani
30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoidi
N	(C ₆ -C ₃) _n	Lignini
	(C ₆) _n	Melanini
	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Kondenzirani tanini

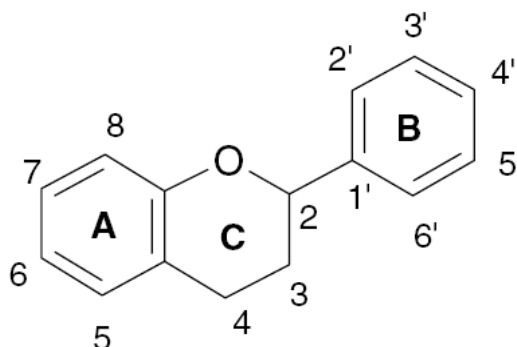
Več tisoč fenolnih spojin, ki se nahajajo v rastlinah, lahko razdelimo v več skupin. Te skupine se med seboj razlikujejo predvsem na podlagi števila ogljikovih atomov in glede na strukturo osnovnega ogrodja posamezne spojine. Razdelitev fenolnih spojin po številu ogljikovih atomov je prikazana v preglednici 1. Poleg enostavnih vodotopnih oblik fenolnih spojin, ki jih najdemo pretežno v vakuolah, obstajajo še polimerizirane oblike različnih topnosti (tanini) ali popolnoma netopne oblike (lignini) (Macheix in sod., 1990).

Navadno je tako, da v določeni rastlini prevladuje določena skupina fenolnih spojin, kar ne izključuje prisotnosti drugih fenolnih spojin v tej rastlini. Nekatere skupine, kot so hidroksicimetne kisline in flavonoidi, so prisotne skoraj povsod, medtem ko se druge skupine najdejo le pri rastlinah določenega rodu in vrste (Macheix in sod., 1990).

2.2.1 Flavonoidi

Flavonoidi so spojine, ki imajo skupaj 15 ogljikovih atomov in osnovno strukturo C6-C3-C6, ki se imenuje flavan oz. 2-fenilbenzopiran. Flavonoidi predstavljajo dobro polovico od skupaj več kot osem tisoč različnih fenolnih spojin (Abram in Simčič, 1997).

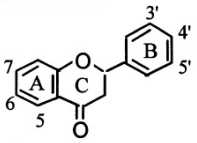
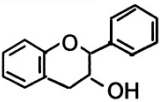
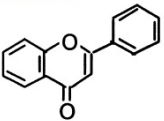
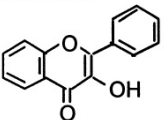
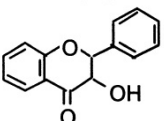
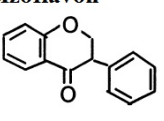
Flavonoidno jedro je sestavljeno iz treh obročev A, B in C (slika 9). Posamezne skupine flavonoidov (slika 10), ki se med seboj razlikujejo po substitucijah na C obroču so flavonoli, flavoni, flavanoni, flavanoli ali katehini, izoflavoni, flavanonoli in antocianidini, od katerih se flavoni in flavonoli najpogosteje pojavljajo in so strukturno najbolj raznoliki (Balasundram in sod., 2006).



Slika 9: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Balasundram in sod., 2006)

Flavonoidi so predstavniki naravnih antioksidantov in so učinkoviti pri preprečevanju oksidacije LDL holesterola, delujejo bakteriostatično, zavirajo rast stafilokokov, znižujejo koncentracijo celokupnega holesterola v krvi, preprečujejo zobno gnilobo, bolezni dlesni, preprečujejo okvare DNK in zavirajo razvoj ateroskleroze (Korošec, 2000).

Preglednica 2: Strukturne formule nekaterih flavonoidov (Birt in sod., 2001)

Strukturna formula	Predstavniki flavonoidov	Substitucije					
		5	6	7	3'	4'	5'
Flavanon							
	Eriodiktiol	OH	H	OH	OH	OH	H
	Hesperetin	OH	H	OH	OH	OMe	H
	Naringenin	OH	H	OH	H	OH	H
Flavanol							
	Katehin	OH	H	OH	OH	OH	H
	Galokatehin	OH	H	OH	OH	OH	OH
Flavon							
	Apigenin	OH	H	OH	H	OH	H
	Krisin	H	H	OH	H	H	H
	Luteolin	OH	H	OH	OH	OH	H
Flavonol							
	Kemferol	OH	H	OH	H	OH	H
	Miricetin	OH	H	OH	OH	OH	OH
	Kvercetin	OH	H	OH	OH	OH	H
Flavanonol							
	Taksifolin	OH	H	OH	OH	OH	H
Izoflavon							
	Daidzein	H	H	OH	H	OH	H
	Genistein	OH	H	OH	H	OH	H
	Glicitein	OH	OMe	OH	H	OH	H
	Formononetin	H	H	OH	H	OMe	H

2.2.2 Pomen fenolnih spojin

Fenolne spojine so kemično reaktivne snovi. Prispevajo k okusu, vonju in barvi živil ter pijač. V rastlinah je običajno okrog 1 do 2 % fenolnih spojin, v zrelih sadežih pa 8,5 %. Te spojine so fiziološkega in morfološkega pomena za rastline. Imajo pomembno vlogo pri rasti in razmnoževanju. V naravi fenolne spojine zagotavljajo zaščito rastlin pred patogeni in plenilci, delujejo kot kemične signalne spojine pri cvetenju, oplojevanju in rastlinski simbiozi ter prispevajo k barvi in senzorični lastnosti sadja in zelenjave.

Za fenolne spojine menijo, da prispevajo k odpornosti rastlin pri mehanskem stresu, ki je posledica prisotnih insektov ali mehanskih poškodb, infekcij z glivami, bakterijami in virusi. Kot odgovor na stres rastlina izrabi prisotne ali zaradi stresa na novo nastale fenolne spojine. Številne fenolne spojine imajo tudi protimikrobno učinkovitost, zato lahko pripomorejo k obrambi rastline. Taka spojina je resveratrol v grozdju (Abram in Simčič, 1997).

Fenolne spojine so sekundarni metaboliti, ki nastajajo po pentoza fosfatni, šikimatni in fenilpropanoidni poti v rastlinah.

Fenolne spojine imajo širok spekter fizioloških lastnosti, kot so antialergeno, antiaterogeno, protivnetno, protimikrobno, antioksidantno, antitrombotično, kardio-protetktivno in vazodilatorno delovanje (Balasundram in sod., 2006).

2.2.3 Fenolne spojine vinske trte

Fenolna sestava grozdja in listja vinske trte (*Vitis vinifera* spp.) je odvisna od različnih dejavnikov: podnebja, kjer rastejo, stopnje zrelosti oz. faze zorenja in sorte vinske trte (Montealegre in sod., 2006; Katalinić in sod., 2009). Fenolne spojine vinske trte predstavljajo obsežno in pomembno skupino kemijskih spojin, ki so odločilne za barvo, vonj in okus grozdja in listov ter iz njih narejenih izdelkov.

Številne raziskave so pokazale učinek na zdravje in antioksidativne lastnosti fenolnih spojin iz grozdja in vina, predvsem v povezavi z boleznimi srca in ožilja. Izdelki, kot so ekstrakti pečk in kožic grozdnih jagod ter listov vinske trte, že obstajajo kot prehranska dopolnila (Monagas in sod., 2006).

Kožice grozdnih jagod in listi vinske trte so sestavljeni iz antocianinov in flavonolov. Antocianini, ki so identificirani v *V. vinifera* spp. so 3-O-monoglikozidi in 3-O-acilirani monoglikozidi petih antocianidinov (delfinidin, cianidin, petunidin, peonidin in malvidin). Flavonoli, najdeni v *V. vinifera* spp., so: 3-O-glikozidi miricetina, kvercetina, kamferola in izoramnetina. Glukoza, galaktoza in galakturonska kislina so najbolj zastopani sladkorji v omenjenih spojinah (Monagas in sod., 2006).

Fenolne spojine, ki jih najdemo v listih vinske trte so fenolne kisline (3- hidroksibenzojska kislina, kavna kislina, galna kislina in vanilinska kislina), flavonoidi (katehin, epikatehin, apigenin, miricetin, kvercetin, kvercetin-4-glukozid, rutin, antocianini, kamferol) in stilbeni (trans-resveratrol in derivati resveratrola) (Katalinić in sod., 2009).

Fenolne spojine, ki jih najdemo v kožicah grozdnih jagod, so estri hidroksicimetnih kislin, monomeri in dimeri flavan-3-olov (katehin, epikatehin, epikatehin galat, procianidin), flavonoli (kvercetin glukozid), stilbeni (cis- in trans-rezveratrol) in antocianini – glikozilirani antocianidini (delfinidin, cianidin, petunidin, penonidin in malvidin) (Montealegre in sod., 2006; Katalinić in sod., 2009; Monagas in sod., 2005). Kožice grozdnih jagod belih sort vsebujejo: flavanole, proantocianidine, hidroksicimetne kisline, medtem ko vsebujejo kožice grozdnih jagod rdečih sort: antocianine, flavanole, proantocianidine, flavonole in hidroksicimetne kisline (Makris in sod., 2007).

2.3 STRANSKI PROIZVODI VINOGRADNIŠTVA

Živilsko predelovalna industrija vsako leto ustvari velike količine tekočih in trdnih odpadkov. Ti odpadni materiali vsebujejo pretežno biorazgradljive organske delce, katerih odlaganje lahko povzroča resne okoljske probleme (Negro in sod., 2003). V zadnjih letih se zato veliko pozornosti posveča zmanjševanju vpliva stranskih produktov proizvodnje na okolje.

Kopičenje odpadkov v predelovalnih obratih se lahko bistveno zmanjša z uporabo novih ali spremenjenih načinov predelave, s pomočjo čistilnih naprav znotraj proizvodnega obrata in z drugimi načini, ki se razvijajo v tej smeri. Na primer spreminjanje odpadkov v biogoriva, živilske sestavine in druge izdelke z dodano vrednostjo (Makris in sod., 2007).

Večina rastlinskih stranskih produktov v kmetijstvu in živilsko predelovalni industriji vsebuje biološko aktivne komponente fenolne spojine (Torres in sod., 2002). V odpadnih vodah te spojine povečajo biokemijske in kemijske potrebe po kisiku, kar povzroča škodo živalim in rastlinam v okolici. V odpadkih, ki se uporabljajo za gnojenje, pa lahko velika vsebnost polifenolov zavira kalitev. Po drugi strani pa so za okolje škodljivi odpadki potencialni viri bioaktivnih polifenolov, ki se lahko uporabljajo za različne namene v farmacevtski, kozmetični in živilski industriji.

Široko uporabljeni prehranski antioksidanti BHT, BHA in TBHQ so sintetični antioksidanti. Veliko se uporabljajo zaradi nizke cene in visoke učinkovitosti, vendar se pojavljajo dvomi o varnosti in toksičnosti sintetičnih antioksidantov, zato so postali zanimivi naravni antioksidanti, ki imajo poleg antioksidativne učinkovitosti še hranilno vrednost (Russis in sod., 2008). Med naravne antioksidante sodijo tudi fenolne spojine.

V pridelavi sadja na svetu je poleg pomaranč pridelava grozdja (*Vitis sp.*, *Vitaceae*) na drugem mestu, z več kot 60 milijoni ton na leto. Približno 80 % celotnega pridelka se uporabi za proizvodnjo vina (Schieber in sod., 2001). Stranski odpadki, ki vključujejo tropine, kožice in peclje, predstavljajo skoraj 30 % surovine, ki se uporabi za proizvodnjo vina (Makris in sod., 2007). Grozdne tropine, pridobljene po maceraciji in fermentaciji rdečega grozdja, so glavni stranski produkt v proizvodnji vina. Tropine sestavljajo kožice

grozdnih jagod, pečke in včasih peclji. Stranski produkti pri proizvodnji belih vin pa so nefermentirane kožice grozdnih jagod in pečke. Tudi listi vinske trte se uporabljajo kot vir fenolnih spojin (Monagas in sod., 2006).

Stranski proizvodi pri proizvodnji vina so zelo bogat vir antioksidantov polifenolov v primerjavi z drugimi kmetijsko-živilskimi trdnimi odpadki (Makris in sod., 2007). Zato predstavljajo zanimiv stranski proizvod bogat s fenolnimi spojinami, ki se lahko uporablja kot naravni dodatek živilom ali kot prehransko dopolnilo.

2.4 ANTIOKSIDANTI

Antioksidanti so v splošnem snovi, ki so sposobne že v majhnih količinah preprečiti ali zmanjšati oksidativne poškodbe biološko pomembnih spojin: maščob, beljakovin in nukleinskih kislin (Balik in sod., 2008).

V telesu so prosti radikali v stalnem ravnotežju z antioksidanti. Kadar se ravnotežje poruši, kar imenujemo oksidativni stres, pride do poškodb celičnih struktur, ki so najpogostejši vzrok za staranje, degenerativne bolezni, raka, ishemijo, kardiovaskularne bolezni, aterosklerozo, zmanjšan imunski odziv in številne druge bolezni (Korošec, 2000).

Prosti radikali so atomi, molekule in ioni z vsaj enim elektronom brez para. So rezultat normalne celične presnove, dejavnikov iz okolja (UV in gama žarki, topota, kajenje, onesnaženo okolje) ter delovanja nekaterih snovi in zdravil (aflatoksini, alkohol, analgetiki, anestetiki, citostatiki itd.). Prosti radikali delujejo znotraj celice in tudi zunajcelično. Učinke prikazuje preglednica 3.

Najpomembnejši kisikovi prosti radikali so:

- superoksidni anion,
- tripletni kisik,
- singletni kisik,
- hidroksilni radikali,
- vodikov peroksid,
- radikal dušikovega oksida in
- peroksilni radikal.

Preglednica 3: Mesta delovanja in učinki prostih radikalov (Korošec, 2000)

Mesto	Učinek
Lipidi	Peroksidacija maščobnih kislin, spremenjena prepustnost membran.
Proteini	Oksidacija SH- skupin, aktivacija encimov (kolagenaze), inaktivacija encimov (α_1 -antitripsina).
DNK	Cepitev verige, povečana poraba NAD, motena sinteza ATP.

Porušeno ravnotežje ali oksidativni stres preprečujejo antioksidanti z lovljenjem prostih radikalov, keliranjem kovinskih ionov z odstranjevanjem in/ali popravljanjem oksidativno poškodovanih bioloških molekul.

2.4.1 Mehanizem delovanja antioksidantov

Vloga antioksidantov je preprečevanje oksidacije v fazi iniciacije ali propagacije. Antioksidanti so torej pomembni za ohranjanje obstojnosti, prehranske vrednosti in senzoričnih lastnosti živila (videza, vonja, okusa, barve). Prav tako pa imajo antioksidanti pozitivne učinke v človeškem telesu.

Oksidacija maščob je glavni vzrok poškodb bioloških molekul tako v živilih kot v telesu (Halliwell in Chirico, 1993). Oksidaciji maščob pravimo tudi avtooksidacija in poteka v treh stopnjah:

1. Iniciacija ali začetek



2. Propagacija ali napredovanje



3. Terminacija ali zaključek



Učinkovitost antioksidanta je odvisna od redukcijskega potenciala in drugih fizikalno kemijskih značilnosti. Tako je važna polarnost antioksidanta, ki določa, kako se antioksidant porazdeli med polarnim in nepolarnim medijem in kako dobro se antioksidant absorbira v organizmu.

Za fenolne antioksidante (AH) predpostavljajo, da zaustavijo oksidacijo lipidov, ker se njihov vodikov atom hitro poveže z lipidnim radikalom (relaciji 7 in 8). Učinkovitost antioksidantov je tem večja, čim manjša je jakost vezi A-H. Nastali fenoksilni radikal ($A^\bullet$) ne sme sprožiti novih radikalnih reakcij ali hitro oksidirati (Abram, 2000). V nadaljevanju fenoksilni radikal reagira z naslednjim prostim radikalom, pri čemer nastane stabilni produkt (relaciji 9 in 10).



2.4.2 Antioksidanti v živilih in njihov vpliv na zdravje

Ljudje živimo nezdravo življenje. Uživamo neustrezno prehrano, živimo stresno in smo zelo malo telesno aktivni, kar je glavni dejavnik za razvoj številnih kroničnih bolezni. Čeprav je kisik neobhodno potreben za življenje, lahko za mnoge bolezni okrivimo prav kisik, ki povzroča oksidacijske reakcije v telesu. Znanstveniki so uničujoče reakcije kisika povezali z najmanj šestdesetimi različnimi kroničnimi boleznimi (Mikuš in Poljšak, 2009).

Fenolne spojine imajo pozitivne antioksidativne učinke na človekovo zdravje. Lahko preprečijo oksidacije LDL- proteina in s tem znižajo tveganje za nastanek bolezni srca. Prav tako imajo protivnetne in antikancerogene lastnosti (Negro in sod., 2003; Shrikhande, 2000). Katehini inducirajo apoptozo v različnih celičnih linijah in tako preprečijo izražanje določenih s tumorjem povezanih genov, kar kaže na to, da so katehini dobri kandidati za preventivna sredstva proti raku (Torres in sod., 2002). Fenolne spojine preprečujejo tudi proces staranja, na katerega imajo kisik in drugi različni oksidanti velik vpliv (Fukumoto in Mazza, 2000).

Hrana bogata z vsebnostjo antioksidantov torej igra pomembno vlogo pri preprečevanju različnih bolezni. Po drugi strani pa je oksidacija maščob v živilih glavni vzrok kemijskega kvara, njeni produkti pa so lahko tudi toksični (Roussis in sod., 2008). Dodatek snovi z antioksidativno učinkovitostjo v živilski izdelek prispeva h kakovosti in varnosti hrane, saj podaljša obstojnost ter zviša biološko vrednost živila. Antioksidanti se pogosto uporabljajo v živilih za preprečevanje oksidacije maščob. V zadnjem času narašča zanimanje za

iskanje naravnih antioksidantov za uporabo v živilih. Možen vir antioksidantov so prav gotovo tudi rastlinske fenolne spojine, ki so antioksidativno učinkovite snovi (Negro in sod., 2003; Fukumoto in Mazza, 2000)

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1 MATERIALI

3.1.1 Ekstrakti kožic grozdnih jagod in listov vinske trte

Za analize smo uporabili ekstrakte kožic grozdnih jagod in listov različnih sort vinske trte *Vitis vinifera* L. V raziskavo smo vključili bele sorte: debit, kujundžuša, zlatarica in rdeče sorte: lasin, trnjak, vranac. Listi so bili zbrani v različnih vegetacijskih obdobjih. V maju: lasin 5, pošip 5, syrah 5; v avgustu: pošip 8, syrah 8; v septembru: lasin 9, syrah 9. Ekstrakti so bili pripravljeni po metodi, ki so jo opisali Katalinić in sodelavci (2010) s topilom – zmes metanol/voda (70:30 v/v) na Fakulteti za kemijo in tehnologijo, Univerza v Splitu. Diplomsko delo je del širše raziskave, ki je potekala v okviru bilateralnega raziskovalnega projekta med Slovenijo in Hrvaško.

3.1.2 Rožmarin

Za analize smo uporabili komercialno dostopni ekstrakt listov rožmarina VIVOX 40, ki po navedbi proizvajalca vsebuje 40 % karnozolne kisline (Vitiva d.o.o., Slovenija).

3.1.3 Reagenti in pribor

Za analize smo uporabljali naslednje reagente:

- metanol (analitske čistosti, Merck, Nemčija)
- etanol (96 %, Merck, Nemčija)
- Folin-Ciocalteu reagent (Fluka, Švica)
- β -karoten (čistost >97 % Fluka, Švica)
- DPPH• reagent (Sigma, Nemčija)
- kalijev dihidrogenfosfat (analitske čistosti, Kemika, Hrvaška)
- natrijev dihidrogenfosfat (analitske čistosti, Kemika, Hrvaška)
- natrijev hidroksid (Merck, Nemčija)
- kloroform (analitske čistosti, Merck, Nemčija)

- linolna kislina (Sigma, Nemčija)
- fenazin metasulfat (Sigma, Nemčija)
- nitro tetrazol modro (Sigma, Nemčija)
- β -nikotinamid adenin dinukleotid dinatrijeva sol hidrat (Sigma, Nemčija)
- železov (III) klorid (Carlo Erba Reagenti, Italija)
- trikloroocetna kislina (Merck, Nemčija)
- kalijev heksacianoferat (III) (Merck, Nemčija)
- natrijev karbonat (Merck, Nemčija)
- galna kislina (Sigma, Nemčija)
- Tween 20 detergent (Sigma, Nemčija)

Za pripravo raztopin smo uporabljali bidestilirano vodo.

Uporabljali smo sledečo opremo in pribor:

- avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija)
- centrifuga (Eppendorf 5415C)
- 2 mL plastične centrifugirke (Eppendorf, Nemčija)
- 1 mL plastične centrifugirke (Eppendorf, Nemčija)
- ladjice za tehtanje
- merilni valji
- magnetno mešalo 550 M (Tehtnica Železniki, Slovenija)
- vrtinčnik
- pH-meter (Mettler Toledo, Švica)
- rotavapor (Büchi Rotavapor r-114, Švica)
- spektrofotometer (Hewlett-Packard 8453, ZDA)
- tehtnica AT201 (Mettler Toledo, Švica)

- tehtnica (Sartorius analytic)
- ultrazvočna kopel (Bandelin, Nemčija)

3.2 METODE

3.2.1 Določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin v ekstraktih kožic grozdnih jagod in listov vinske trte

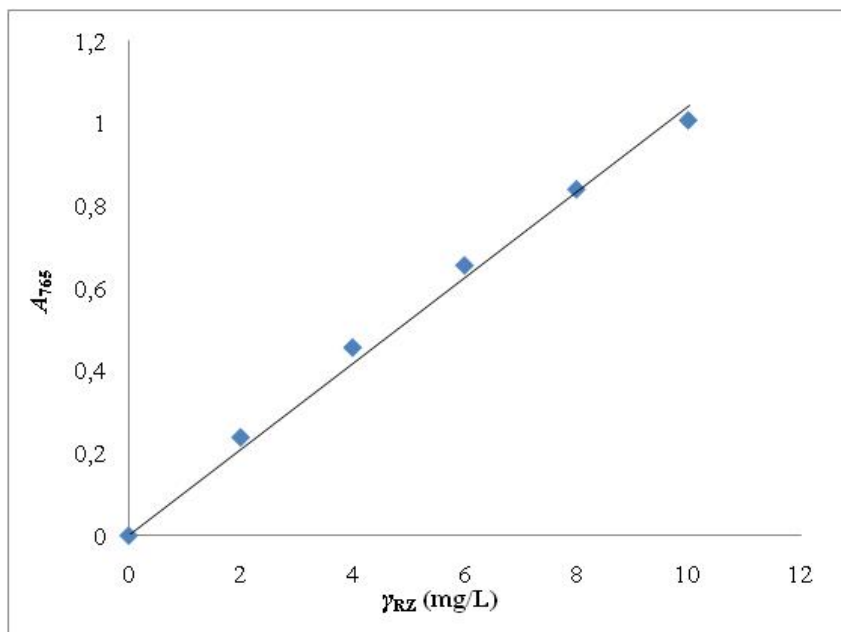
Vsebnost skupnih fenolnih spojin smo določili po Folin-Ciocalteu metodi, ki jo je opisal Gutfinger (1981). V 1,5 mL plastične epice smo odpipetirali 0,2 mL raztopine ustrezno razredčenega ekstrakta, mu dodali 0,125 mL Folin-Ciocalteu reagenta (razredčen z vodo v razmerju 1:2) ter premešali. Nato smo dodali 0,125 mL 20 % raztopine natrijevega karbonata in dopolnili z vodo do 1 mL, ponovno premešali ter centrifugirali v Eppendorfovi centrifugi 5415c 10 min pri 13000 obr/min. Po 40 minutah smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 765 nm (A_{765}). Slepri vzorec smo pripravili na isti način, le da smo namesto ekstrakta dodali 50 % MetOH. Vsako meritev smo opravili v treh ponovitvah.

Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili galno kislino. V 25 mL bučko smo zatehtali 10 mg galne kisline, jo raztopili v destilirani vodi in razredčili do 25 mL. Koncentracija pripravljene izhodne raztopine je bila 400 $\mu\text{g/mL}$. V epice smo dodali različne volumne izhodne raztopine in v skladu s Folin-Ciocalteu metodo izmerili absorbanco. V preglednici 4 so podane vrednosti za masno koncentracijo galne kisline v reakcijski zmesi in povprečne vrednosti izmerjene absorbance.

Preglednica 4: Vrednosti masne koncentracije galne kisline v reakcijski zmesi (γ_{RZ}) in povprečne vrednosti absorbance (A_{765})

γ_{RZ} (mg/L)	A_{765}
2	0,2378
4	0,4551
6	0,6543
8	0,8386
10	1,0057

Iz povprečne vrednosti absorbance in masne koncentracije galne kisline v reakcijski zmesi smo narisali umeritveno krivuljo (premica), ki je prikazana na sliki 10. Z linearno regresijo smo določili koeficient oz. naklon premice. Vrednost koeficienta k je $0,104 \pm 0,002 \text{ (mg/L)}^{-1}$.



Slika 10: Umeritvena krivulja z galno kislino

Masno koncentracijo fenolnih spojin v reakcijski zmesi smo izračunali iz zveze:

$$\gamma_{RZ} = A_{765} / k \quad \dots (11)$$

Vsebnost skupnih fenolnih spojin v metanolnih ekstraktih kožic grozdnih jagod in listov vinske trte smo izrazili kot miligram galne kisline na liter metanolnega ekstrakta ($\text{mg}_{\text{GK}}/\text{L}$). Izračunali smo jo iz koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi, volumna metanolnega ekstrakta in razredčitve ekstrakta.

3.2.2 Analiza sposobnosti redukcije

Sposobnost redukcije smo povzeli po metodi, ki so jo opisali Juntachote in sodelavci (2006). V epruvete smo odpipetirali 0,5 mL raztopine ustrezno razredčenega ekstrakta in dodali 2,5 mL fosfatnega pufra ($\text{pH} = 6,8$), 2,5 mL 1 % raztopine kalijevega heksacianoferata (III) in 2,5 mL 20 % raztopine trikloroacetne kisline ter vse skupaj premešali. Sledilo je centrifugiranje v Eppendorfovi centrifugi 5415c 10 min pri 13000 obr/min. Po centrifugiranju smo odvzeli 2,5 mL supernatanta, mu dodali 2,5 mL bidestilirane vode in 1 mL 1 % raztopine železovega (III) klorida ter dobro premešali. Po 25 minutah smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 740 nm (A_{740}) proti slepemu vzorcu, ki je bil pripravljen po istem postopku, le da smo namesto ekstrakta dodali ustrezno topilo (50 % MetOH). Vsako meritev smo opravili v dveh paralelkah.

3.2.3 Metoda z radikalom DPPH•

Analizo sposobnosti lovljenja prostih radikalov smo določili z DPPH• metodo, ki so jo opisali Brand-Williams in sodelavci (1995). Pripravili smo etanolno raztopino DPPH•, in sicer smo 1,97 mg DPPH• raztopili v 50 mL 96 % etanola in postavili za 5 min v ultrazvočno kopel. V kivete smo odpipetirali 2,9 mL sveže pripravljene raztopine DPPH• in 0,1 mL raztopine ustrezno razredčenega metanolnega ekstrakta. Po 30 minutah smo merili absorbanco pri 517 nm (A_{517}) proti slepemu vzorcu (96 % etanol). Izmerili smo tudi absorbanco kontrolnega vzorca, ki je vseboval 2,9 mL raztopine DPPH• in 0,1 mL 96 % etanola.

3.2.4 Beljenje β -karotena

Postopek določitve antioksidativne učinkovitosti z β -karotenom smo opravili v skladu z metodo, ki so jo opisali Moure in sodelavci (2000). V bučko smo odmerili 5 mL kloroformne raztopine β -karotena, 0,1 mL linolne kisline, 1 mL detergenta Tween 20, premešali in na rotavaporju odparili topilo. K preostanku, ki je nastal po odparevanju, smo počasi dodali 250 mL bidestilirane vode in vse skupaj stresali 5 min. Dobljeno emulzijo smo razporedili po 5 mL v epruvete ter dodali 0,2 mL raztopine metanolnega ekstrakta. Koncentracija fenolnih spojin v reakcijski zmesi je bila 0,05 mg/L. Zmes smo inkubirali dve uri pri temperaturi 50° C. Absorbanco (A_{470}) smo merili vsakih 20 minut pri valovni dolžini 470 nm proti slepemu vzorcu, ki je vseboval emulzijo brez β -karotena. Absorbanco smo izmerili v dveh paralelkah. Izmerili smo tudi absorbanco kontrolnega vzorca, ki smo ga pripravili tako, da smo namesto vzorca dodali 50 % MetOH. Vse meritve smo opravili v dveh paralelkah.

3.2.5 Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala

Analizo sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala smo določili z metodo, ki sta jo opisala Roback in Gryglewski (1988), z manjšimi modifikacijami. Reagenti so bili pripravljene v 0,1 M fosfatnem pufru (pH = 7,4). V plastične epruvete smo odpipetirali 0,5 mL raztopine metanolnega ekstrakta različnih koncentracij, 0,5 mL NBT reagenta, 0,5 mL NADH reagenta in 0,5 mL PMS reagenta. Vse skupaj premešali in po 5 minutah od dodatka reagenta PMS izmerili absorbanco pri 560 nm (A_{560}) proti slepemu vzorcu, ki je vseboval 0,5 mL ustreznega topila, 0,5 mL NBT reagenta, 0,5 mL NADH reagenta in 0,5 mL fosfatnega pufra. Izmerili smo tudi absorbanco kontrolnega vzorca, ki smo ga pripravili tako, da smo namesto vzorca dodali 50 % MetOH. Vse meritve smo opravili v dveh paralelkah.

3.2.6 Statistična analiza

Analize smo delali v dveh oz. treh paralelkah, vrednosti so podane kot povprečje $\pm$ standardni odklon. Povprečne vrednosti meritev znotraj posamezne metode smo izračunali v skladu z naslednjo enačbo (Košmelj, 2007):

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i \quad \dots (12)$$

Kjer je:

$\bar{x}$ - povprečna vrednost

n - število vzorcev

x_i - vrednosti i-te meritve

Standardni odklon smo izračunali v skladu z naslednjo enačbo (Košmelj, 2007):

$$s = \sqrt{s^2} \quad \dots (13)$$

$$s^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad \dots (14)$$

S - standardni odklon

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 SKUPNE FENOLNE SPOJINE

Skupne fenolne spojine smo določili po Gutfingerju (1981) z uporabo metode s Folin-Ciocalteu reagentom. Točna kemijska sestava reagenta ni znana, je pa sprejeto, da vsebuje fosforvolframov in fosformolibdenov kompleks v vodni raztopini. Reagent v alkalnem okolju oksidira fenolne spojine v ekstraktih, pri čemer nastane modro obarvana reducirana oblika kompleksa, medtem ko je nereducirana rumene barve. Določitev nastale reducirane oblike je spektrofotometrična pri valovni dolžini 765 nm. Izmerjena absorbanca je premosorazmerna koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski zmesi (Magalhaes in sod., 2008; Košmerl in Kač, 2004).

Metoda je preprosta, občutljiva in natančna. Veliko število substanc moti analizo, kar je slabost metode. To so večinoma ogljikovi hidrati, nekatere aminokisline, žveplov dioksid, organske kisline, askorbinska kislina in drugi reducenti (Shahidi in Naczek, 2004).

Vsebnost skupnih fenolnih spojin v ekstraktih kožic grozdnih jagod in listov vinske trte je podana v preglednici 5. Vsebnost skupnih fenolnih spojin je izražena kot masa galne kisline v mg na L analiziranega ekstrakta.

Preglednica 5: Vsebnost fenolnih spojin (γ) v ekstraktih listov vinske trte, zbranih v maju (5), avgustu (8) in septembru (9), kožic grozdnih jagod in listov rožmarina, izražena v mg galne kisline na L ekstrakta, ter vrednosti izmerjene absorbance (A_{765}).

SKUPINA	VZOREC	$A_{1(765)}$	γ (mg/L)	$A_{2(765)}$	γ_2 (mg/L)	$A_{3(765)}$	γ_3 (mg/L)	γ (mg/L)
ekstrakti listov vinske trte	lasin 5	0,429	20523,0	0,432	20681,8	0,441	21119,9	20775 $\pm$ 309
	lasin 9	0,463	22143,8	0,466	22274,4	0,464	22223,0	22214 $\pm$ 66
	pošip 5	0,426	20403,1	0,433	20705,7	0,419	20056,9	20389 $\pm$ 325
	pošip 8	0,437	20896,2	0,431	20613,4	0,435	20801,0	20770 $\pm$ 144
	syrah 5	0,427	20414,6	0,430	20566,7	0,428	20486,8	20489 $\pm$ 76
	syrah 8	0,583	27914,6	0,584	27936,4	0,584	27961,7	27938 $\pm$ 24
	syrah 9	0,735	35144,7	0,737	35282,5	0,748	35773,4	35400 $\pm$ 330
ekstrakti kožic grozdnih jagod	debit	0,382	1460,9	0,381	1456,5	0,376	1439,5	1452 $\pm$ 11
	kujundžuša	0,803	3841,3	0,804	3845,5	0,795	3804,1	3830 $\pm$ 23
	zlatarica	0,471	2253,5	0,473	2263,5	0,474	2266,9	2261 $\pm$ 7
	lasin	0,328	785,8	0,321	767,7	0,324	774,3	776 $\pm$ 9
	trnjak	0,821	7859,7	0,814	7794,2	0,816	7807,7	7821 $\pm$ 35
	vranac	0,635	6080,0	0,632	6045,6	0,632	6045,7	6057 $\pm$ 20
ekstrakt listov rožmarina	rožmarin	0,549	262,7	0,538	257,5	0,545	260,9	260 $\pm$ 3

Če bi želeli verodostojno primerjati vsebnost fenolnih spojin med listi in kožicami, bi bilo potrebno vsebnost fenolnih spojin izraziti na masno enoto izhodnega materiala (listi ali kožice). Ker pa smo v analizo dobili že pripravljene ekstrakte, omenjene primerjave med listi in kožicami ne moremo izvesti.

Koncentracijo skupnih fenolnih snovi smo določili tudi v metanolni raztopini ekstrakta iz listov rožmarina Vivox 40. Raztopino smo pripravili tako, da smo v 25 mL bučko zatehtali 25 mg ekstrakta in dopolnili s 96 % metanolom. Tako je koncentracija skupnih fenolnih spojin v ekstraktih listov rožmarina znašala 260 mg/L.

4.1.1 Vpliv stopnje vegetacije na vsebnost fenolnih spojin v ekstraktih listov vinske trte

V tem poglavju smo želeli spremljati vpliv stopnje vegetacije na vsebnost fenolnih spojin v ekstraktih listov vinske trte. Rezultati določitve koncentracije skupnih fenolov v metanolnih ekstraktih, ki smo jih določili s Folin-Ciocalteu metodo, so predstavljeni na sliki 11.

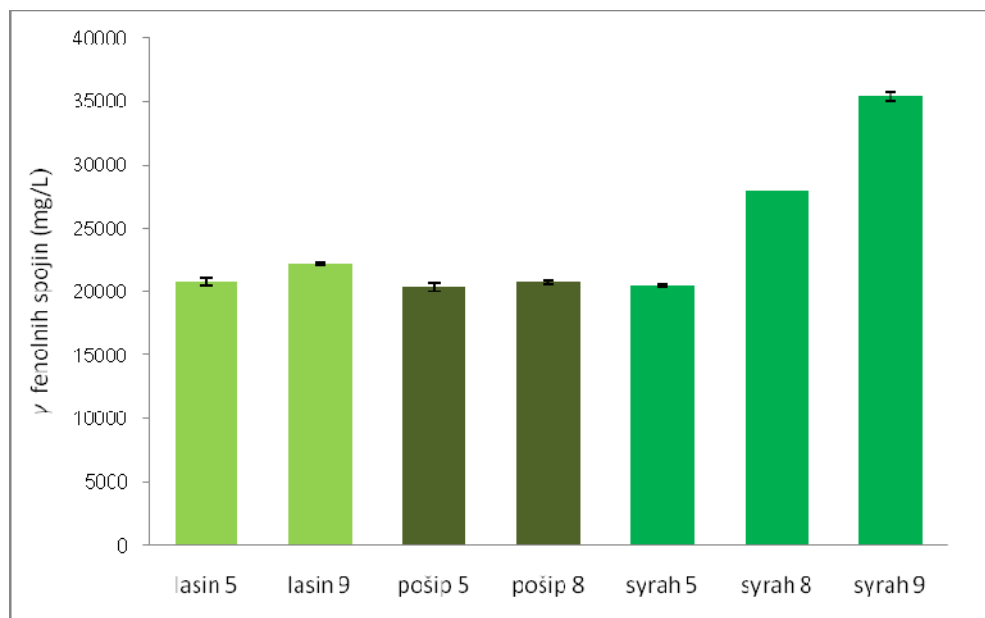
Med vzorci zbranimi v mesecu maju ima najvišjo koncentracijo fenolnih spojin ekstrakt sorte lasin 5 ((20775 ± 309) mg/L), najnižjo pa sorte pošip 5 ((20389 ± 325) mg/L). Povprečna koncentracija fenolnih spojin v ekstraktih listov zbranih v maju je 20550 mg/L. Pri listih zbranih v mesecu avgustu je koncentracija fenolnih spojin v ekstraktu višja kot v mesecu maju. Povprečje tega meseca znaša 24354 mg/L. Najvišjo koncentracijo v avgustu ima ekstrakt syrah 8. V septembru je koncentracija fenolnih spojin višja v primerjavi z listi, zbranimi v maju in avgustu. Povprečna koncentracija fenolnih spojin v septembru je 28806 mg/L. Najvišjo koncentracijo v septembru ima ekstrakt syrah 9 in sicer (35400 ± 330) mg/L.

Koncentracija fenolnih spojin z vegetacijo od maja do septembra narašča. Najbolj opazna je rast pri sorti syrah. V avgustu se koncentracija poviša za 36 % v primerjavi s koncentracijo v maju. V septembru pa se koncentracija poviša še za dodatnih 36 % v primerjavi z majem. Povišanje koncentracije fenolnih spojin v ekstraktih sort lasin in pošip ni tako izrazito, a je vseeno opazen podoben trend naraščanja z vegetacijo.

Fenolna sestava se lahko razlikuje med posameznimi fazami oz. stopnjami vegetacije, kar lahko pripišemo številnim kemijskim in encimskim spremembam nekaterih fenolnih spojin med fazami vegetacije (Doshi in sod., 2006).

Katalinić in sod. (2009) pa so primerjali ekstrakte listov vinske trte zbranih v mesecu maju in septembru. Ugotovili so, da so ekstrakti listov obeh stopenj vegetacije bogat vir skupnih

fenolnih spojin. V ekstraktih listov zbranih v septembru je bila koncentracija skupnih fenolnih spojin za 30 % višja kot v maju. V septembru se je povišala vsebnost skupnih flavonoidov, predvsem katehinov, medtem ko je bila vsebnost neflavonoidov v vzorcih obeh stopenj vegetacije skoraj enaka. Zaključili so, da se v obdobju med razcvetom in do konca zorenja fenolne spojine kopičijo, kar lahko sklepamo tudi iz analize naših vzorcev, saj smo opazili rast vsebnosti skupnih fenolnih spojin med posameznimi stopnjami vegetacije.



Slika 11: Koncentracija fenolnih spojin (mg/L) v ekstraktih listov vinske trte, zbranih v maju (5), avgustu (8) in septembru (9)

4.1.2 Primerjava vsebnosti fenolnih spojin v ekstraktih kožic grozdnih jagod belih in rdečih sort

V tem poglavju smo želeli vsebnost fenolnih spojin v ekstraktih kožic grozdnih jagod belih sort primerjati z ekstrakti kožic rdečih sort. Koncentracija fenolnih spojin v ekstraktih kožic grozdnih jagod belih in rdečih sort je prikazana na sliki 12.

Med belimi sortami najbolj izstopa ekstrakt kožic sorte kujundžuša, ki ima za več kot polovico višjo vsebnost fenolnih spojin ((3830 ± 23) mg/L) kot ostale bele sorte. Sledita ji sorti zlatarica ((2261 ± 7) mg/L) in debit ((1452 ± 11) mg/L).

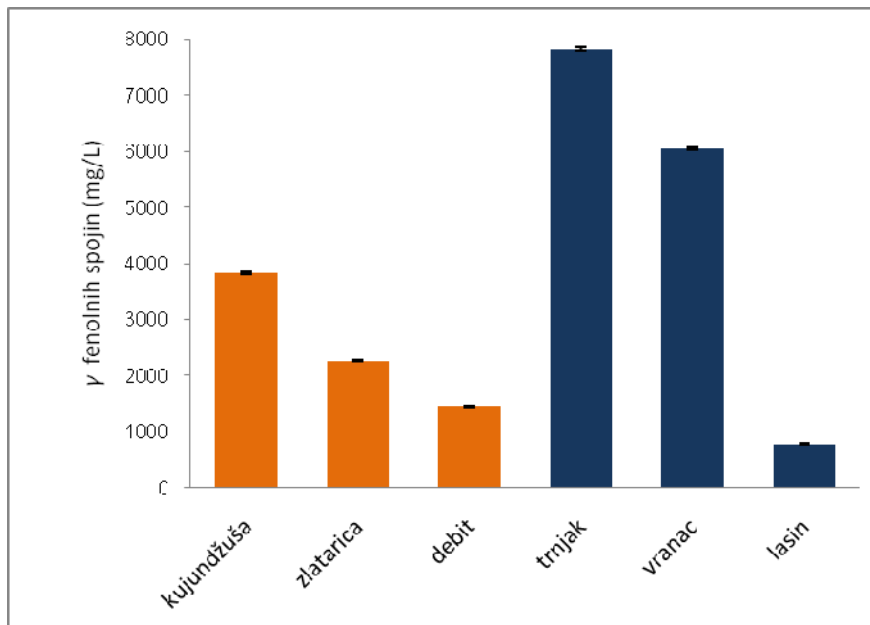
Koncentracija fenolnih spojin v ekstraktih rdečih sort je znatno višja kot koncentracija v ekstraktih belih, z izjemo sorte lasin (nizko-pigmentirana sorta), ki ima nižjo koncentracijo

od belih sort, celo dvakrat nižjo od najšibkejšje bele sorte debit ((776 ± 9) mg/L). Ostali rdeči sorti imata znatno višjo koncentracijo fenolnih spojin.

Najvišjo koncentracijo fenolnih spojin v ekstraktih ima rdeča sorta trnjak, ki je visoko pigmentirana sorta ((7821 ± 35) mg/L). Količina fenolnih spojin v ekstraktih kožic grozdnih jagod sorte trnjak je dvakrat višja kot v najmočnejši beli sorti Kujundžuša ((3830 ± 23) mg/L) in desetkrat višja kot v nizko pigmentirani rdeči sorti lasin (776 ± 9) mg/L). Delež fenolnih spojin v rdečih sortah je pričakovano visok zaradi vsebnosti antocianov, ki se med zorenjem grozdja akumulirajo v kožicah grozdnih jagod.

Znano je, da imajo tako genski zapis kot okoljski dejavniki pomembno vlogo pri fenolni sestavi in hranilni vrednosti pridelkov. Yang in sod. (2009) so ugotovili, da je v splošnem vsebnost fenolnih spojin v rdečih kožicah močno višja od vsebnosti v belih kožicah. Prav tako pa pravijo, da vsebnost fenolnih spojin ni nujno odvisna od barve kožic grozdnih jagod ampak predvsem od sortnih razlik. To se ujema tudi z našimi rezultati, saj imajo v povprečju rdeče kožice višjo vsebnost fenolnih spojin (4885 mg/L) kot kožice belih sort (2515 mg/L). Hkrati pa je vsebnost fenolnih spojin v rdečih kožicah sorte lasin nižja kot v najšibkejšji beli sorti debit.

Na razlike med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin zagotovo vpliva naravni potencial posamezne sorte. Poleg tega pa lahko tudi struktura celične stene vpliva na učinkovitost ekstrakcije in s tem vsebnost fenolnih spojin v ekstraktu (Pinelo in sod., 2006).



Slika 12: Koncentracija fenolnih spojin (mg/L) v ekstraktih kožic grozdnih jagod belih sort (■) in rdečih sort (■)

4.2 ANTIOKSIDATIVNA UČINKOVITOST FENOLNIH SPOJIN

Antioksidativno učinkovitost fenolnih spojin v ekstraktih listov vinske trte in kožicah grozdnih jagod smo določili s štirimi metodami: določitev sposobnosti lovljenja prostega DPPH• radikala, določitev sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala, beljenje β-karotena in analiza sposobnosti redukcije.

4.2.1 Metoda z radikalom DPPH•

Metoda temelji na reakciji med stabilnim prostim radikalom DPPH• in donorjem vodika. Je ena najstarejših in pogosto uporabljenih indirektnih metod za določanje antioksidativne učinkovitosti (Brand-Willams in sod., 1995). Antioksidativno učinkovitost določenega ekstrakta smo določili tako, da smo merili znižanje absorbance DPPH• pri valovni dolžini 517 nm. Ko DPPH• reagira z antioksidantom, ki je donor vodika, nastane reducirana oblika DPPH. To opazimo kot spremembo barve iz vijolične v rumeno. Znižanje absorbance merimo spektrofotometrično in je proporcionalno antioksidativni učinkovitosti fenolnih spojin (Matthäus, 2002). Sposobnost preiskovanih ekstraktov za lovljenje radikala DPPH• smo izrazili kot delež preostalega radikala DPPH• v reakcijski zmesi po 30 minutah inkubacije.

Delež preostalega DPPH• smo izračunali v skladu z naslednjo zvezo:

$$\text{Delež preostalega DPPH}\bullet = \frac{A_{\text{vz517}}}{A_{\text{k517}}} \times 100 \% \quad \dots(15)$$

A_{vz517} – absorbanca vzorca po 30 minutah inkubacije

A_{k517} – absorbanca kontrole

V preglednicah 6 in 7 so podane koncentracije fenolnih spojin preiskovanih ekstraktov v reakcijski zmesi, pri kateri smo izmerili absorbanco A_{vz517} in delež preostalega DPPH• po 30 minutah inkubacije.

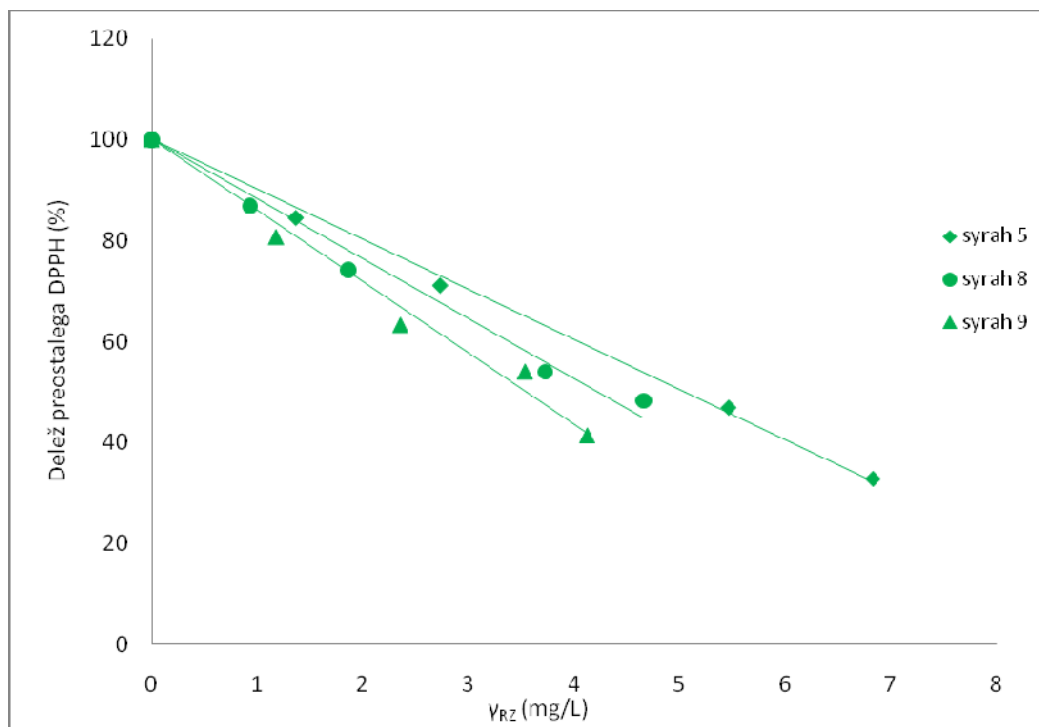
Preglednica 6: Koncentracije fenolnih spojin ekstraktov iz listov vinske trte, zbranih v maju (5), avgustu (8) in septembru (9), v reakcijski zmesi (γ_{RM}), vrednosti izmerjene absorbanca (A_{vz}) in delež preostalega DPPH• po 30 minutah inkubacije

SKUPINA	VZOREC	γ_{RM} (mg/L)	A_{vz} (po 30 min)	Delež preostalega DPPH (%)
ekstrakti listov vinske trte	lasin 5	1,39	0,9544	82,7
		2,77	0,7774	67,4
		4,16	0,6427	55,7
		5,54	0,5119	44,4
	lasin 9	0,74	0,9629	85,7
		2,22	0,7330	65,3
		2,96	0,6405	57,0
		3,70	0,5551	49,4
	pošip 5	1,36	1,0264	93,2
		3,40	0,6947	63,1
		4,76	0,5355	48,6
		6,80	0,3070	27,9
	pošip 8	1,38	0,9731	83,1
		2,77	0,7836	66,9
		4,15	0,6358	54,3
		5,54	0,5312	45,4
	syrah 5	1,37	1,0069	84,5
		2,73	0,8473	71,1
		5,46	0,5584	46,8
		6,83	0,3904	32,7
	syrah 8	0,93	0,9441	86,8
		1,86	0,8065	74,2
		3,73	0,5874	54,0
		4,66	0,5243	48,2
	syrah 9	1,18	0,9351	80,6
		2,36	0,7328	63,2
		3,54	0,6257	54,0
		4,13	0,4791	41,3

Preglednica 7: Koncentracije fenolnih spojin ekstraktov iz kožic grozdnih jagod in listov rožmarina v reakcijski zmesi (γ_{RM}), vrednosti izmerjene absorbance (A_{vz}) in delež preostalega DPPH• po 30 minutah inkubacije

SKUPINA	VZOREC	γ_{RM} (mg/L)	A_{vz} (po 30 min)	Delež preostalega DPPH (%)
ekstrakti kožic grozdnih jagod	debit	1,82	0,7834	71,8
		2,42	0,7188	65,9
		3,03	0,6022	55,2
		3,63	0,6010	55,1
		4,24	0,4848	44,4
	kujundžuša	1,92	0,8213	71,4
		2,55	0,7506	65,3
		3,83	0,5973	51,9
		5,11	0,4611	40,1
	zlatarica	1,51	0,8659	74,0
		2,26	0,7532	64,4
		3,02	0,7234	61,8
		4,52	0,4885	41,8
		5,28	0,3738	32,0
	lasin	2,59	0,8818	76,2
		3,88	0,7500	64,8
		5,17	0,6679	57,7
		6,47	0,5641	48,7
	trnjak	2,09	0,7998	70,5
		3,13	0,6735	59,4
		4,17	0,5653	49,9
		5,21	0,5048	44,5
	vranac	2,42	0,8204	72,4
		4,04	0,6641	58,6
		6,06	0,5151	45,4
		7,07	0,3948	34,8
ekstrakt listov rožmarina	rožmarin	3,33	0,9419	81,0
		6,67	0,7418	63,8
		10,00	0,5106	43,9
		13,33	0,3245	27,9

Na sliki 13 je za primer za tri preiskovane vzorce (syrah 5, syrah 8, syrah 9) prikazana odvisnost deleža preostalega DPPH• po 30 minutah inkubacije od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi.



Slika 13: Delež DPPH• (%), ki je preostal v reakcijski zmesi po 30 minutah inkubacije v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin (mg/L) v reakcijski zmesi, za tri ekstrakte iz listov vinske trte, zbrane v maju (5), avgustu (8) in septembru (9)

Vsi analizirani ekstrakti so reagirali s prostim radikalom DPPH•. Iz preglednic 6 in 7 ter s slike 13 je razvidno, da se delež preostalega DPPH• zmanjšuje z višanjem koncentracije fenolnih spojin. Del krivulje, kjer se delež preostalega DPPH• linearno zmanjšuje z višanjem koncentracije fenolnih spojin, lahko opišemo z enačbo premice:

$$\text{Delež preostalega DPPH} = 100\% - k \cdot x_{VRZ} \quad \dots(16)$$

k pomeni naklon premice, ki smo ga določili z linearno regresijsko analizo.

Sposobnost lovljenja prostih radikalov smo podali kot koncentracijo fenolnih spojin, ki je potrebna za 50 % zmanjšanje začetne vsebnosti DPPH• (EC_{50}). EC_{50} smo izračunali s pomočjo naklona premice:

$$EC_{50} = \frac{-50\%}{k} \quad \dots(17)$$

O sposobnosti lovljenja prostega radikala DPPH• lahko sklepamo iz naklona premice. Boljša kot je antioksidativna učinkovitost oz. sposobnost lovljenja, večja je absolutna vrednost naklona premice in s tem nižja vrednost EC_{50} . Vrednosti za naklon linearnega dela krivulj in EC_{50} so podane v preglednici 8. Vrednosti EC_{50} so prikazane tudi na sliki 14.

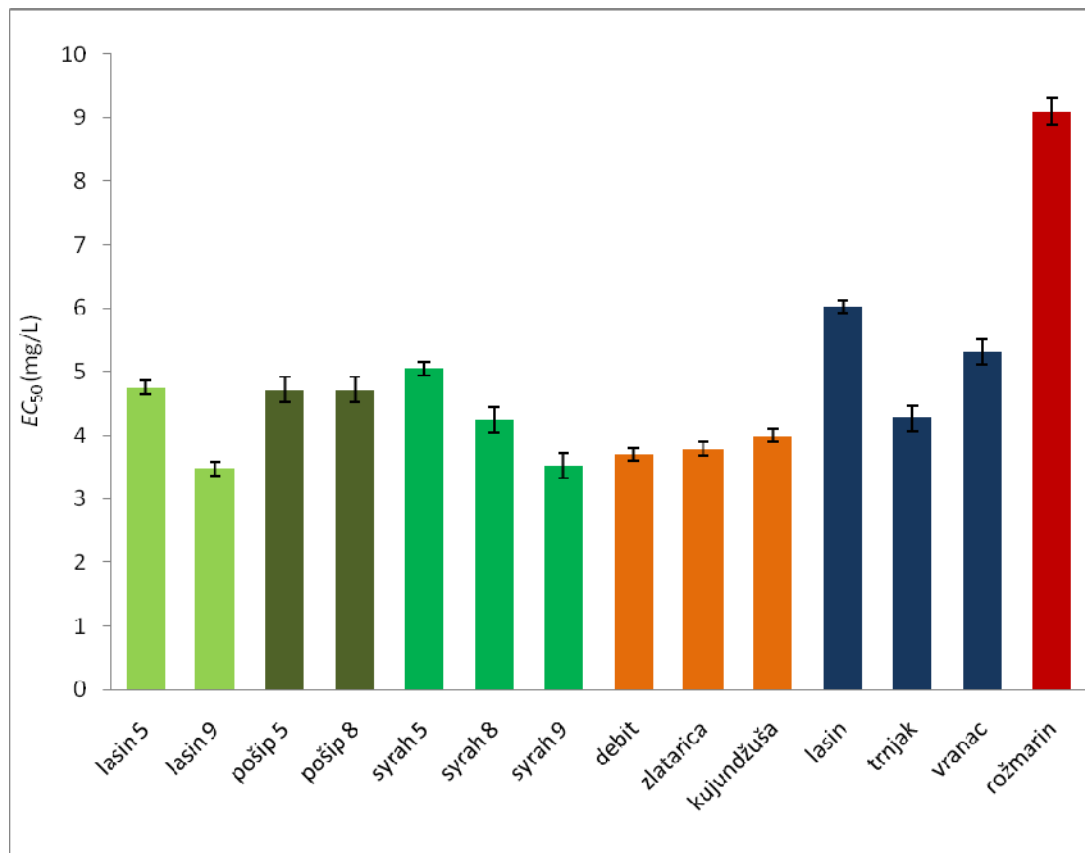
Preglednica 8: Nakloni linearnega dela krivulj (k) in koncentracije fenolnih spojin ekstraktov iz listov vinske trte, zbranih v maju (5), avgustu (8) in septembru (9), kožic grozdnih jagod in listov rožmarina, ki so potrebne za 50 % zmanjšanje začetne vsebnosti DPPH• (EC_{50})

SKUPINA	VZOREC	k (mg/L) ⁻¹	EC_{50} (mg/L)
ekstrakti listov vinske trte	lasin 5	-10,5 ± 0,3	4,8 ± 0,1
	lasin 9	-14,4 ± 0,5	3,5 ± 0,1
	pošip 5	-10,6 ± 0,4	4,7 ± 0,2
	pošip 8	-10,6 ± 0,4	4,7 ± 0,2
	syrah 5	-9,9 ± 0,2	5,1 ± 0,1
	syrah 8	-11,8 ± 0,5	4,2 ± 0,2
	syrah 9	-14,1 ± 0,5	3,5 ± 0,1
ekstrakti kožic grozdnih jagod	debit	-13,5 ± 0,5	3,7 ± 0,1
	kujundžuša	-12,4 ± 0,5	4,0 ± 0,2
	zlatarica	-13,2 ± 0,5	3,8 ± 0,1
	lasin	-8,3 ± 0,2	6,0 ± 0,1
	trnjak	-11,7 ± 0,6	4,3 ± 0,2
	vranac	-9,4 ± 0,3	5,3 ± 0,2
ekstrakt listov rožmarina	rožmarin	-5,5 ± 0,1	9,1 ± 0,2

Najnižjo vrednost EC_{50} in s tem najboljšo sposobnost lovljenja prostega radikala DPPH• med zbranimi ekstrakti imajo fenolne spojine iz listov lasin 9 ((3,5 ± 0,1) mg/L) in syrah 9 ((3,5 ± 0,1) mg/L). Najvišjo vrednost EC_{50} ima syrah 5 ((5,1 ± 0,1) mg/L), kar pomeni, da

so fenolne spojine v tem ekstraktu najmanj učinkovite v lovljenju prostega DPPH• radikala.

Med ekstrakti kožic grozdnih jagod so najboljšo sposobnost lovljenja prostega radikala DPPH• pokazale fenolne spojine bele sorte debit, saj je vrednost EC_{50} znašala $(3,7 \pm 0,1)$ mg/L. Najslabšo sposobnost pa je pokazala rdeča sorta lasin, kjer je za enak učinek potrebna znatno višja koncentracija fenolnih spojin $((6,0 \pm 0,1)$ mg/L).



Slika 14: Koncentracije fenolnih spojin ekstraktov listov vinske trte (■, ■, ■), zbranih v maju (5), avgustu (8) in septembru (9), kožic grozdnih jagod (■ - bele sorte, ■ - rdeče sorte) in listov rožmarina (■), ki so potrebne za 50 % zmanjšanje začetne vsebnosti DPPH• (EC_{50})

4.2.1.1 Vpliv stopnje vegetacije listov vinske trte na sposobnost lovljenja prostega radikala DPPH•

Želeli smo preveriti, ali stopnja vegetacije vpliva na antioksidativno učinkovitost fenolnih spojin v ekstraktih listov vinske trte. Zato smo spremljali, kako se s stopnjo vegetacije spreminja vrednost za koncentracijo fenolnih spojin v ekstraktih listov vinske trte, ki so potrebne za 50 % zmanjšanje začetne vsebnosti DPPH•.

Kot je razvidno s slike 14, sposobnost lovljenja prostega radikala DPPH• ekstraktov listov vinske trte s stopnjo vegetacije narašča. Najnižjo vrednost EC_{50} in s tem najboljšo sposobnost lovljenja prostega radikala DPPH• med vzorci, zbranimi v mesecu maju, ima pošip 5 ($(4,7 \pm 0,2)$ mg/L), sledi mu lasin 5 ($(4,8 \pm 0,1)$ mg/L) in nato syrah 5 ($(5,1 \pm 0,1)$ mg/L). Povprečna vrednost EC_{50} za mesec maj znaša 4,9 mg/L. Vzorci, zbrani v mesecu avgustu, so pokazali boljšo sposobnost lovljenja prostega radikala DPPH•, saj povprečna vrednost EC_{50} znaša 4,5 mg/L. Za sorto syrah se v mesecu avgustu EC_{50} vrednost zniža na $(4,2 \pm 0,2)$ mg/L. V septembru se vrednost EC_{50} še dodatno zniža in znaša $(3,5 \pm 0,1)$ mg/L, iz česar je razvidno, da je z naraščanjem stopnje vegetacije potrebna vedno manjša koncentracija fenolnih spojin za 50 % zmanjšanje začetnega deleža DPPH•. Sposobnost lovljenja prostega radikala DPPH• narašča tudi pri sorti lasin, saj je v mesecu septembru vrednost EC_{50} ($(3,5 \pm 0,1)$ mg/L) nižja kot v maju. Pri sorti pošip ni opazne spremembe sposobnosti lovljenja prostega radikala DPPH•, saj sta vrednosti EC_{50} v mesecu maju in avgustu enaki ($(4,7 \pm 0,2)$ mg/L). Za ekstrakte listov zbranih v septembru znaša povprečna vrednost EC_{50} 3,5 mg/L.

Katalinić in sod. (2009) so v svoji raziskavi preverili sposobnost lovljenja prostega radikala DPPH• v ekstraktih listov vinske trte. Ugotovili so, da so ekstrakti listov sposobni hitro in učinkovito reagirati s prostim DPPH• radikalom in da so listi, zbrani v mesecu septembru, bolj učinkoviti pri lovljenju prostih radikalov kot listi, zbrani v mesecu maju.

4.2.1.2 Primerjava sposobnosti lovljenja prostega radikala DPPH• med fenolnimi spojinami v ekstraktih kožic grozdnih jagod belih in rdečih sort

Ker nas je zanimalo, ali obstaja razlika med antioksidativno učinkovitostjo fenolnih spojin v ekstraktih kožic grozdnih jagod belih in rdečih sort, smo za posamezne ekstrakte primerjali vrednosti EC_{50} (slika 14).

Boljšo sposobnost lovljenja prostega DPPH• radikala imajo ekstrakti kožic grozdnih jagod belih sort, saj je njihova vrednost EC_{50} v povprečju nižja in znaša 3,8 mg/L, medtem ko je povprečna vrednost za rdeče sorte 5,2 mg/L.

Med ekstrakti kožic belih sort ima najboljšo sposobnost lovljenja DPPH• sorta debit, saj ima najnižjo vrednost EC_{50} ($(3,7 \pm 0,1)$ mg/L). Sledita ji zlatarica ($(3,8 \pm 0,1)$ mg/L) in kujundžuša ($(4,0 \pm 0,2)$ mg/L). Med rdečimi sortami ima najboljšo sposobnost lovljenja DPPH• ekstrakt sorte trnjak z najnižjo vrednostjo EC_{50} ($(4,3 \pm 0,2)$ mg/L). Sledita mu ekstrakta sort vranac ($(5,3 \pm 0,2)$ mg/L) in lasin ($(6,0 \pm 0,1)$ mg/L).

Katalinić in sod. (2010) so v svoji raziskavi preverili sposobnost lovljenja prostega radikala DPPH• v ekstraktih kožic grozdnih jagod različnih sort. Med seboj so primerjali povprečne vrednosti EC_{50} belih in rdečih sort. Ugotovili so, da ni statističnih razlik med povprečno EC_{50} rdečih in belih sort. Razlike v posamezni sortni skupini pa pripisujejo

različni fenolni sestavi posamezne sorte. Prav tako so mnenja, da kljub večji vsebnosti antocianinov v kožicah rdečega grozdja, le-te ne vplivajo na vrednost EC_{50} , kar kaže na njihovo slabšo sposobnost lovljenja prostega radikala DPPH•.

4.2.1.3 Primerjava sposobnosti lovljenja prostega radikala DPPH• med fenolnimi spojinami v ekstraktih iz kožic grozdnih jagod, listov vinske trte in listov rožmarina

Zanimalo nas je, ali obstaja razlika v sposobnosti lovljenja prostega radikala DPPH• med fenolnimi spojinami v ekstraktih iz kožic grozdnih jagod, listov vinske trte in rožmarina. Zato smo za posamezne ekstrakte primerjali koncentracije fenolnih spojin, ki so potrebne za 50 % zmanjšanje začetnega deleža DPPH• (slika 14).

Primerjavo med ekstrakti listov in kožic smo opravili na primeru sorte lasin in ugotovili, da so boljšo sposobnost lovljenja prostega radikala pokazali listi vinske trte, saj je vrednost EC_{50} za vzorec listov sorte lasin, zbrane v septembru, znašala $(3,5 \pm 0,1)$ mg/L. Medtem ko je bila za enak učinek potrebna skoraj dvakratna koncentracija fenolnih spojin ekstrakta kožic grozdnih jagod iste sorte $((6,0 \pm 0,1)$ mg/L).

Fenolne spojine v ekstraktu iz listov rožmarina so pokazale najslabšo sposobnost v primerjavi z ostalimi preiskovanimi vzorci, saj je vrednost EC_{50} znašala $(9,1 \pm 0,2)$ mg/L. Lahko sklepamo, da so fenolne spojine, ki se nahajajo v vzorcih listov vinske trte in kožic grozdnih jagod, učinkovitejše pri lovljenju prostega DPPH• radikala kot fenolne spojine v rožmarinovem ekstraktu.

4.2.2 Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala

Superoksidni anionski radikal ($O_2^{\cdot-}$) je reducirana oblika molekularnega kisika. Nastaja pri mnogih presnovnih procesih, lahko pa nastane tudi kot posledica aktivacije kisika s sevanjem (Magalhaes in sod., 2008). Je prekurzor za nastanek aktivnih prostih radikalov, ki lahko reagirajo z biološkimi makromolekulami in s tem povzročajo poškodbe tkiv (Halliwell in Gutteridge, 1984). Pri metodi, ki smo jo izvedli, nastaja $O_2^{\cdot-}$ radikal v reakciji med fenazin metasulfatom (PMS) in nikotinamidadenindinukleotidom (NADH). Nastali $O_2^{\cdot-}$ reducira nitrotetrazol modro (NBT) do formazana, kar smo merili spektrofotometrično pri absorbcanci 560 nm po 5 minutah inkubacije pri sobni temperaturi. Vrednosti izmerjenih absorbcanc so podane v preglednici 9.

Preglednica 9: Koncentracije fenolnih spojin ekstraktov iz listov vinske trte, zbranih v maju (5), avgustu (8) in septembru (9), kožic grozdnih jagod in listov rožmarina v reakcijski zmesi (γ_{RZ}) in vrednosti izmerjene absorbance (A_{560})

SKUPINA	VZOREC	γ_{RM} (mg/L)	A_1 (560)	A_2 (560)	A_{RZ}
ekstrakti listov vinske trte	lasin 5	0	0,3163	0,2560	0,29 ± 0,03
		1,04	0,2572	0,1888	0,22 ± 0,03
		2,08	0,1971	0,1458	0,17 ± 0,03
		3,12	0,1676	0,1186	0,14 ± 0,02
		4,16	0,1359	0,1083	0,12 ± 0,01
		5,19	0,1215	0,1110	0,12 ± 0,01
	lasin 9	0	0,2624	0,3007	0,28 ± 0,02
		0,56	0,2445	0,2582	0,25 ± 0,01
		1,11	0,1742	0,2346	0,20 ± 0,03
		2,22	0,1323	0,1361	0,13 ± 0,01
		3,33	0,1164	0,1365	0,13 ± 0,01
		4,44	0,1234	0,1466	0,14 ± 0,01
	pošip 5	0	0,2552	0,2491	0,25 ± 0,01
		1,02	0,1722	0,1761	0,17 ± 0,01
		2,04	0,1331	0,1287	0,13 ± 0,01
		3,06	0,1123	0,1108	0,11 ± 0,01
		4,08	0,1016	0,1023	0,10 ± 0,01
		5,10	0,1027	0,1021	0,10 ± 0,01
	pošip 8	0	0,3026	0,3018	0,30 ± 0,01
		1,04	0,2348	0,2446	0,24 ± 0,01
		2,08	0,2298	0,2217	0,23 ± 0,01
		3,12	0,1823	0,1793	0,18 ± 0,01
		4,15	0,1532	0,1363	0,14 ± 0,01
		5,19	0,1496	0,1365	0,14 ± 0,01
	syrah 5	0	0,2933	0,2624	0,28 ± 0,02
		1,02	0,2025	0,1799	0,19 ± 0,01
		2,05	0,1615	0,1480	0,15 ± 0,01
		3,07	0,1332	0,1157	0,12 ± 0,01
		4,10	0,1345	0,1239	0,13 ± 0,01
		5,12	0,1197	0,1140	0,12 ± 0,01

»se nadaljuje«

nadaljevanje preglednice 9: Koncentracije fenolnih spojin ekstraktov iz listov vinske trte, zbranih v maju (5), avgustu (8) in septembru (9), kožic grozdnih jagod in listov rožmarina v reakcijski zmesi (γ_{RZ}) in vrednosti izmerjene absorbance 

SKUPINA	VZOREC	γ_{RM} (mg/L)	$A_{1(560)}$	$A_{2(560)}$	
ekstrakti listov vinske trte	syrah 8	0	0,2901	0,2738	0,28 ± 0,01
		1,40	0,1940	0,1857	0,19 ± 0,01
		2,79	0,1569	0,1284	0,14 ± 0,01
		4,19	0,1144	0,1136	0,11 ± 0,01
		5,59	0,1171	0,1002	0,11 ± 0,01
		6,98	0,1114	0,1024	0,11 ± 0,01
	syrah 9	0	0,3314	0,2983	0,31 ± 0,02
		0,89	0,2666	0,2629	0,26 ± 0,01
		1,77	0,1988	0,1788	0,19 ± 0,01
		3,54	0,1707	0,1422	0,16 ± 0,01
		5,31	0,1329	0,1196	0,13 ± 0,01
		7,08	0,1065	0,1056	0,11 ± 0,01
ekstrakti kožic grozdnih jagod	debit	0	0,4123	0,3956	0,40 ± 0,01
		0,91	0,3739	0,3468	0,36 ± 0,01
		1,82	0,3537	0,3292	0,34 ± 0,01
		2,72	0,2691	0,2768	0,27 ± 0,01
		3,63	0,2621	0,2632	0,26 ± 0,01
		4,54	0,2386	0,2362	0,24 ± 0,01
	kujundžuša	0	0,4239	0,4503	0,44 ± 0,01
		1,92	0,3921	0,3914	0,39 ± 0,01
		3,83	0,3150	0,2968	0,31 ± 0,01
		5,75	0,2445	0,2819	0,26 ± 0,02
		7,66	0,2376	0,2328	0,24 ± 0,01
		9,58	0,1973	0,2114	0,20 ± 0,01
	zlatarica	0	0,4140	0,4071	0,41 ± 0,01
		1,13	0,3858	0,3921	0,39 ± 0,01
		2,26	0,3212	0,3238	0,32 ± 0,01
		3,39	0,2893	0,2909	0,29 ± 0,01
		4,52	0,2684	0,2529	0,26 ± 0,01
		5,65	0,2459	0,2320	0,24 ± 0,01

»se nadaljuje«

nadaljevanje preglednice 9: Koncentracije fenolnih spojin ekstraktov iz listov vinske trte, zbranih v maju (5), avgustu (8) in septembru (9), kožic grozdnih jagod in listov rožmarina v reakcijski zmesi (γ_{RZ}) in vrednosti izmerjene absorbance 

SKUPINA	VZOREC	γ_{RM} (mg/L)	$A_{1(560)}$	$A_{2(560)}$	
ekstrakti kožic grozdnih jagod	lasin	0	0,4358	0,3952	0,42 ± 0,02
		0,78	0,3768	0,3311	0,35 ± 0,02
		1,55	0,3224	0,3097	0,32 ± 0,01
		2,33	0,3017	0,2737	0,29 ± 0,01
		3,10	0,2825	0,2656	0,27 ± 0,01
		3,88	0,2631	0,2517	0,26 ± 0,01
	trnjak	0	0,3884	0,3749	0,38 ± 0,01
		1,96	0,3145	0,2603	0,29 ± 0,03
		3,91	0,1825	0,1685	0,18 ± 0,01
		5,87	0,1459	0,1316	0,14 ± 0,01
		7,82	0,1236	0,1168	0,12 ± 0,01
		9,78	0,1008	0,1033	0,10 ± 0,01
	vranac	0	0,3844	0,3401	0,36 ± 0,01
		1,51	0,3179	0,3007	0,31 ± 0,01
		3,03	0,2326	0,2324	0,23 ± 0,01
		4,54	0,1981	0,1725	0,19 ± 0,01
		6,06	0,1380	0,1463	0,14 ± 0,01
		7,57	0,1230	0,1346	0,13 ± 0,01
ekstrakt listov rožmarina	rožmarin	0	0,6467	0,6210	0,63 ± 0,01
		3,25	0,4884	0,4835	0,49 ± 0,01
		6,51	0,4436	0,4550	0,45 ± 0,01
		13,02	0,3387	0,3306	0,33 ± 0,01
		19,53	0,1628	0,1561	0,16 ± 0,01
		26,03	0,1117	0,0588	0,09 ± 0,03
		32,54	0,0866	0,0643	0,08 ± 0,01

Pri tej metodi antioksidanti v vzorcu tekmujejo z NBT za $\text{O}_2^{\bullet-}$ radikal. Bolj kot je antioksidant učinkovit, več $\text{O}_2^{\bullet-}$ radikala bo pretvoril v neaktivno obliko, posledično pa se bo reduciralo manj NBT in zato bo vrednost absorbance pri 560 nm nižja. Znižanje absorbance je sorazmerno sposobnosti antioksidanta za lovljenje $\text{O}_2^{\bullet-}$ radikala.

Sposobnost antioksidantov za lovljenje $O_2^{\bullet-}$ radikala (SASA) smo izračunali s pomočjo enačbe:

$$SASA = \frac{A_{560}}{A_{k560}} \times 100 \% \quad \dots(18)$$

A_{vz560} – absorbanca vzorca

A_{k560} – absorbanca kontrole

V preglednici 10 so podane vrednosti SASA za preiskovane vzorce pri določeni koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski zmesi.

Preglednica 10: Koncentracije fenolnih spojin ekstraktov iz listov vinske trte, zbranih v maju (5), avgustu (8) in septembru (9), kožic grozdnih jagod in listov rožmarina v reakcijski zmesi (γ_{RZ}) in sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala (SASA)

SKUPINA	VZOREC	γ_{RM} (mg/L)	SASA ₁ (%)	SASA ₂ (%)	SASA (%)
ekstrakti listov vinske trte	lasin 5	1,04	18,7	26,2	22 ± 4
		2,08	37,7	43,1	40 ± 3
		3,12	47,0	53,7	50 ± 3
		4,16	57,0	57,7	57 ± 1
		5,19	61,6	56,7	59 ± 2
	lasin 9	0,56	6,8	14,2	10 ± 4
		1,11	33,6	22,0	28 ± 6
		2,22	49,6	45,4	47 ± 2
		3,33	55,6	54,6	55 ± 1
		4,44	53,0	51,2	52 ± 1
	pošip 5	1,02	32,5	29,3	31 ± 2
		2,04	47,9	48,3	48 ± 1
		3,06	56,0	55,5	56 ± 1
		4,08	60,2	58,9	60 ± 1
		5,10	59,8	59,0	59 ± 1
	pošip 8	1,04	22,4	18,9	21 ± 2
		2,08	24,1	26,5	25 ± 1
		3,12	39,7	40,6	40 ± 1
		4,15	49,4	54,8	52 ± 3
		5,19	50,6	54,8	53 ± 2

»se nadaljuje«

nadaljevanje preglednice 10: Koncentracije fenolnih spojin ekstraktov iz listov vinske trte, zbranih v maju (5), avgustu (8) in septembru (9), kožic grozdnih jagod in listov rožmarina v reakcijski zmesi (γ_{RZ}) in sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala (SASA)

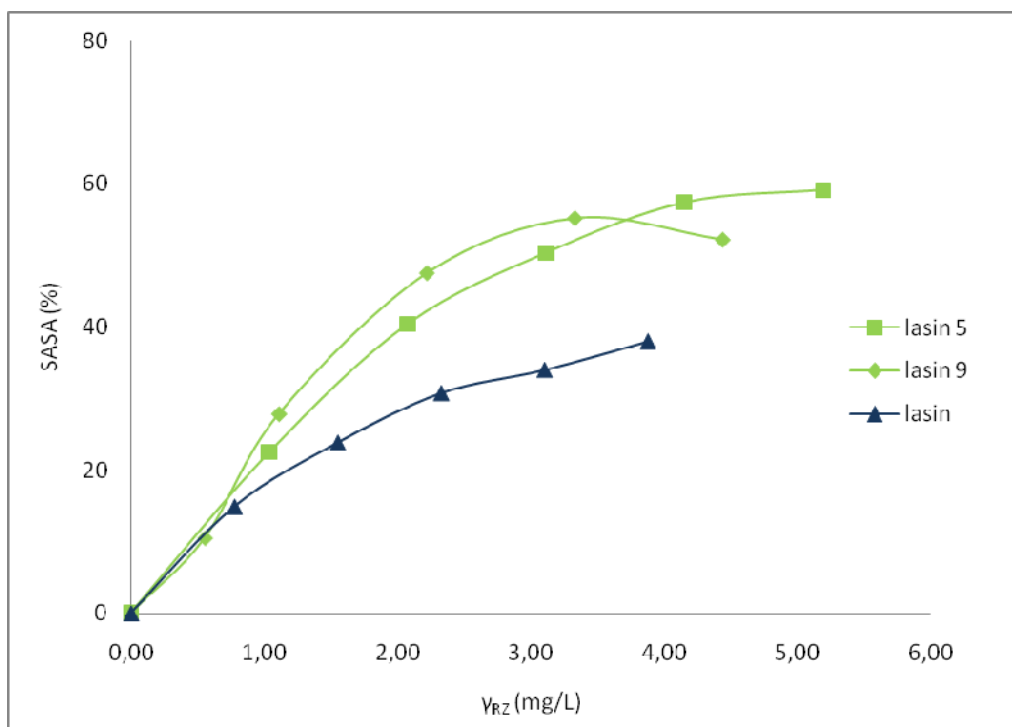
SKUPINA	VZOREC	γ_{RM} (mg/L)	SASA ₁ (%)	SASA ₂ (%)	SASA (%)
ekstrakti listov vinske trte	syrah 5	1,02	30,9	31,5	31 ± 1
		2,05	44,9	43,6	44 ± 1
		3,07	54,6	55,9	55 ± 1
		4,10	54,1	52,8	53 ± 1
		5,12	59,2	56,6	58 ± 1
	syrah 8	1,40	33,1	32,2	33 ± 1
		2,79	45,9	53,1	50 ± 4
		4,19	60,6	58,5	60 ± 1
		5,59	59,6	63,4	62 ± 2
		6,98	61,6	62,6	62 ± 1
	syrah 9	0,89	19,6	11,9	16 ± 4
		1,77	40,0	40,1	40 ± 1
		3,54	48,5	52,3	50 ± 2
		5,31	59,9	59,9	60 ± 1
		7,08	67,9	64,6	66 ± 2
ekstrakti kožic grozdnih jagod	debit	0,91	9,3	12,3	11 ± 2
		1,82	14,2	16,8	15 ± 1
		2,72	34,7	30,0	32 ± 2
		3,63	36,4	33,5	35 ± 1
		4,54	42,1	40,3	41 ± 1
	kujundžuša	1,92	7,5	13,1	10 ± 3
		3,83	25,7	34,1	30 ± 4
		5,75	42,3	37,4	40 ± 2
		7,66	43,9	48,3	46 ± 2
		9,58	53,5	53,0	53 ± 1
	zlatarica	1,13	3,7	6,8	5 ± 2
		2,26	20,5	22,4	21 ± 1
		3,39	28,5	30,1	29 ± 1
		4,52	37,9	35,2	37 ± 1
		5,65	43,0	40,6	42 ± 1

»se nadaljuje«

nadaljevanje preglednice 10: Koncentracije fenolnih spojin ekstraktov iz listov vinske trte, zbranih v maju (5), avgustu (8) in septembru (9), kožic grozdnih jagod in listov rožmarina v reakcijski zmesi (γ_{RZ}) in sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala (SASA)

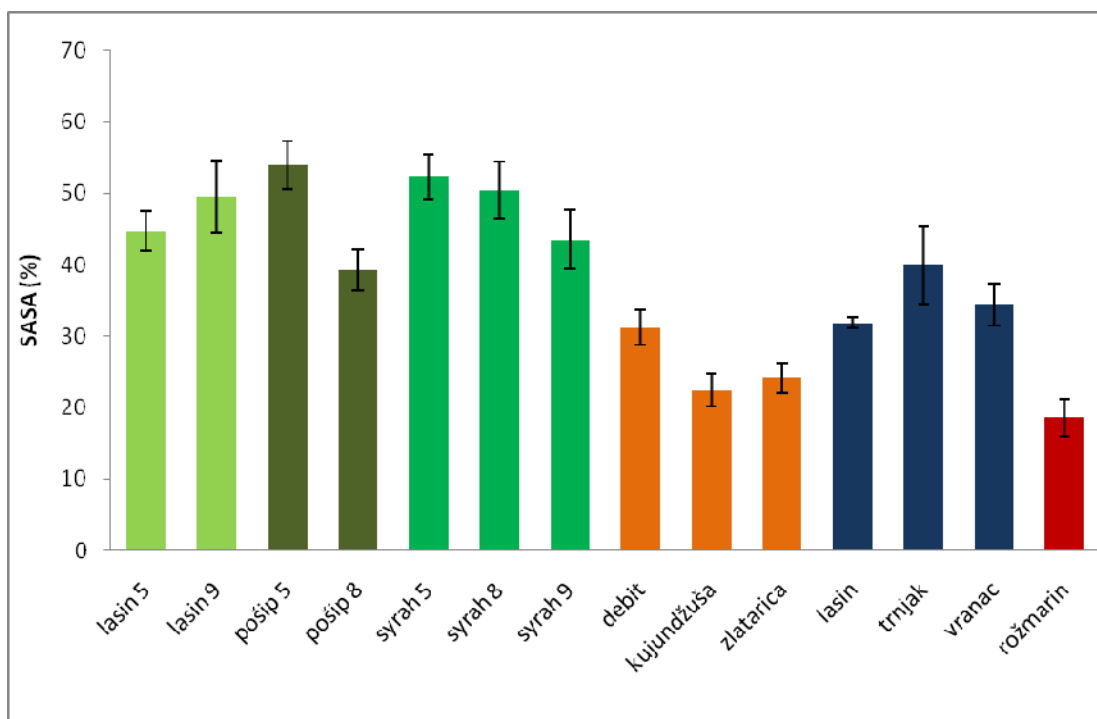
SKUPINA	VZOREC	γ_{RM} (mg/L)	SASA ₁ (%)	SASA ₂ (%)	SASA (%)
ekstrakti kožic grozdnih jagod	lasin	0,78	13,5	16,2	15 ± 1
		1,55	26,0	21,7	24 ± 2
		2,33	30,8	30,7	31 ± 1
		3,10	35,2	32,8	34 ± 1
		3,88	39,6	36,3	38 ± 2
	trnjak	1,96	19,0	30,6	25 ± 6
		3,91	53,0	55,1	54 ± 1
		5,87	62,4	64,9	64 ± 1
		7,82	68,2	68,9	69 ± 1
		9,78	74,0	72,5	73 ± 1
	vranac	1,51	17,3	11,6	14 ± 3
		3,03	39,5	31,7	36 ± 4
		4,54	48,5	49,3	49 ± 1
		6,06	64,1	57,0	61 ± 4
		7,57	68,0	60,4	64 ± 4
ekstrakt listov rožmarina	rožmarin	3,25	24,5	22,1	23 ± 1
		6,51	31,4	26,7	29 ± 2
		13,02	47,6	46,8	47 ± 1
		19,53	74,8	74,9	75 ± 1
		26,03	82,7	90,5	87 ± 4
		32,54	86,6	89,6	88 ± 2

Pri vseh preiskovanih ekstraktih vrednost SASA narašča s koncentracijo fenolnih spojin v reakcijski zmesi. Kot primer je na sliki 15 za tri preiskovane vzorce (lasin 5, lasin 9, lasin) prikazana odvisnost SASA od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi. Vidimo, da SASA nelinearno narašča s koncentracijo fenolnih spojin. Da bi bolj nazorno predstavili primerjavo sposobnosti preiskovanih vzorcev za lovljenje $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikalov, smo s pomočjo nelinearne regresijske analize določili parametre krivulje, ki opisuje koncentracijsko odvisnost SASA. Iz parametrov krivulje smo za preiskovane ekstrakte izračunali vrednosti SASA pri koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski zmesi 3 mg/L.



Slika 15: Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala (SASA) v odvisnosti od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi za dva ekstrakta listov vinske trte, zbrane v maju (5) in septembru (9), in ekstrakt kože grozdnih jagod

Na sliki 16 so prikazane vrednosti SASA za ekstrakte listov vinske trte, kožic grozdnih jagod in listov rožmarina pri koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski zmesi 3 mg/L.



Slika 16: Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala (SASA) za ekstrakte listov vinske trte (■, ■, ■), zbrane v maju (5), avgustu (8) in septembru (9), kožic grozdnih jagod (■ - bele sorte, ■ - rdeče sorte) in listov rožmarina (■), pri koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski zmesi 3 mg/L

4.2.2.1 Vpliv stopnje vegetacije listov vinske trte na sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala

Vpliv stopnje vegetacije listov vinske trte na sposobnost fenolnih spojin v ekstraktih za lovljenje superoksidnega anionskega radikala smo določili tako, da smo primerjali vrednosti SASA za ekstrakte listov vinske trte, pri koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski zmesi 3 mg/L, kot je prikazano na sliki 16.

Najboljšo sposobnost lovljenja $O_2^{\bullet-}$ radikala med ekstrakti listov, ki so bili zbrani v mesecu maju, ima pošip 5 ($(54 \pm 3) \%$), sledi mu syrah 5 ($(52 \pm 3) \%$) in nato lasin 5 ($(45 \pm 3) \%$).

Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala s stopnjo vegetacije pada pri sorti pošip. Pri sorti syrah je sicer nakazan trend padanja, vendar ostajajo vrednosti SASA v okviru napake skozi celotno vegetacijsko obdobje nespremenjene. Podobno pri sorti lasin z obdobjem vegetacije vrednosti SASA sicer nekoliko narastejo, vendar se med seboj v okviru napake ne razlikujejo. Povprečna vrednost SASA za mesec maj znaša 50 %. V mesecu avgustu je povprečna sposobnost lovljenja $O_2^{\bullet-}$ radikala 45 %. V septembru povprečna vrednost SASA znaša 46 %. Ker so se vrednosti SASA spreminjale z vegetacijo

v okviru napake, ne moremo z gotovostjo trditi, da se sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala z vegetacijo spreminja.

4.2.2.2 Primerjava sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala med kožicami grozdnih jagod belih in rdečih sort

V tem poglavju nas je zanimalo, ali obstaja razlika med antioksidativno učinkovitostjo fenolnih spojin v ekstraktih kožic grozdnih jagod belih in rdečih sort, zato smo primerjali vrednosti SASA pri koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski zmesi 3 mg/L (slika 16).

Boljšo sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala so pokazale fenolne spojine iz kožic grozdnih jagod rdečih sort, saj je njihova vrednost SASA v povprečju višja in znaša 35 %, medtem ko je povprečna vrednost za bele sorte 26 %.

Med belimi sortami imajo najboljšo sposobnost lovljenja $O_2^{\cdot-}$ radikala fenolne spojine sorte debit ((31 ± 2) %), sledi zlatarica ((24 ± 2) %) in nato kujundžuša ((22 ± 2) %). Med rdečimi sortami imajo najboljšo sposobnost lovljenja $O_2^{\cdot-}$ radikala fenolne spojine sorte trnjak z vrednostjo SASA (40 ± 5) %. Sledita sorti vranac ((34 ± 3) %) in lasin ((32 ± 1) %).

4.2.2.3 Primerjava sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala med kožicami grozdnih jagod, listi vinske trte in rožmarinom

V tem poglavju nas je zanimalo, ali obstaja razlika v sposobnosti lovljenja superoksidnega anionskega radikala med fenolnimi spojinami v ekstraktih iz kožic grozdnih jagod in listov vinske trte ter rožmarina (slika 16).

Primerjava med učinkovitostjo fenolnih spojin v ekstraktih listov in kožic na primeru sorte lasin pokaže, da je vrednost SASA za ekstrakt listov, zbranih v septembru, znašala (49 ± 5) %, medtem ko je za ekstrakt kožic grozdnih jagod iste sorte vrednost SASA znašala manj ((32 ± 1) %). V splošnem lahko rečemo, da so v primerjavi s fenolnimi spojinami v ekstraktih iz grozdnih kožic, boljšo antioksidativno učinkovitost pokazale fenolne spojine v ekstraktih iz listov vinske trte. V povprečju znaša vrednost SASA za fenolne spojine v ekstraktih iz listov 48 % in za ekstrakte iz kožic 31 %. Antioksidativna učinkovitost listov rožmarina je najslabša, saj je vrednost SASA znašala le (19 ± 3) %. Iz tega lahko sklepamo, da so fenolne spojine v ekstraktih listov vinske trte in kožic grozdnih jagod bolj učinkoviti antioksidanti pri lovljenju superoksidnega anionskega radikala kot fenolne spojine v rožmarinovem ekstraktu.

4.2.3 Beljenje β -karotena

Metoda temelji na reakciji β -karotena s prostimi radikali, ki nastajajo pri avtooksidaciji linolne kisline v vodnih emulzijah. To opazimo kot razbarvanje oz. beljenje β -karotena. Prisotnost dodanih antioksidantov, ki tekmujejo z β -karotenom, zavira beljenje β -karotena, saj dodani antioksidanti nevtralizirajo proste radikale, ki nastajajo v sistemu. V sistemu brez dodanega antioksidanta se absorbanca hitro zmanjša, medtem ko v prisotnosti dodanega antioksidanta sistem obdrži svojo barvo daljši čas in se absorbanca ne zniža v tolikšni meri (Barros in sod., 2007). Beljenje β -karotena smo spremljali spektrofotometrično v odvisnosti od časa inkubacije pri temperaturi 50 °C. Absorbanco smo merili pri valovni dolžini 470 nm. Koncentracija fenolnih spojin v emulziji je znašala 0,05 mg/L. Vrednosti izmerjenih absorbanc pri določenem času inkubacije so podane v preglednici 11.

Preglednica 11: Vrednosti izmerjenih absorbanc (A_{470}) v emulziji za ekstrakte iz listov vinske trte, zbrane v maju (5), avgustu (8) in septembru (9), kožic grozdnih jagod in listov rožmarina pri različnih časih (t)

SKUPINA	VZOREC	T	$A_{1(470)}$	$A_{2(470)}$
ekstrakti listov vinske trte	lasin 5	0	0,5155	0,6032
		40	0,5124	0,5603
		80	0,4536	0,5068
		120	0,3994	0,4585
	lasin 9	0	0,5217	0,5850
		40	0,5214	0,5478
		80	0,4651	0,4842
		120	0,4131	0,4366
	pošip 5	0	0,5189	0,6072
		40	0,4946	0,5290
		80	0,4079	0,4310
		120	0,3209	0,3591
	pošip 8	0	0,5194	0,6061
		40	0,5031	0,5507
		80	0,4190	0,4755
		120	0,3470	0,4115
	syrah 5	0	0,5158	0,6091
		40	0,4888	0,5395
		80	0,3797	0,4442
		120	0,2856	0,3566

»se nadaljuje«

nadaljevanje preglednice 11: Vrednosti izmerjenih absorbanc (A_{470}) v emulziji za ekstrakte iz listov vinske trte, zbrane v maju (5), avgustu (8) in septembru (9), kožic grozdnih jagod in listov rožmarina pri različnih časih (t)

SKUPINA	VZOREC	T	$A_{1(470)}$	$A_{2(470)}$
ekstrakti listov vinske trte	syrah 8	0	0,5224	0,6046
		40	0,4935	0,5510
		80	0,4136	0,4852
		120	0,3451	0,4180
	syrah 9	0	0,5219	0,5872
		40	0,5216	0,5484
		80	0,4850	0,4921
		120	0,4394	0,4405
ekstrakti kožic grozdnih jagod	debit	0	0,4950	0,5667
		40	0,4856	0,5471
		80	0,4549	0,5080
		120	0,4181	0,4732
	kujundžuša	0	0,5508	0,5651
		40	0,5136	0,5422
		80	0,4523	0,4982
		120	0,3882	0,4650
	zlatarica	0	0,5324	0,5868
		40	0,5069	0,5494
		80	0,4658	0,5005
		120	0,4233	0,4588
	trnjak	0	0,5270	0,5865
		40	0,5268	0,5738
		80	0,5267	0,5449
		120	0,5024	0,5154
	vranac	0	0,5330	0,5794
		40	0,5272	0,5610
		80	0,4976	0,5328
		120	0,4537	0,5006
ekstrakt listov rožmarina	rožmarin	0	0,5189	0,5740
		40	0,5186	0,5626
		80	0,5184	0,5508
		120	0,5184	0,5385

Določili smo tudi hitrost razpada β -karotena v kontrolnih vzorcih (brez dodanega antioksidanta) v primerjavi z vzorci, ki so vsebovali preiskovani ekstrakt. Antioksidativno učinkovitost preiskovanih metanolnih ekstraktov v emulziji linolne kisline, ki je vidna kot zaviranje bledenja oranžne barve β -karotena, smo izrazili kot koeficient antioksidativne učinkovitosti (C_{AA}), ki smo ga izračunali po enačbi:

$$C_{AA} = \left(1 - \frac{A_{vz470}^t - A_{vz470}^0}{A_{k470}^t - A_{k470}^0}\right) \cdot 100\% \quad \dots(19)$$

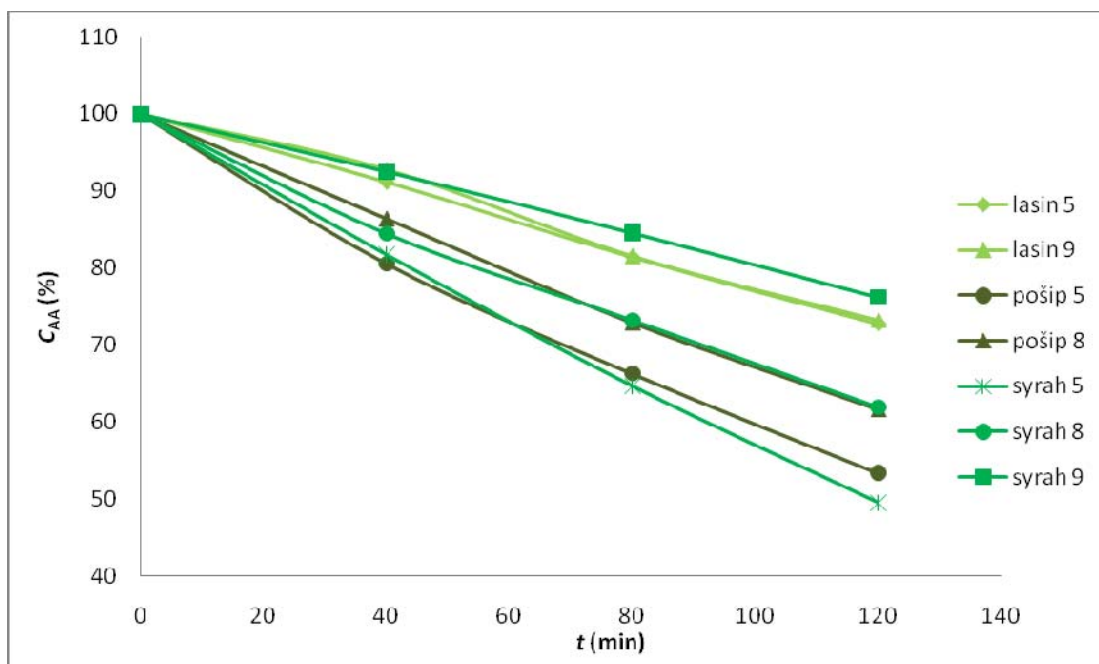
A_{vz470}^0 – absorbanca vzorca ob času $t = 0$

A_{vz470}^t – absorbanca vzorca ob času $t = x$

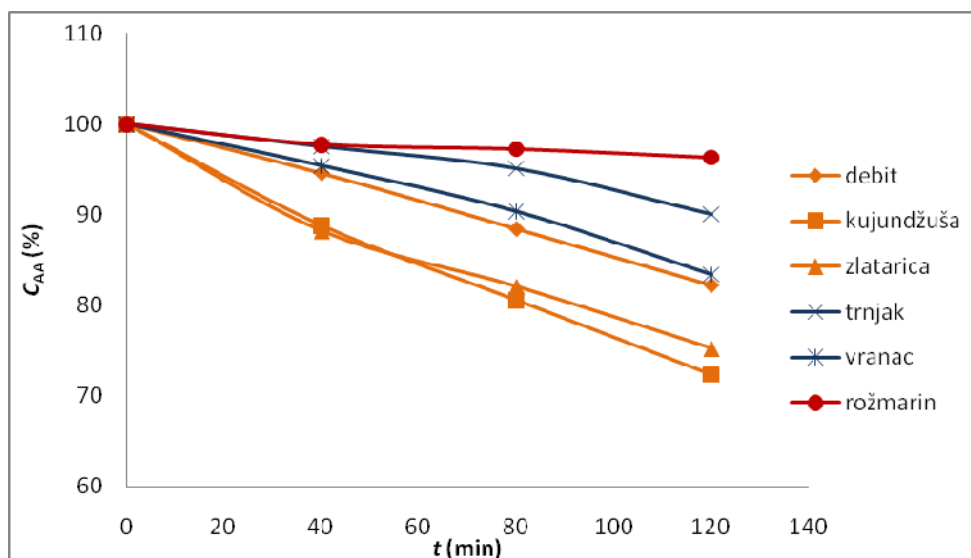
A_{k470}^0 – absorbanca kontrole ob času $t = 0$

A_{k470}^t – absorbanca kontrole ob času $t = x$

Na slikah 17 in 18 smo za preiskovane vzorce spremljali koeficiente antioksidativne učinkovitosti v odvisnosti od časa inkubacije. Pri vseh preiskovanih vzorcih opazimo padanje antioksidativne učinkovitosti s časom, z izjemo rožmarina, ki ima komaj opazen padec antioksidativne učinkovitosti s časom. Padanje antioksidativne učinkovitosti s časom smo med eksperimentom opazili kot bledenje oranžne barve β -karotena.



Slika 17: Koeficient antioksidativne učinkovitosti (C_{AA}) ekstraktov listov vinske trte, zbranih v maju (5), avgustu (8) in septembru (9), v emulziji v odvisnosti od časa inkubacije (t)

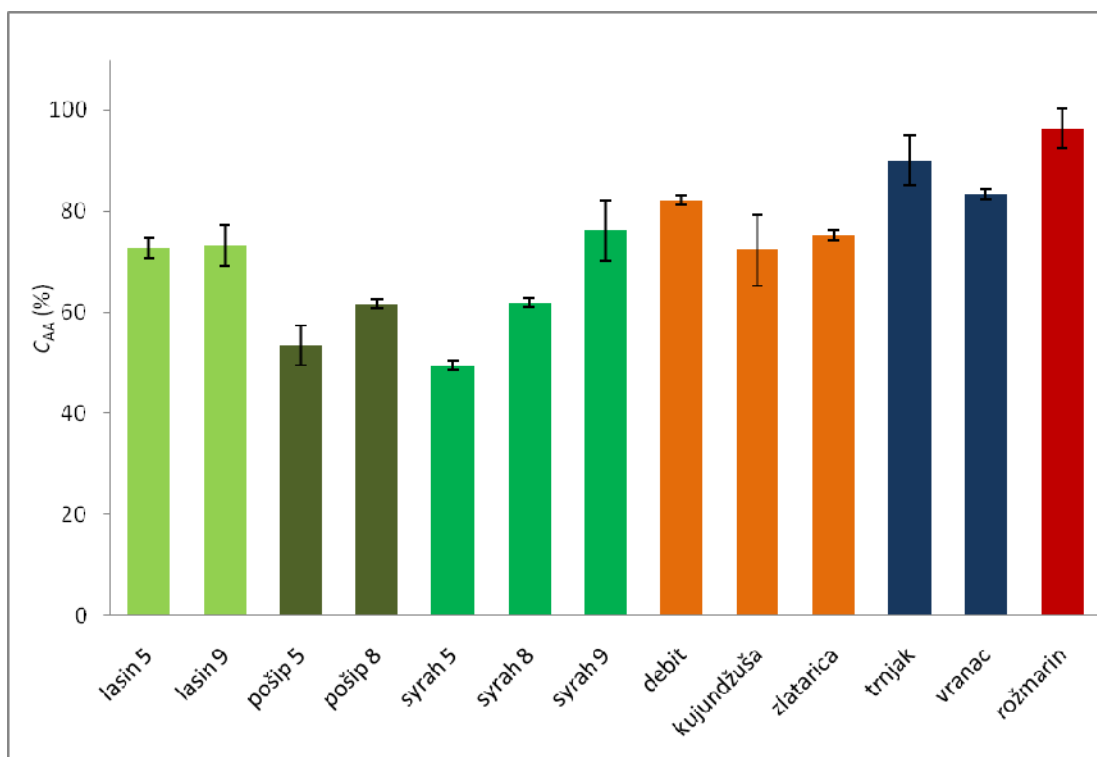


Slika 18: Koeficient antioksidativne učinkovitosti (C_{AA}) ekstraktov kožic grozdnih jagod (■ - bele sorte, ■ - rdeče sorte) in listov rožmarina (■) v emulziji v odvisnosti od časa inkubacije (t)

Vrednosti koeficientov antioksidativne učinkovitosti (C_{AA}) preiskovanih vzorcev po 120 min inkubacije pri temperaturi 50°C so prikazane v preglednici 12 in grafično na sliki 20.

Preglednica 12: Vrednosti koeficientov antioksidativne učinkovitosti (C_{AA}) ekstraktov iz listov vinske trte, zbranih v maju (5), avgustu (8) in septembru (9), kožic grozdnih jagod in listov rožmarina v emulziji po 120 minutah inkubacije pri koncentraciji fenolnih spojin 1,04 mg/L

SKUPINA	VZOREC	C_{AA1} (%)	C_{AA2} (%)	C_{AA} (%)
ekstrakti listov vinske trte	lasin 5	75,1	70,4	73 ± 2
	lasin 9	76,7	69,6	73 ± 4
	pošip 5	57,6	49,2	53 ± 4
	pošip 8	63,1	60,2	62 ± 1
	syrah 5	50,7	48,3	50 ± 1
	syrah 8	62,0	61,8	62 ± 1
	syrah 9	82,3	70,0	76 ± 6
ekstrakti kožic grozdnih jagod	debit	83,5	80,9	82 ± 1
	kujundžuša	65,2	79,5	72 ± 7
	zlatarica	76,7	73,8	75 ± 1
	trnjak	94,7	85,4	90 ± 5
	vranac	83,0	83,9	83 ± 1
ekstrakt listov rožmarina	rožmarin	99,9	92,7	96 ± 4



Slika 19: Vrednosti koeficientov antioksidativne učinkovitosti (C_{AA}) za ekstrakte listov vinske trte (■, ■, ■), zbrane v maju (5), avgustu (8) in septembru (9), kožic grozdnih jagod (■- bele sorte, ■- rdeče sorte) in listov rožmarina (■), v emulziji po 120 minutah inkubacije pri koncentraciji fenolnih spojin 0,05 mg/L

4.2.3.1 Vpliv stopnje vegetacije listov vinske trte na antioksidativno učinkovitost ekstrakta v emulziji linolne kisline v vodi

Vpliv stopnje vegetacije listov vinske trte na antioksidativno učinkovitost ekstrakta v emulziji, smo spremljali s primerjavo vrednosti C_{AA} preiskovanih ekstraktov po 120 min inkubacije pri koncentraciji fenolnih spojin 0,05 mg/L (preglednica 12 in slika 19).

Vsi preiskovani ekstrakti listov vinske trte učinkovito zavirajo oksidacijo linolne kisline v emulziji. Med vzorci, zbranimi v mesecu maju, imajo najboljšo antioksidativno učinkovitost fenolne spojine v ekstraktu sorte lasin 5 (73 ± 2 %), sledi mu syrah 5 (53 ± 4 %) in nato pošip 5 (50 ± 1 %). Povprečna vrednost antioksidativne učinkovitosti za mesec maj znaša 59 %. Antioksidativna učinkovitost s stopnjo vegetacije narašča pri sortah pošip in syrah, pri sorti lasin pa ostaja nespremenjena v okviru eksperimentalne napake. V mesecu avgustu se vrednost C_{AA} v primerjavi z mesecem majem zviša na (62 ± 1 %) in je enaka za oba preiskovana ekstrakta (pošip in syrah). V mesecu septembru pa se koeficient antioksidativne učinkovitosti pri sorti syrah še dodatno zviša na (76 ± 6 %), povprečje tega meseca pa znaša 75 %.

V raziskavi, ki jo so jo opravili Katalinić in sod. (2009), so spremljali odstotek inhibicije beljenja β -karotena ekstraktov listov vinske trte, zbranih v mesecu maju in septembru. Ekstrakti zbrani v mesecu septembru so pokazali višjo učinkovitost pri preprečevanju oksidacije linolne kisline v emulziji v primerjavi z listi, zbranimi v maju. To spremembo so povezali z razliko v polifenolni sestavi teh dveh ekstraktov, ki so jo določili s HPLC metodo.

4.2.3.2 Primerjava antioksidativne učinkovitosti fenolnih spojin ekstraktov iz kožic grozdnih jagod belih in rdečih sort v emulziji linolne kisline v vodi

V tem poglavju smo želeli ugotoviti, ali obstaja v emulziji razlika v antioksidativni učinkovitosti med fenolnimi spojinami iz kožic grozdnih jagod belih in rdečih sort. V ta namen smo primerjali vrednosti C_{AA} (%) preiskovanih ekstraktov po 120 min inkubacije pri koncentraciji fenolnih spojin 0,05 mg/L (preglednica 12 in slika 19).

Vsi preiskovani ekstrakti kožic grozdnih jagod učinkovito zavirajo oksidacijo linolne kisline v emulziji. Najboljšo antioksidativno učinkovitost je pokazala rdeča sorta trnjak ($(90 \pm 5) \%$), sledi pa mu sorta vranac z vrednostjo C_{AA} (83 ± 4) %. Med belimi sortami ima najboljšo antioksidativno učinkovitost sorta debit, saj vrednost C_{AA} znaša (82 ± 1) %. Sledita zlatarica ($(75 \pm 1) \%$) in kujundžuša ($(72 \pm 7) \%$).

Ekstrakti kožic grozdnih jagod rdečih sort so pokazali v povprečju za 10 % višjo antioksidativno učinkovitost pri preprečevanju oksidacije linolne kisline v emulziji v primerjavi s kožicami belih sort. Povprečna vrednost C_{AA} za kožice rdečih sort znaša 87 %, za kožice belih sort pa le 76 %.

Katalinić in sod. (2010) so v svoji raziskavi spremljali antioksidativno učinkovitost ekstraktov kožic grozdnih jagod v sistemu β -karotena in linolne kisline v emulziji. Ugotovili so višjo antioksidativno učinkovitost pri ekstraktih kožic grozdnih jagod rdečih sort v primerjavi z belimi.

4.2.3.3 Primerjava antioksidativne učinkovitosti fenolnih spojin v ekstraktu listov rožmarina s fenolnimi spojinami ekstraktov kožic grozdnih jagod in listov vinske trte

V tem poglavju nas je zanimalo, ali obstaja razlika v antioksidativni učinkovitosti med listi rožmarina ter kožicami grozdnih jagod in listi vinske trte (preglednica 12 in slika 19).

V povprečju so fenolne spojine ekstraktov iz grozdnih kožic pokazale boljšo antioksidativno učinkovitost v emulziji (81 %) kot pa fenolne spojine ekstraktov iz listov vinske trte (64 %). Fenolne spojine v ekstraktu iz listov rožmarina so pokazale najboljšo antioksidativno učinkovitost med preiskovanimi vzorci. Vrednost C_{AA} za rožmarin znaša kar $(96 \pm 4) \%$, medtem ko za najboljšo sorto listov vinske trte syrah 9 znaša C_{AA} $(76 \pm 6) \%$ in najboljšo sorto med kožicami grozdnih jagod trnjak $(90 \pm 5) \%$.

4.2.4 Analiza sposobnosti redukcije

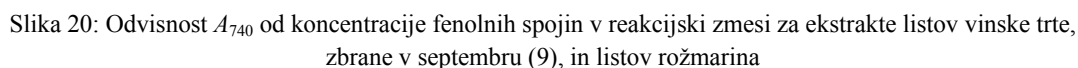
Metoda analiza sposobnosti redukcije temelji na sposobnosti antioksidanta (fenolne spojine), da reducira ion Fe^{3+} v ion Fe^{2+} . Spremembo barve kompleksa v modrozeleno smo spremljali spektrofotometrično pri valovni dolžini 740 nm (Juntachote in Berghofer, 2005).

Izmerjene vrednosti absorbanc (A_{740}) in povprečne vrednosti absorbanc pri določenih koncentracijah fenolnih spojin v reakcijski zmesi so podane v preglednici 13.

Preglednica 13: Koncentracije fenolnih (mg/L) spojin ekstraktov listov vinske trte, zbranih v septembru (9), in listov rožmarina v reakcijski zmesi (γ_{RZ}) ter vrednosti izmerjene absorbance (A_{740})

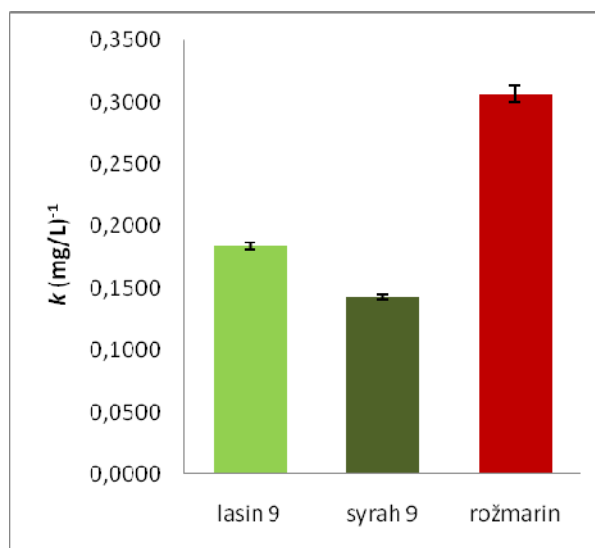
SKUPINA	VZOREC	γ_{RZ} (mg/L)	$A_{1(740)}$	$A_{2(740)}$	A_{740}
ekstrakti listov vinske trte	lasin 9	0,96	0,1645	0,1489	$0,16 \pm 0,01$
		1,93	0,3581	0,3350	$0,35 \pm 0,01$
		2,89	0,5352	0,5012	$0,52 \pm 0,02$
		3,86	0,7504	0,7577	$0,75 \pm 0,01$
		4,82	0,8518	0,7906	$0,82 \pm 0,03$
		5,78	1,1131	1,0875	$1,10 \pm 0,01$
	syrah 9	1,54	0,1750	0,1908	$0,18 \pm 0,01$
		3,07	0,4198	0,4357	$0,43 \pm 0,01$
		4,61	0,6456	0,6590	$0,65 \pm 0,01$
		6,15	0,8764	0,9064	$0,89 \pm 0,02$
		7,68	1,1074	1,1117	$1,11 \pm 0,01$
ekstrakt listov rožmarina	rožmarin	0,60	0,1485	0,1496	$0,15 \pm 0,01$
		1,17	0,2772	0,2825	$0,28 \pm 0,01$
		1,75	0,4920	0,5030	$0,50 \pm 0,01$
		2,33	0,7070	0,7278	$0,72 \pm 0,01$
		3,00	0,9304	0,9299	$0,93 \pm 0,01$
		3,75	1,1888	1,1880	$1,19 \pm 0,01$

Na sliki 20 je za preiskovane ekstrakte prikazana odvisnost A_{740} od koncentracije fenolnih spojin v reakcijski zmesi. Vidimo, da A_{740} linearno narašča s koncentracijo fenolnih spojin. S pomočjo linearne regresijske analize smo izračunali naklon premic (k) in sposobnost redukcije kvantitativno ovrednotili kot naklon premic. Večji naklon pomeni večjo sposobnost redukcije. Vrednosti naklonov oziroma sposobnosti redukcije so za vse preiskovane ekstrakte podane v preglednici 14.



SKUPINA	VZOREC	k_1 (mg/L) ⁻¹	k_2 (mg/L) ⁻¹	k (mg/L) ⁻¹
ekstrakti listov vinske trte	lasin 9	0,1872	0,1804	0,184 ± 0,003
	syrah 9	0,1419	0,1447	0,143 ± 0,002
ekstrakt listov rožmarina	rožmarin	0.3056	0.3077	0.307 ± 0.007

Na sliki 21 vidimo, da imajo najvišjo vrednost naklona in s tem najboljšo sposobnost redukcije fenolne spojine v ekstraktu rožmarina $((0,307 \pm 0,007) \text{ (mg/L)}^{-1})$. Med ekstrakti listov vinske trte pa je boljšo spodobnost redukcije pokazal lasin 9 z vrednostjo naklona $(0,184 \pm 0,003) \text{ (mg/L)}^{-1}$.



Slika 21: Spособnost redukcije oz. naklon premic (k), ki podaja koncentracijsko odvisnost A_{740} za ekstrakte listov vinske trte, zbrane v septembru (9), in listov rožmarina

4.2.5 Primerjava metod določanja antioksidativne učinkovitosti fenolnih spojin

Uporaba različnih metod določanja antioksidativne učinkovitosti je nujno potrebna, da bi dobili čim bolj realno sliko o antioksidativnem profilu določenega rastlinskega ekstrakta ali posamezne komponente (Koleva in sod., 2002). Da bi čim bolj ugotovili, kakšna je sposobnost preiskovanega vzorca za lovljenje prostih radikalov, je potrebno vzorce analizirati s pomočjo vsaj dveh metod z različnima prostima radikaloma (Yu in sod., 2002).

V tem poglavju smo med seboj primerjali rezultate o antioksidativni učinkovitosti fenolnih spojin v ekstraktih listov vinske trte, kožic grozdnih jagod in listov rožmarina. Antioksidativno učinkovitost smo določili s pomočjo treh različnih metod:

- sposobnost lovljenja prostega radikala ali metoda z radikalom DPPH•
- sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala
- sposobnost preprečevanja oksidacije linolne kisline ali beljenje β -karotena

Na slikah 22, 23 in 24 smo za liste, zbrane v posameznih vegetacijskih obdobjih, kožice rdečih sort ter kožice belih sort zaradi nazornejše primerjave prikazali povprečne vrednosti preiskovanih parametrov antioksidativne učinkovitosti (EC_{50} , SASA, C_{AA}). Na slikah vidimo, da se antioksidativna učinkovitost s stopnjo vegetacije spreminja, kar je mogoče pripisati spreminjanju vsebnosti fenolnih spojin ter fenolne sestave z zorenjem (Doshi in sod., 2006; Katalinić in sod., 2009).

Sposobnost lovljenja prostega radikala DPPH• z vegetacijo narašča, kar je razvidno s slike 22, saj je z zorenjem potrebna vedno manjša koncentracija fenolnih spojin za 50 % zmanjšanje začetnega deleža DPPH•. Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala z vegetacijo pada (slika 22), medtem ko sposobnost preprečevanja oksidacije linolne kisline, določena z metodo beljenja β -karotena, z vegetacijo narašča (slika 23).

Zaključimo lahko, da antioksidativna učinkovitost z vegetacijo narašča kot posledica akumulacije tistih fenolnih spojin, ki so uspešne pri lovljenju DPPH• radikala in preprečevanju oksidacije linolne kisline, medtem ko je v listih z zorenjem vedno manj fenolnih spojin, ki kažejo sposobnost lovljenja $O_2^{\bullet-}$ radikala.

Kot omenjajo Katalinić in sod. (2009), lahko različne spojine, prisotne v ekstraktu, definirajo antioksidativno učinkovitost, ki je odvisna od metode določitve. Prav tako pa med zorenjem potekajo številni kemijski in encimski procesi, ki vplivajo na spremembo fenolne sestave (Doshi in sod., 2006).

Antioksidativna učinkovitost se razlikuje med ekstrakti kožic grozdnih jagod belih in rdečih sort, kot prikazujejo slike 22, 23 in 24, kar sovпада z dejstvom, da se tudi po vsebnosti posameznih fenolnih spojin rdeče sorte razlikujejo od belih. V splošnem naj bi bila vsebnost skupnih fenolnih spojin v rdečih kožicah znatno višja od vsebnosti v belih kožicah (Yang in sod., 2009).

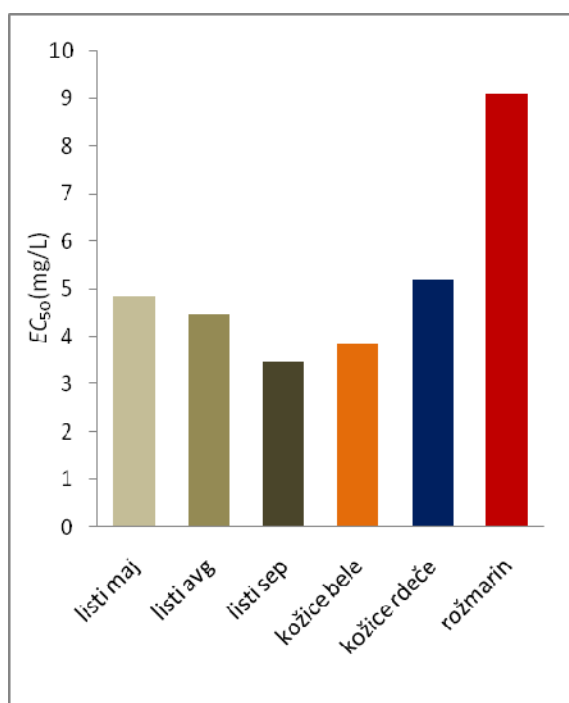
Pri metodi z radikalom DPPH• so ekstrakti kožic grozdnih jagod belih sort pokazali boljšo sposobnost lovljenja prostega radikala DPPH• v primerjavi s kožicami rdečih sort. Komercialno dostopen ekstrakt iz listov rožmarina je pokazal slabšo sposobnost lovljenja prostega radikala DPPH• v primerjavi s kožicami grozdnih jagod (slika 22). Pri sposobnosti lovljenja $O_2^{\bullet-}$ radikala so se najboljše izkazale kožice rdečih sort, bele so bile manj uspešne, medtem ko je rožmarin ponovno pokazal najslabšo antioksidativno učinkovitost (slika 23). Na sliki 24 vidimo, da ima ekstrakt listov rožmarina zelo močno antioksidativno učinkovitost v emulziji, saj je pokazal najboljšo sposobnost preprečevanja oksidacije linolne kisline. Kožice rdečih sort pa so bile ponovno bolj učinkovite od belih.

Zaključimo lahko, da imajo kožice grozdnih jagod rdečih sort višjo antioksidativno učinkovitost zaradi fenolnih spojin, ki uspešno lovijo $O_2^{\bullet-}$ radikal in preprečujejo oksidacijo linolne kisline, medtem ko imajo kožice belih sort druge fenolne spojine, ki so bolj učinkovite pri lovljenju prostega DPPH• radikala. Ekstrakt listov rožmarina pa vsebuje fenolne spojine, ki so pri lovljenju tako $O_2^{\bullet-}$ kot DPPH• radikala manj učinkovite od tistih v kožicah grozdnih jagod, vendar pa v heterogenem sistemu emulzije fenolne spojine ekstrakta iz listov rožmarina kažejo boljšo antioksidativno učinkovitost.

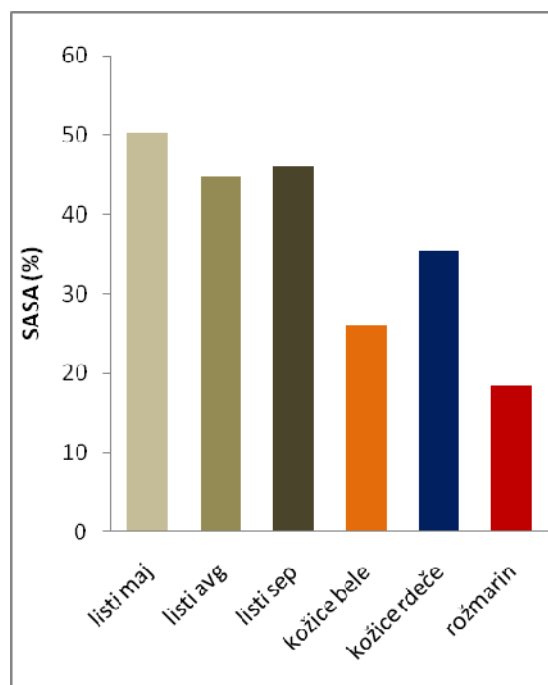
Kožice grozdnih jagod belih sort vsebujejo: flavanole, proantocianidine, hidroksicimetne kisline, medtem ko vsebujejo kožice grozdnih jagod rdečih sort: antocianine, flavanole, proantocianidine, flavonole in hidroksicimetne kisline (Makris, 2007). Fukumoto in Mazza

(2000) sta ugotovila, da so antocianini, flavonoli ter flavanoli zelo aktivni pri metodi beljenja β -karotena, kar potrjujejo tudi rezultati naše raziskave, saj so rdeče kožice pokazale boljšo sposobnost preprečevanja oksidacije linolne kisline kot bele.

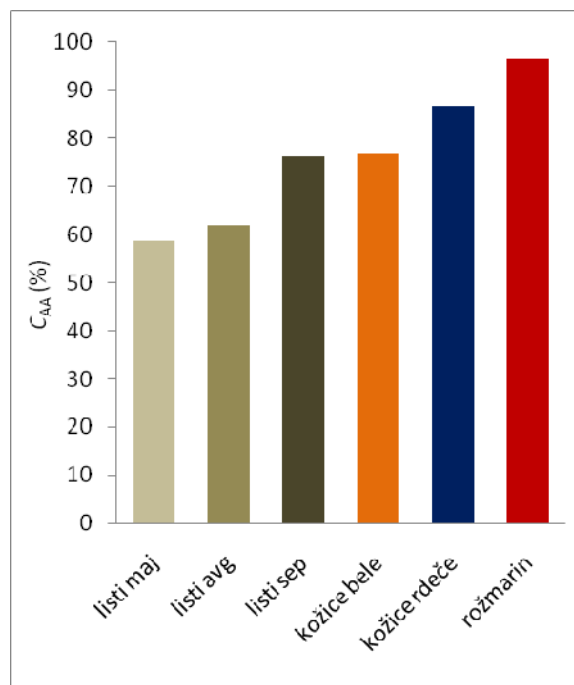
Antioksidativna učinkovitost fenolnih spojin v emulziji je med drugim odvisna tudi od polarosti posamezne spojine ter posledično od porazdelitve med vodno in lipidno fazo (Katalinić in sod., 2009). Manj polarne spojine se v večji meri porazdelijo v nepolarno lipidno fazo in so bolj učinkovite pri zaviranju oksidacije linolne kisline od bolj polarnih, ki se v večji meri porazdelijo v vodno fazo.



Slika 22: Koncentracije fenolnih spojin ekstraktov listov vinske trte, zbranih v maju (■), avgustu (■) in septembru (■), kožic grozdnih jagod (■ - bele sorte, ■ - rdeče sorte) in listov rožmarina (■), ki so potrebne za 50 % zmanjšanje začetne vsebnosti DPPH• (EC_{50})



Slika 23: Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala (SASA) za ekstrakte listov vinske trte, zbrane v maju (■), avgustu (■) in septembru (■), kožic grozdnih jagod (■ - bele sorte, ■ - rdeče sorte) in listov rožmarina (■), pri koncentraciji fenolnih spojin v reakcijski zmesi 3 mg/L



Slika 24: Vrednosti koeficientov antioksidativne učinkovitosti (C_{AA}) za ekstrakte listov vinske trte, zbrane v maju (■), avgustu (■) in septembru (■), kožice grozdnih jagod (■ - bele sorte, ■ - rdeče sorte) in listov rožmarina (■), v emulziji po 120 minutah inkubacije pri koncentraciji fenolnih spojin 1,04 mg/L

5 SKLEPI

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko sklepamo naslednje:

- V listih vinske trte se vsebnost fenolnih spojin spreminja s stopnjo vegetacije.
- Vsebnost fenolnih spojin v kožicah rdečih sort je sicer v povprečju višja od belih sort grozdja, vendar to ni pravilo. Vsebnost fenolnih spojin ni nujno odvisna od barve kožic grozdnih jagod, ampak predvsem od sortnih razlik.
- Z različnimi metodami smo preiskovanim vzorcem dokazali antioksidativno učinkovitost. Ekstrakti so pokazali sposobnost lovljenja prostega DPPH• radikala in superoksidnega anionskega radikala, sposobnost zaviranja oksidacije linolne kisline v emulziji ter sposobnost redukcije.
- Antioksidativna učinkovitost ni odvisna le od vsebnosti fenolnih spojin, ampak tudi od izbrane metode določitve. Ekstrakti listov vinske trte so pokazali boljšo sposobnost lovljenja DPPH• radikala in superoksidnega anionskega radikala v primerjavi z ekstrakti kožic grozdnih jagod iste sorte, medtem ko je ekstrakt listov rožmarina pokazal najslabšo sposobnost lovljenja pri obeh metodah. Pri metodi beljenja β -karotena je ekstrakt listov rožmarina pokazal najboljšo antioksidativno učinkovitost med preiskovanimi vzorci, sledijo mu ekstrakti kožic grozdnih jagod in nato ekstrakti listov, ki so se pri tej metodi najslabše odrezali.
- Antioksidativna učinkovitost fenolnih spojin v listih vinske trte se spreminja z vegetacijo. Antioksidativna učinkovitost narašča zaradi tistih fenolnih spojin, ki so uspešne pri lovljenju DPPH• radikala in preprečevanju oksidacije linolne kisline, medtem ko je v listih z zorenjem vedno manj fenolnih spojin, ki kažejo sposobnost lovljenja prostega superoksidnega anionskega radikala.
- Antioksidativna učinkovitost fenolnih spojin v ekstraktih kožic grozdnih jagod rdečih sort se razlikuje od antioksidativne učinkovitosti ekstraktov belih sort. Ekstrakti kožic grozdnih jagod rdečih sort imajo višjo antioksidativno učinkovitost zaradi fenolnih spojin, ki uspešno lovijo superoksidni anionski radikal in preprečujejo oksidacijo linolne kisline, medtem ko vsebujejo ekstrakti kožic belih sort fenolne spojine, ki so bolj učinkovite pri lovljenju prostega DPPH• radikala.
- Komercialno dostopni ekstrakt iz listov rožmarina je pokazal boljšo antioksidativno učinkovitost od preiskovanih vzorcev v heterogenem sistemu emulzije pri metodi beljenja β -karotena in boljšo sposobnost redukcije.

Rezultati našega raziskovalnega dela so delno potrdili naše delovne hipoteze.

6 POVZETEK

V okviru diplomske naloge smo v ekstraktih listov vinske trte in kožicah grozdnih jagod določili koncentracijo skupnih fenolnih spojin. S pomočjo različnih metod smo preiskovanim ekstraktom določili antioksidativno učinkovitost. Podali smo tudi primerjavo z antioksidativno učinkovitostjo ekstrakta listov rožmarina.

Koncentracijo skupnih fenolnih spojin v ekstraktih smo določili spektrofotometrično, s pomočjo Folin-Ciocalteu metode. Vsebnost fenolnih spojin se razlikuje med posameznimi stopnjami vegetacije. V ekstraktih listov vinske trte zbranih v mesecu maju je povprečna koncentracija fenolnih spojin 20550 mg/L. V ekstraktih listov zbranih v mesecu avgustu je koncentracija fenolnih spojin višja kot v mesecu maju (24354 mg/L). V septembru je povprečna koncentracija fenolnih spojin v ekstraktih listov višja v primerjavi z ekstrakti listov, ki so bili zbrani v maju in avgustu (28806 mg/L). Vsebnost fenolnih spojin v ekstraktih kožic grozdnih jagod je v povprečju višja pri rdečih sortah (4885 mg/L) kot pri belih sortah (2515 mg/L). Vendar vsebnost fenolnih spojin ni nujno odvisna od barve kožic grozdnih jagod, ampak predvsem od sortnih razlik, saj je vsebnost fenolnih spojin v ekstraktu kožic rdeče sorte lasin nižja kot v najšibkejši beli sorti debit. Ekstrakti iz listov vinske trte in kožic grozdnih jagod vsebujejo več fenolnih spojin kot ekstrakt listov rožmarina ((260 ± 3) mg/L).

Antioksidativno učinkovitost preiskovanih ekstraktov smo dokazali s štirimi metodami:

- sposobnost lovljenja prostega DPPH• radikala
- sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala
- učinkovitost zaviranja oksidacije linolne kisline v emulziji
- določitev sposobnosti redukcije

Preiskovani ekstrakti so pokazali antioksidativno učinkovitost pri omenjenih štirih metodah.

Sposobnost lovljenja prostega DPPH• radikala smo izrazili kot koncentracijo fenolnih spojin, ki je potrebna za 50 % zmanjšanje začetnega deleža DPPH• radikala. Sposobnost lovljenja prostega radikala DPPH• s stopnjo vegetacije narašča, saj je z zorenjem potrebna vedno manjša koncentracija EC_{50} . Boljšo sposobnost lovljenja prostega DPPH• radikala so v primerjavi z ekstrakti kožic grozdnih jagod rdečih sort pokazali ekstrakti kožic belih sort, saj je bila njihova vrednost EC_{50} v povprečju nižja. Ekstrakti listov vinske trte so pokazali boljšo sposobnost lovljenja DPPH• v primerjavi z ekstrakti kožic grozdnih jagod iste sorte, medtem ko je ekstrakt listov rožmarina pokazal najslabšo sposobnost lovljenja DPPH• v primerjavi z ostalimi preiskovanimi vzorci.

Sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala z vegetacijo pada. Boljšo sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala je pokazal ekstrakt kožic grozdnih jagod rdečih sort, saj je njegova vrednost SASA v povprečju višja od povprečne vrednosti za kožice belih sort. Najslabšo sposobnost lovljenja superoksidnega anionskega radikala je pokazal ekstrakt listov rožmarina. V okviru iste sorte, so ekstrakti listov vinske trte ponovno pokazali boljšo antioksidativno učinkovitost od ekstraktov kožic grozdnih jagod.

Sposobnost ekstraktov iz listov za preprečevanje oksidacije linolne kisline, določena z metodo beljenja β -karotena, z obdobjem vegetacije narašča. Ekstrakti kožic grozdnih jagod rdečih sort so pri tej metodi pokazali v povprečju višjo antioksidativno učinkovitost od kožic belih sort. Ekstrakt listov rožmarina je pokazal najboljšo antioksidativno učinkovitost med preiskovanimi vzorci, sledijo mu ekstrakti kožic grozdnih jagod in nato ekstrakti listov, ki so se pri tej metodi najslabše odrezali.

Pri metodi analiza sposobnosti redukcije je, v primerjavi z ekstrakti listov vinske trte, boljšo sposobnost redukcije pokazal ekstrakt listov rožmarina.

7 VIRI

- 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, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99: 191-203
- Balik J., Kyselakova M., Vrchotova N., Triska J., Kumšta M., Veverka J., Hic P., Totušek J., Lefnerova D. 2008. Relations between polyphenols content and antioxidant activity in vine grapes and leaves. *Czech Journal of Food Sciences*, 26: 25-32
- Barros L., Ferreira M.J., Queiros B., Ferreira I.C.F.R., Baptista P. 2007. Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 103: 413-419
- Birt D.F., Hendrich S., Wang W. 2001. Dietary agents in cancer prevention: Flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 90: 157-177
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 28: 25-30
- Burić D.P. 1985. *Savremeno vinogradarstvo*. Beograd, Nolit: 499 str.
- Dani C., Oliboni L.S., Agostini F., Funchal C., Serafini L., Henriques J.A., Salvador M. 2010. Phenolic content of grapevine leaves (*Vitis labrusca* var. Bordo) and its neuroprotective effect against peroxide damage. *Toxicology in Vitro*, 24: 148-153
- Doshi P., Adsule P., Banerjee K. 2006. Phenolic composition and antioxidant activity in grapevine parts and berries (*Vitis vinifera* L.) cv. Kishmish Chornyi (Sharad Seedless) during maturation. *International Journal of Food Science & Technology*, 41: 1-9
- Fukumoto L.R., Mazza G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3597-3604
- Furiga A., Lonvaud-Funel A., Badet C. 2009. *In vitro* study of antioxidant capacity and antibacterial activity on oral anaerobes of a grape seed extract. *Food Chemistry*, 113: 1037-1040

- Gropuzzo R. 2008. Vranac. Lovran, Vinopedia: 1 str.
www.vinopedia.hr (december 2010)
- Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive oils. Journal of the American Oil Chemist's Society, 58: 966-968
- Halliwell B., Chirico S. 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. American Journal of Clinical Nutrition, 57: 715-724
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. 1984. Oxygen toxicology, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochemical Journal, 219: 1-4
- Hribar J., Zlatić E. 2006. Flavonoidi sadja in zelenjave kot antikancerogene komponente V: Karcinogene in antikarcinogene komponente v živilih. 24. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 9. in 10. oktober 2006. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 157-163
- Juntachote T., Berghofer E. 2005. Antioxidative properties and stability of ethanolic extracts of holy basil and galangal. Food Chemistry, 92: 193-202
- Juntachote T., Berghofer E., Siebenhandal S., Bauer F. 2006. The antioxidative properties of holy basil and galangal in cooked ground pork. Meat Science, 72: 446-456
- Katalinić V., Generalić I., Skroza D., Ljubenkov I., Teskera A., Konta I., Boban M. 2009. Insight in the phenolic composition and antioxidative properties of *Vitis vinifera* leaves extracts. Croatian Journal of Food Science and Technology, 1: 7-15
- Katalinić V., Možina S.S., Skroza D., Generalić I., Abramović H., Miloš M., Ljubenkov I., Piskernik S., Pezo I., Terpinč P., Boban M. 2010. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). Food Chemistry, 119: 715-723
- Koleva I.I., Van Beek T.A., Linssen J.P.H., de Groot A., Evstatieva L. N. 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. Phytochemical Analysis, 13: 8-17
- Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-22
- Košmelj K. 2007. Uporabna statistika. 2. izd. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 249 str.
- Košmerl T., Kač M. 2004. Osnove kemijske analize mošta in vina. 2. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, oddelek za živilstvo: 97-106

- Macheix J.J., Fleuriet A., Billot J. 1990. Fruit phenolics. Boca Raton, CRC Press: 392 str.
- Magalhaes 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
- Makris D.P., Boskou G., Andrikopoulos N.K. 2007. Polyphenolic content and *in vitro* antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 125-132
- Mikuš R.P., Poljšak B. 2005. Funkcionalna hranila v zdravi prehrani. Obzornik Zdravstvene Nege, 39: 201-207
- Mirošević N., Turković Z. 2003. Ampelografski atlas. Zagreb, Golden marketing-Tehnička knjiga: 375 str.
- Monagas M., Hernandez-Ledesma B., Gomez-Cordoves C., Bartolome B. 2006. Commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. leaves and grape skins: □ Antioxidant and chemical characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 319-327
- Monagas M., Garrido I., Bartolome B., Gomez-Cordoves C. 2006. Chemical characterization of commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. *Analytica Chimica Acta*, 563: 401-410
- Montealegre R.R., Peces R.R., Chacon Vozmediano J.L., Gascuena J.M., Romero E.G. 2006. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 687-693
- Moure A., Cruz J.M., Franco D., Dominguez J.M., Sineiro J., Dominguez H., Nunez M.J., Parajo J.C. 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72: 145-171
- Moure A., Franco D., Sineiro J., Dominguez H., Nunez M.J., Lema J.M. 2000. Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3890-3897
- Negro C., Tommasi L., Miceli A. 2003. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technology*, 87: 41-44
- Orhan N., Aslan M., Orhan D. D., Ergun F., Yesilada E. 2006. *In-vivo* assessment of antidiabetic and antioxidant activities of grapevine leaves (*Vitis vinifera*) in diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 108: 280-286
- Pinelo M., Arnous A., Meyer A.S. 2006. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology*, 17: 579-590

- Roback J., Gryglewski R.J. 1988. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical Pharmacology*, 37: 837-841
- Roussis I.G., Lambropoulos I., Tzimas P., Gkoulioti A., Marinos V., Tsoupeis D., Boutaris I. 2008. Antioxidant activities of some Greek wines and wine phenolic extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21: 614-621
- Schieber A., Stintzing F.C., Carle R. 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds-recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 12: 401-413
- Shahidi F., Naczek M. 2004. Phenolics in food and nutraceuticals. 2nd ed. Boca Raton, CRC Press: 558 str.
- Shrikhande A.J. 2000. Wine by-products with health benefits. *Food Research International*, 33: 469-474
- Terpine P., Bezjak M., Abramovič H. 2009. A kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts. *Food Chemistry*, 115: 740-744
- Torres J.L., Varela B., Garcia M.T., Carilla J., Matito C., Centelles J.J., Cascante M., Sort X., Bobet R. 2002. Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 :7548-7555
- Turković G. 2008. Pošip bijeli. Lovran, Vinopedia: 1 str.
www.vinopedia.hr (december 2010)
- Yang J., Martinson T.E., Liu R.H. 2009. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chemistry*, 116: 332-339
- Yu L., Haley S., Perret J., Harris M., Wilson J., Qian M. 2002. Free radical scavenging properties of wheat extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1619-1624
- Zdunić G. 2008a. Debit bijeli. Lovran, Vinopedia: 1 str.
www.vinopedia.hr (december 2010)
- Zdunić G. 2008b. Kujundžuša. Lovran, Vinopedia: 1 str.
www.vinopedia.hr (december 2010)
- Zdunić G. 2009a. Lasina. Lovran, Vinopedia: 1 str.
www.vinopedia.hr (december 2010)
- Zdunić G. 2009b. Rudežuša. Lovran, Vinopedia: 1 str.
www.vinopedia.hr (december 2010)

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Heleni Abramovič za vse nasvete in pomoč, ki mi jih je nudila v času izdelave diplomske naloge.

Za pregled naloge se najlepše zahvaljujem recenzentki prof. dr. Tatjani Košmerl.

Zahvalila bi se Fakulteti za kemijo in tehnologijo, Univerze v Splitu, ker so mi odstopili vzorce za analizo, ter Ivani Generalić, dipl. inž., za pomoč v laboratoriju.

Hvala Lini Burkan Makivić, univ. dipl. inž., za pregled in pomoč pri urejanju literature.

Zahvaljujem se Petri Terpinc, univ. dipl. inž. živ. teh., za nasvete in pomoč pri izvedbi analiz. Hvala tudi tehnični sodelavki ge. Janji Martinuč za pomoč v laboratoriju.

Za pregled diplomske naloge se zahvaljujem prijateljici Luciji Kac.

Staršema, Vedrani in Dušanu, ter bratu Luki hvala za pomoč in podporo tekom študija in pri pisanju diplomske naloge.

Posebna zahvala fantu Amelu, ki me vedno podpira in mi stoji ob strani.