

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Luka WECHTERSBAH

**STABILNOST POLARNIH IN NEPOLARNIH ANTIOKSIDANTOV V
KOMPLEKSNEM MATRIKSU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**STABILITY OF POLAR AND NON-POLAR ANTIOXIDANTS IN
COMPLEX MATRIX**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2005

POPRAVKI

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

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorja imenovala doc. dr. Blaža Cigića, za somentorja doc. dr. Marjana Simčiča in za recenzentko prof. dr. Veroniko Abram.

Mentor: doc. dr. Blaž Cigić

Somentor: doc. dr. Marjan Simčič

Recenzentka: prof. dr. Veronika Abram

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Luka Wechtersbach

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMATIKA

ŠD Dn
 DK UDK 543.645: 641.1(043) = 863
 KG antioksidanti / antioksidativna aktivnost / DPPH / 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil / TCEP / Tris(2-karboksietil)fosfin / vitamin C / vitamin E / stabilnost / metafosforna kislina / homogenizacija / shranjevanje
 AV WECHTERSBACK, Luka
 SA CIGIČ, Blaž (mentor) / SIMČIČ, Marjan (somentor) / ABRAM, Veronika (recenzentka)
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani. Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
 LI 2005
 IN STABILNOST POLARNIH IN NEPOLARNIH ANTIOKSIDANTOV V KOMPLEKSNEM MATRIKSU
 TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
 OP XI, 59 s., 9 pregl., 26 slik, 2 pril., 59 vir.
 IJ sl
 JI sl / en
 AI Kompleksna živila vsebujejo tako polarne kot nepolarne antioksidante. V okviru diplomske naloge smo optimizirali metode homogenizacije, ekstrakcije in shranjevanja, da bi zagotovili čim večjo stabilnost antioksidantov v vzorcih obrokov od priprave do analize. Antioksidativno aktivnost (AA) polarnih in nepolarnih antioksidantov smo spremljali z radikalom 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil (DPPH^{*}). Določili smo molsko razmerje med DPPH^{*} in askorbinsko kislino (ASK), ki je 1,9:1 ter med DPPH^{*} in α -tokoferolom (α -TF), ki je 1,7:1 ter ugotovili, da DPPH^{*} ne reagira z dehidroaskorbinsko kislino (DHA). Postopke homogenizacije in stabilizacije antioksidantov smo optimizirali na že pripravljeni mesno zelenjavni omaki ter ugotovili, da z dodatkom metafosforne kisline (MFK) v omako pred homogenizacijo stabiliziramo ASK. Da ima pH velik vpliv na stabilnost ASK smo potrdili s preučevanjem v modelnih raztopinah. Pokazali smo, da ASK pri pH vrednostih večjih od 3 ni stabilna. Pri pH 4 v acetatnem pufru razpade na sobni temperaturi v 20 urah več kot 85 % ASK. Pri obroku smo poleg skupne AA s HPLC določali vsebnost ASK. Ko smo izvedli homogenizacijo pri pH 3,9, smo kromatografsko določili 97 % izkoristek standardnega dodatka ASK. Izkoristek standardnega dodatka α -TF, ki smo ga določili z merjenjem AA, je bil 52 %. Polarni in nepolarni antioksidanti so v homogeniziranih vzorcih obroka, shranjeni v zamrzovalniku na -70 °C, relativno nestabilni. Že po nekaj dneh smo opazili zmanjšanje AA tudi pri pH vrednostih nižjih od 3. Del ASK se je oksidiral do DHA, vendar je skupna vsebnost vitamina C med zamrzovanjem ostala praktično nespremenjena. Iz primerjave kromatografsko določene vsebnosti ASK in polarnih antioksidantov določenih z DPPH^{*} smo ugotovili, da je najbolj nestabilen polaren antioksidant ASK.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 543.645: 641.1(043) = 863
CX antioxidants / antioxidant potencial / DPPH / 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl / TCEP / Tris(2-carboxyethyl)phosphine / vitamin C / vitamin E / stability / metaphosphoric acid / meal homogenization / preservation
AU WECHTERSBACK, Luka
AA CIGIČ, Blaž (supervisor) / SIMČIČ, Marjan (co-advisor) / ABRAM, Veronika (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2005
TI STABILITY OF POLAR AND NON-POLAR ANTIOXIDANTS IN COMPLEX MATRIX
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 59 p., 9 tab., 26 fig., 2 ann., 59 ref.
LA sl
AL sl / en
AB Complex foods contain polar and nonpolar antioxidants. In a course of a graduation thesis methods of homogenization, extraction and storage were optimized in order to stabilize antioxidants in food samples until analysis was performed. Antioxidant activity (AA) was determined with free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]). Molar ratio of DPPH[•] : ascorbic acid (ASK) was found to be 1,9:1 and molar ratio of DPPH[•] : α -tocopherol (α -TF) was found to be 1,7:1. Free radical DPPH[•] did not react with dehydroascorbic acid (DHA). Methods of homogenization and stabilization were optimized on pre-prepared meat and vegetable sauce. We have determined that metaphosphoric acid (MFK) significantly stabilized ASK, when added to the sauce prior to the homogenization. Influence of pH on the stability of ASK was further studied in model solutions. ASK was stable only in solutions where pH was 3 or lower, as 85 % of ASK was degraded over 20 hours in acetate buffer pH 4. In the meal, not only antioxidant activity but also chromatographic analysis of ASK was performed. When the meal was homogenized in MFK at pH 3,9, chromatographically determined recovery of added ASK was 97 %. Recovery of α -TF, determined with measured AA, was 52 %. Both, polar and non-polar antioxidants in homogenized meal were not stable even if refrigerated at -70°C . Decrease of AA was observed after few days also at pH values bellow 3. Certain proportion of AA was oxidized to DHA, however total vitamin C content in frozen samples remained relatively constant. Decrease of ASK content, determined with HPLC, corresponds to decrease in polar antioxidants determined with DPPH[•], meaning that ASK is the least stable polar antioxidant in homogenized meal.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMATIKA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PRILOG.....	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XI
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN DELA.....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 PROSTI RADIKALI.....	3
2.1.1 Glavne vrste prostih radikalov.....	3
2.2 ANTIOKSIDANTI	3
2.2.1 Askorbinska kislina (Vitamin C).....	5
2.2.1.1 Nomenklatura.....	5
2.2.1.2 Struktura L-askorbinske kisline	5
2.2.1.3 Vitamin C v živilih.....	6
2.2.1.4 Določanje askorbinske in dehidroaskorbinske kisline	7
2.2.2 Vitamin E	8
2.2.2.1 Nomenklatura.....	8
2.2.2.2 Vitamin E v živilih.....	9
2.3 METODE ZA MERJENJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI	9
2.3.1 Direktne metode.....	10
2.3.1.1 Direktne metode, ki temeljijo na kinetiki lipidne avtooksidacije	10
2.3.1.2 Direktne kompeticijske metode	10
2.3.2 Indirektne metode.....	11
2.3.2.1 DPPH [•] (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)	11
2.3.2.2 ABTS ^{•+} (2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat]).....	13
2.3.2.3 Redukcija Fremijevega radikala	13
2.3.2.4 Metoda z redukcijo Fe ³⁺	13
2.3.3 Ostale metode.....	13
2.4 EKSTRAKCIJA ANTIOKSIDANTOV	14
2.4.1 Ekstrakcija nepolarnih antioksidantov.....	14
2.4.1.1 Organska solventna ekstrakcija	14
2.4.1.2 Superkritična tekočinska ekstrakcija.....	15
2.4.1.3 Ekstrakcija s trdno fazo (Solid-phase extraction)	15
2.4.2 Ekstrakcija polarnih antioksidantov.....	15
2.5 STABILNOST ANTIOKSIDANTOV.....	16
2.5.1 Stabilnost askorbinske kisline	16
2.5.1.1 Vplivi temperature na razgradnjo askorbinske kisline.....	17
2.5.1.2 Vpliv kovinskih ionov in pH na oksidacijo askorbinske kisline	17

2.5.2	Stabilnost vitamina E.....	17
2.5.2.1	Vpliv temperature	17
2.5.2.2	Vpliv kisika.....	18
2.5.2.3	Vpliv svetlobe	18
2.5.2.4	Vpliv pH	18
3	MATERIALI IN METODE	19
3.1	MATERIALI	19
3.2	METODE DELA	20
3.2.1	Antioksidativna aktivnost.....	20
3.2.1.1	Meritev antioksidativne aktivnosti z reagentom DPPH [*]	20
3.2.1.2	Meritev antioksidativne aktivnosti s Folin – Ciocalteaujevim reagentom (F-C).....	21
3.2.2	Spektrofotometrično določanje stabilnosti askorbinske kisline.....	22
3.2.3	Metode homogenizacije in ekstrakcije vzorcev omake za analize antioksidativne aktivnosti	23
3.2.4	Metode priprave, homogenizacije in ekstrakcije vzorcev obroka za analize antioksidativne aktivnosti in kvantitativno analizo askorbinske kisline z metodo HPLC.....	24
3.2.5	Določanje askorbinske kisline z metodo HPLC.....	26
4	REZULTATI	28
4.1	ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST IZBRANIH ANTIOKSIDANTOV	28
4.1.1	DPPH [*]	28
4.1.2	Folin-Ciocalteau.....	29
4.2	STABILNOST ASKORBINSKE KISLINE V MODELNIH RAZTOPINAH	31
4.3	STABILNOST ANTIOKSIDANTOV V KOMPLEKSNIH MATRIKSIH.....	32
4.3.1	Določanje antioksidativne aktivnosti v omaki – »Sugo«	32
4.3.2	DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI V OBROKU.....	38
4.3.2.1	Vpliv dodatka MFK na stabilnost antioksidantov v obroku.....	38
4.3.2.2	Stabilnost standardnega dodatka askorbinske kisline in α -tokoferola v obroku z dodano MFK	39
4.3.2.3	Vpliv dodatnega zniževanja pH na stabilnost antioksidantov v obroku	42
4.4	KROMATOGRAFSKO DOLOČANJE ASKORBINSKE KISLINE.....	44
4.4.1	Umeritvena krivulja za kromatografsko določanje askorbinske kisline ..	44
4.4.2	Določanje askorbinske kisline v zelju	45
4.4.3	Določanje askorbinske kisline v obroku	46
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	49
5.1	RAZPRAVA.....	49
5.2	SKLEPI	53
6	POVZETEK.....	54
7	VIRI	55
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1:	Vsebnost vitamina C v nekaterih vrstah sadja in zelenjave (Rubatzky in Yamaguchi, 1997).....	6
Pregl. 2:	Vsebnost posameznih tokoferolov (TF), tokotrienolov (T3) in števila ekvivalentov α -tokoferola v različnih oljih in semenih v mg/100 g (Vitamin E, 2004)	9
Pregl. 3:	Prikaz različnih dodatkov v obrok pred homogenizacijo in po homogenizaciji	24
Pregl. 4:	Priprava vzorcev pri določanju askorbinske kisline z metodo HPLC v zelju..	26
Pregl. 5:	Množinsko razmerje med DPPH [•] in nekaterimi antioksidanti	29
Pregl. 6:	Primerjava učinkovitosti nekaterih antioksidantov s koncentracijo $2,5 \times 10^{-5}$ mol/l za redukcijo F-C reagenta	30
Pregl. 7:	Primerjava učinkovitosti ekstrakcije antioksidantov s heksanom in etil acetatom	32
Pregl. 8:	Razredčitve pri pripravi vzorcev omake	34
Pregl. 9:	Določen delež standardnih dodatkov askorbinske kisline in α -tokoferola v ekstraktih omake takoj po homogenizaciji.....	36

KAZALO SLIK

Slika 1:	Struktura L-askorbinske kisline (Klofutar in sod., 1998).....	5
Slika 2:	Prehajanje med L-askorbinsko kislino in L-dehidroaskorbinsko kislino (Gökmen in sod., 2000).....	6
Slika 3:	Redukcija DHA v ASK z reducentom TCEP (Lykkesfeldt, 2000).....	8
Slika 4:	Strukturna formula α -tokoferola (Vitamin E, 2004).....	8
Slika 5:	Možna pot razgradnje askorbinske kisline (Green in Fry, 2005).....	16
Slika 6:	2,2–difetil–1–pikril–hidrazil.....	20
Slika 7:	Shema priprave vzorcev omake za analize polarne in nepolarne antioksidativne aktivnosti ob dodatku standardnih dodatkov ASK in α -TF	24
Slika 8:	Priprava vzorcev obroka za določanje antioksidativne aktivnosti z DPPH [•] in določanje vsebnosti askorbinske kisline z metodo HPLC	25
Slika 9:	Odvisnost množine porabljenega DPPH [•] od množine askorbinske kisline, α -tokoferola, troloxa in klorogenske kisline v reakcijski zmesi.....	28
Slika 10:	Učinkovitost nekaterih antioksidantov v odvisnosti od njihove koncentracije, za redukcijo F-C reagenta	29
Slika 11:	Stabilnost askorbinske kisline raztopljene v različnih raztopinah.....	31
Slika 12:	Stabilnost askorbinske kisline raztopljene v pufrih z različnimi pH vrednostmi	32
Slika 13:	Stabilnost standardnega dodatka askorbinske kisline, z masnim deležem 528 μ g/g omake, določena z DPPH [•]	33
Slika 14:	Stabilnost standardnega dodatka α -tokoferola raztopljenega v etil acetatu z masnim deležem 565 μ g/g omake določena z DPPH [•]	36
Slika 15:	Stabilnost standardnega dodatka α -tokoferola raztopljenega v etanolu z masnim deležem 565 μ g/g omake določena z DPPH [•]	37
Slika 16:	Primerjava vsebnosti polarnih antioksidantov v obrokih homogeniziranih z in brez MFK, določenih z DPPH [•] in podanih kot μ g ekvivalentov askorbinske kisline na g obroka.....	38
Slika 17:	Primerjava vsebnosti nepolarnih antioksidantov v obrokih homogeniziranih z in brez MFK, določenih z DPPH [•] in podanih kot μ g ekvivalentov α -tokoferola (TF) na g obroka	39

Slika 18:	Primerjava vsebnosti polarnih antioksidantov v obrokih s in brez standardnega dodatka askorbinske kisline, določenih z DPPH [•] in podanih kot µg ekvivalentov askorbinske kisline na g obroka.....	40
Slika 19:	Primerjava vsebnosti nepolarnih antioksidantov v obrokih s in brez standardnega dodatka α-tokoferola, določenih z DPPH [•] in podanih kot µg ekvivalentov α-tokoferola na g obroka.....	41
Slika 20:	Primerjava vsebnosti polarnih antioksidantov v obrokih glede na ustrezne dodatke kislin pred in po homogenizaciji, določenih z DPPH [•] in podanih kot µg ekvivalentov askorbinske kisline na g obroka.....	42
Slika 21:	Primerjava vsebnosti nepolarnih antioksidantov v obrokih glede na ustrezne dodatke kislin pred in po homogenizaciji, določenih z DPPH [•] in podanih kot µg ekvivalentov α-tokoferola na g obroka.....	43
Slika 22:	Umeritvena krivulja askorbinske kisline na HPLC sistemu	44
Slika 23:	Vpliv različnih postopkov homogenizacije in priprave vzorcev na delež askorbinske kisline v zelju	45
Slika 24:	Primerjava kromatografsko določene vsebnosti askorbinske kisline in dehidroaskorbinske kisline v obrokih homogeniziranih z in brez MFK.....	46
Slika 25:	Primerjava kromatografsko določene vsebnosti askorbinske kisline in dehidroaskorbinske kisline v obrokih s in brez standardnega dodatka askorbinske kisline.....	47
Slika 26:	Primerjava kromatografsko določene vsebnosti askorbinske kisline glede na ustrezne dodatke kislin pred in po homogenizaciji.....	48

KAZALO PRILOG

- Priloga A:** Kromatogram standarda askorbinske kisline s koncentracijo 20 µg/ml
- Priloga B:** Kromatogram askorbinske kisline določene s predhodnjo redukcijo z reducentom TCEP pri obroku homogeniziranem pri pH 2,5

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AA	antioksidativna aktivnost
ABTS ^{•+}	2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat]
ASK	askorbinska kislina
DHA	dehidroaskorbinska kislina
DPPH [•]	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DTT	ditiotreitol
F-C	Folin-Ciocalteujev reagent
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
MFK	metafosforna kislina
TCEP	Tris(2-karboksietil)fosfin
TF	tokoferol

1 UVOD

S pojmom antioksidanti največkrat opišemo strukturno različne spojine in encime, ki preprečujejo oksidacijo ostalih molekul. Neencimski antioksidanti delujejo tako, da reagirajo z reaktivnimi prostimi kisikovimi radikali preden ti poškodujejo biološko pomembne molekule. V živilih antioksidanti preprečujejo kvar, žarkost in razbarvanje, ki se pojavljajo kot posledica oksidacije. Antioksidante lahko delimo na polarne in nepolarne. Poseben pomen imata polaren antioksidant askorbinska kislina in nepolaren α -tokoferol (Kaur in Kapoor, 2001).

Na stabilnost antioksidantov v živilih vplivajo temperatura, svetloba, pH, prisotnost kisika in določeni kovinski ioni. Prav kemijska reaktivnost antioksidantov v kompleksnih matriksih predstavlja velik problem pri njihovi kvantifikaciji. Oksidacija askorbinske kisline v kompleksnih matriksih lahko poteče že v nekaj minutah (Koshiishi in Imanari, 1997).

Tokoferoli so bolj stabilni od askorbinske kisline, vendar se tudi ti v relativno kratkem času lahko oksidirajo (Kamal-Eldin in Appelqvist, 1996).

Za določanje vsebnosti tako polarnih kot nepolarnih antioksidantov je primerna metoda, ki temelji na reakciji antioksidantov z radikalom DPPH[•] (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Omenjeno metodo smo uporabili za določanje vsebnosti polarnih in nepolarnih antioksidantov v obroku. Koncentraciji askorbinske kisline in dehidroaskorbinske kisline, ki je oksidirana oblika vitamina C, smo določali kromatografsko.

1.1 NAMEN DELA

- Optimizirati postopek homogenizacije obroka, da bi zagotovili čim večjo stabilnost antioksidantov.
- Vpeljati metodo ekstrakcije polarnih in nepolarnih antioksidantov iz homogeniziranega obroka.
- Z metodo DPPH[•] določiti vsebnost polarnih in nepolarnih antioksidantov v homogeniziranem obroku.
- Določiti molsko razmerje med posameznimi antioksidanti in DPPH[•], da bi lahko ovrednotili stabilnost antioksidantov v homogenizatu in učinkovitost ekstrakcije.
- Določiti vsebnost askorbinske kisline in dehidroaskorbinske kisline v homogeniziranem obroku

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Priprava in homogeniziranje obroka ima velik vpliv na stabilnost antioksidantov. Dejavniki kot so večja dostopnost kisika, mešanje antioksidantov in kovinskih ionov, ki so katalizatorji v reakcijah oksidacije ter sprememba pH pospešujejo njihovo oksidacijo. Z optimizacijo postopkov homogenizacije in ekstrakcije povečamo stabilnost antioksidantov in tako posledično tudi pravilnost določene vsebnosti v celotnem obroku.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PROSTI RADIKALI

Prosti radikali so atomi, molekule ali ioni z vsaj enim elektronom brez para. Pogostokrat proste radikale opišejo tudi kot zelo reaktivne molekule, ki poškodujejo različne celične strukture. Prost radikali največkrat nastanejo iz molekul pri cepitvi kovalentnih vezi. So rezultat normalne celične presnove in posledica dejavnikov okolja. Prost radikali izredno hitro reagirajo z drugimi spojinami tako, da poskušajo odvzeti za stabilnost potrebni elektron. Ko določeni spojini, ki ni prost radikal odvzamejo elektron, ta sama postane prost radikal, kar sproži verižno reakcijo. Ko se proces začne, lahko povzroči lipidno peroksidacijo, le-ta pa lahko povzroči destabilizacijo in razgradnjo komponent celične membrane. Prost radikali lahko pogostokrat poškodujejo tudi makromolekule kot so proteini in DNA (Kaur in Kapoor, 2001).

Kisikovi prost radikali so udeleženi pri številnih normalnih procesih kot so celično dihanje in delovanje imunskega sistema. V primeru porušenega ravnotežja imajo prost radikali pomembno vlogo pri staranju, degenerativnih boleznih, raku, kardiovaskularnih boleznih, pri sladkorni bolezni in mnogih drugih patoloških stanjih. Te bolezni so pogostokrat povezane s pomanjkanjem naravnih antioksidantov (vitaminov A, C, E, β -karotena, flavonoidov,...), aminokislin (cistina, cisteina, glutationa) ter elementov v sledovih (Se, Zn, Mn, Cu) (Korošec, 2000).

2.1.1 Glavne vrste prostih radikalov

Najpomembnejši kisikovi prost radikali so hiperoksidni anion (O_2^-), hidroksilni radikal ($\text{OH}^\bullet$), hidroperoksidni radikal ($\text{OOH}^\bullet$), peroksidni radikal ($\text{OOR}^\bullet$) in alkoksidni radikal ($\text{OR}^\bullet$) (Kaur in Kapoor, 2001).

2.2 ANTIOKSIDANTI

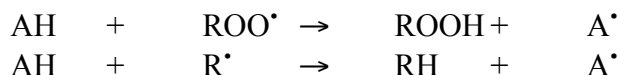
Antioksidanti so spojine, ki varujejo biološke sisteme pred poškodbami, ki jih povzročajo prost radikali (Krinsky, 1989). V zadnjem času se je zanimanje za antioksidante izredno povečalo, predvsem zaradi ugotovljenega vpliva pri preprečevanju kroničnih in degenerativnih boleznih, kot so rak in kardiovaskularne bolezni (Diaz in sod., 1997; Ames in sod., 1993, 1995; Young in Woodside, 2001). Predvsem je bila ugotovljena povezava med uživanjem sadja in zelenjave, ki vsebujejo večje količine antioksidantov, ter zmanjšanim obolevanjem za naštetimi boleznimi. Antioksidanti so za zdravje pomembni predvsem, ker reducirajo oz. vežejo proste radikale. (Kaur in Kapoor, 2001). Porušeno ravnotežje med prostimi radikali in antioksidanti imenujemo oksidativni stres. Antioksidanti ga preprečujejo z lovljenjem prostih radikalov, s keliranjem kovinskih ionov, z odstranjevanjem in/ali popraviom oksidativno poškodovanih biomolekul. Antioksidanti,

ki telo ščitijo pred učinki prostih radikalov, so encimi (superoksid-dismutaza, katalaza, glutathion-peroksidaza), vitamini (A, E, C), betakaroteni, bioflavonoidi, katehini, itn. ter mikrorudnine – selen, cink, mangan. Nekatere antioksidante sintetizira telo samo (glutathion, sečno kislino, ubikinon), druge pa dobimo s hrano (antioksidativni vitamini) (Korošec, 2000).

Antioksidante lahko glede na način delovanja razdelimo v dve skupini:

Primarni antioksidanti ali pravi antioksidanti, ki vežejo nastajajoče proste radikale preden ti sprožijo verižno reakcijo (Diplock, 1993). Ti antioksidanti predstavljajo glavno znotrajcelično obrambo (katalaza, glutathion-peroksidaza)

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



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

V literaturi je omenjena še tretja skupina antioksidantov, to so tako imenovani antioksidantni sinergisti, ki omogočajo delovanje antioksidantom iz prve skupine ali pa inhibirajo prooksidante. Te spojine nimajo antioksidativne aktivnosti, ampak so učinkoviti ob prisotnosti drugih snovi (Korošec, 2000).

Neencimski naravni antioksidanti so predvsem v sadju, zelenjavi, algah, raznih travah, zeliščih, začimbah ali pa so produkti mikroorganizmov. Vsebnost neencimskih antioksidantov v hrani živalskega izvora je največkrat precej manjša od omenjenih virov. Večina naravnih antioksidantov, ki jih zaužijemo, je rastlinskega izvora, najpogostejši pa so: flavonoidi (flavanoni, flavoni, izoflavoni, flavonoli, antociani, flavani), cimetova kislina in njeni derivati, kumarini, tokoferoli, organske kisline, tanini, karotenoidi, askorbinska kislina in drugi. K antioksidativni učinkovitosti sadja in zelenjave največ prispevajo askorbinska kislina, α -tokoferol, β -karoten in flavonoidi (Cao in sod., 1996; Wang in sod., 1996).

2.2.1 Askorbinska kislina (Vitamin C)

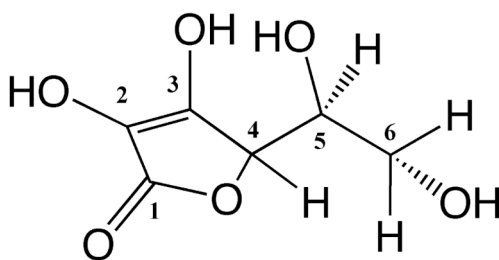
Askorbinska kislina (ASK), imenovana tudi vitamin C, je vodotopen vitamin, ki kot močan reducent ščiti druge, tudi v maščobah topne antioksidante (Požrl, 2001). Primer takšnega delovanja je regeneracija vitamina E in to tako, da reducira tokoferoksilne radikale (Malešič in Meško, 1999).

Askorbinska kislina je najpomembnejši antioksidant v ekstracelularni tekočini. Organizem varuje pred reaktivnimi prostimi radikali. Učinkovito odstranjuje hipoklorite, hidroksilne radikale, vodikov peroksid in hiperoksidne anione ter ščiti biološke membrane pred oksidativnimi poškodbami (Guyton, 1988).

Dnevne potrebe po vitaminih pri ljudeh se razlikujejo in so odvisne od stanja metabolizma posameznika, od starosti in spola. Tako je priporočena dnevna doza za odrasle okoli 100 mg na dan, nosečnice naj bi zaužile 110 mg, doječe matere 150 mg in kadilci vsaj 150 mg na dan. Mnogi strokovnjaki priporočajo naj bi se zaradi dokazano pozitivnih učinkov za zdravje priporočena dnevna doza povečala na 200 mg na dan (Ausman, 1999).

2.2.1.1 Nomenklatura

Vitamin C nastane iz glukoze, je optično aktiven in suče ravnino linearno polarizirane svetlobe. Zanimivo je, da D-enantiomer fiziološko ne more nadomestiti L-askorbinske kisline. Po svoji strukturi je vitamin C 1,4-lakton nenasičene karboksilne kisline. Močno izražene kisle lastnosti kažeta enolni hidroksilni skupini, vezani na drugem in tretjem ogljikovem atomu.



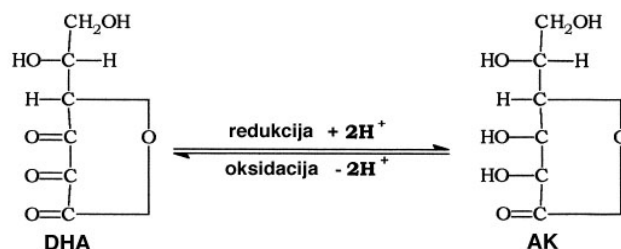
Slika 1: Struktura L-askorbinske kisline (Klofutar in sod., 1998)

Protona na enolni skupini na drugem in tretjem ogljikovem atomu elektrolitsko disociirata. Negativna desetiška logaritma njunih konstant disociacije sta $pK_{a1} = 4,25$ ($C_3\text{-OH}$) in $pK_{a2} = 11,79$ ($C_2\text{-OH}$) (Klofutar in sod., 1998).

2.2.1.2 Struktura L-askorbinske kisline

Vitamin C lahko dobimo s hrano v dveh oblikah, in sicer kot L-askorbinsko kislino (ASK), ki je močan reducent, in v oksidirani obliki kot L-dehidroaskorbinsko kislino (DHA). Čeprav se vitamin C nahaja v telesnih tekočinah večinoma v reducirani obliki, sta ASK kot

DHA biološko aktivna in se v organizmu v encimsko kataliziranih reakcijah oksidacije in redukcije eden v drugega pretvarjata (Basu in Dickerson, 1996).



Slika 2: Prehajanje med L-askorbinsko kislino in L-dehidroaskorbinsko kislino (Gökmen in sod., 2000)

2.2.1.3 Vitamin C v živilih

V živilski industriji se askorbinska kislina uporablja kot stabilizator v proizvodnji pijač, vin in mesnih izdelkov. Antioksidant je tudi D-izoaskorbinska kislina, bolj poznana kot eritorbinska kislina, ki je cenejša od askorbinske kisline in se včasih uporablja v proizvodnji. V nekaterih državah je dovoljeno nadomeščanje askorbata z eritorbatom, če so za to določeni razlogi (zahteva po antioksidativnih lastnostih in ne po vitaminski aktivnosti aditiva) (Ball, 1998).

Vitamin C najdemo skoraj izključno v živilih rastlinskega izvora. Razen ledvic nobeno živilo živalskega izvora ni pomemben vir vitamina. Vsebnost vitamina C je pogojena z različnimi faktorji, kot so vrsta, sorta, osvetlitev, del rastline, stopnja zrelosti, klima, metode obiranja, skladiščenja in procesiranja (Oruña-Concha in sod., 1998). Tako vsebuje npr. glava brokolija več vitamina C (158 mg / 100 g) kot njegovo steblo (110 mg / 100 g). Vendar se v steblih ohrani 80 % vitamina C med deset minutnim kuhanjem, medtem ko v glavah ostane manj kot 60 % (Basu in Dickerson, 1996). Pri jabolkih je največ ASK pod lupino (123 mg / 100 g na obsijani strani in 35 mg / 100 g na senčni strani). Z oddaljenostjo od lupine se koncentracija ASK močno zmanjšuje. Tako je koncentracija ASK v jabolku pri semenu le 2 mg / 100 g (Simčič in sod., 2001).

Preglednica 1: Vsebnost vitamina C v nekaterih vrstah sadja in zelenjave (Rubatzky in Yamaguchi, 1997)

DOMAČE IME	LATINSKO IME	Vitamin C (mg/100g)
Acerola	<i>Malpighra punififolica</i>	1700
Aktinidija	<i>Actinidia chinensis</i>	71
Ananas	<i>Ananas comosus</i>	50
Jabolko	<i>Malus silvestris</i>	12
Jagoda	<i>Fragaria vesca</i>	64
Limona	<i>Citrus medica</i>	53
Paprika - rdeča	<i>Capsicum annum</i>	240
Paprika - zelena	<i>Capsicum annum</i>	81
Belo zelje	<i>Brassica oleracea</i>	46
Krompir	<i>Solanum tuberosum</i>	11
Solata	<i>Lactuca sativa var. capitata</i>	9

2.2.1.4 Določanje askorbinske in dehidroaskorbinske kisline

Vsebnost ASK lahko določamo volumetrično, spektrofotometrično ali kromatografsko metodo. Volumetrična metoda temelji na redukciji barvila 2,6-diklorofenolindofenola s kislino raztopino ASK. V končni točki titracije je presežek nereduciranega barvila rožnate barve (Nisperos-Carriedo in sod., 1992). Za spektrofotometrično določevanje ASK je opisanih več različnih postopkov. Pri uporabi barvila 2,4-dinitrofenilhidrazina ob reakciji z ASK nastane oranžno obarvan osazon, katerega absorbanco merimo v spektru rdeče svetlobe. Na podoben način spektrofotometrično določamo ASK z redukcijo Fe(III) v Fe(II), ki reagira z 1,10-fenantrolinom, ki absorbira svetlobo pri 515 nm. Večina ostalih metod prav tako temelji na redukcijskih sposobnostih ASK (Farooqui in sod., 1990). Zgoraj opisane metode pa ne podajajo nobene kvantitativne informacije o dehidroaskorbinski kislini. Za določanje DHA in ASK se v zadnjem času uporablja predvsem HPLC metoda. ASK in DHA lahko določamo direktno ali indirektno. Pri direktnem določanju istočasno merimo absorbanco pri 254 nm, kjer najbolj absorbira ASK, in pri 210 nm, kjer absorbira DHA. (Nisperos-Carriedo in sod., 1992). Vendar se pri direktnem določanju DHA z metodo HPLC in UV-Vis detektorjem pojavlja predvsem problem občutljivosti metode. Občutljivost določanja DHA je boljša pri uporabi elektrokemičnih in fluorimetričnih detektorjev. Najpogosteje se DHA določa indirektno s predhodno redukcijo in merjenjem razlike med ASK v vzorcu pred in po redukciji. Za redukcijo DHA v ASK se uporablja različne reducente npr. homocistein, treitol, L-cistein, DTT in TCEP (Gökmen in sod., 2000).

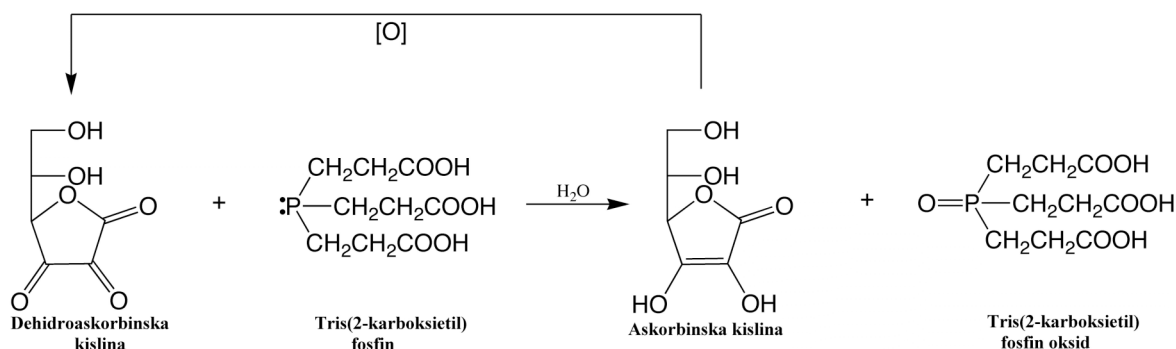
- ditiotreitol (DTT)

Shema redukcije DHA v ASK je podana na sliki 2. Količina dodatka reducenta DTT je predvsem odvisna od koncentracije DHA. Pri pričakovani vrednosti DHA 100 µg/ml dodamo v vzorec 0,1 mg DTT na 1 ml vzorca. Z večanjem koncentracije reducenta se skrajšuje čas reakcije. Redukcija običajno poteka 90-120 min pri sobni temperaturi (Gökmen in sod., 2000).

DTT učinkovito pretvarja DHA v ASK le pri nevtralnih ali rahlo kislih pH vrednostih. Optimalen pH za redukcijo z DTT je med 7,1 in 8,0, vendar ga lahko uporabimo tudi pri pH med 6,5 in 9,0. Ker pa sta DHA in ASK pri teh vrednostih pH nestabilna, DTT ni najboljši reducent (Lykkesfeldt, 2000).

- Tris(2-karboksietil)fosfin (TCEP)

Za redukcijo pri nizkih pH vrednostih je možna uporaba novejšega reducenta TCEP, ki dobro deluje v širokem spektru pH. Vzorci reducirani s TCEP so stabilni tudi po 96 urah, ob redukciji z DTT pa je bila opažena 3,5 odstotna izguba po 24 urah oz. 20 odstotno po 48 urah. Čas za redukcijo z reagentom TCEP s končno koncentracijo 0,25 mmol/l v vzorcu je približno 90 minut pri sobni temperaturi. Učinkovitost redukcije s TCEP je enaka pri pH 6,2 in 4,3. DTT je pri pH vrednosti 4,3 skoraj neučinkovit (Lykkesfeldt, 2000).



Slika 3: Redukcija DHA v ASK z reducentom TCEP (Lykkesfeldt, 2000)

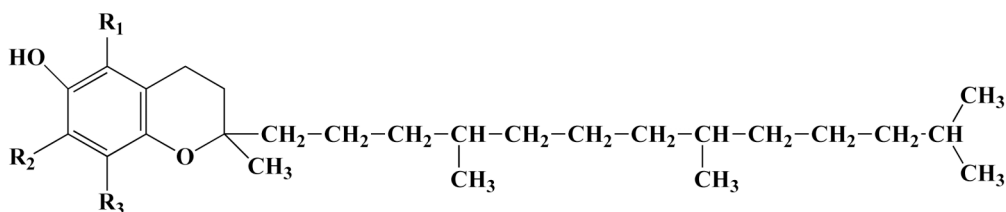
2.2.2 Vitamin E

Pod tem skupnim imenom razlikujemo osem različnih molekul – štiri tokotrienole in štiri tokoferole. Glede na število in mesto vezave metilne skupine ločimo α -, β -, γ - in δ -tokoferole (imajo nasičeno stransko verigo) in tokotrienole (imajo nenasičeno stransko verigo). V človeškem telesu je največ α -tokoferola (Shahidi in Naczki, 1995).

Ljudje in živali niso sposobni sinteze vitamina E. Ves vitamin E, ki ga potrebujejo, dobijo iz rastlin. Čeprav je v rastlinah več različnih homologov tokoferolov, sta v človeških in živalskih tkivih in krvi prisotna le α -tokoferol in γ -tokoferol. Biološka aktivnost tokoferolov in tokotrienolov je različna in je 100 % za α -tokoferol, 30 % za γ -tokoferol in 1,4 % za δ -tokoferol (Cooney in sod., 1993). Biološka aktivnost α -tokotrienola naj bi bila 30 %, vendar nekatere raziskave kažejo, da je α -tokotrienol boljši antioksidant kot α -tokoferol (Suzuki in sod., 1993).

2.2.2.1 Nomenklatura

Po veljavni nomenklaturi naravne tokoferole označujemo kot RRR-spojine, npr. RRR- α -tokoferol (prej D- α -tokoferol). Oznaka RRR pomeni, da ima molekula tri kiralne centre z R konfiguracijo. α -tokoferol, ki je fiziološko najbolj aktivna oblika vitamina E, je derivat 6-hidroksikromana metiliran na mestih 2, 5, 7 ter 8 in ima kiralne centre na mestih 2, 4' in 8'. Na C₂ atomu ima poleg metilne skupine vezano še razvejano nasičeno alifatsko skupino s 16 ogljikovimi atomi (slika 4).



Slika 4: Strukturna formula α -tokoferola (Vitamin E, 2004)

2.2.2.2 Vitamin E v živilih

Največ vitamina E je v rastlinskih oljih in semenih. Koruza in soja predstavljata glavni vir vitamina E za živali. Ljudje pa večino vitamina E zaužijejo z olji, namazi, prelive in margarino. Priporočen dnevni vnos vitamina E za človeka je 15 mg (Vitamin E, 2004).

Preglednica 2: Vsebnost posameznih tokoferolov (TF), tokotrienolov (T3) in števila ekvivalentov α -tokoferola v različnih oljih in semenih v mg/100 g (Vitamin E, 2004)

	α -TF	β -TF	γ -TF	δ -TF	α -T3	β -T3	γ -T3	α -TF ekvivalentov
sončnično olje	69	3	/	/	/	/	/	71
repično olje	26	/	36	1	/	/	/	30
sojino olje	11	3	74	36	/	/	/	21
koruzno olje	20	1	121	4	/	/	/	32
oljčno olje	8	2	2	/	/	/	/	9
Koruza	0,4	0,02	4,5	0,04	0,5	/	1,1	1
Pšenica	1,6	0,9	/	/	0,6	4,2	/	2,4

Evropska zakonodaja dopušča štiri tipe tokoferolov za aditive:

- E 306: Naravni ekstrakt obogaten s tokoferolom
- E 307: sintetični D,L- α -tokoferol
- E 308: sintetični D,L- γ -tokoferol
- E 309: sintetični D,L- δ -tokoferol

(Vitamin E, 2004).

2.3 METODE ZA MERJENJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

Za določanje in primerjavo antioksidativne aktivnosti (AA) v živilih lahko uporabljamo vrsto različnih metod. Na voljo so relativno enostavne spektroskopske metode, s katerimi določamo redukcijsko sposobnost antioksidantov v sistemih s kovinskimi ioni ali sintetičnimi radikali, metode s katerimi določamo vpliv antioksidantov na stabilnost realnih vzorcev, kot so proteini ali lipidi, ter metode kot je elektronska spinska resonanca, kjer lahko dejansko izmerimo vsebnost prostih radikalov v določenem sistemu (Roginsky in Lissi, 2005).

V 50. letih prejšnjega stoletja so se pogosto uporabljale metode, ki so temeljile na merjenju stabilnosti lipidov oz. emulzij do oksidacije v prisotnosti merjenih antioksidantov. Te

metode so največkrat zelo zamudne, poleg tega pa so odvisne od večih različnih dejavnikov kot so temperatura, tlak in sestava lipidnega matriksa (Prakash, 2001).

AA torej lahko določamo na dva načina, direktno ali indirektno. Pri indirektnih metodah merimo sposobnost antioksidantov za lovljenje tistih prostih radikalov, ki niso direktno povezani z oksidacijsko razgradnjo. Primer indirektnega določanja je uporaba obarvanih prostih radikalov, kjer določamo sposobnost antioksidanta da odda vodikov atom in ne direktno antioksidativno aktivnost, čeprav sta ti dve lastnosti včasih neposredno povezani. Direktno metode pa na splošno temeljijo na preučevanju vpliva dodanega antioksidanta na potek verižne oksidacije določenega substrata s prostimi radikali. Za substrate oksidacije lahko izberemo posamezne lipide, proteine, DNA, ali biološki material, ki vsebuje lipide (krvna plazma, LDL, biološke membrane, ...) (Roginsky in Lissi, 2005).

2.3.1 Direktno metode

2.3.1.1 Direktno metode, ki temeljijo na kinetiki lipidne avtooksidacije

Antioksidativno aktivnost določenih antioksidantov v lipidnih matriksih največkrat določamo tako, da študiramo vpliv dodanega antioksidanta na kinetiko oksidacije pristotnih lipidov. Pojav oksidacije lipidov je povezan s povečanjem koncentracije konjugiranih dienov in tvorbo hidroperoksidov. Konjugirane diene določamo z merjenjem absorbance v ultravijoličnem delu spektra, nastale hidroperoksidi pa določamo s peroksidnim številom. V kasnejši fazi začnejo lipidi razpadati. To privede do povečane koncentracije malondialdehida, ki ga zaznamo tako, da dodamo tiobarbiturno kislino in nastali produkt kromatografsko detektiramo. AA lahko spremljamo tudi z nastankom krajših organskih kislin, ki nastanejo v procesu oksidacije in razcepu C-C vezi, kar lahko merimo z Rancimatom (Antolovich in sod., 2002).

Pomankljivost večine metod je slaba ponovljivost, saj je kinetika avtooksidacije odvisna od prisotnosti katalitskih koncentracij kovin in začetne koncentracije peroksidov v lipidnem matriksu (Roginsky in Lissi, 2005).

2.3.1.2 Direktno kompeticijske metode

To so kinetične metode, ki temeljijo na oksidaciji naravnih substratov s peroksilnim radikalom. Antioksidativni učinek dodanih antioksidantov, ki tekmujejo z naravnim substratom pri reakciji s prostim radikalom, zaznamo kot upočasnen proces oksidacije substrata. Poznanih je več različnih metod:

- **zmanjšanje fluorescence R-fikoeritrina ob prisotnosti prostih radikalov**

R-fikoeritrin je protein, ki fluorescira v vidnem delu spektra in ga dodamo kot referenčni lovilec prostih radikalov. Intenziteta fluorescence R-fikoeritrina se zmanjšuje zaradi peroksilnih radikalov, ki jih v sistemu tvorimo s termolizo reagenta 2,2'-azobis-2-amidinopropana dihidroklorida. Ob prisotnosti testiranih antioksidantov, ki reagirajo s hidroksilnim radikalom, se razgradnja R-fikoeritrina ustrezno zmanjša. (Roginsky in Lissi, 2005).

- **kompetitivno razbarvanje krocina**

Krocina je barvilo iz žafrana, ki močno absorbira v vidnem spektru svetlobe. Krocina se razbarva ob oksidaciji s peroksilnim radikalom. Merilo za antioksidativno aktivnost dodanih antioksidantov pa je, v kolikšni meri ti upočasnijo proces razbarvanja barvila.

- **kompetitivno razbarvanje β -karotena**

Metoda temelji na reakciji β -karotena s produkti avtooksidacije linolne kisline v vodnih emulzijah. Razbarvanje merimo kot zmanjšanje absorbance v vidnem spektru (Miller, 1971). Ob dodatku merjenega antioksidanta se razbarvanje β -karotena zmanjša. Pomankljivost metode je slaba kvantifikacija, saj dobljeni rezultati podajo samo stopnjo zmanjšanja intenzivnosti razbarvanja β -karotena (Roginsky in Lissi, 2005).

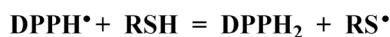
2.3.2 Indirektne metode

2.3.2.1 DPPH $\cdot$ (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

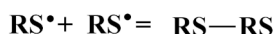
Metoda s prostim radikalom DPPH $\cdot$ je ena izmed najstarejših indirektnih metod za določanje antioksidativne aktivnosti. Metoda temelji na reakciji med stabilnim prostim radikalom DPPH $\cdot$ in donorji vodika (npr. fenoli) (Brand-Williams in sod., 1995). DPPH $\cdot$ ima velik molarni absorpcijski koeficient v vidnem delu spektra z maksimumom pri 517 nm, kar pomeni, da lahko koncentracijo radikala DPPH $\cdot$ določamo spektrofotometrično. Možno pa je tudi določanje z elektronsko spinsko resonanco. Za razliko od ABTS $^{++}$ DPPH $\cdot$ ne reagira z nekaterimi flavonoidi in aromatskimi kislinami, ki ne vsebujejo -OH skupin na obroču B oz. imajo samo eno -OH skupino (Roginsky in Lissi, 2005).

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

Če molekula DPPH $\cdot$ reagira samo z 1 molekulom antioksidanta, potem je stehimetrija reakcije 1:1. V naslednjih enačbah je prikazan primer reakcije cisteina (RSH) z DPPH $\cdot$.

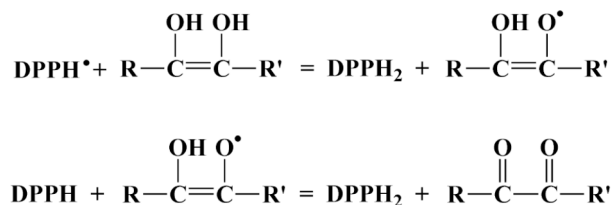


Prosti radikal RS $\cdot$ reagira s še eno sebi enako molekulom, ki nastane z vzporedno reakcijo.



Torej sta za redukcijo dveh radikalov DPPH $\cdot$ potrebni dve molekuli cisteina.

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



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

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

Eden izmed načinov je tako imenovana koncentracija učinkovitosti, pogosto pisana kot EC₅₀ ali IC₅₀. Koncentracija učinkovitosti je definirana kot koncentracija antioksidanta, ki je potrebna za redukcijo 50 % radikala DPPH[•] oz. za ustrezno zmanjšanje absorbance. Čeprav se ta način podajanja rezultatov pogostokrat pojavlja v literaturi ima več pomanjkljivosti. Morda je največja ta, da avtorji pogostokrat ne podajo koncentracije radikala DPPH[•] v testirani raztopini, kar onemogoča direktno določanje antioksidativne aktivnosti in primerjavo z deli drugih avtorjev. Manjša pomanjkljivost je tudi ta, da se z večanjem antioksidativne aktivnosti zmanjšuje vrednost EC₅₀, kar je predvsem nerodno pri grafičnem predstavljanju (Molyneux, 2004).

Drug način podajanja podatkov je, da se izračuna razmerje med številom molov DPPH[•], ki zreagira z ustreznim številom molov določenega antioksidana. Antioksidanti z večjim razmerjem DPPH[•]/antioksidant so bolj učinkoviti. Vzorci katerim določamo antioksidativno aktivnost so pogostokrat kompleksni, npr. rastlinski ekstrakti, kar pomeni, da ne poznamo dejanske sestave in molarne koncentracije. Takrat je smiselno podati antioksidativno učinkovitost vzorca kot razmerje med številom molov DPPH[•], ki reagirajo z antioksidanti v 1g suhe snovi (Molyneux, 2004).

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

$$\Delta A = \varepsilon \cdot \Delta c \cdot l; \quad n_{\text{DPPH}_2} = c \cdot V_{\text{reakcijske zmesi}}$$

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

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

2.3.2.2 ABTS^{•+} (2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat])

Metoda z reagentom ABTS^{•+} je danes med najbolj razširjenimi metodami za indirektno določanje AA. ABTS^{•+} je v raztopinah kjer ni antioksidantov stabilen. Ob dodatku donorjev vodika npr. fenolov, pa reakcija poteče in jo merimo pri valovni dolžini med 600 in 750 nm. Možna sta dva pristopa k tej metodi. Prva možnost je, da spremljamo zaviralni vpliv antioksidantov na tvorbo radikala ABTS^{•+} v prisotnosti različnih reagentov, ki tvorijo radikal ABTS^{•+} (Roginsky in Lissi, 2005). Druga možnost pa je, da preučujemo vpliv dodanih antioksidantov na redukcijo predhodno pripravljenega radikala ABTS^{•+} (Antolovich in sod, 2002). Prednost metode ABTS^{•+} je predvsem njena preprosta uporaba in možnost za rutinske uporabe v vsakem laboratoriju. Slabost metode je, da podaja sposobnost spojin za reakcijo z ABTS^{•+} in ne njeno AA (Roginsky in Lissi, 2005).

2.3.2.3 Redukcija Fremijevega radikala

Metoda temelji na reakciji stabilnega Fremijevega prostega radikala z donorji vodika. Koncentracijo Fremijevega radikala spremljamo z ESR (Roginsky in Lissi, 2005).

2.3.2.4 Metoda z redukcijo Fe³⁺

Metoda poimenovana tudi FRAP (antioksidativna moč redukcije železa) temelji na redukciji železa Fe³⁺ v Fe²⁺ v prisotnosti antioksidantov. Nastali Fe²⁺ ioni tvorijo z reagentom 2,4,6-tripiridil-S-triazin obarvan kompleks (Roginsky in Lissi, 2005).

2.3.3 Ostale metode

Nekatere metode niso direktno mišljene za določanje AA, vendar so včasih uporabne, še posebej v kombinacijah z nekaterimi zgoraj navedenimi metodami.

Ena izmed metod je HPLC, s katero sicer lahko določimo koncentracije fenolov in drugih antioksidantov, vendar zaradi neraziskanih medsebojnih interferenc med antioksidanti težko napovemo AA.

Druga metoda je določanje koncentracije fenolov s Folin-Ciocaltejevim reagentom (F-C), ki je najstarejša metoda za določanje skupne koncentracije fenolov, vendar je lahko primerna tudi za določanje AA. Problem metode je predvsem to, da ni standardizirana za določanje AA kljub temu, da ima dobro ponovljivost (Roginsky in Lissi, 2005).

2.4 EKSTRAKCIJA ANTIOKSIDANTOV

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

2.4.1 Ekstrakcija nepolarnih antioksidantov

Za ločevanje nepolarnih antioksidantov se uporablja več različnih vrst ekstrakcij. Problem predstavlja predvsem relativno majhna koncentracija nepolarnih antioksidantov glede na ostale v maščobah topne komponente, njihova nestabilna kemična struktura, občutljivost na UV svetlobo in toploto. Zaradi tega je običajno ekstrakcija nepolarnih antioksidantov sestavljena iz več faz. Za določanje antioksidantov v živilih, ki so običajno v trdni ali pol trdni obliki, se navadno najprej izvede ekstrakcija trdo-tekoče in nato postopek koncentriranja. V nekaterih primerih pa lahko izvedemo tudi ekstrakcijo z disperzijo trdne faze (Luque-Garcia in Luque de Castro, 2001).

2.4.1.1 Organska solventna ekstrakcija

Solventna ekstrakcija je separacijska metoda za ločevanje posameznih faz mešanic na osnovi različnih topnosti komponent mešanice. Metoda je primerna za izolacijo antioksidantov iz tekočih matriksov. Metoda je pogosto uporabljena za ekstrakcijo v maščobi topnih vitaminov iz telesnih tekočin in je primerna tudi za tekoča živila. Za solventno ekstrakcijo je na voljo večje število različnih čistih ali mešanih topil z različno polarnostjo. Za ekstrakcijo α -tokoferola se uporabljajo predvsem acetonitril, dietileter in mešanice metanola in toluena, tetrahidrofuran in dietileter, ksilen, dietileter, heksan ali etil acetat. Po ekstrakciji lahko proteine in ostale moteče snovi odstranimo z dodatkom acetonitrila in filtracijo. Ta faza je še posebno pomembna, ko analizo antioksidantov izvajamo s HPLC metodo. Za izolacijo v maščobi topnih vitaminov in antioksidantov iz trdnih ali pol trdnih živil predhodno opravimo izpiranje. Izpiranje največkrat opravimo kar z organsko ekstrakcijo. Vitamin E ponavadi iz trdnih ali poltrdnih vzorcev ekstrahiramo s Soxhletovo ekstrakcijo s pomočjo etanola ali heksana (Luque-Garcia in Luque de Castro, 2001). Drugi avtorji priporočajo homogenizacijo živila pri 4 °C z etil acetatom in zmanjšani svetlobi in nato ločevanje faz. Izbor etil acetata je predvsem primeren pri istočasnem določanju polarnih in nepolarnih antioksidantov, predvsem zaradi večje polarnosti glede na heksan in še nekatera druga topila (Arnao in sod., 2001). Nekateri avtorji pa priporočajo postopke, ki vključujejo umiljenje. Ti postopki so sestavljeni iz več zaporednih solventnih ekstrakcij, sušenja in postopka koncentriranja. Vendar pa ima ta postopek več slabosti. Največji problem predstavlja majhna stabilnost α -tokoferola v alkalnem. Zato je potrebno postopke izvajati ob dodatkih drugih antioksidantov, ki stabilizirajo α -tokoferol, zmanjšani svetlobi in vpihovanju dušika. Isti avtorji tudi ugotavljajo, da med hladno saponifikacijo in direktno ekstrakcijo α -tokoferola iz žitaric z mešanico topil heksan:etil acetat (8:2) ni signifikantne razlike (Ryynänen in sod., 2004).

2.4.1.2 Superkritična tekočinska ekstrakcija

V zadnjih dveh desetletjih se je superkritična tekočinska ekstrakcija, še posebno z uporabo CO₂, izkazala za izredno učinkovito metodo ekstrakcije nepolarnih spojin iz trdnih vzorcev. Superkritično ekstrakcijo so prilagodili za ekstrakcijo iz živil. Poskusi ekstrakcije so bili opravljeni na jetrih in mleku v prahu, pri čemer je bila ponovljivost metode določanja vitamina E 96 % (Luque-Garcia in Luge de Castro, 2001).

2.4.1.3 Ekstrakcija s trdno fazo (Solid-phase extraction)

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

2.4.2 Ekstrakcija polarnih antioksidantov

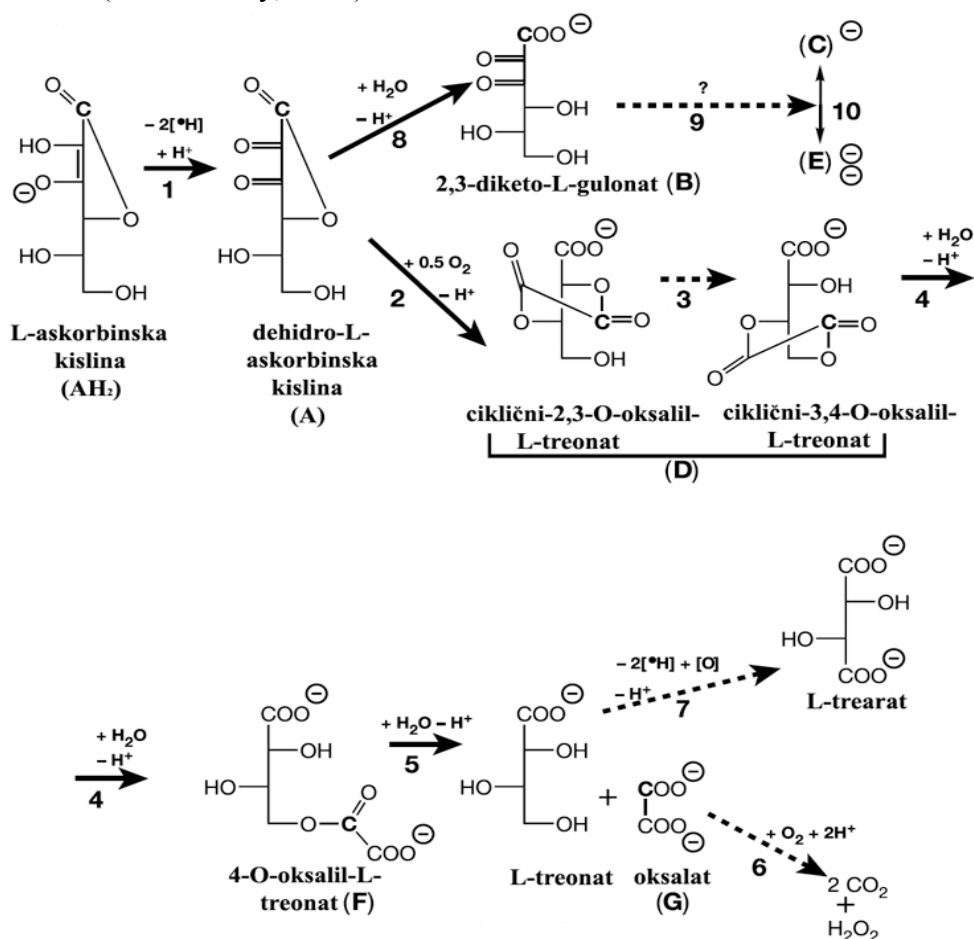
Pred ekstrakcijo moramo kompleksne vzorce antioksidantov, v katerih določamo tudi askorbinsko kislino, dobro nakisati. Največkrat se doda metafosforno kislino. Količina dodane kisline mora biti taka, da je končna koncentracija okoli 2 %. Ugotovili so, da 75 % askorbinske kisline raztopljene v destilirani vodi razpade že po pol ure, medtem ko so vzorci raztopljeni v 2 % metafosforni kislini stabilni še po 2 urah tudi, če so bili dodani Cu²⁺ ioni, ki katalizirajo oksidacijo askorbinske kisline (Musulin in King, 1936). Pri določanju askorbinske kisline v zelenjavi avtorji priporočajo ekstrakcijo z 10 % trikloroacetno kislino, 5 % oksalno kislino, 3 % metafosforno kislino ali 8 % očetno kislino. V vseh teh ekstraktih so antioksidanti stabilni vsaj 1 uro po ekstrakciji. Čeprav so razlike majhne, so avtorji določili največ askorbinske kisline z uporabo 10 % trikloroacetne kisline (Aydoğmuş in sod., 2001). Za ekstrakcijo polifenolov iz živil se uporablja mešanica etanola in vode. Za učinkovito ekstrakcijo je predvsem pomembno razmerje med tekočo in trdno fazo, koncentracija etanola, temperatura in čas ekstrakcije. Pri ekstrakciji polifenolov iz grozdnih pešk so najboljše rezultate dobili z ekstrakcijo v 50 % etanolu in razmerjem med tekokočo in trdno fazo 7,5:1 (Shi in sod., 2003).

2.5 STABILNOST ANTIOKSIDANTOV

Vitamins in antioksidanti, ki so najbolj labilni (zmanjšanje > 10 % po dveh urah) pri toplem ali hladnem shranjevanju kuhanih obrokov, so vitamin C, folat, vitamin B-6 in tokoferol (Williams, 1996). Na stabilnost antioksidantov v živilu vplivajo predvsem svetloba, kisik, temperatura in notranji vplivi živil kot so vsebnost vode, aktivnost vode, lipidna oksidacija, alkalnost medija in vsebnost določenih kovinskih ionov (Miquel in sod., 2004). Znano je tudi, da lahko sama obdelava živila in shranjevanje močno zmanjša količino naravnih antioksidantov. Postopki kot so rezanje in lupljenje močno inducirajo encimsko razgradnjo naravnih antioksidantov. Povišana temperatura oz. toplotna obdelava pa je poglavitni vzrok za razpad antioksidantov v hrani (Kaur in Kapoor, 2001).

2.5.1 Stabilnost askorbinske kisline

Pot razgradnje L-askorbinske kisline ni popolnoma znana. Potekala naj bi preko dehidroaskorbinske kisline do oksalata in L-treonata. Vmesna stopnja vključuje 4-O-oksalil-L-treonat. Pot razgradnje sta avtorja prikazala z encimsko razgradnjo, vendar predvidevata, da lahko razgradnja poteče po enaki, a neencimski poti npr. med toplotno obdelavo živil. (Green in Fry, 2005).



Slika 5: Možna pot razgradnje askorbinske kisline (Green in Fry, 2005)

2.5.1.1 Vplivi temperature na razgradnjo askorbinske kisline

Temperatura je eden izmed najpomembnejših faktorjev, ki vplivajo na stabilnost ASK. Pri merjenju ASK v aseptično pakiranem sadnem soku so avtorju ugotovili, da je po 64 dneh hranjenja pri 4 °C ostalo 60,4 % ASK, pri 20 °C 48,6 % ASK, pri 37 °C 11,9 % ASK. Pri temperaturah nad 76 °C je bil razpad še hitrejši, saj je že po nekaj dneh razpadla praktično vsa askorbinska kislina. Hitrost razpada ASK ni bila linearna, saj je bil največji padec koncentracije pri vseh merjenih temperaturah največji v prvih dneh shranjevanja. Avtorji predvidevajo, da je to verjetno posledica raztopljenega kisika, kar so tudi potrdili z merjenjem koncentracije (Kennedy in sod., 1992). Razgradnja ASK se sicer nadaljuje tudi, ko so koncentracije raztopljenega kisika nizke, vendar z mnogo manjšo stopnjo, ker ima anaerobna razgradnja ASK počasnejšo kinetiko. Deaeracija pred shranjevanjem vzorcev verjetno poveča obstojnost ASK, ker je raztopljeni kisik limitirajoč faktor pri procesih razgradnje. (Kennedy in sod., 1992). Znano je tudi, da reakcijski mehanizem razgradnje ASK pri temperaturah nad 95 °C preide iz oksidativnega v neoksidativni. Vse raziskave kažejo, da kinetiko aerobne in anaerobne razgradnje lahko opišemo kot reakcijo prvega reda. To velja, kadar je kisik prisoten ali pa popolnoma odsoten. V primeru, ko pa je kisik prisoten v majhnih količinah, kinetika razgradnje sledi reakcijam drugega reda (Van den Broeck, 1998).

2.5.1.2 Vpliv kovinskih ionov in pH na oksidacijo askorbinske kisline

Ioni bakra in železa v sledovih delujejo kot katalizatorji pri oksidaciji askorbinske kisline. Najnovejše raziskave kažejo, da je katalitska učinkovitost Cu(II) kompleksov močno odvisna od narave ligandov in od koordinacijske geometrije kovinskega iona. Ob konstantni koncentraciji dodanih Cu(II) ionov se hitrost oksidacije askorbinske kisline povečuje z višanjem pH acetatnega pufru do pH 6,0. V citratnem pufru se oksidacija do pH 4,5 pospešuje, vendar se pri višanju pH do 6,0 upočasni. Pri uporabi ftalatnega pufru se hitrost reakcije ves čas upočasnjuje z višanjem pH do 4,5 in se nato povečuje pri nadaljnjem višanju pH do 6,0. Pri uporabi tartratnega pufru se hitrost oksidacije ves čas povečuje do pH okoli 5,5. Hitrost oksidacije se povečuje v katerem koli pH območju z večanjem koncentracije Cu(II) (Imer in sod., 2003).

2.5.2 Stabilnost vitamina E

2.5.2.1 Vpliv temperature

Vsi izomeri tokoferola razpadajo pri povišani temperaturi, vendar je hitrost razpada odvisna od izomera. Pri raziskavi stabilnosti tokoferolov v riževi moki se je po 24 urah pri 95 °C razgradilo 27,3 % α -tokoferola, 46,4 % α -tokotriola, 47,4 % γ -tokoferola in 32 % γ -tokotrienola (Park in sod., 2004).

Miquel in sodelavci so primerjali razlike v stabilnosti naravno prisotnega α -tokoferola v mleku ob dodatku sintetičnega α -tokoferola ali α -tokoferol acetata v mleko v prahu pri različnih temperaturah shranjevanja. Hkrati so tudi preverjali kako na stabilnost vpliva dodatek železovega laktata oz. sulfata. Po 17 mesecih shranjevanja mleka v prahu na 22 °C in dodatku α -tokoferola ter železovega laktata se je razgradilo 53,8 % ekvivalentov

α -tokoferola, pri 37 °C pa se ga je razgradilo 60,8 %. Pri enakih pogojih shranjevanja in dodatku železovega sulfata se je razgradilo 62,2 % oz. 83,7 % ekvivalentov α -tokoferola. Pri dodatku α -tokoferol acetata v mleko v prahu ter dodatku železovega laktata pa se je razgradilo 23,7 % oz. 7,9 % ekvivalentov α -tokoferola, ob dodatku železovega sulfata pa se ga je razgradilo 33,3 % oz. 46,7 %. Razgradnja izražena kot zmanjšanje ekvivalentov α -tokoferola je bila posledica razgradnje naravno prisotnih tokoferolov in tokotrienolov, saj je bil dodani α -tokoferol acetat med shranjevanjem popolnoma stabilen. Tako lahko dodatek acetata zagotovi potrebno količino vitamina E v izdelku tudi po daljšem shranjevanju, ker delno stabilizira α -tokoferol in ostale biološko aktivne tokoferole, sam pa bistveno ne dviguje antioksidativne aktivnosti živila (Miquel in sod., 2004).

2.5.2.2 Vpliv kisika

Pri merjenju stabilnosti vseh izomer tokoferola v riževi moki ni bilo po štirih urah na temperaturi 95 °C in v odsotnosti kisika opaziti nobenega razpada. Pri 21 % kisika in enaki temperaturi je po štirih urah razpadlo več kot 20 % tokoferolov oziroma tokotriolov. Razgradilo se je 45 % γ -tokoferola, 43 % γ -tokotriola, 24 % α -tokoferola in 19 % α -tokotriola. Več kot 20 % gama izomer je razpadlo že pri 2 % kisika (Park in sod., 2004).

2.5.2.3 Vpliv svetlobe

Znano je, da svetloba močno vpliva na razpad tokoferolov. Pri merjenju stabilnosti α -tokoferola v oljčnem olju je bilo po 2 mesecih hranjenja pod razpršeno svetlobo ugotovljeno 30 % zmanjšanje tokoferola, po 4 mesecih pa 79 % zmanjšanje. Vzrok za takšno dramatično zmanjšanje je, da je α -tokoferol lovilec singletnega kisika med fotooksidacijo. Po 4 mesecih se je hitrost razpada tokoferola upočasnila, kar je verjetno posledica njegove majhne koncentracije. Pri hranjenju pod razpršeno svetlobo se je razgradilo tudi 72 % skupnih fenolov. Pri hranjenju v popolni temi je bil razpad α -tokoferola mnogo manjši. Po 12 mesecih hranjenja se ga je razgradilo 62 %. V istem času hranjenja se je razgradilo tudi 50 % fenolov (Okogeri in Tasioula-Margari, 2002).

2.5.2.4 Vpliv pH

Analiza stabilnosti α -tokoferola je pokazala, da je le-ta najvišja pri pH 3 in najnižja pri pH 7. Po 8 dneh shranjevanja α -tokoferola pri 60 °C se ga je pri pH 7 razgradilo 90 %, pri pH 3 pa le 20 %. Poleg tega je ista raziskava pokazala, da je sposobnost doniranja vodika α -tokoferola v sistemu olje-voda pri nižjem pH večja in s tem tudi večja antioksidativna aktivnost. Nizek pH ima še druge pozitivne učinke na stabilnost tokoferola. Ob dodatku citrata kot kompleksanta ta veliko bolje veže prehodne kovine, npr. Cu(II), pri nižjem pH. Pri pH 7 se bakrovi ioni vežejo s proteini in so tako nedostopni za citrat (Osborn-Barnes in Akoh, 2003).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Zelje

Za določanje askorbinske kisline smo uporabljali sveže belo zelje v glavi. Zelje smo kupili dan pred analizo v Mercatorju. Dobavitelj zelja je bil M-sadje zelenjava.

Gotova omaka iz zelenjave in mesa – »Sugo«

Antioksidativno aktivnost polarnih in nepolarnih antioksidantov smo določali v mesni omaki s paradižnikom za testenine Sugo blagovne znamke Spar. Omaka je bila primerna predvsem zato, ker je bila že delno homogenizirana in je imela podobno razmerje maščob, beljakovin in ogljikovih hidratov kot naj bi jih imel standarden obrok. Omaka vsebuje 4,1 % maščob, 3,3 % beljakovin in 8,9 % ogljikovih hidratov. Poleg dodane vode omaka vsebuje mleto svinjsko in goveje meso, čebulo, korenje, sladkor, zeleno, rastlinsko olje, modificiran škrob, sol, govejo juho v prahu, kalcijev laktat, dinatrijev inozinat, aromo zelišč, pšenično moko, natrijev glutaminat in česen v prahu. Energetska vrednost omake je 362 kJ/100g. Omaka je bila kupljena v trgovini Spar in je bila do uporabe hranjena v originalni embalaži v temnem prostoru na sobni temperaturi. Po odprtju smo omako hranili v hladilniku.

Obrok

Obrok je vseboval goveje stegno, kompot z mešanim sadjem v konzervi proizvajalca ETA, sok Fruc-multivitamin proizvajalca Fructal, paradižnikovo omako znamke Natureta, domači polbeli kruh v štruci proizvajalca pekarna Vrhnika, kisló smetano v lončku Ljubljanskih mlekarn, sončnično olje blagovne znamke Spar, jabolčni kis blagovne znamke Spar in beli krompir. Vse surovine so bile kupljene dan pred pripravo obroka in hranjene pri 0 °C v tehnološkem laboratoriju na Oddelku za živilstvo.

Reagenti

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

3.2 METODE DELA

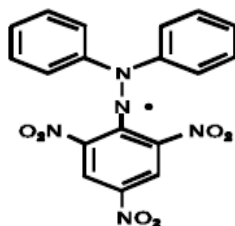
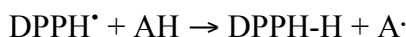
3.2.1 Antioksidativna aktivnost

Antioksidativno aktivnost smo določali s Folin–Ciocalteaujevim reagentom (F-C) in z 2,2-difenil-1-pikril-hidrazilom (DPPH[•]).

3.2.1.1 Meritev antioksidativne aktivnosti z reagentom DPPH[•]

Princip

Prosti radikal DPPH[•] (slika 6) je topen v raztopinah organskih topil kot sta metanol ali etanol. Raztopina radikala, ki ima absorpcijski maksimum pri 517 nm, je vijolično obarvana. Radikal se reducira po naslednji reakciji, v kateri je AH nek reducent ali antioksidant:



Slika 6: 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil

Reducirana oblika radikala (DPPH-H) ne absorbira pri 517 nm, kar pomeni, da ima dodatek antioksidantov za posledico zmanjšanje absorbance pri 517 nm (Brand-Williams in sod., 1995). Radikal DPPH[•] je uporaben za določanje antioksidativne aktivnosti različnih antioksidantov tako v polarnih kot nepolarnih topilih.

Reagenti:

- DPPH[•] (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil), Sigma, ZDA
- 50 mmol/L acetatni pufer (NaOAc), pH 5,5
- 2 % MFK (metafosforna kislina), Aldrich, ZDA
- etanol 96 %, Merck, Nemčija
- metanol, Merck, Nemčija

Izvedba

Umeritvene krivulje z reagentom DPPH[•]: Na analitski tehtnici smo zatehtali 4,0 mg DPPH[•] in ga ob mešanju z magnetnim mešalom raztopili v 20 ml etanola oz. metanola. Etanol smo uporabili, kadar smo določali antioksidativno aktivnost v nepolarni fazi,

metanol pa za določanje antioksidativne aktivnosti v polarni fazi. Pripravili smo standardne raztopine askorbinske kisline raztopljene v destilirani vodi s koncentracijo $2,5 \times 10^{-4}$ mol/l, klorogensko kislino raztopljeno v 10 % metanol (v/v) s koncentracijo $2,5 \times 10^{-4}$ mol/l, α -tokoferol raztopljen v etil acetatu s koncentracijo $2,5 \times 10^{-4}$ mol/l in Trolox raztopljen v vodi s koncentracijo 1×10^{-4} . V 1,5 ml mikrocentrifugirke smo odpipetirali od 0-250 μ l standardne raztopine oksidanta in do 250 μ l dopolnili s topilom, v katerem je bil antioksidant raztopljen, dodali 250 μ l raztopine DPPH $\cdot$ in dopolnili do končnega volumna 1250 μ l z etanolom za nepolarne vzorce oz. metanolom za polarne vzorce. Pripravljene vzorce smo dobro premešali in po 30 minutah merili absorbanco na spektrofotometru pri 517 nm. Maksimalno absorbanco smo izmerili vzorcu, kateremu nismo dodali standarda. Od maksimalne absorbance smo odštevali ostale meritve in po enačbi Beer-Lambertovega zakona izračunali množino porabljenega reagenta DPPH $\cdot$ v odvisnosti od množine dodanega standarda. Ker v literaturi ni nedvoumnega podatka o molarnem absorpcijskem koeficientu DPPH $\cdot$, smo izbrali povprečno vrednost literaturnih podatkov in predpostavili, da je $\epsilon_{517 \text{ nm}}$ enak $12000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Molyneux, 2004).

$$n = \frac{\Delta A \cdot V}{\epsilon \cdot l}$$

Vzorci: Polarno in nepolarno fazo smo analizirali posebej. Za polarno fazo smo v 1,5 ml mikrocentrifugirkah zmešali 250 μ l DPPH $\cdot$ raztopljenega v metanolu s koncentracijo 0,2 mg/ml, 750 μ l metanola in 250 μ l polarne faze. Mešanico smo dobro premešali na vrtinčniku. Po 20 minutah smo vzorce centrifugirali 5 minut pri 14000 min^{-1} na minuto in po 30 minutah merili absorbanco pri 517 nm. Nepolarno fazo smo pripravili enako, le da smo uporabljali DPPH $\cdot$ raztopljen v etanolu in dodali 750 μ l etanola. Vsak vzorec smo določili v treh paralelkah. Pri vsaki seriji meritev smo opravili še tri meritve brez antioksidanta, v katere smo namesto vzorca dodali topilo. Pri polarni fazi smo dodali 2 % metafosforno kislino (MFK) oz. vodo, odvisno od tega kaj smo dodali pred homogenizacijo, pri nepolarni fazi smo vedno dodajali etil acetat.

3.2.1.2 Meritev antioksidativne aktivnosti s Folin – Ciocalteaujevim reagentom (F-C)

Princip

V alkalni raztopini se antioksidanti oksidirajo s F-C reagentom. Določene komponente F-C reagenta v reducirani obliki absorbirajo pri valovni dolžini okoli 750 nm. Njihova koncentracija je premosorazmerna s koncentracijo oksidiranih spojin v vzorcu. Ker se absorbanca linearno spreminja s koncentracijo, lahko s standardnimi raztopinami pripravimo umeritveno krivuljo, iz katere odčitamo skupno koncentracijo antioksidantov v vzorcu izraženo kot koncentracijo antioksidanta, s katerim smo pripravili umeritveno krivuljo (Roginsky in Lissi, 2005).

Reagenti:

- Folin - Ciocalteaujev reagent razredčen z destilirano vodo v razmerju 1:2, Fluka, Švica
- 20 % raztopina Na_2CO_3
- destilirana voda

Izvedba

Umeritvene krivulje z reagentom F-C: Pripravili smo standardne vodne raztopine askorbinske kisline in klorogenske kisline s koncentracijo 1×10^{-4} mol/l, dehidroaskorbinske kisline s koncentracijo $1,52 \times 10^{-4}$ in glutationa s koncentracijo $3,33 \times 10^{-4}$ mol/l. V 1,5 ml centrifigirke smo odpipetirali 25-250 μl standardne raztopine, dopolnili do končnega volumna 725 μl z destilirano vodo, premešali in dodali 125 μl F-C reagenta predhodno razredčenega z destilirano vodo v razmerju 1:2 ter po 5 minutah še 125 μl 20 % Na_2CO_3 . Po 60 minutah smo na spektrofotometru izmerili absorbance standardnih raztopin pri 746 nm. Slep vzorec smo pripravili tako, da smo namesto vzorca dodali le destilirano vodo. Iz izmerjenih absorbanc in znanih koncentracij standardnih raztopin smo narisali umeritvene krivulje.

3.2.2 Spektrofotometrično določanje stabilnosti askorbinske kisline

Princip

Čista askorbinska kislina ima absorpcijski maksimum pri valovnih dolžinah okoli 250 nm. Dehidroaskorbinska kislina, ki nastane pri oksidaciji askorbinske kisline v vodnih raztopinah, pa pri tej valovni dolžini praktično ne absorbira. Zaradi tega lahko razpad askorbinske kisline v odsotnosti nečistoč, ki pri tej valovni dolžini absorbirajo, spremljamo spektrofotometrično.

Reagenti:

- 99 % askorbinska kislina, Sigma, ZDA
- ocetna kislina
- 37 % HCl
- glicin
- fosforna kislina
- metafosforna kislina, Aldrich, ZDA

Izvedba

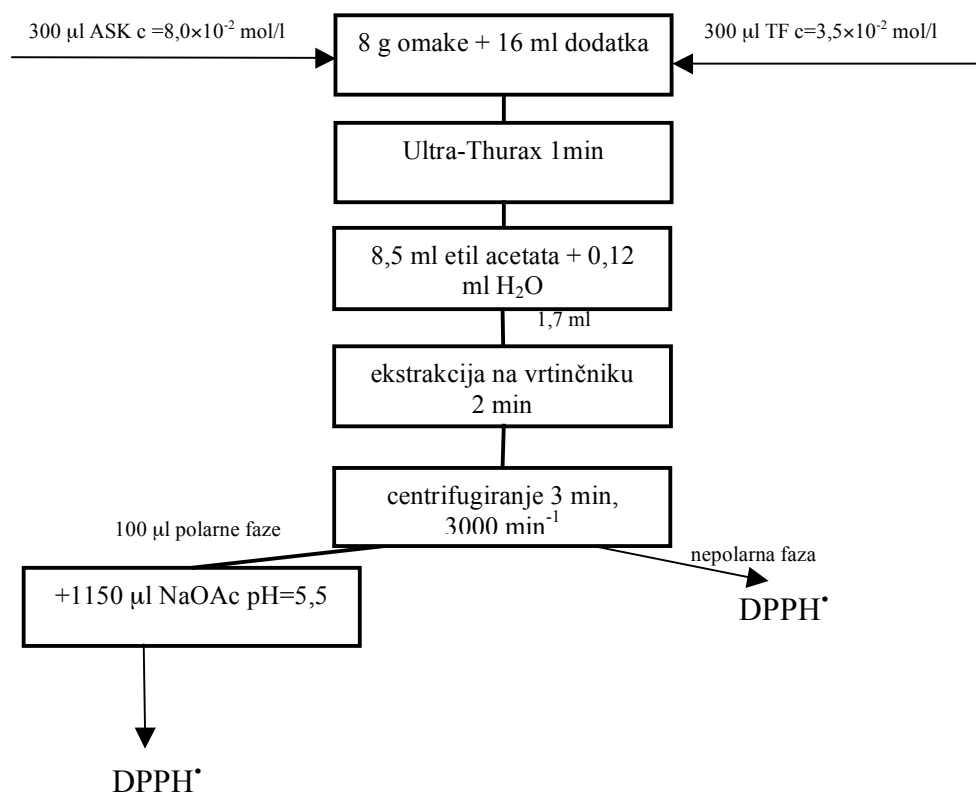
Za analizo smo pripravili 2 % MFK s pH 2, dve raztopini HCl s koncentracijama 1 mol/l in 0,1 mol/l. Poleg tega smo pripravili še puferne raztopine s pH od 3 do 9. Vsi so imeli enako koncentracijo 0,2 mol/l. Z glicinom smo pripravili puferne raztopine pH 3 in pH 9. Za pH 4 in pH 5 smo uporabili acetatni pufer, za pH 6, 7 in 8 pa fosfatni pufer.

Tik pred analizo smo pripravili še raztopino askorbinske kisline v destilirani vodi s koncentracijo $2,5 \times 10^{-3}$ mol/l. V posamezne kivete smo zmešali 50 μl ASK in 900 μl vsakega prej pripravljenega pufera tako, da je bila koncentracija ASK v kiveti $1,3 \times 10^{-4}$ mol/l. Nato smo merili absorbance pri 254 nm po 1, 15, 60, 120, 240 in po 1200

minutah. Začetne absorbance merjene po 1 minuti smo normirali na 100 %. Tako nam je odstotek zmanjšanja absorbance dejansko pomenil delež oksidirane ASK.

3.2.3 Metode homogenizacije in ekstrakcije vzorcev omake za analize antioksidativne aktivnosti

Po 8 g omake smo zatehtali v plastične centrifugirke in dododali 16 ml destilirane vode ali 16 ml citrata s koncentracijo 0,01 mol/l ali 16 ml 2 % MFK. Pri poskusih s standardnim dodatkom znane količine ASK in α -tokoferola smo dodali še 300 μ l askorbinske kisline s koncentracijo $8,0 \times 10^{-2}$ mol/l raztopljene v 2 % MFK in 300 μ l α -tokoferola s koncentracijo $3,5 \times 10^{-2}$ mol/l raztopljenega v etil acetatu ali v etanolu. Po vseh dodatkih smo mešanico homogenizirali 1 minuto z Ultra-Thuraxom. Po homogenizaciji smo odpipetirali 1,7 ml homogenizata v predhodno pripravljeno centrifugirko, v kateri je bilo 8,5 ml etil acetata. Za povečanje volumna polarne faze smo dodali še 0,12 ml destilirane vode. Ekstrahirali smo 2 minuti ob stalnem mešanju z vrtinčnikom in centrifugirali 3 minute pri 3000 min^{-1} . Po centrifugiranju smo odstranili nepolarno fazo, v kateri smo določali antioksidativno aktivnost z reagentom DPPH $^{\bullet}$. Polarno fazo pa smo, če smo dodali standardni dodatek, redčili s 100 mmol/l acetatnim pufrom pH 5,5 v razmerju 1:11,5. Po potrebi smo polarno fazo, če ni bila popolnoma bistra, centrifugirali v mikrocentrifugi 5 minut pri 14000 min^{-1} . Nato smo spektrofotometrično izmerili antioksidativno aktivnost s uporabo radikala DPPH $^{\bullet}$.



Slika 7: Shema priprave vzorcev omake za analize polarne in nepolarne antioksidativne aktivnosti ob dodatku standardnih dodatkov ASK in α -TF

3.2.4 Metode priprave, homogenizacije in ekstrakcije vzorcev obroka za analize antioksidativne aktivnosti in kvantitivno analizo askorbinske kisline z metodo HPLC

Obrok je sestavljalo:

- 150 g v juhi kuhane govedine
- 250 g čiste goveje juhe
- 300 g kuhanega krompirja v oblicah
- 50 g kisle smetane
- 100 g paradižnikove omake
- 150 g zeljne solate
- 230 g sadnega kompota (150 g sadja in 80 g soka)
- 120 g kruha
- 250 ml sadnega soka
- 40 ml rastlinskega olja
- 10 ml kisa

Juho smo pripravili v laboratoriju Katedre za tehnologijo mesa tako, da smo v 1300 g vode 70 minut kuhali 630 g na zrezke narezanega govejega stegna. Masa mesa po kuhanju je bila 320 g. Krompir v oblicah smo kuhali tako, da je vrel 30 minut. Po kuhanju smo ga olupili in narezali. Vse sestavine obroka smo natančno stehtali, dali v čaše in jih shranili v hladilnici pri temperaturi 0 °C za 2 uri. Prav tako smo v hladilnici ohladili posodo, nož in pokrov kutra. Hladne sestavine smo dali v kuter ter dodali različne dodatke. V preglednici 3 so navedeni različni dodatki pri posameznem poskusu. Dodali smo različne kisline za stabilizacijo vzorcev in/ali dodatke standardov ASK in α -tokoferola.

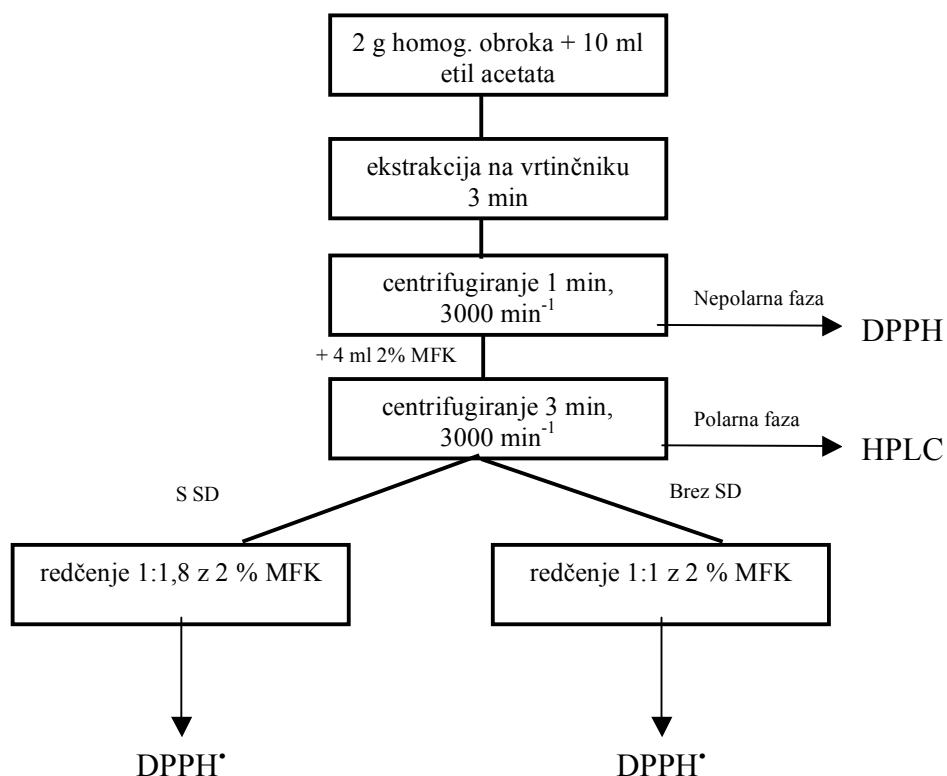
Preglednica 3: Prikaz različnih dodatkov v obrok pred homogenizacijo in po homogenizaciji

OBROK	DODATEK PRED HOMOGENIZACIJO	DODATEK PO HOMOGENIZACIJI
1 obrok ₁	/	/
1 obrok ₂	115 g 20 % MFK	/
2 obrok ₁	115 g 20 % MFK	/
2 obrok ₂	115 g 20 % MFK + 116 mg ASK + 133 mg α -TF	/
3 obrok ₁	115 ml H ₂ O	200 μ l H ₂ O
3 obrok ₂	115 g 20 % MFK	200 μ l H ₂ O
		200 μ l 20 % MFK
		200 μ l 1,9 mol/l H ₃ PO ₄
		200 μ l H ₂ O
3 obrok ₃	115 g 20 % MFK + 38 g 85 % H ₃ PO ₄	200 μ l H ₂ O

Homogenizirali smo v malem kutru v laboratoriju Katedre za meso in mesne izdelke. Prvo minuto smo homogenizirali pri 300 min⁻¹ in nato povečali obrate na 3000 min⁻¹. Po treh minutah smo homogenizacijo zaključili. Izmerili smo temperaturo in okvirno določili pH s testnimi lističi. Kasneje pa smo pomerili pH še s pH metrom. Pri prvem in drugem obroku

smo takoj in nato po eni uri prenesli približno po 2 g homogenizata v zatehtane plastične centrifugirke in jih takoj zamrznili s tekočim dušikom. Prvi obrok smo do analize shranjevali v zmrzovalniku pri -20°C , drugi pa v zmrzovalniku pri -70°C . Pri tretjem obroku smo prav tako prenesli po 2 g homogenizata v plastične centrifugirke in dodali $200\ \mu\text{l}$ 20 % MFK, fosforno kislino ali vodo (preglednica 3). Pri prvem obroku smo z analizami vsebnosti antioksidantov pričeli naslednji dan po pripravi vzorcev. Pri ostalih vzorcih smo prve analize opravili še isti dan kot je bil pripravljen obrok.

Za ekstrakcijo nepolarnih antioksidantov smo vzorcu iz zmrzovalnika dodali etil acetat v petkratniku mase vzorca. Izvedli smo tri minutno ekstrakcijo s pomočjo vrtinčnika. Nato smo suspenzijo centrifugirali 1 minuto pri $3000\ \text{min}^{-1}$, da sta se fazi ločili. Odstranili smo nepolarno fazo v kateri smo določili antioksidativno aktivnost. Hidratizirani oborini, ki je ostala v centrifugirki, smo dodali 2 % MFK v dvakratniku mase vzorca. Nato smo vzorec pomešali na vrtinčniku in centrifugirali 3 minute pri $3000\ \text{min}^{-1}$, da smo dobili relativno bistro polarno fazo. Del polarne faze smo porabili za določanje askorbinske kisline z metodo HPLC, del pa smo redčili v razmerju 1:1 z 2 % MFK pri obrokih brez standardnih dodatkov oz. 1:1,8 pri obroku s standardnim dodatkom in tako razredčene raztopine uporabili za določanje antioksidativne aktivnosti z DPPH'.



Slika 8: Priprava vzorcev obroka za določanje antioksidativne aktivnosti z DPPH' in določanje vsebnosti askorbinske kisline z metodo HPLC

3.2.5 Določanje askorbinske kisline z metodo HPLC

Princip: S tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) ločujemo vzorec na posamezne komponente, ki potujejo po koloni in prehajajo med mobilno in stacionarno fazo, pri čemer se premikajo le v mobilni fazi z določeno hitrostjo u_x .

$$u_x = 1/t_r$$

t_r je retenzijski čas, ki ga potrebuje komponenta, da pride skozi kolono oz. da zapusti kolono. Ta čas je karakterističen za določeno komponento in ga lahko uporabimo pri konstantnem pretoku za identifikacijo in kvantifikacijo. Spojino na izhodu iz kolone lahko detektiramo na različne načine. Pogostokrat uporabljamo spektrofotometričen detektor, kjer merimo absorbanco eluirane raztopine pri tisti valovni dolžini, kjer analizirana spojina absorbira svetlobo.

Priprava vzorcev zelja: Za določanje stabilnosti ASK smo pred homogenizacijo z nožem narezali zelje. V plastične centrifugirke smo zatehtali 8 g vzorca in dopolnili do 24 g z različnimi topili (preglednica 4). Vsak vzorec smo homogenizirali 2 minuti z Ultra-Thuraxom in po homogenizaciji odvzeli 1,4 ml vodne suspenzije, kateri smo dodali vodo ali vodni raztopini DTT oziroma MFK (preglednica 4) in centrifugirali 5 minut na 14000 min^{-1} .

Preglednica 4: Priprava vzorcev pri določanju askorbinske kisline z metodo HPLC v zelju

DODATEK PRED HOMOGENIZACIJO	DODATEK 0.1 ML V 1.4 ML HOMOGENATA
16 ml 2 % MFK	H ₂ O
15,52 ml H ₂ O + 0,48 ml 0,5 mol/l DTT	20 % MFK
	H ₂ O
14,8 ml H ₂ O + 1,2 ml 0,1 mol/l EDTA	20 % MFK
	H ₂ O
	150 mM DTT
14,8 ml 2 % MFK + 1,2 ml 0,1 mol/l EDTA	H ₂ O
16 ml H ₂ O	20 % MFK
	H ₂ O
	150 mM DTT
16 ml 0,2 mol/l NaH ₂ PO ₄ pH 7,5	20 % MFK
	H ₂ O
	150 mM DTT
15,52 ml 0,2 mol/l NaH ₂ PO ₄ pH 7,5 + 0,48 ml 0,5 mol/l DTT	20 % MFK
	H ₂ O

Priprava vzorcev obroka: 650 µl polarne faze, ki smo jo pripravili kot je opisano pod točko 3.2.4, smo pipetirali v 2 ml mikrocentrifugirke, v katere smo predhodno pipetirali 1300 µl 10 mmol/l DTT v 50 mmol/l fosfatnem pufru pH 7,5, 10 mmol/l TCEP v 2 % MFK ali 2 % MFK. DTT smo uporabljali samo pri prvem obroku v prvi seriji meritev, v vseh ostalih meritvah smo uporabljali TCEP. Po dodatku vseh komponent smo vzorce dobro premešali na vrtinčniku in jih še isti dan analizirali s HPLC.

Postopek določitve vsebnosti askorbinske kisline: Askorbinsko kislino smo določali na koloni Synergie C₁₈ 250 mm x 4 mm, napolnjeni z delci stacionarne faze dimenzije 4 µm. Vzorce, ki smo jih pripravili kot je opisano zgoraj, smo skozi filtre za enkratno uporabo z velikostjo por 0,45 µm prefiltrirali v steklene vial. Vial smo naložili na avtomatski vzorčevalnik in pričeli z analizo. Na kolono, ekvilibrirano s fosfatnim pufrom s koncentracijo 3,54 g/l KH₂PO₄, pH 2,9, smo nanegli 20 µl prefiltriranega vzorca. Kolono smo po nanosu posameznega vzorca 20 minut spirali pri konstantnem pretoku 0,6 ml/min. Eluirane komponente smo spektrofotometrično detektirali pri 254 nm.

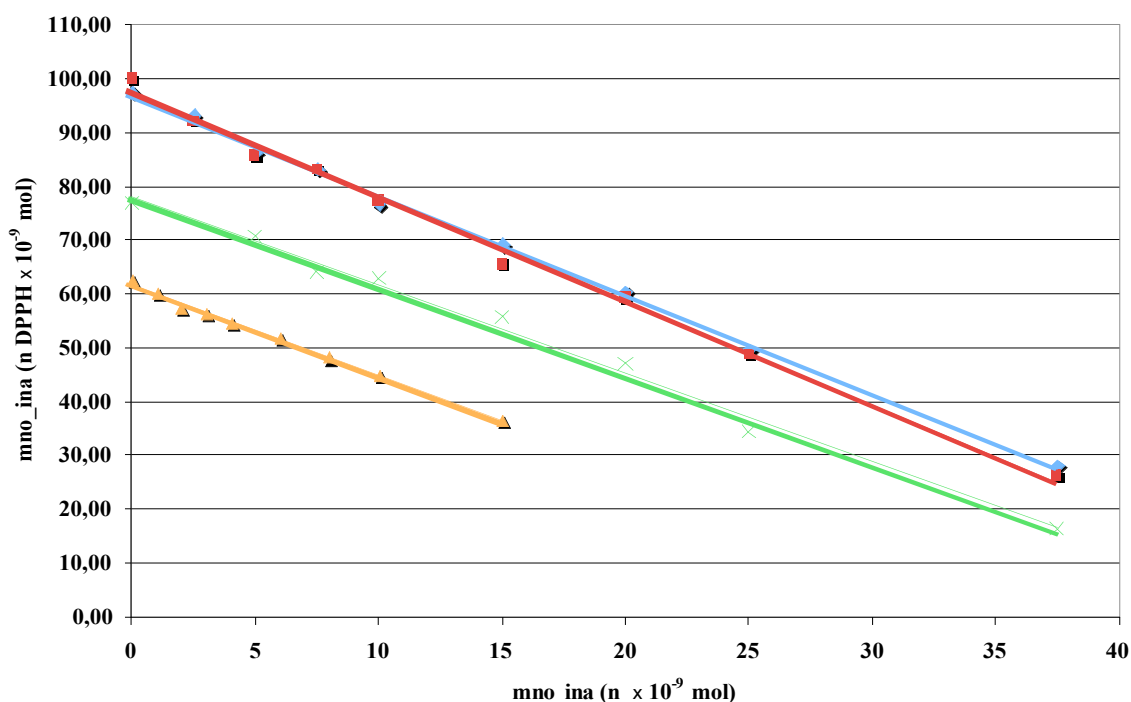
Koncentracijo askorbinske kisline v ekstraktu smo določili s primerjavo vrednosti površine vrhov ASK v kromatogramu ekstraktov z različnimi koncentracijami standardnih raztopin ASK.

4 REZULTATI

4.1 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST IZBRANIH ANTIOKSIDANTOV

Na začetku smo pripravili umeritvene krivulje izbranih antioksidantov s prostim radikalom DPPH[•] in Folin-Ciocalteaujevim reagentom ter preverili ustreznost reagentov za nadaljnje določanje vsebnosti polarnih in nepolarnih antioksidantov.

4.1.1 DPPH[•]



Slika 9: Odvisnost množine porabljenega DPPH[•] od množine askorbinske kisline (♦), α-tokoferola(x), troloxa(▲) in klorogenske kisline(■) v reakcijski zmesi

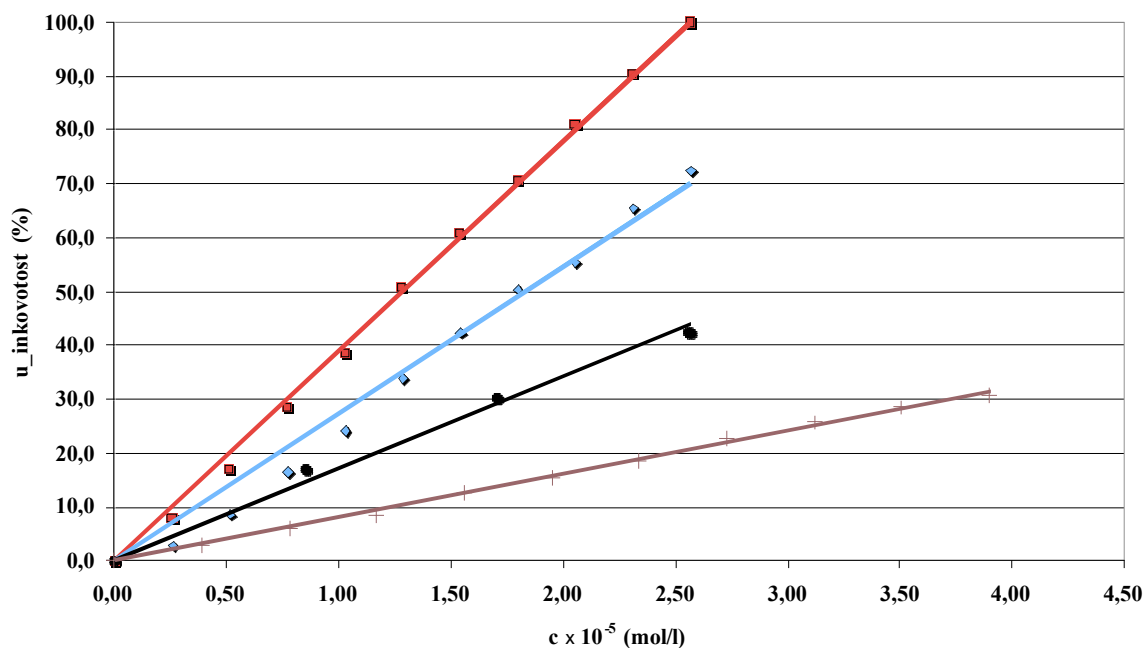
Na zgornjem grafu (slika 9) je podana množina porabljenega DPPH[•] v kivetu v odvisnosti od množine dodane askorbinske kisline, α-tokoferola, klorogenske kisline in troloxa. Absolutna vrednost naklona premic nam poda število molov DPPH[•], ki oksidira mol antioksidanta. Mol askorbinske kisline reducira 1,85 mola DPPH[•], mol α-tokoferola 1,65 mol DPPH[•], mol troloxa 1,67 molov DPPH[•] in mol klorogenske kisline 1,92 mola DPPH[•]. Antioksidativno učinkovitost v sistemu z DPPH[•] smo določali tudi za dehidaskorbinsko kislino. Slednja praktično ne reducira DPPH[•], saj smo določili, da je molarno razmerje med porabljenim DPPH[•] in dehidaskorbinsko kislino le 0,0192. To pomeni, da DHA reagira z DPPH[•] približno 100x slabše kot askorbinska kislina (preglednica 5). Zaradi zanemarljive reaktivnosti dehidaskorbinske kisline se je test z reagentom DPPH[•] izkazal kot primeren za spremljanje stabilnosti askorbinske kisline v kompleksnih mešanica antioksidantov, kjer le-ta ni stabilna.

Preglednica 5: Množinsko razmerje med DPPH[•] in nekaterimi antioksidanti

POLARNI	razmerje DPPH [•] /antioksidant (mol/mol)
askorbinska kislina	1,85
dehidroaskorbinska kislina	0,0192
klorogenska kislina	1,92
trolox	1,67
NEPOLARNI	
α-tokoferol	1,65

4.1.2 Folin-Ciocalteu

Folin-Ciocalteujev (F-C) test se uporablja predvsem za določanje vsebnosti fenolnih spojin. Zanimalo nas je, kako reagira tudi z nekaterimi drugimi antioksidanti, ki sestavljajo kompleksen obrok. Pripravili smo umeritvene krivulje s klorogensko kislino, z askorbinsko kislino, z dehidroaskorbinsko kislino in z glutationom (slika 10). F-C reagent zaradi polarnega medija in prisotnih ionov ni primeren za določanje α-tokoferola, ker je ta topen le v nepolarnih topilih. Test smo kljub temu izvedli, vendar meritve zaradi obarjanja niso bile realne in rezultati meritev tudi niso podani.



Slika 10: Učinkovitost nekaterih antioksidantov v odvisnosti od njihove koncentracije, za redukcijo F-C reagenta izražena kot odstotek absorbance, ki smo jo določili za klorogensko kislino s koncentracijo $2,50 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$. Testirali smo askorbinsko kislino (♦), dehidroaskorbinsko kislino(+), glutation (●) in klorogensko kislino(■)

Preglednica 6: Primerjava učinkovitosti nekaterih antioksidantov s koncentracijo $2,5 \times 10^{-5}$ mol/l za redukcijo F-C reagenta

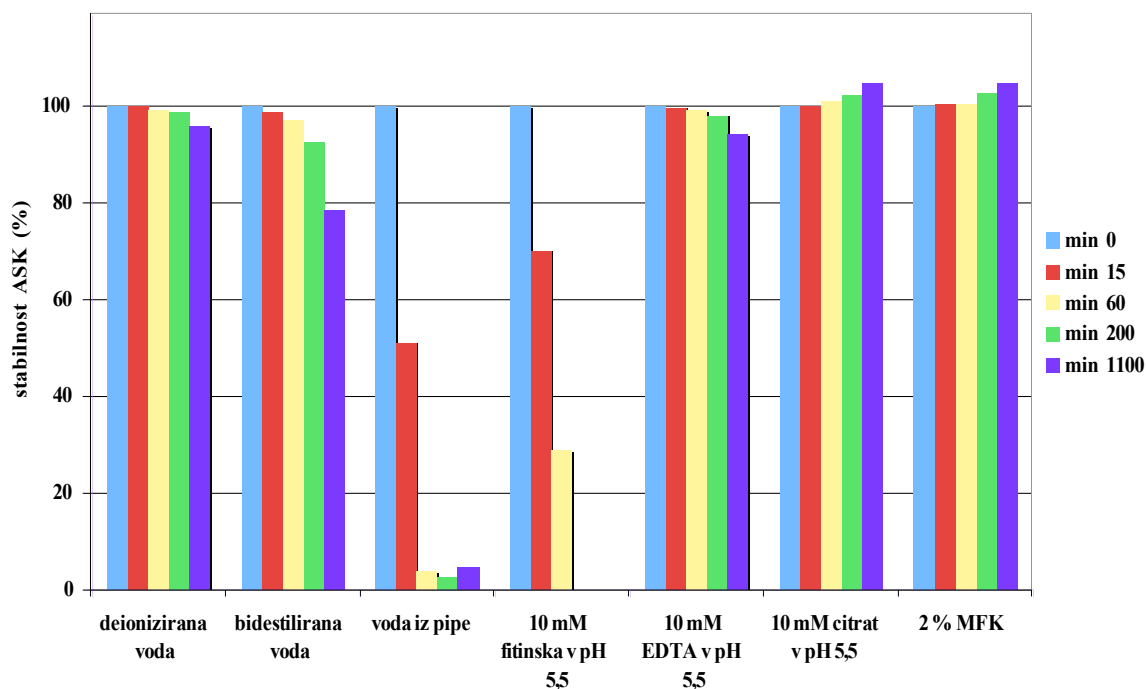
antioksidant	učinkovitost (%)
klorogenska kislina	100
askorbinska kislina	72,6
dehidroaskorbinska kislina	20,9
glutation	42,2

S slike 10 in preglednice 6 je razvidno, da vsi testirani polarni antioksidanti reagirajo s F-C reagentom. Kaže, da je učinkovitost askorbinske kisline povsem primerljiva s klorogensko kislino, kar pomeni, da v kompleksnih mešanicah, ki vsebujejo večji delež askorbinske kisline s F-C metodo ne določamo le polifenolov. Dehidroaskorbinska kislina reagira v manjši meri kot askorbinska kislina, vendar še vedno precej bolje kot z DPPH[•], kar pomeni, da je slednji bolj primeren za spremljanje stabilnosti askorbinske kisline, ki v prvi stopnji razpada, oksidira v dehidroaskorbinsko kislino.

Ker smo želeli spremljati stabilnost antioksidantov in določati tako polarne kot nepolarne antioksidante, smo se odločili, da bomo pri realnih vzorcih antioksidativno aktivnost določali z DPPH[•].

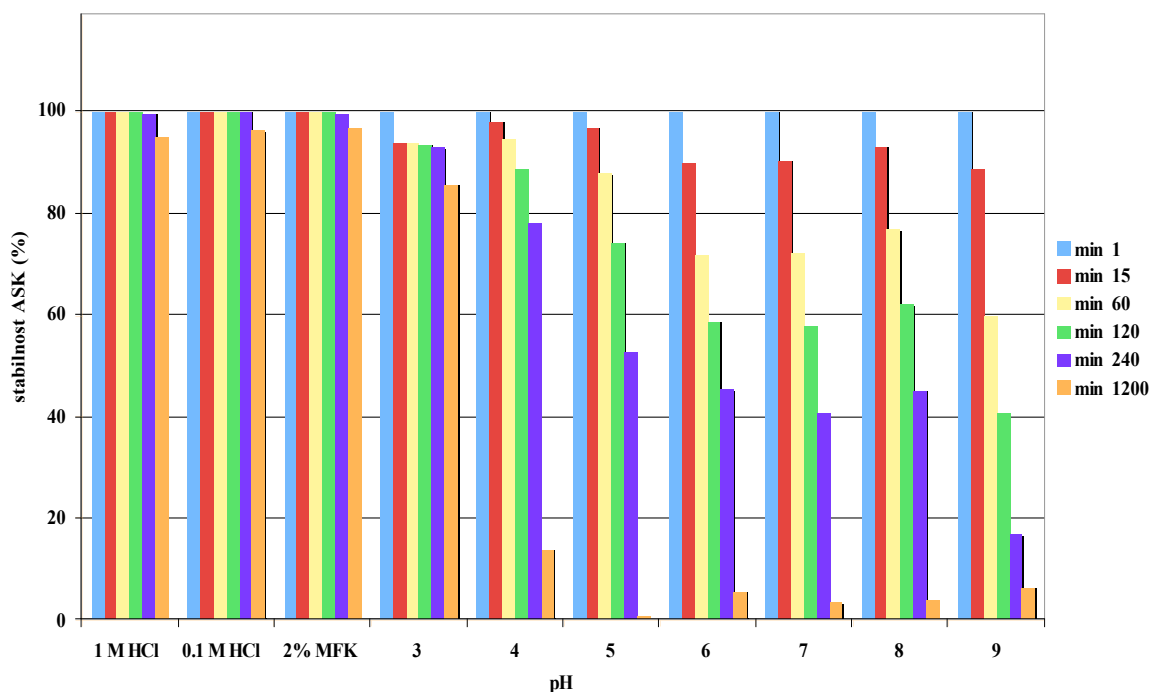
4.2 STABILNOST ASKORBINSKE KISLINE V MODELNIH RAZTOPINAH

Stabilnost askorbinske kisline smo določali spektrofotometrično pri 254 nm (slika 11). Ugotovili smo, da je askorbinska kislina izjemno nestabilna v vodovodni vodi, verjetno zaradi prisotnosti kovinskih ionov, ki lahko katalizirajo njeno oksidacijo (Imer in sod., 2003). Stabilnost ASK je bila precej boljša v deionizirani kot v bidestilirani vodi. Dodatek kompleksantov, ki lahko vežejo dvovalentne ione, je upočasnil razgradnjo le v primeru citrata. Fitat je celo pospešil razgradnjo, medtem ko EDTA ni vplivala na hitrost razpada, če primerjamo stabilnost ASK v deionizirani vodi z EDTA. Po pričakovanjih je bila askorbinska kislina najbolj obstojna v 2 % metafosforni kislini (Musulin in King, 1936).



Slika 11: Stabilnost askorbinske kisline raztopljene v različnih raztopinah

Da bi bolje preučili vpliv pH na stabilnost askorbinske kisline v modelnih raztopinah, smo se odločili, da pripravimo pufre z različnimi pH vrednostmi. Ugotovili smo (slika 12), da je askorbinska kislina relativno stabilna v kislem do pH 3, medtem ko pri višjih pH vrednostih relativno hitro razpada. Že pri pH 4 po 20 urah preostane manj kot 15 % začetne koncentracije askorbinske kisline. Zanimivo je, da prične askorbinska kislina razpadati pri tistih pH vrednostih, ki so blizu pK_{a1} askorbinske kisline, to je pri 4,25 (Klofutar in sod., 1998).



Slika 12: Stabilnost askorbinske kisline raztopljene v pufrih z različnimi pH vrednostmi

4.3 STABILNOST ANTIOKSIDANTOV V KOMPLEKSNIH MATRIKSIH

4.3.1 Določanje antioksidativne aktivnosti v omaki – »Sugo«

Z omako smo preizkusili učinkovitost ekstrakcije nepolarnih antioksidantov s heksanom in etil acetatom. Zanimalo nas je, ali etil acetat dobro ekstrahira nepolarne del antioksidantov in če vpliva na določanje polarnih antioksidantov. Omako smo zmešali s heksanom oz. etil acetatom v razmerju 1:2 in izvedli ekstrakcijo na vrtničniku. Opravili smo obe ekstrakciji in določali antioksidativno aktivnost polarne in nepolarne faze z DPPH[•]. V preglednici 7 so prikazani rezultati meritev absorbance testiranih raztopin DPPH[•], v katere smo dodali polarne in nepolarne faze, ki smo jih dobili pri ekstrakciji s heksanom oziroma etil acetatom.

Preglednica 7: Primerjava učinkovitosti ekstrakcije antioksidantov s heksanom in etila cetatom

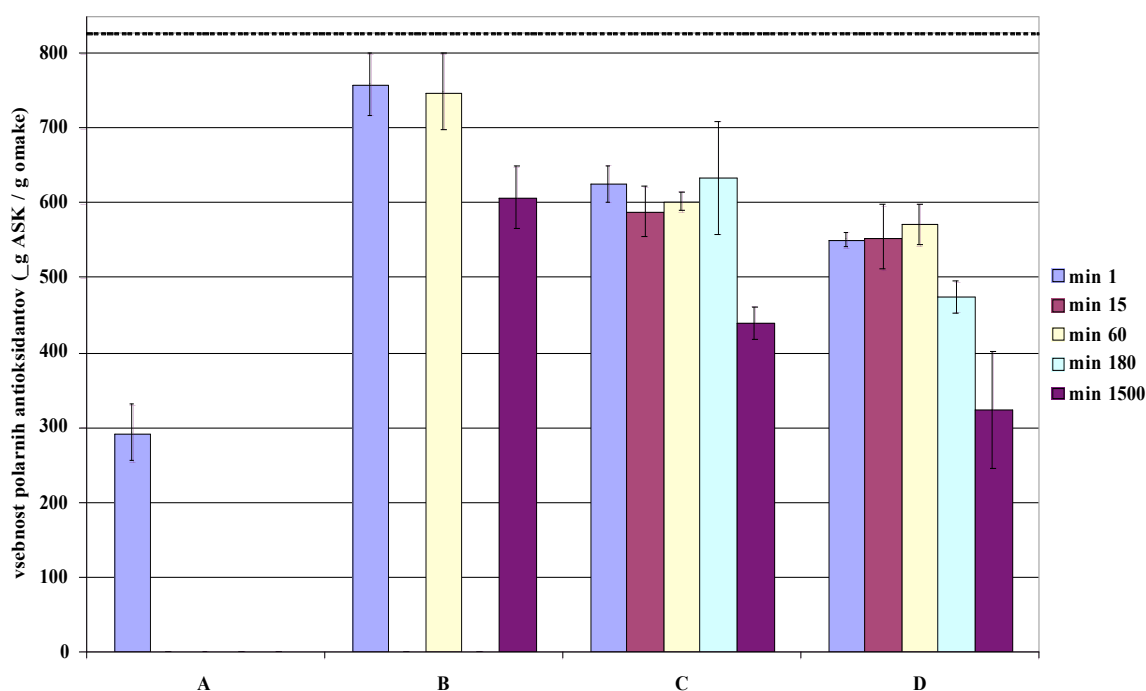
	heksan ₁	heksan ₂	etil acetat ₁	etil acetat ₂	referenčna razt.
nepolarna faza	0,891	0,898	0,632	0,697	0,949
polarna faza	0,463	0,488	0,517	0,511	0,834

Iz primerjave z absorbanco referenčne raztopine, v kateri je bil samo etil acetat je razvidno, da je delež antioksidantov, ki smo jih ekstrahirali s heksanom, precej manjši kot delež antioksidantov, ki smo jih ekstrahirali z etil acetatom. Izbira topila za ekstrakcijo nepolarnih antioksidantov ni imela večjega vpliva na vsebnost antioksidantov v polarni

fazi, zato smo se odločili, da bomo za ekstrakcijo nepolarnih antioksidantov uporabljali etil acetat.

V nadaljnjih preiskavah smo se usmerili na preučevanje stabilnosti antioksidantov v omaki pri homogenizaciji v vodi, metafosforni kislini in citratu. Za citrat smo se odločili, ker je ta stabiliziral askorbinsko kislino v modelnih raztopinah (slika 11). Ker vemo, da ima pH velik vpliv na stabilnost askorbinske kisline smo namenoma pripravili citrat s pH 4,6, ki je hkrati tudi pH omake same. Želeli smo preveriti le vlogo citrata pri stabilizaciji zaradi vezave železa in nekaterih drugih ionov, ki katalizirajo oksidacijo askorbinske kisline in ne stabilizacijo zaradi nizkega pH.

Na sliki 13 je prikazan vpliv izbranega medija na stabilnost standardnega dodatka askorbinske kisline v omaki. Za ugotavljanje izkoristka ekstrakcije in stabilnosti askorbinske kisline smo upoštevali eksperimentalno določeno vsebnost polarnih antioksidantov v sami omaki, kateri smo prišteli antioksidativno aktivnost standardnega dodatka askorbinske kisline, ki smo ga določili iz molskega razmerja med DPPH[•] in askorbinsko kislino (preglednica 5). Tako dobljena vrednost predstavlja črtkano črto na sliki 13. Višina stolpcev predstavlja eksperimentalno določeno vsebnost antioksidantov v določenem mediju ob dodatku ASK merjeno v različnih časovnih intervalih.



Slika 13: Stabilnost standardnega dodatka askorbinske kisline, z masnim deležem 528 µg/g omake, določena z DPPH[•]. A - omaka brez standardnega dodatka homogenizirana v 1,4 % MFK, B - omaka s standardnim dodatkom homogenizirana v 1,4 % MFK, C - omaka s standardnim dodatkom homogenizirana v destilirani vodi, D - omaka s standardnim dodatkom homogenizirana v 10mM citratu pH 4,6. V poskusu B smo spremljali stabilnost samo v 3 časovnih intervalih

V nadaljevanju je prikazan primer izračuna izkoristka za standardni dodatek ASK homogeniziran v 1,4 % MFK po 15 minutah:

Iz razlik absorbanc povprečij treh meritev za referenčno raztopino in vzorcev katerim smo dodali polarni ekstrakt omake brez in s standardnim dodatkom (SD) smo izračunali množino reduciranega DPPH[•].

$$\Delta A \text{ (Brez SD): } 0,841 - 0,655 = 0,187$$

$$\Delta A \text{ (S SD): } 0,877 - 0,399 = 0,478$$

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

$$n_{DPPH_2} = \frac{0,187}{12000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}} \times 0,00125 = 19,4 \times 10^{-9} \text{ mol}$$

$$n_{DPPH_2} = \frac{0,478}{12000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}} \times 0,00125 = 49,8 \times 10^{-9} \text{ mol}$$

Ker vemo kakšno je razmerje med moli reduciranega DPPH[•] in oksidirano askorbinsko kislino (preglednica 5), lahko izrazimo antioksidante v testirani raztopini kot ekvivalente askorbinske kisline.

$$\text{Brez SD: } 19,4 \times 10^{-9} \text{ mol} / 1,85 = 10,5 \times 10^{-9} \text{ mol askorbinske kisline}$$

$$\text{S SD: } 49,8 \times 10^{-9} \text{ mol} / 1,85 = 26,9 \times 10^{-9} \text{ mol askorbinske kisline}$$

Iz znanih razredčitev (upoštevamo, da je gostota vseh raztopin in suspenzij približno 1,0 g/mL) lahko izrazimo ekvivalentno maso askorbinske kisline na g omake. Pri tem smo faktor zaradi razredčitev zaokrožili na celo število (40).

Preglednica 8: Razredčitve pri pripravi vzorcev omake

Stopnje	Razredčitev
8 g omake + 16 g 2 % MFK	3
0,12 ml H ₂ O pri odvzemu 1,7 ml	1,82/1,7
100 µl vzorca v 1150 µl NaOAc	12,5
Skupna razredčitev:	40

Za vzorec brez standardnega dodatka je tako vsebnost ASK na g obroka:

$$\frac{m_{AK \text{ v testu}}}{m_{obroka \text{ v testu}}} = \frac{n_{AK} \cdot M_{AK}}{\frac{m_{dodatka \text{ v testu}}}{R_f}} = \frac{10,5 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot 176,1 \text{ g/mol}}{\frac{0,250 \text{ g}}{40}} = 296 \frac{\mu\text{g AK}}{\text{g obroka}}$$

Za vzorec s standardnim dodatkom: $= 758 \frac{\mu\text{g AK}}{\text{g obroka}}$

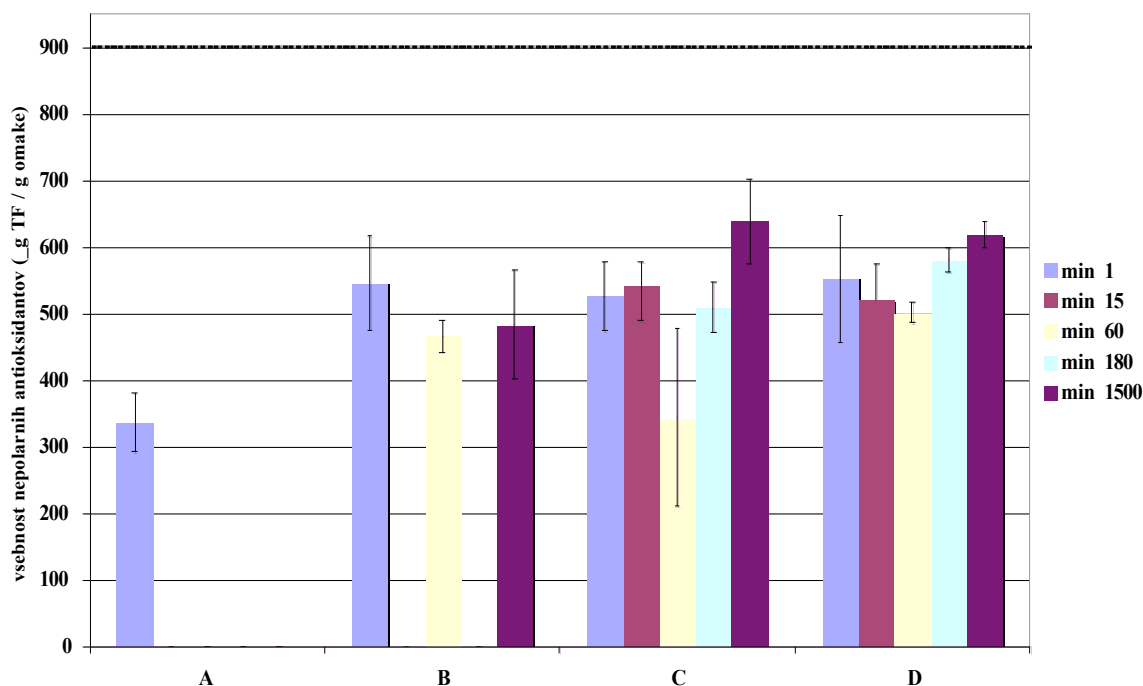
Pri drugem izračunu je razredčitev nekoliko večja zaradi dodatka 300 μl raztopine askorbinske kisline v 24 g nehomogeniziranega razredčenega vzorca. Iz dobljenih rezultatov in znanega dodatka askorbinske kisline lahko izračunamo izkoristek.

$758 \mu\text{g ASK} / \text{g omake} - 296 \mu\text{g ASK} / \text{g omake} = 462 \mu\text{g ASK} / \text{g omake}.$

$528 \mu\text{g ASK} / \text{g omake}$ predstavlja 100% izkoristek. Torej smo določili 88 % dodane askorbinske kisline.

S slike 13 je razvidno, da po homogenizaciji omake v 1,4 % metafosforni kislini ohranimo precej več antioksidantov kot pri homogenizaciji v vodi ali citratu. Citrat proti pričakovanjem ni stabiliziral askorbinske kisline, ki je tu še hitreje razpadala kot v vodi. Po enem dnevu je v citratu razpadla praktično vsa dodana askorbinska kislina, medtem ko je pri dodani MFK ostalo še okoli dve tretjini askorbinske kisline. V primeru, ko nismo dodali MFK, se je koncentracija askorbinske kisline drastično zmanjšala že takoj po homogenizaciji (slika 13, preglednica 9).

Na sliki 14 je prikazan vpliv izbranega medija na stabilnost in izkoristek ekstrakcije standardnega dodatka α -tokoferola v omaki. Za ugotavljanje izkoristka ekstrakcije in stabilnosti askorbinske kisline smo upoštevali eksperimentalno določeno vsebnost nepolarnih antioksidantov v sami omaki, kateri smo prišteli antioksidativno aktivnost standardnega dodatka α -tokoferola, ki smo ga določili iz molskega razmerja med DPPH $^{\bullet}$ in α -tokoferolom (preglednica 5). Tako dobljena vrednost predstavlja črtkano črto na sliki 14. Višina stolpcev pa predstavlja eksperimentalno določena vsebnost antioksidantov v določenem mediju oziroma času po dodatku α -tokoferola. Izkoristke pri ekstrakciji α -tokoferola smo računali na podoben način kot za askorbinsko kislino, le da smo upoštevali drugačne razredčitve, molsko maso in razmerje med porabljeni DPPH $^{\bullet}$ ter antioksidantom.



Slika 14: Stabilnost standardnega dodatka α -tokoferola raztopljenega v etil acetatu z masnim deležem 565 $\mu\text{g/g}$ omake določena z DPPH $^{\bullet}$. A - omaka brez standardnega dodatka homogenizirana v 1,4 % MFK, B - omaka s standardnim dodatkom homogenizirana v 1,4 % MFK, C - omaka s standardnim dodatkom homogenizirana v destilirani vodi, D - omaka s standardnim dodatkom homogenizirana v 10mM citratu pH 4,6. V poskusu B smo spremljali stabilnost samo v 3 časovnih intervalih

S slike 14 in preglednice 9 lahko vidimo, da so izkoristki pri določanju α -tokoferola zelo nizki že takoj po homogenizaciji, vendar za razliko od ASK pri daljših časih ni bilo opaziti trenda slabših izkoristkov. Problem tako najverjetneje ni posledica razgradnje α -tokoferola (TF) v kompleksnem matriksu, ampak je povezan s slabšo ekstrakcijo ali porazdelitvijo standardnega dodatka po matriksu.

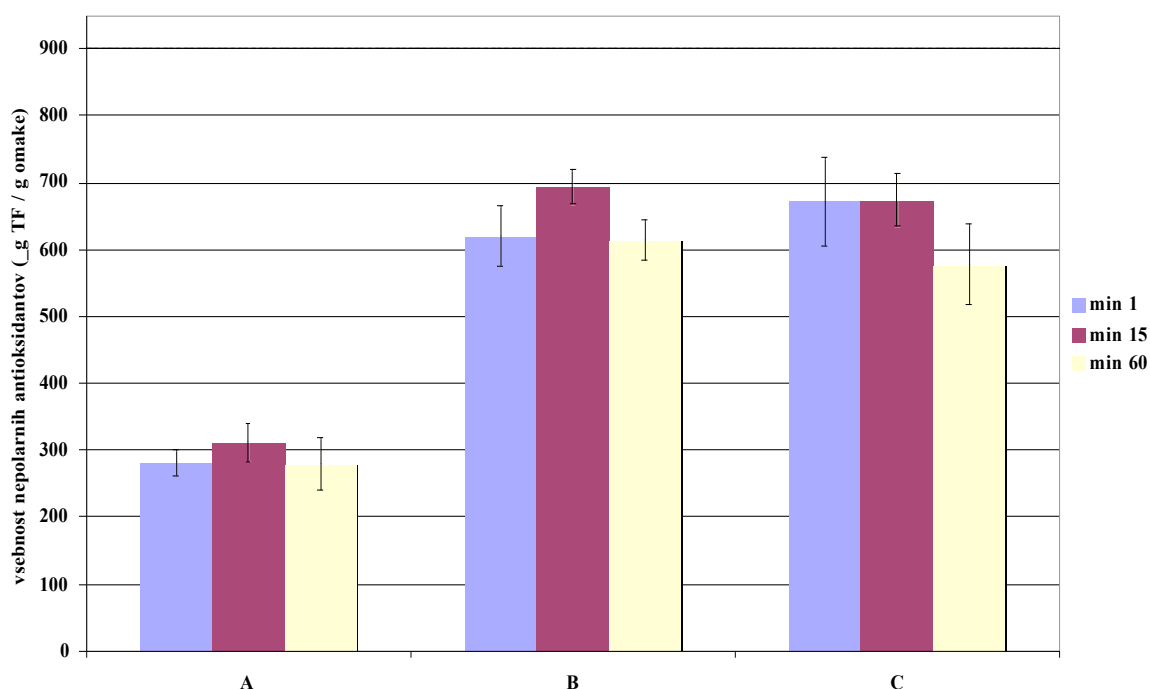
Preglednica 9: Določen delež standardnih dodatkov askorbinske kisline in α -tokoferola v ekstraktih omake takoj po homogenizaciji

	C _{ekvivalentov} ASK $\mu\text{g ASK} / \text{omake}$	C _{ekvivalentov} TF $\mu\text{g TF} / \text{omake}$	določen delež std. dod. ASK [%]	določen delež std. dod. TF [%]
Omaka brez SD	293	336	/	/
Dodatek antioksidanta	528	585	/	/
Omaka + SD + 2 % MFK	759	546	88	37
Omaka + SD + H ₂ O	626	527	63	34
Omaka + SD + citrat	551	553	49	38

Da bi preverili, če je bistven del napake v slabi porazdelitvi standarda po vzorcu, smo se odločili, da bomo standard raztopili v etanolu, ki se z vodo meša v vseh razmerjih, in ne v

etil acetatu, ki se takoj po homogenizaciji izloči na vrhu centrifugirke. Ko smo analizirali rezultate analize smo ugotovili, da se je izkoristek več kot podvojil in je znašal 69 %, kar je še vedno relativno majhna vrednost, a v okvirih rezultatov nekaterih drugih avtorjev (Jung in sod., 2001).

Pri dodatku α -tokoferola raztopljenega v etanolu (slika 15) so bili izkoristki pri določanju večji za več kot 30 % večji, kot če je topilo etil acetat (slika 14). Na osnovi teh rezultatov lahko z gotovostjo trdimo, da se dodani α -tokoferol raztopljen v etil acetatu ni zadostno porazdelil po vzorcu, ampak se je nabral na površini in ga pri odvzemu s pipeto nismo uspeli zajeti. Potrdili smo tudi, da je α -tokoferol za razliko od askorbinske kisline precej bolj obstojen, saj po eni uri nismo zasledili večjih izgub.

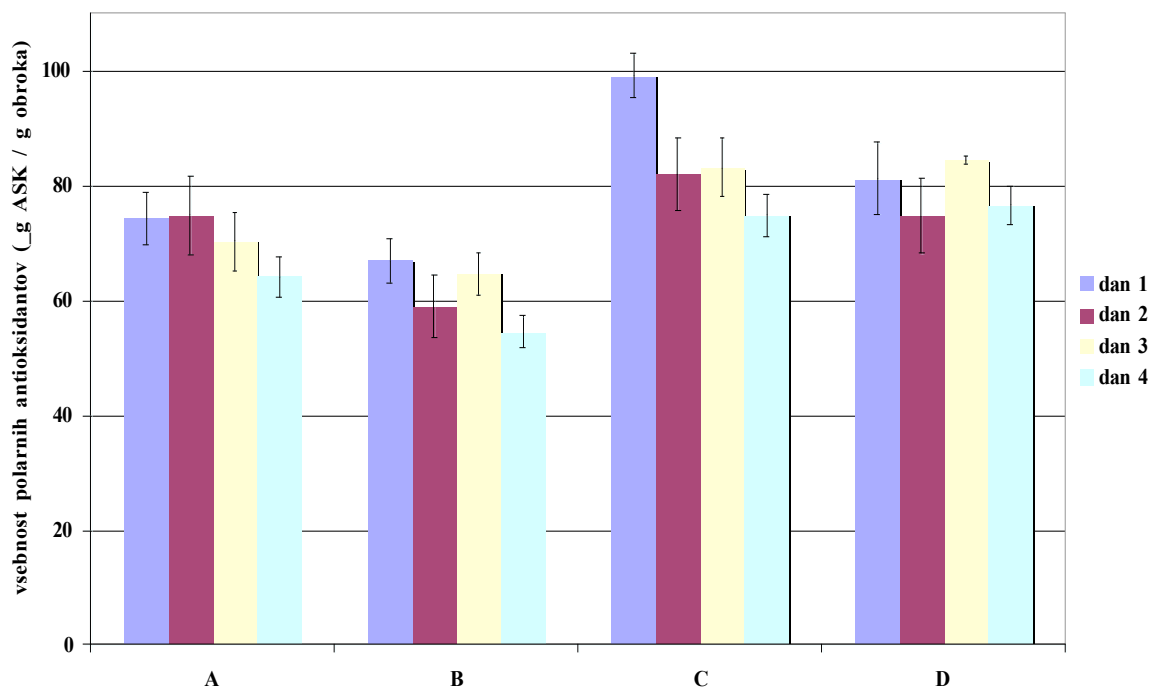


Slika 15: Stabilnost standardnega dodatka α -tokoferola raztopljenega v etanolu z masnim deležem 565 μ g/g omake določena z DPPH $\bullet$. A - omaka brez standardnega dodatka homogenizirana v 1,4 % MFK, B - omaka s standardnim dodatkom homogenizirana v 1,4 % MFK, C - omaka s standardnim dodatkom homogenizirana v destilirani vodi

4.3.2 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI V OBROKU

4.3.2.1 Vpliv dodatka MFK na stabilnost antioksidantov v obroku

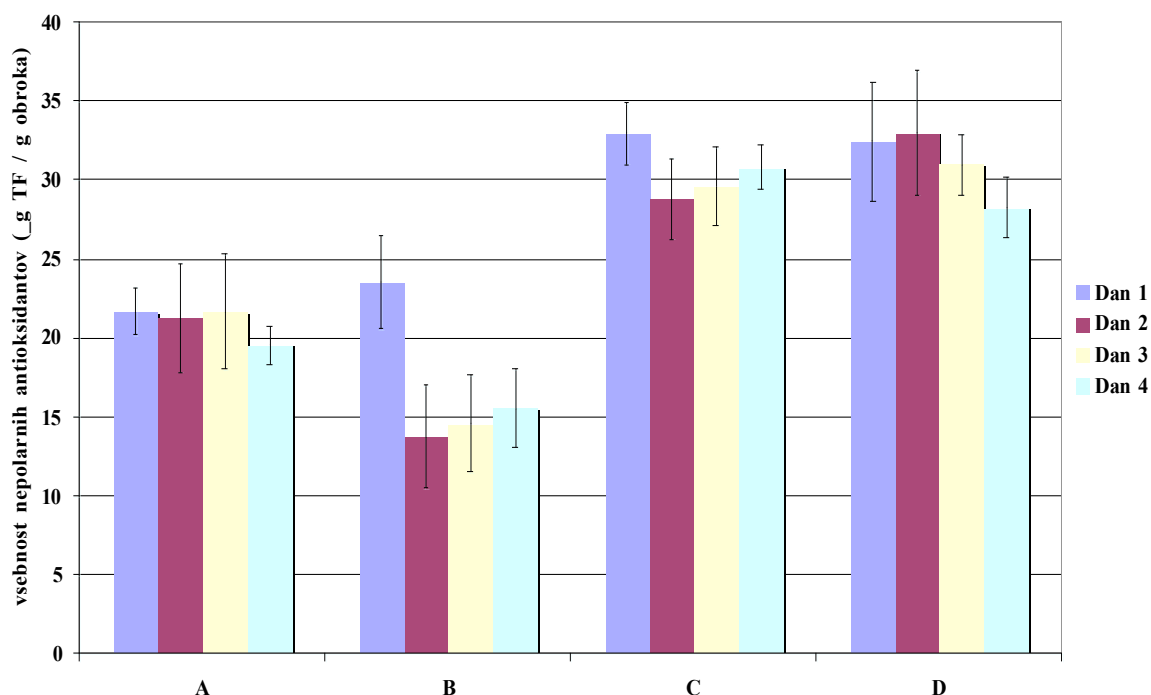
Obrok smo skuhali in ga ohladili, ter razdelili na dva enaka dela. Polovico obroka smo homogenizirali kot takega, polovico pa po dodatku metafosforne kisline do skupaj 1,4 %. Vzorce za analizo smo odvzeli takoj po homogenizaciji in po 1 uri. Odvzete vzorce smo takoj zamrznili v tekočem dušiku in jih shranili v zmrzovalniku pri -20 °C. Prve analize smo opravili naslednji dan po homogenizaciji. pH homogenata z dodano MFK je bil 3,90 in temperatura 9 °C. pH homogenata brez MFK je bil 5,25 in temperatura 11 °C. Temperatura se je v obeh primerih po eni uri, ko smo drugič odvzeli vzorce, dvignila za 1°C. Ekstrakcija vzorcev, v katere je bila dodana kislina, je potekala mnogo bolje, saj je bila polarna faza skoraj popolnoma bistra, najverjetneje zaradi obarjanja proteinov pri nižjem pH.



Slika 16: Primerjava vsebnosti polarnih antioksidantov v obrokih homogeniziranih z in brez MFK, določenih z DPPH[•] in podanih kot µg ekvivalentov askorbinske kisline na g obroka. Temperatura shranjevanja je bila -20 °C. A - brez dodatka MFK in zamrznjeno takoj po homogenizaciji, B – brez dodatka MFK in zamrznjeno 1 uro po homogenizaciji, C – z dodatkom MFK in zamrznjeno takoj po homogenizaciji, D – z dodatkom MFK in zamrznjeno 1 uro po homogenizaciji

S slike 16 je razvidno, da MFK oziroma nizek pH stabilizira polarne antioksidante v homogenizatu. Razlika pri vzorcih homogeniziranih z MFK in brez MFK, ki so bili odvzeti takoj po homogenizaciji in analizirani naslednji dan, je okoli 25 %. Razlog za nestabilnost

je najverjetneje neustrezen pH in prisotnost železovih ionov, katerih izvor je mioglobin iz govejega mesa. Proti pričakovanjem smo opazili, da so praktično vsi vzorci nestabilni tudi, če so shranjeni na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, saj smo opazili trend zmanjševanja določene antioksidativne aktivnosti po nekajdnevem shranjevanju. Razlika je bila največja pri vzorcu C, kjer smo prvi dan analize določili največjo antioksidativno aktivnost. Zaradi naštetega smo se odločili, da bo potrebno pri naslednjih eksperimentih analizirati vzorce še isti dan, ko bodo homogenizirani. Izboljšanje stabilnost shranjevanja zmrznjenih vzorcev pa smo skušali doseči z nižjo temperaturo $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.



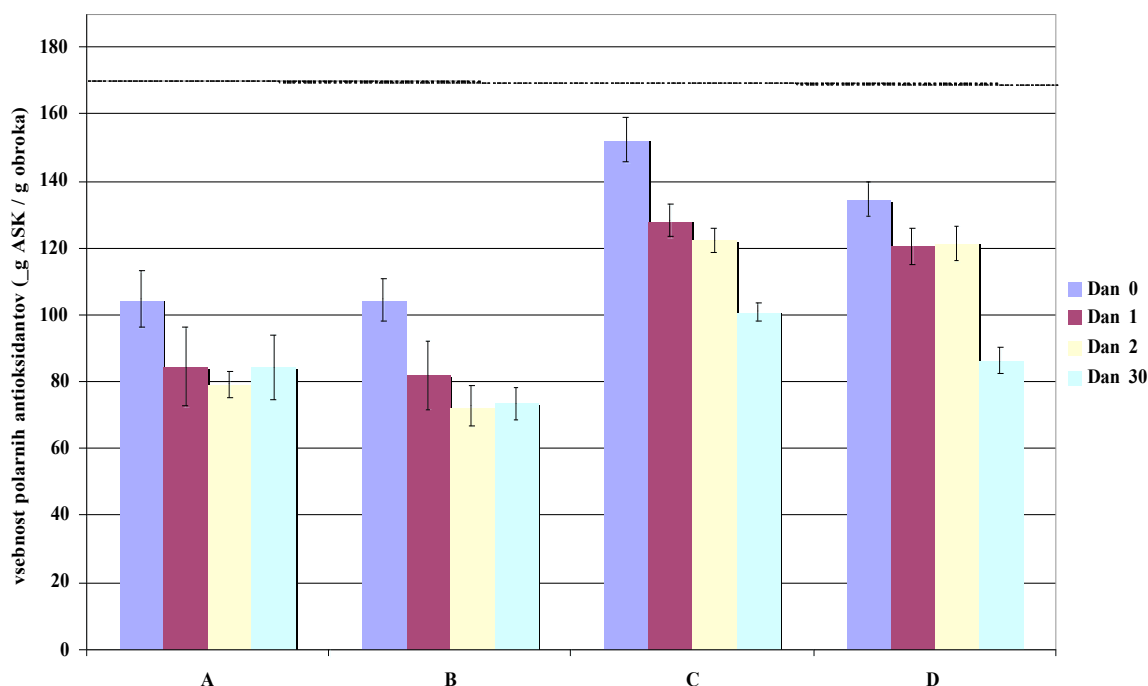
Slika 17: Primerjava vsebnosti nepolarnih antioksidantov v obrokih homogeniziranih z in brez MFK, določenih z DPPH^{*} in podanih kot μg ekvivalentov α -tokoferola (TF) na g obroka. Temperatura shranjevanja je bila $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A - brez dodatka MFK in zamrznjeno takoj po homogenizaciji, B - brez dodatka MFK in zamrznjeno 1 uro po homogenizaciji, C - z dodatkom MFK in zamrznjeno takoj po homogenizaciji, D - z dodatkom MFK in zamrznjeno 1 uro po homogenizaciji

S slike 17 je razvidno, da velja za nepolarne antioksidante podobno kot za polarne. Nižji pH med homogenizacijo jih stabilizira, saj so bile vrednosti v MFK približno za tretjino večje, viden pa je tudi trend zmanjševanja antioksidativne aktivnosti med zmrzovanjem Pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3.2.2 Stabilnost standardnega dodatka askorbinske kisline in α -tokoferola v obroku z dodano MFK

Obrok smo skuhali in ga ohladili ter ga razdelili na dva enaka dela. Polovici obroka smo pred homogenizacijo dodali MFK do skupaj 1,4 %, 116 mg askorbinske kisline in 133 mg α -tokoferola, kar je predstavljalo dodatek $65\text{ }\mu\text{g}$ askorbinske kisline oziroma $75\text{ }\mu\text{g}$

α -tokoferola na g obroka. Drugi polovici smo pred homogenizacijo dodali le MFK do skupaj 1,4 %. Vzorce za analizo smo odvzeli takoj po homogenizaciji in po 1 uri. Odvzete vzorce smo takoj zamrznili v tekočem dušiku in jih shranili v zmrzovalniku pri -70°C . Prve analize smo opravili še isti dan. pH homogenata je bil v vseh primerih 3,90. Temperatura vzorca s standardnim dodatkom takoj po homogenizaciji je bila 10°C in temperatura vzorca brez standardnega dodatka 12°C . Temperatura se je v obeh primerih po eni uri, ko smo drugič odvzeli vzorce, dvignila za 1°C .

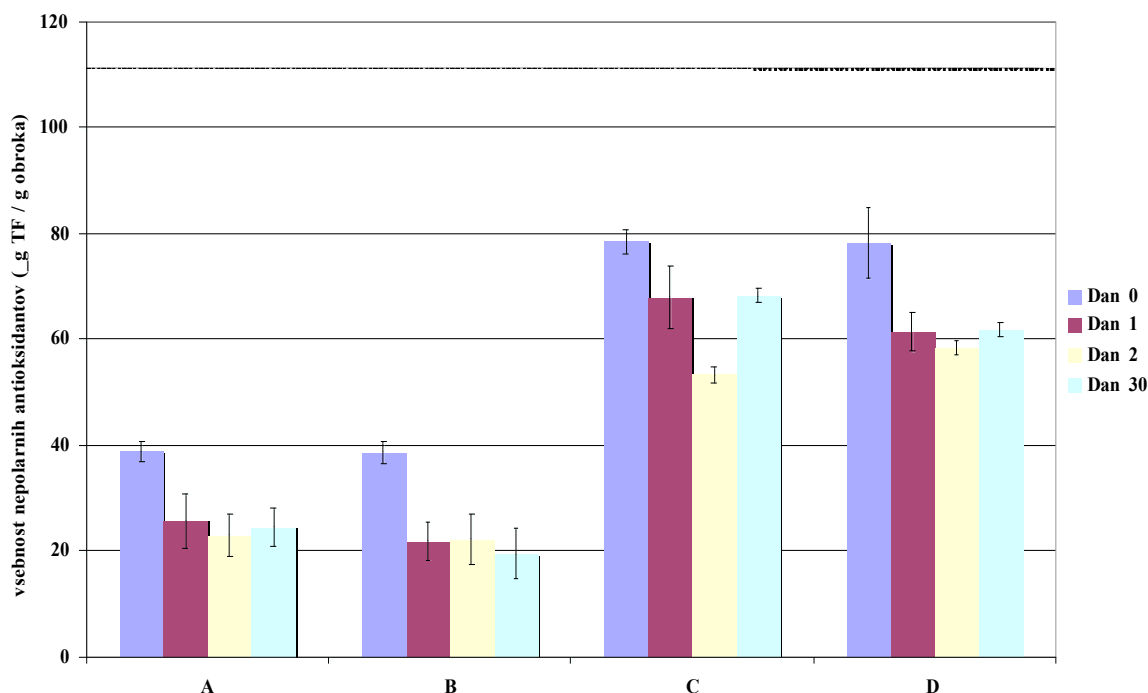


Slika 18: Primerjava vsebnosti polarnih antioksidantov v obrokih s in brez standardnega dodatka askorbinske kisline, določenih z DPPH[•] in podanih kot μg ekvivalentov askorbinske kisline na g obroka. Temperatura shranjevanja je bila -70°C . A - z dodatkom MFK in zamrznjeno takoj po homogenizaciji, B - z dodatkom MFK in zamrznjeno 1 uro po homogenizaciji, C - z dodatkom MFK in standardnim dodatkom askorbinske kisline zamrznjeno takoj po homogenizaciji, D - z dodatkom MFK in standardnim dodatkom askorbinske kisline zamrznjeno 1 uro po homogenizaciji

Zmanjševanje antioksidativne aktivnosti med zmrzovanjem, ki smo jo opazili pri predhodnem eksperimentu (slika 16), je še bolj izrazito prikazano na sliki 18. Ker smo tu vzorce analizirali že prvi dan, je še bolj razvidna kinetika zmanjševanja antioksidativne aktivnosti med zmrzovanjem. Nižja temperatura shranjevanja -70°C , ni zavrla oksidacije. Po enem dnevu shranjevanja v zmrzovalniku se izkoristek določenih antioksidantov v povprečju zmanjša za slabih 20 %.

S slike 18 je razvidno, da je absolutno zmanjševanje antioksidativne aktivnosti precej večje pri vzorcih s standardnim dodatkom askorbinske kisline, kar najverjetneje pomeni, da je slednja zelo nestabilna. Iz znane količine standardnega dodatka lahko izračunamo izkoristke ekstrahirane askorbinske kisline. V vzorcu brez standardnega dodatka smo

določili 104 μg askorbinske kisline na g obroka. V vzorcu s standardnim dodatkom, ki smo ga zamrznili takoj po homogenizaciji in še isti dan analizirali, smo določili 152 μg askorbinske kisline. Ob upoštevanju standardnega dodatka 65 μg askorbinske kisline na g obroka smo izračunali, da je izkoristek določene askorbinske kisline 74 %, kar je nekaj manj kot smo določili v omaki. pH, ki smo ga zagotovili z dodatkom 2 % metafosforne kisline, je bil zaradi pufrske kapacitete sistema (meso) previsok, da bi stabiliziral askorbinsko kislino, tudi če smo analize opravili še isti dan.

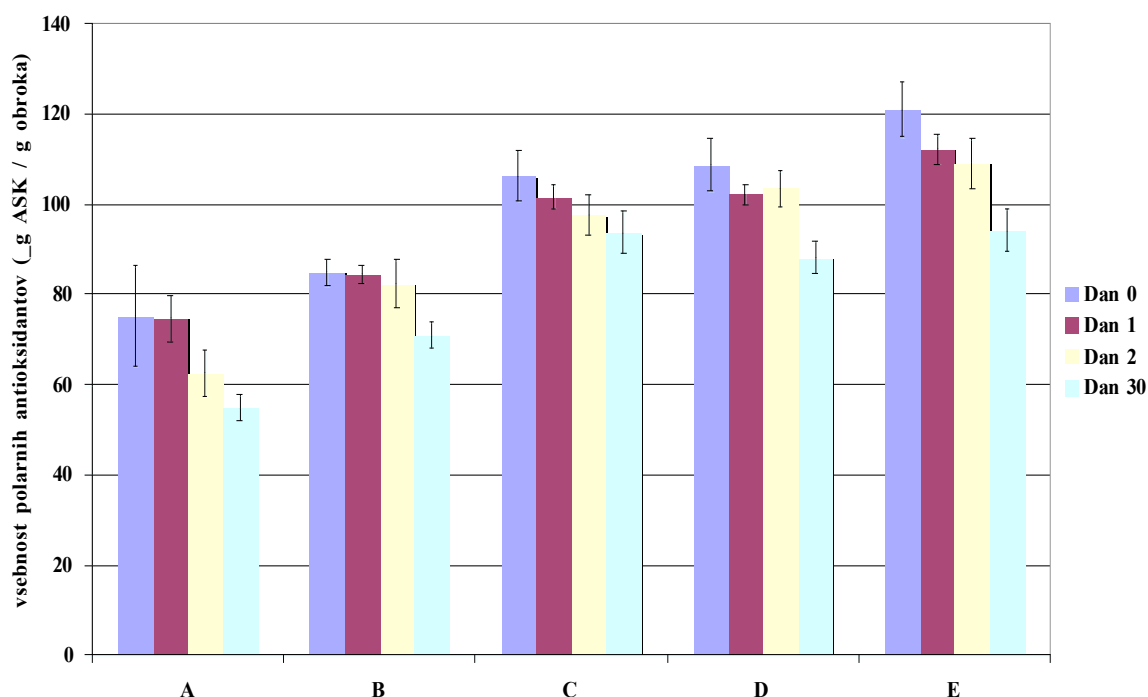


Slika 19: Primerjava vsebnosti nepolarnih antioksidantov v obrokih s in brez standardnega dodatka α -tokoferola, določenih z DPPH* in podanih kot μg ekvivalentov α -tokoferola na g obroka. Temperatura shranjevanja je bila $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. A - z dodatkom MFK in zamrznjeno takoj po homogenizaciji, B - z dodatkom MFK in zamrznjeno 1 uro po homogenizaciji, C - z dodatkom MFK in standardnim dodatkom α -tokoferola zamrznjeno takoj po homogenizaciji, D - z dodatkom MFK in standardnim dodatkom α -tokoferola zamrznjeno 1 uro po homogenizaciji

Na enak način kot za polarne antioksidante lahko tudi za nepolarne antioksidante izračunamo izkoristek ekstrakcije. V vzorcu brez standardnega dodatka smo prvi dan določili 39 μg ekvivalentov α -tokoferola na g obroka, v vzorcu s standardnim dodatkom pa 78 μg ekvivalentov α -tokoferola na g obroka. Ker smo uporabili standardni dodatek 75 μg tokoferola na g obroka, je bil izkoristek 52 %. Podobno kot za polarne antioksidante velja tudi za nepolarne antioksidante, da propadajo med shranjevanjem pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

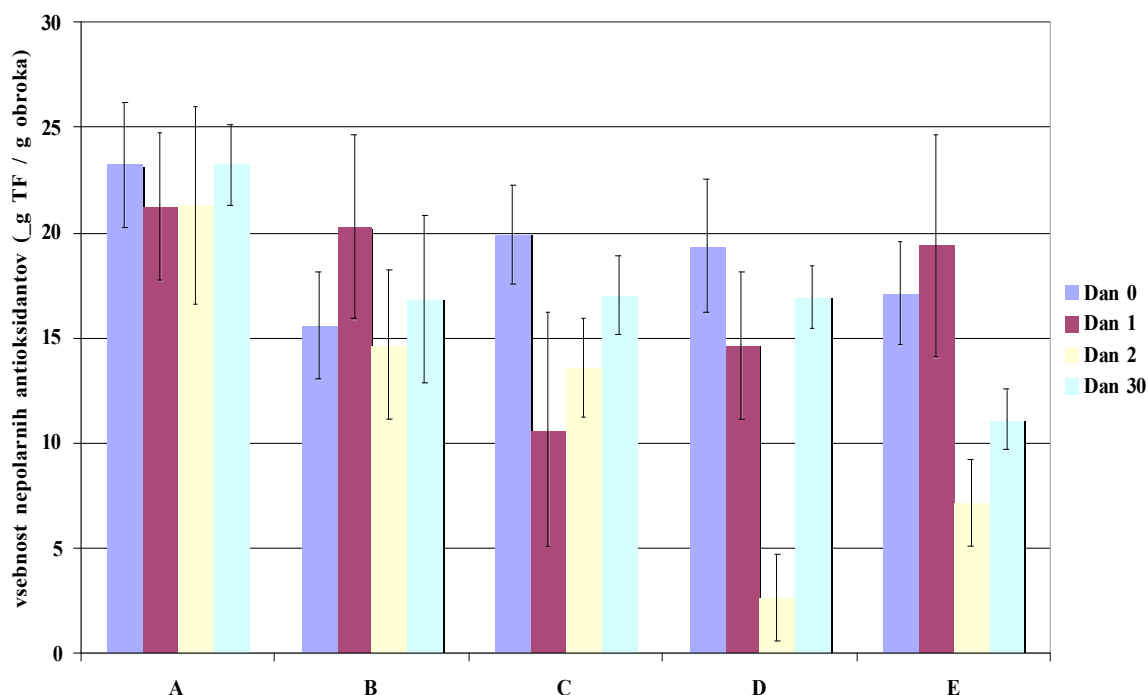
4.3.2.3 Vpliv dodatnega zniževanja pH na stabilnost antioksidantov v obroku

Obrok smo skuhali in ga ohladili ter razdelili na tri enake dele. Prvi del obroka smo homogenizirali kot takega. pH homogenata je bil 5,3, temperatura po koncu homogenizacije pa 11 °C. Drugi del obroka smo homogenizirali v 1,4 % MFK, pH tako pripravljenega homogenata je bil 3,9, temperatura po koncu homogenizacije pa 10 °C. Tretji del obroka smo homogenizirali v mešanici 1,4 % MFK in 2 % H₃PO₄. pH homogenata je bil 2,5, temperatura po koncu homogenizacije pa 10 °C. Da bi preverili vpliv masnega deleža dodanih kislin na stabilnost antioksidantov, smo alikvotom vzorcev dodali vodo, MFK ali H₃PO₄ kot je prikazano v tabeli 3. pH alikvotov, ki so vsebovali samo vodo je bil 5,3, pH alikvotov, ki so vsebovali vodo in 1,4 % MFK je bil 3,9, pH alikvotov, ki so vsebovali 3,4 % MFK je bil 2,7 in pH alikvotov, ki so vsebovali 1,4 % MFK in 2 % H₃PO₄ je bil 2,5. Ker je bilo potrebno dodatke porazdeliti po vzorcu, smo suspenzijo v posameznih centrifugirkah mešali na vrtničniku približno 10 sekund, nato pa vzorce zamrznili v tekočem dušiku. Del vzorcev smo še isti dan analizirali, del pa shranili na -20 °C.



Slika 20: Primerjava vsebnosti polarnih antioksidantov v obrokih glede na ustrezne dodatke kislin pred in po homogenizaciji, določenih z DPPH[•] in podanih kot µg ekvivalentov askorbinske kisline na g obroka. Temperatura shranjevanja je bila -20 °C. A – homogenizirano v vodi z naknadnim dodatkom vode, B – homogenizirano v MFK z naknadnim dodatkom vode, C – homogenizirano v MFK z naknadnim dodatkom MFK, D – homogenizirano v MFK z naknadnim dodatkom H₃PO₄; E – homogenizirano v MFK in H₃PO₄ z naknadnim dodatkom vode

Kot je razvidno s slike 20 je stabilnost polarnih antioksidantov neposredno povezana s pH. Razlika med določeno antioksidativno aktivnostjo vzorcev homogeniziranih pri pH 5,3 in 2,5, zamrznjenih v tekočem dušiku in še isti dan analiziranih je skoraj 40 % (stolpca A in E). Z nižanjem pH se povečuje stabilnost polarnih antioksidantov, čeprav procesa oksidacije zamrznjenih vzorcev ne moremo zaustaviti niti pri pH 2,5 (slika 20, stolpec E; 20E), kar pomeni, da je vzorce za antioksidativno aktivnost najboljše analizirati še isti dan, ko jih homogeniziramo.



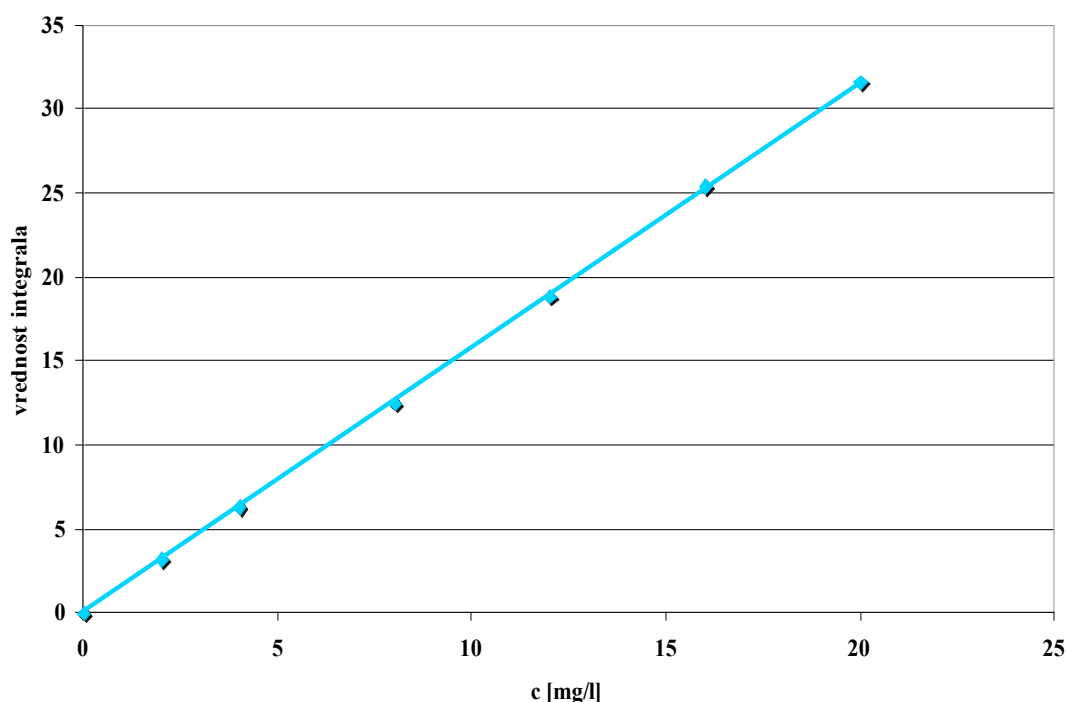
Slika 21: Primerjava vsebnosti nepolarnih antioksidantov v obrokih glede na ustrezne dodatke kislin pred in po homogenizaciji, določenih z DPPH[•] in podanih kot μg ekvivalentov α -tokoferola na g obroka. Temperatura shranjevanja je bila $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A – homogenizirano v vodi z naknadnim dodatkom vode, B – homogenizirano v MFK z naknadnim dodatkom vode, C – homogenizirano v MFK z naknadnim dodatkom MFK, D – homogenizirano v MFK z naknadnim dodatkom H_3PO_4 ; E – homogenizirano v MFK in H_3PO_4 z naknadnim dodatkom vode

Določena antioksidativna aktivnosti za nepolarne antioksidante prikazana na sliki 21 je precej nižja kot pri prejšnjih obrokih. Čeprav so bili določeni vzorci pri predhodnih eksperimentih homogenizirani pri enakih pogoji, 21B ustreza 17E in 19A, vidimo, da predstavlja določena antioksidativna aktivnost v vzorcu 21B le okoli polovico antioksidativne aktivnosti, ki smo jo določili za vzorca 17E in 19A. Opazne so tudi izredno velike razlike med posameznimi določitvami prikazanimi na sliki 21, ki jih ne moremo razložiti s procesi oksidacije med zamrzovanjem. Edina razlika v postopku glede na predhodnje je bila, da smo v eksperimentu, katerega rezultati so prikazani na sliki 21, vzorce pred zamrzovanjem za nekaj sekund mešali na vrtničniku. Možno je, da smo z mešanjem v vzorce vnesli večje količine kisika in jih izpostavili svetlobi, kar bi lahko pospešilo oksidacijo nepolarnih antioksidantov (Park in sod., 2004).

4.4 KROMATOGRAFSKO DOLOČANJE ASKORBINSKE KISLINE

V vzorcih smo s HPLC poleg antioksidativne aktivnosti določali tudi askorbinsko kislino. Predvsem so nas zanimala spremembe koncentracije askorbinske kisline v odvisnosti od različnih metod homogenizacije, ekstrakcije, različnih dodatkov kislin in reducentov. Najprej smo naredili umeritveno krivuljo za kromatografsko določanje askorbinske kisline.

4.4.1 Umeritvena krivulja za kromatografsko določanje askorbinske kisline



Slika 22: Umeritvena krivulja askorbinske kisline (♦) na HPLC sistemu. Odvisnost vrednosti integrala meritve od koncentracije. Kolona Synergie C₁₈ 250 mm x 4 mm, mobilna faza fosfat pH 2,9, pretok 0,6 ml/min, detekcija pri 254 nm.

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

$$\gamma_{\text{ASK}} (\text{mg/L}) = \text{vrednost integrala} / 1,5803$$

4.4.2 Določanje askorbinske kisline v zelju

Stabilnost askorbinske kisline smo najprej preučevali v zelju, ker ta predstavlja relativno enostaven matriks in vsebuje večje količine askorbinske kisline. Zanimala nas je predvsem stabilnost askorbinske kisline pri različnih pogojih homogenizacije.

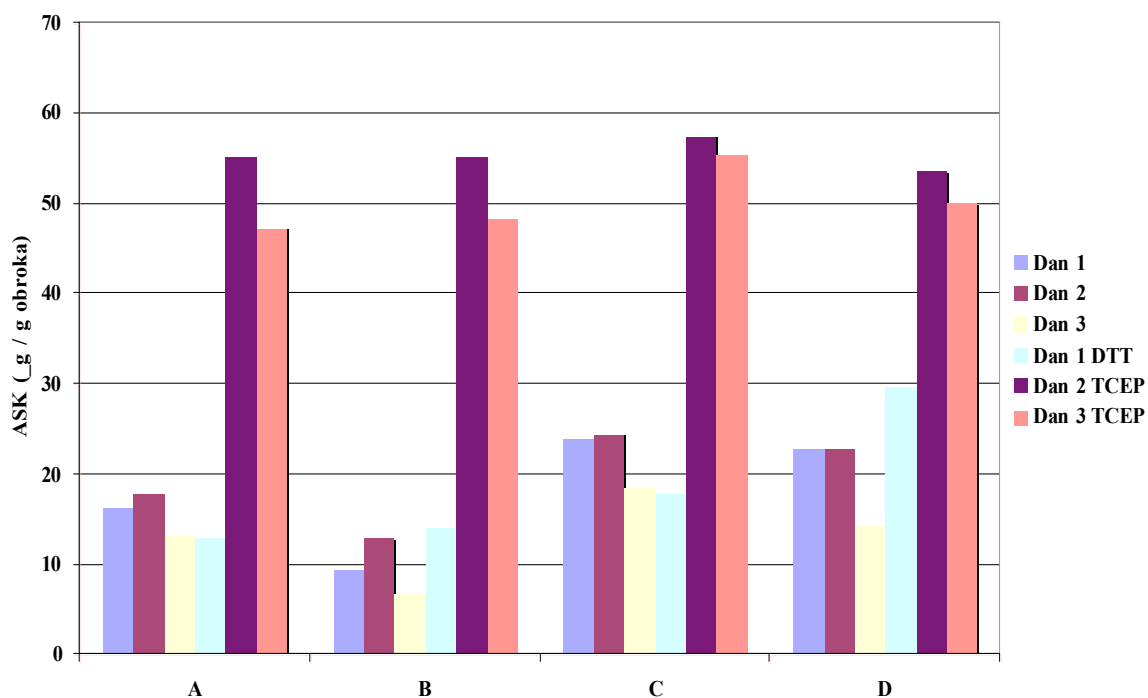


Slika 23: Vpliv različnih postopkov homogenizacije in priprave vzorcev na delež askorbinske kisline v zelju. A – homogenizirano v 1,4 % metafosforni kislini, B – homogenizirano v 15 mM DTT, po homogenizaciji dodana 2 % metafosforna kislina, C – homogenizirano v 15 mM DTT, po homogenizaciji dodana voda, D – homogenizirano v 15 mM DTT pH 7, po homogenizaciji dodana 2 % metafosforna kislina, E – homogenizirano v 15 mM DTT pH7, po homogenizaciji dodana voda, F – homogenizirano v vodi, po homogenizaciji dodana 2 % metafosforna kislina, G – homogenizirano v vodi, po homogenizaciji dodana voda, H – homogenizirano v vodi, po homogenizaciji dodan 150 mM DTT

Rezultati prikazani na sliki 23 se skladajo z meritvami stabilnosti askorbinske kisline v kompleksnih matriksih, ki smo jo spremljali z DPPH[•]. Največ askorbinske kisline smo določili, ko smo jo homogenizirali v 1,4 % MFK (23A). Ob upoštevanju razredčitev smo v gramu zelja določili 493 µg askorbinske kisline. Podobne rezultate smo dobili tudi ob dodatku reducenta DTT, ki delno prepreči oksidacijo askorbinske kisline (23B-23E). Homogenizacija v vodi (23F-23H) je pokazala, da je askorbinska kislina pri teh pogojih zelo nestabilna. Že po dveh minutah homogenizacije se je oksidiralo skoraj 60 % odstotkov askorbinske kisline (23F). Če oksidacije nismo prekinili z metafosforno kislino (23G), ni preostalo praktično nič več askorbinske kisline, čeprav smo vzorce analizirali še isti dan. Po dodatku reducenta DTT v homogenat (23H), smo določili več askorbinske kisline kot v primeru (23F), kar pomeni, da je med homogenizacijo nastalo precej dehidroaskorbinske kisline, ki smo jo lahko reducirali nazaj v askorbinsko kislino.

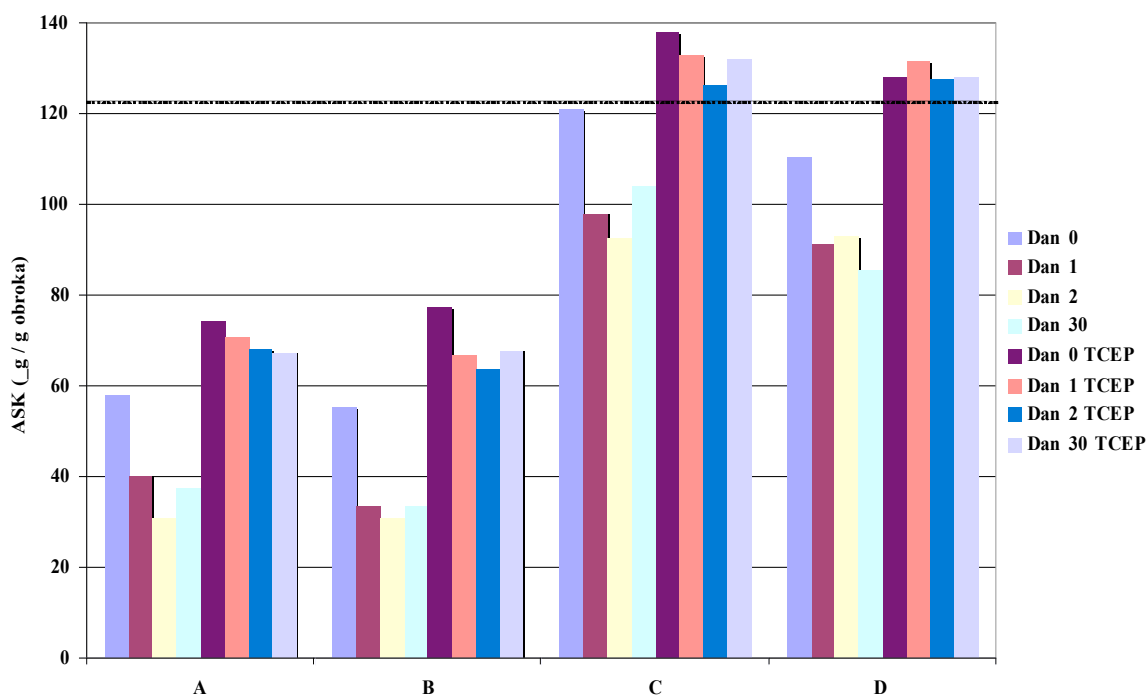
Kljub temu, da DTT lahko reducira dehidroaskorbinsko kislino, smo največji delež askorbinske kisline določili po homogenizaciji v MFK. Očitno se v prisotnosti DTT, ki je dober reducent le okoli nevtralnega pH, določen delež askorbinske kisline ireverzibilno razgradi.

4.4.3 Določanje askorbinske kisline v obroku



Slika 24: Primerjava kromatografsko določene vsebnosti askorbinske kisline in dehidroaskorbinske kisline v obrokih homogeniziranih z in brez MFK. A - brez dodatka MFK in zamrznjeno takoj po homogenizaciji, B - brez dodatka MFK in zamrznjeno 1 uro po homogenizaciji, C - z dodatkom MFK in zamrznjeno takoj po homogenizaciji, D - z dodatkom MFK in zamrznjeno 1 uro po homogenizaciji

S slike 24 je razvidno, da MFK oziroma nizek pH stabilizirata askorbinsko kislino v homogenatu. Vrednosti nereduciranih vzorcev v stolpcih C in D so ustrezno večje od vrednosti v stolpcih A in B. Podobno kot pri določanju antioksidativne aktivnosti tudi tu opazimo zmanjševanje vsebnosti askorbinske kisline med shranjevanjem. Za analizo skupnega vitamina C, ki vključuje askorbinsko in dehidroaskorbinsko kislino, smo vzorce prvi dan reducirali z DTT. Pri analizah, ki smo jih opravili drugi in tretji dan smo uporabili TCEP raztopljen v MFK. Določene vrednosti skupnega vitamina C so precej večje, če smo uporabili TCEP. To se sklada z meritvami pri zelju, ko smo ugotovili, da DTT zaradi nevtralnega pH, pri katerem je učinkovit, ni najbolj primeren za redukcijo dehidroaskorbinske kisline v kompleksnem matriksu. Pri TCEP regulacija pH ni potrebna. TCEP dobro učinkuje tudi v metafosforni kislini, kjer je askorbinska kislina najbolj stabilna, zato smo se odločili, da za nadaljnje poskuse uporabljamo izključno reducent TCEP.

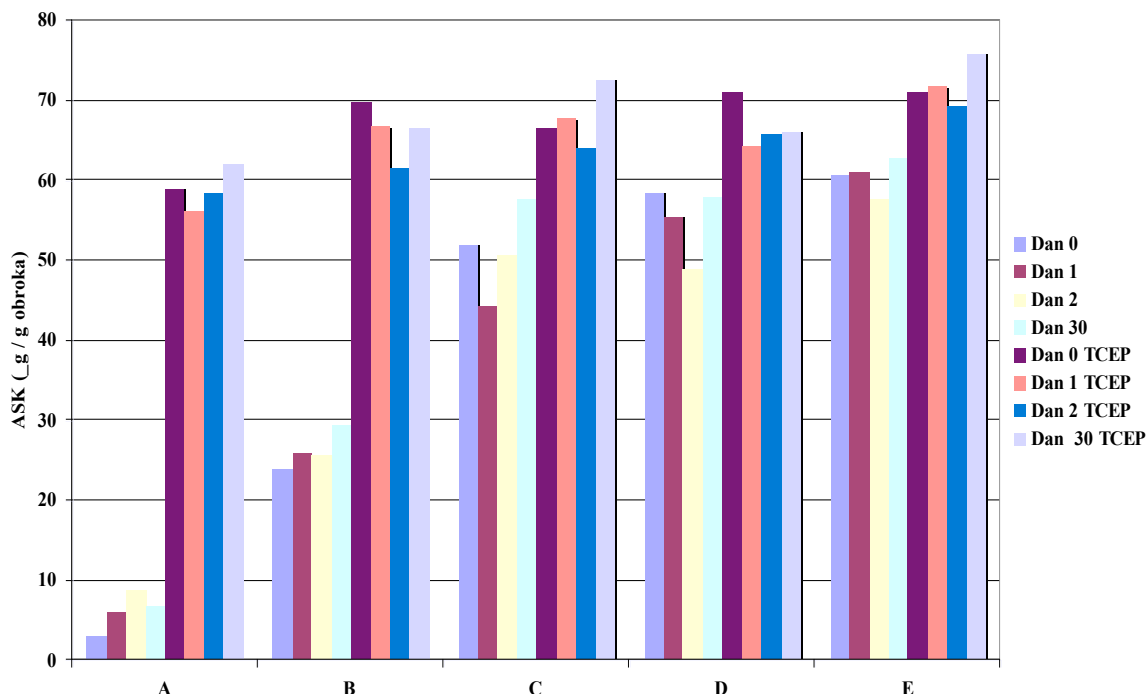


Slika 25: Primerjava kromatografsko določene vsebnosti askorbinske kisline in dehidroaskorbinske kisline v obrokih s in brez standardnega dodatka askorbinske kisline: A - z dodatkom MFK in zamrznjeno takoj po homogenizaciji, B - z dodatkom MFK in zamrznjeno 1 uro po homogenizaciji, C - z dodatkom MFK in standardnim dodatkom askorbinske kisline zamrznjeno takoj po homogenizaciji, D - z dodatkom MFK in standardnim dodatkom askorbinske kisline zamrznjeno 1 uro po homogenizaciji

Na sliki 25 je prikazana določena vsebnost askorbinske kisline v vzorcih homogeniziranih v MFK. Polovici obroka (25C in 25D) je bilo pred homogenizacijo dodano 65 μg askorbinske kisline na g obroka. Za razliko od prvega obroka smo opravljali analize še isti dan, ko smo vzorce homogenizirali. Izkoristek ekstrakcije dodane askorbinske kisline je izjemno dober in znaša 97 %.

Določene vsebnosti askorbinske kisline na dan homogenizacije v vzorcih brez dodatka reducenta (25A in 25B) so precej večje kot vrednosti, ki smo jih določili za te vzorce naslednji dan oziroma pri prvem obroku (24C in 24D) in tako potrdili, da zmanjšanje antioksidativne aktivnosti v veliki meri lahko pripišemo oksidaciji askorbinske kisline. Razlika v določeni askorbinski kislini med dnevom nič in kasnejšimi meritvami za posamezne vzorce na sliki 25 ustreza zmanjšanju antioksidativne aktivnosti polarnih antioksidantov prikazane na sliki 18. Razmerje med askorbinsko kislino in skupnim vitaminom C, ki smo ga za posamezne vzorce določili z redukcijo, je precej večje ob dnevu nič, kot pa po nekajdnevem shranjevanju na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, kar pomeni, da večina dehidroaskorbinske kisline nastane kot rezultat homogenizacije in shranjevanja in ne med pripravo obroka. Vsebnost skupnega vitamina C, določena pri redukcijskih pogojih, se med shranjevanjem zmanjšuje počasneje, kar pomeni, da je oksidirana oblika askorbinske kisline, dehidroaskorbinska kislina, med shranjevanjem zamrznjenih vzorcev bolj stabilna.

Hiter razpad askorbinske kisline med shranjevanjem zamrznjenih vzorcev je pomanjkljivost, ki smo jo skušali odpraviti z dodatnim nižanjem pH homogenata.



Slika 26: Primerjava kromatografsko določene vsebnosti askorbinske kisline glede na ustrezne dodatke kislin pred in po homogenizaciji. A – homogenizirano v vodi z naknadnim dodatkom vode, B – homogenizirano v MFK z naknadnim dodatkom vode, C – homogenizirano v MFK z naknadnim dodatkom MFK, D – homogenizirano v MFK z naknadnim dodatkom H_3PO_4 , E – homogenizirano v MFK in H_3PO_4 z naknadnim dodatkom vode

Na sliki 26 so prikazane vsebnosti askorbinske kisline in skupnega vitamina C pri vzorcih, ki se razlikujejo v pH homogenizacije in po naknadni stabilizaciji homogenata s kislinami. Meritve so opravljene na istih obrokih, ki so opisani pod točko 4.3.2.3. Že pri določitvi vsebnosti nepolarnih antioksidantov pri tako pripravljenih obrokih (slika 21) smo ugotovili, da so rezultati nezanesljivi, saj smo vzorce pred zamrznitvijo močno aerirali, kar je lahko povzročilo oksidacijo določenih antioksidantov. Kljub temu, da je bila ASK homogenizirana v MFK (26B), smo jo določili polovico manj kot v vzorcu, kjer homogenata z MFK nismo pomešali na vrtničniku (25A). Razlika v določenem skupnem vitaminu C ni tako velika, kar pomeni, da je šlo pretežno za oksidacijo v dehidroaskorbinsko kislino. Kljub manj optimalni pripravi vzorcev pa je razvidno, da z nižanjem pH homogenizacije in shranjevanja določimo vse več askorbinske kisline, medtem ko se skupna vsebnost vitamina C ne spreminja (Priloga B). Prednost znižanega pH med homogenizacijo je tudi ta, da je določena vsebnost askorbinske kisline praktično enaka ob dnevu nič kot po enem mesecu shranjevanja (26E).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V okviru diplomskega dela smo optimizirali postopke priprave vzorcev, da bi zagotovili čim večjo stabilnost polarnih in nepolarnih antioksidantov v kompleksnem matriksu kot je obrok. Za določevanje antioksidativne aktivnosti smo uporabili test, ki temelji na redukciji radikala DPPH[•]. Izbrali smo antioksidante kot so askorbinska kislina, dehidroaskorbinska kislina, klorogenska kislina, α -tokoferol in trolox ter določili molsko razmerje pri reakciji med DPPH[•] in ustreznim antioksidantom. Ugotovili smo, da je molsko razmerje za α -tokoferol in trolox, ki je vodotopen analog vitamina E, praktično enako in ima vrednost 1,7 (preglednica 5). Molsko razmerje za askorbinsko kislino je 1,9, dehidroaskorbinska kislina pa praktično ne reagira z DPPH[•]. Vrednosti so nekaj nižje kot je teoretična vrednost 2 (Molyneux, 2004; Arnao, 2001), ki temelji na določenem številu vodikov, ki jih molekula antioksidanta lahko odda. Odstopanja od teoretične vrednosti se najverjetneje pojavljajo zaradi določenega deleža nečistoč v standardu, nepopolne reakcije in medsebojne reakcije delno oksidiranih antioksidantov. Standardne raztopine antioksidantov smo testirali tudi s Folin-Ciocalteaujevim reagentom, ki se uporablja predvsem za določanje skupnih polifenolov (slika 10). Ugotovili smo, da ta dobro reagira tudi z drugimi antioksidanti kot so askorbinska kislina, glutation in dehidroaskorbinska kislina, medtem ko nepolarnega α -tokoferola zaradi obarjanja nismo mogli določiti. Čeprav so metode kot je Folin, pri katerih merimo prirast absorbance, bolj občutljive od metod, pri katerih merimo zmanjšanje absorbance, kot je metoda z DPPH[•] (Roginsky in Lissi, 2005), smo se odločili za slednjo. Razloga sta predvsem dva. Z DPPH[•] lahko določamo tako polarne kot nepolarne antioksidante. Prednost metode je tudi ta, da za razliko od Folina, dehidroaskorbinska kislina z radikalom praktično ne reagira, kar pomeni, da lahko z DPPH[•] spremljamo oksidacijo askorbinske kisline.

V literaturi je pogostokrat omenjeno, da je askorbinska kislina relativno nestabilna v vodnih raztopinah, v katerih je raztopljen kisik, predvsem pri višjih pH vrednostih. Proces oksidacije do dehidroaskorbinske kisline ob prisotnosti katalitskih koncentracij bakrovih in železovih ionov ter ionov drugih prehodnih kovin (Koshiishi in sod., 1998), ki pospešijo oksidacijo, je reakcija prvega reda glede na askorbinsko kislino (Immer in sod., 2003). Tudi sami smo ugotovili, da je askorbinska kislina relativno stabilna pri pH vrednostih, ki so nižje od 3 (slika 12). V 2 % metafosforni kislini, ki ima pH okoli 2, je po enem dnevu razpadlo le 5 % askorbinske kisline, v acetatnem pufru pH 4 pa približno 85 % askorbinske kisline. V vodovodni vodi, ki zagotovo vsebuje katalitske koncentracije kationov, ki lahko pospešijo oksidacijo, se je praktično vsa askorbinska kislina razgradila že po eni uri.

Preden smo se lotili analiz pravega obroka smo analizirali gotovo omako iz zelenjave in mesa. Za že pripravljeno omako smo se odločili zaradi podobne sestave makrokomponent kot jo ima obrok. Na ta način smo lahko preverili in optimizirali metode in postopke dela na relativno enostaven ter hiter način in s poceni surovino. Ker je bila omaka relativno

homogena, smo lahko zaradi kratke homogenizacije dejansko spremljali stabilnost antioksidantov med shranjevanjem v različnih medijih ter izkoristek oz. učinkovitost ekstrakcije. Učinkovitost ekstrakcije nepolarnih antioksidantov smo testirali s heksanom in etil acetatom. Želeli smo preveriti ali je etil acetat dovolj učinkovit za ekstrakcijo, saj bi ostanki heksana v polarni fazi, v kateri smo naknadno določali askorbinsko kislino, lahko povzročali težave pri kromatografskem določevanju askorbinske kisline. Meritve so pokazale, da je etil acetat ne samo zadovoljiv, ampak za ekstrakcijo skupnih nepolarnih antioksidantov celo bolj primeren (preglednica 7), hkrati pa bistveno ne vpliva na polarne antioksidante.

V prvi fazi smo sam postopek homogenizacije in ekstrakcije izvajali na podoben način kot avtorji, ki so določali skupno antioksidativno aktivnost v že pripravljenih juhah (Arnao in sod., 2001). Rezultati meritev (slika 13C) so pokazali, da se askorbinska kislina pri naših pogojih relativno hitro oksidira. Mnogo večjo stabilnost smo dosegli, če smo pred homogenizacijo pH znižali z metafosforno kislino (slika 13B). Dodatek citrata, ki v modelnih raztopinah upočasni oksidacijo (Imer in sod., 2003; Arya in sod., 2000; Erel, 2004), ni imel praktično nobenega učinka na hitrost oksidacije (slika 13D). Zato smo se odločili, da ga v obrok ne bomo dodali.

Znano je, da na stabilnost nepolarnih antioksidantov vplivajo temperatura (Miquel in sod., 2004), svetloba (Okogeri in Tasioula-Margari, 2002) in kisik (Park in sod., 2004). Tudi sami smo v prvi fazi določili približno 30 % izkoristke ekstrakcije tokoferola, vendar večjih razlik v odvisnosti od pH nismo opazili, čeprav naj bi nizek pH stabiliziral nepolarne antioksidante (Osborn-Barnes in Akoh, 2003). Za razliko od askorbinske kisline, katere vsebnost se je zmanjševala v homogenizirani omaki po nekaj urah, je bila določena vsebnost nepolarnih antioksidantov prenizka, a praktično konstantna v tem časovnem okviru. Vzrok za slab izkoristek je lahko povezan z oksidacijo med fazo intenzivne aeracije ob homogeniziranju, nepopolno ekstrakcijo ali s slabo porazdelitvijo standardnega dodatka po vzorcu. Da ravno slednje predstavlja velik delež pri slabem izkoristku smo ugotovili tako, da smo standardni dodatek namesto v etil acetatu, ki se slabo meša z vodo, raztopili etanolu. Pri tem se je izkoristek ekstrakcije praktično podvojil na 70 %.

Po analizah omake smo analizirali še bolj kompleksen matriks – obrok. Zaporedno smo pripravili tri obroke. Pri prvem obroku smo preverjali predvsem vpliv dodane metafosforne kisline na stabilnost antioksidantov v homogeniziranem obroku v okviru ene ure, kakor tudi vpliv daljšega shranjevanja na -20 °C. Ugotovili smo, da se koncentracija polarnih antioksidantov signifikantno zmanjša, če homogeniziran vzorec stoji eno uro na temperaturi okoli 10 °C. Proces se upočasni pri zamrznjenih vzorcih, vendar je tudi tu opazno zmanjševanje antioksidativne aktivnosti. V obroku, kateremu smo dodali metafosforno kislino, smo določili več polarnih antioksidantov, vendar se je njihova koncentracija med shranjevanjem tudi tu zmanjševala (slika 16C in 16D), kar pomeni, da je bil pH 3,9 očitno previsok. Relativno visok pH je najverjetneje posledica velike pufirske kapacitete sistema, saj ta vsebuje precej proteinov in soli organskih kislin. Podobno kot za polarne, velja tudi za nepolarne antioksidante. Dodatek metafosforne kisline jih stabilizira, vendar ne dovolj saj se njihova koncentracija med shranjevanjem zmanjšuje (slika 17C in 17D).

Pri drugem obroku smo določali izkoristek ekstrakcije α -tokoferola in askorbinske kisline v obroku, homogeniziranem pri enakih pogojih kot pri prvem eksperimentu. Izkoristka ekstrakcije sta bila nekaj manjša kot pri omaki (slika 18 in slika 13), kar je lahko posledica daljšega časa homogenizacije in s tem povezane zmanjšane antioksidativne aktivnosti. Antioksidativna aktivnost se je zmanjševala tudi, če smo vzorce hranili na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, kar pomeni, da smo morali še dodatno znižati pH.

Pri tretjem obroku smo uspeli s kombinacijo fosforne in metafosforne kisline pH znižati na 2,5. Izkazalo se je, da je pomemben predvsem pH vzorca in ne toliko katero kislino uporabimo. S slike 20 je razvidno, da nižji kot je pH, več polarnih antioksidantov določimo. Vendar tudi pri pH 2,5 nismo uspeli zaustaviti razgradnje polarnih antioksidantov med zamrzovanjem, zato je v vsakem primeru potrebno skupne polarne antioksidante določiti takoj po homogenizaciji. Pri nepolarnih antioksidantih smo določili relativno malo antioksidantov v primerjavi s prejšnjimi obroki. Opazno je tudi veliko nihanje določenih vrednosti. Predvidevamo, da je razlog za manjšo antioksidativno aktivnost v močni aeraciji vzorcev pred zamrzovanjem. V vzorcu brez dodane kisline, ki ga edinega nismo aerirali, smo namreč določili največ antioksidantov, čeprav smo predhodno ugotovili (slika 21A), da nižji pH stabilizira nepolarne antioksidante v obroku. Za povečanje stabilnosti nepolarnih in polarnih antioksidantov bi bila zagotovo najprimernejša homogenizacija v vakumu ali v dušikovi atmosferi. V primeru tehničnih omejitev pa je možno prepihanje z dušikom tik pred zamrzovanjem (Chen in Bergman, 2005).

Kot smo prikazali na modelnih sistemih, je askorbinska kislina izjemno nestabilna v prisotnosti kisika pri pH vrednostih višjih od 3 in se hitro oksidira v dehidroaskorbinsko kislino. To se lahko zgodi že med samo homogenizacijo, če pH ni zadosti nizek. Tako so Gökmen in sodelavci (2000) določili izjemno velike deleže dehidroaskorbinske kisline pri določenih vrstah sadja in zelenjave, kar je bolj odraz vsebnosti kislin, ki znižajo pH med homogenizacijo in preprečijo oksidacijo do dehidroaskorbinske kisline, kot pa dejanske vsebnosti dehidroaskorbinske kisline.

Na primeru zelja smo pokazali, da se brez dodane kisline večina askorbinske kisline oksidira že v dveh minutah. Potrebna je torej velika previdnost pri delu in interpretaciji rezultatov, da določimo pravo razmerje med dehidroaskorbinsko in askorbinsko kislino. Za določanje skupnega vitamina C se pogostokrat uporablja metoda, ki temelji na redukciji dehidroaskorbinske kisline v askorbinsko kislino, katero nato kromatografsko določimo. Najpogostejše se kot reducent v literaturi omenja DTT (Gibbons in sod., 2001; Jansson in sod., 2004; Gökmen in sod., 2000). Ugotovili smo, da reducent DTT, ki deluje okoli nevtralnega pH, ni najbolj primeren za redukcijo dehidroaskorbinske kisline v kompleksnem matriksu, saj je hitrost oksidacije askorbinske kisline primerljiva s hitrostjo redukcije z DTT in na ta način določimo premalo skupnega vitamina C. V literaturi smo zasledili članek, kjer so uporabljali reducent TCEP, ki naj bi bil aktiven tudi pri nižjem pH (Lykkesfeldt, 2000). Rezultati so pokazali, da je TCEP dober reducent tudi pri pH okoli 2, v 2 % metafosforni kislini, kjer ne prihaja do oksidacije askorbinske kisline. Reducirani vzorci so stabilni tudi po nekaj dneh hranjenja pri sobni temperaturi, kar predstavlja veliko prednost glede na redukcijo z DTT. Uporaba TCEP podaja izhodišča za nadaljnje raziskave, saj je objavljeno zelo malo literature na to temo.

Iz primerjave določenih polarnih antioksidantov v obroku (slika 20E) in kromatografsko določene vsebnosti askorbinske kisline (slika 26E) je razvidno, da slednja prispeva več kot polovico antioksidativne aktivnosti. Askorbinska kislina je tudi med najbolj labilnimi antioksidanti v obroku med shranjevanjem, saj zmanjšanje antioksidativne aktivnosti pri vzorcih ustreza padcu vsebnosti askorbinske kisline (sliki 18 in 25). Zanimivo je, da se vsebnost skupnega vitamina C med shranjevanjem le malo spreminja. Povečuje se le delež dehidroaskorbinske kisline na račun askorbinske kisline. To se sklada z literaturnimi podatki, ki navajajo da se razpad dehidroaskorbinske kisline upočasni pri nižjih temperaturah (Gibbons, 2001). Izjema je že omenjen tretji obrok, kjer smo vzorce pred zamrzovanjem aerirali. V tem primeru so bile razlike med vzorci v stopnji aeracije in s tem povezani trenutni oksidaciji najverjetneje večje od razlik pri počasnejši oksidaciji med zamrzovanjem, tako da zmanjševanja med zamrzovanjem nismo opazili.

Glede na pridobljene eksperimentalne podatke lahko sklepamo, da lahko za določitev skupnega vitamina C vzorce shranimo v zamrzovalniku tudi daljši čas, najmanj do enega meseca. Za določitev razmerja med askorbinsko in dehidroaskorbinsko kislino v vzorcih pa je smiselno opraviti analize v čim krajšem času po homogenizaciji.

Ker smo preverjali različne postopke priprave in shranjevanja vzorcev, tehnično ni bilo možno izvesti več ponovitev za posamezen vzorec na določen dan. To pomeni, da v večini primerov nismo mogli določiti standardne deviacije eksperimentalno določenih vrednosti.

V diplomski nalogi so opisani postopki homogenizacije, ekstrakcije in samih meritev, ki omogočajo hitro in enostavno določitev polarnih in nepolarnih antioksidantov ter vsebnosti askorbinske in dehidroaskorbinske kisline v kompleksnih vzorcih.

5.2 SKLEPI

Na osnovi opravljenega dela lahko povzamemo naslednje sklepe:

- ✓ Radikalom DPPH[•] reagira z askorbinsko kislino in α -tokoferolom v razmerju 1,9:1 oziroma 1,7:1, kar je nekoliko manj od teoretične vrednosti 2:1. Dehidroaskorbinska kislina z radikalom DPPH[•] ne reagira.
- ✓ Antioksidanti v kompleksnem matriksu so zelo nestabilni. pH pomembno vpliva na stabilnost antioksidantov. Askorbinska kislina je relativno stabilna pri pH vrednostih nižjih od 3, pri višjih pH vrednostih se hitro oksidira v dehidroaskorbinsko kislino.
- ✓ Ker je oksidacija relativno hiter proces, je potrebno pH znižati že pred homogenizacijo. Homogeniziramo čim krajši čas in pri čim nižji temperaturi.
- ✓ Za ekstrakcijo nepolarnih antioksidantov iz kompleksnega matriksa je etil acetat bolj primeren kot heksan, ker ekstrahira več antioksidantov. Poleg tega se tako izognemo nekompatibilnosti topil pri kromatografski določitvi vitamina C.
- ✓ Nepolarni antioksidanti so občutljivi na kisik. Pri samih postopkih homogenizacije, odvzema vzorcev in ekstrakcije je potrebno izbrati take postopke, ki v vzorce vnašajo čim manjše količine kisika.
- ✓ Relativno visoka določena vsebnost dehidroaskorbinske kisline v sadju in zelenjavi ter drugih kompleksnih matriksih je lahko rezultat nepravilnih postopkov stabilizacije askorbinske kisline. Pri dodatku kisline pred homogenizacijo dehidroaskorbinske kisline v zelju ne določimo, kljub omembi v literaturi.
- ✓ Askorbinska kislina, ki v našem modelnem obroku predstavlja več kot polovico polarnih antioksidantov, je najbolj labilen vodotopni antioksidant. Zmanjšanje antioksidativne aktivnosti ustreza zmanjšanju kromatografsko določene vsebnosti askorbinske kisline.
- ✓ Učinkovanje reducenta DTT je omejeno na pH vrednosti večje od 6, kjer je askorbinska kislina relativno nestabilna. Zato s tem reducentom določimo premalo skupnega vitamina C. TCEP, ki učinkuje pri pH okoli 2, je zaradi relativno dobre stabilnosti askorbinske kisline pri teh pogojih primernejši reducent.
- ✓ Pravilne vsebnosti skupnega vitamina C v vzorcih lahko določimo tudi po enem mesecu, če so ti shranjeni v kislem pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antioksidativna aktivnost se med zamrovanjem zmanjšuje, tako da moramo meritve opraviti čim hitreje po homogenizaciji.

6 POVZETEK

V diplomski nalogi smo preiskovali vpliv homogenizacije, ekstrakcije in shranjevanja na stabilnost polarnih in nepolarnih antioksidantov ter askorbinske kisline v kompleksnih matriksih. Cilj diplomskega dela je bil optimizacija postopkov priprave vzorcev, s katerimi bi zagotovili stabilnost antioksidantov. Antioksidativno aktivnost smo določali s prostim radikalom DPPH[•], ki omogoča enostavno in rutinsko merjenje aktivnosti. Vsebnost askorbinske kisline smo določali s HPLC.

Z uporabo standardnih raztopin askorbinske kisline in α -tokoferola smo določili molsko razmerje reakcije med antioksidantoma in DPPH[•]. Pridobljene podatke smo uporabili za izražanje skupne antioksidativne aktivnosti, kakor tudi za analizo stabilnosti standardnih dodatkov obeh antioksidantov.

Diplomsko delo smo nadaljevali na gotovi omaki iz zelenjave in mesa. Omaka je relativno kompleksen matriks, ima podobno sestavo kot obrok in je že delno homogenizirana. Pokazali smo, da je za ekstrakcijo nepolarnih antioksidantov etil acetat primernejši od heksana. Ugotovili smo, da je za stabilizacijo polarnih antioksidantov nujno potrebno znižati pH že pred homogenizacijo. V vzorcih, v katere nismo dodali metafosforne kisline, se je na sobni temperaturi po enem dnevu razgradil praktično ves standardni dodatek askorbinske kisline. Pri α -tokoferolu tega nismo opazili.

V obroku smo poleg antioksidativne aktivnosti kromatografsko določali tudi vsebnost askorbinske kisline. pH vzorca pri postopku homogenizacije bistveno vpliva na stabilnost polarnih antioksidantov, še posebno na stabilnost askorbinske kisline. Z zniževanjem pH do 2,5 med homogenizacijo smo povečali določeno vsebnost askorbinske kisline in skupnih polarnih antioksidantov. Toda tudi pri teh vzorcih nismo uspeli preprečiti zmanjševanja antioksidativne aktivnosti med zamrzovanjem.

Za določanje skupnega vitamina C smo dehidroaskorbinsko kislino pred analizo reducirali. Ugotovili smo, da relativno nov reducent TCEP, ki deluje v širokem spektru pH vrednosti, tudi pri pH 2, predstavlja dobro alternativo redukciji z DTT. Slednja učinkovito deluje le pri pH vrednostih večjih od 6, kjer je askorbinska kislina nestabilna.

7 VIRI

- Ames B.N., Gold L.S., Willet W.C. 1995. The causes and prevention of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 12: 5258–5265.
- Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 7915–7922.
- Andersen M.L., Lauridsen R.K., Skibsted L. 2005. Power of phenolic compounds. V: *Phytochemical functional foods*. Johnson I., Williamson G. (eds.). Cambridge, England, Woodhead Publishing Ltd.: 315-346
- Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., Robards K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127: 183-198.
- Arnao M.B., Cano A., Acosta M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry* 73: 239-244.
- Arya S.P., Mahajan M., Jain P. 2000. Non-spectrophotometric methods for the determination of vitamin C. *Analytica Chimica Acta*, 417: 1-14.
- Ausman L.M. 1999. Criteria and recommendations for vitamin C intake. *Nutrition Reviews*, 57: 222-224
- Ayedoğmuş Z., Çetin M., Üstün Özgür M. 2002. Determination of ascorbic acid in vegetables by derivate spectrophotometry. *Turkish Journal of Chemistry*, 26: 697-704.
- Ball G.F.M. 1998. Bioavailability and analysis of vitamins in foods. London, Chapman and Hall: 517-560.
- Basu T.K., Dickerson J.W.T. 1996. Vitamins in human health and disease. Wallingford, CAB International: 125-146.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie/Food Science and Technology*, 28: 25-30.
- Cao G., Sofic E., Prior R.L. 1996. Antioxidant capacity of tea common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 3426-3431.
- Chen M.H., Bergman C.J. 2005. A rapid procedure for analysing rice bran tocopherol, tocotrienol, γ -oryzanol contents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18: 319-331.

- Cooney R.V., Franke A.A., Harwood P.J., Hatch-Pigott V., Custer L.J., Mordan L.J. 1993. Gamma-tocopherol detoxification of nitrogen dioxide: superiority to alpha-tocopherol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 90, 5: 1771-1775
- Diaz M.N., Frei B., Keaney Jr. J.F. 1997. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *New England Journal of Medicine*, 337: 408-416.
- Diplock A.T. 1993. Antioxidants. V: *Encyclopedia of food science, food technology and nutrition*. Vol. 1. Macrae R., Robinson R.K., Sadler M.J. (eds.). London, Academic Press: 212-237.
- Erel O. 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation , more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37: 277-285.
- Farooqui M.I., Anwar J., Khan A., Ali R.M., Mahmood R. 1990. A new sensitive method for the microdetermination of ascorbic acid. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 12, 4: 333-336.
- Gibbons E., Allwood M.C., Neal T., Hardy G. 2001. Degradation of dehydroascorbic acid in parenteral nutrition mixtures. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25: 605-611.
- Green M.A., Fry S.C. 2005. Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate. *Nature*, 433: 83-87.
- Guyton C.A. 1988. *Medicinska fiziologija*. 9th ed. Beograd, Zagreb, Medicinska knjiga: 1221-1222.
- Gökmen V., Kahraman N., Demir N., Acar J. 2000. Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 881: 309-316.
- Imer F., Sonmezoglu I.C., Kozcaz M. 2003. The role of buffers on the kinetics of L-ascorbic acid oxidation catalyzed by copper (II). *Italian Journal of Food Science*, 4, 15: 521-529.
- Jansson P.J., Jung H.R., Lindqvist C., Nordström T. 2004. Oxidative decomposition of vitamin C in drinking water. *Free Radical Research*, 38, 8: 855-860.
- Jung B.H., Chang B.S., Chung B.C. 2001. Determination of vitamin E in porcine plasma after oral administration of vitamin enriched feedstuffs using high performance liquid chromatography. *Analytical Letters*, 34, 13: 2303-2310.
- Kamaleldin A., Appelqvist L.A. 1996. The chemistry and antioxidants properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31, 7: 671-701.

- Kaur C., Kapoor H.C. 2001. Antioxidants in fruits and vegetables—the millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*, 36: 703–725.
- Kennedy J.F., Rivera Z., Lloyd L.L., Warner F.P., Jumel K. 1992. L-Ascorbic acid stability in aseptically processed orange juice in TetraBrik cartons and the effect of oxygen. *Food Chemistry*, 45: 327-331.
- Klofutar C., Šmalc A., Rudan-Tasič D. 1998. Laboratorijske vaje iz kemije. 3. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 282-285.
- Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi. 26. in 27. oktober 2000, Portorož. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-21.
- Krinsky N.I. 1989. Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 7: 617-635.
- Koshiishi I., Mamura Y., Liu J., Imanari T. 1998. Evaluation of an acidic deproteinization for the measurement of ascorbate and dehydroascorbate in plasma samples. *Clinical Chemistry*, 44, 4: 863-868.
- Koshiishi I., Imanari T. 1997. Measurement of ascorbate and dehydroascorbate contents in biological fluids. *Analytical Chemistry*, 69: 216-220.
- Lykkesfeldt J. 2000. Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in biological samples using subtraction methods: reliable reduction with Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride. *Analytical Biochemistry*, 282: 89-93.
- Luque-García J.L., Luque de Castro M.D. 2001. Extraction of fat-soluble vitamins. *Journal of Chromatography A*, 935: 3-11.
- Malešič I., Meško M. 1999. Vrednosti askorbinske kisline v krvnem serumu zdravih ljudi in bolnikov. *Farmacevtski vestnik*, 50, 3: 409-416.
- Miller H.E. 1971. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 48, 2: 91-91.
- Miquel E., Alegría A., Barberá R., Farré R., Clemente G. 2004. Stability of tocopherols in adapted milk-based infant formulas during storage. *International Dairy Journal*, 14: 1003-1011.
- Molyneux P. 2004. The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 2: 211-219.

- Musulini R.R., King C.G. 1936. Metaphosphoric acid in the extraction and titration of vitamin C. *Journal of Biological Chemistry*, 116: 409-413
- Nisperos-Carriedo M.O., Buslig B.S., Shaw P.E. 1992. Simultaneous detection of dehydroascorbic, ascorbic, and some organic acids in fruits and vegetables by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 1127-1130.
- Okogeri O., Tasioula-Margari M. 2002. Changes occurring in phenolic compounds and α -tocopherol of virgin olive oil during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1077-1080.
- Oruña-Concha M.J., Gonzalez-Castro M.J., Lopez-Hernandez J., Simal-Lozano J. 1998. Monitoring of the vitamin C content of frozen green beans and padron peppers by HPLC. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76: 477-480.
- Osborn-Barnes H.T., Akoh C.C. 2003. Copper-Catalyzed Oxidation of a Structured Lipid-Based Emulsion Containing α -Tocopherol and Citric Acid: Influence of pH and NaCl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 6851-6855.
- Park S.R., Kim Y.H., Park H.J., Lee Y.S. 2004. Stability of tocopherols and tocotrienols extracted from unsaponifiable fraction of rice bran under various temperature and oxygen condition. V: 4th International Crop Science Congress. Brisbane, Australia, Gosford NSW, 2250 Australia, The Regional Institute Ltd., 26. Sep - 1. Oct. 2004. Fischer T. (ed.). <http://www.cropscience.org.au/> (30. maj 2005). : 6 str.
- Požrl T. 2001. Regulacija metabolnih sprememb zelja s pakiranjem v modificirano atmosfero. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 3-23.
- Prakash A. 2001. Antioxidant activity. *Analytical Progress*, 19, 2: 1-4.
- Roginsky V., Lissi E.A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92: 235-254.
- Rubatzky V.E., Yamaguchi M. 1997. World vegetables; principles, production, and nutritive values. 2nd ed. New York, Chapman and Hall: 843 str.
- Ryynänen M., Lampi A.M., Salo-Väänänen P., Ollilainen V., Piironen V. 2004. A small-scale sample preparation method with HPLC analysis for determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17: 749-765
- Shahidi F.Y., Naczki M. 1995. Food phenolics: sources, chemistry, effects, applications. Lancaster, Basel. Technomic, Publishing Co. Inc.: 281-319.
- Shi J., Yu J., Pohorly J., Young C. and Bryan M. 2003. Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 1, 2: 42-47.

- Simčič M., Hribar J., Brodnik U. 2001. Compartmentisation and nutritional value of polyphenols and ascorbic acid in apples. V: The book of abstracts. European Scientific Symposium on Molecular and genetic interactions involving phytochemicals. Gozd Martuljek, Slovenija. 17. Sep – 20. Sept. 2000. Kreft I., Škrabanja V. (eds.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 203 -207.
- Suzuki Y.J., Tsuchiya M., Wassall S.R., Choo Y.M., Govil G., Kagan V.E., Packer L. 1993. Structural and dynamic membrane properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol: implication to the molecular mechanism of their antioxidant potency. *Biochemistry*, 32, 40: 10692-10699.
- Van den Broeck I., Ludikhuyze L., Weemaes C., Van Loey A., Hendrickx M. 1998. Kinetics for isobaric-isothermal degradation of L-ascorbic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 2001-2006.
- Vitamin E – Analysis. 2004. Lipid Center (10. maj. 2005).
<http://www.cyberlipid.org/> (15. maj. 2005): 8 str.
- Wang H., Cao G., Prior R.L. 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 701-705.
- Williams P.G. 1996. Vitamin retention in cook/chill and cook/hot-hold hospital foodservices. *Journal of the American Dietetic Association*, 96, 5: 490-498.
- Young I.S., Woodside J.V. 2001. Antioxidant in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54: 176–186.

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem mentorju doc. dr. Blažu Cigiću za izredno strokovno in tehnično pomoč pri izvedbi diplomskega dela.

Zahvaljujem se tudi somentorju doc. dr. Marjanu Simčiču in recenzentki prof. dr. Veroniki Abram.

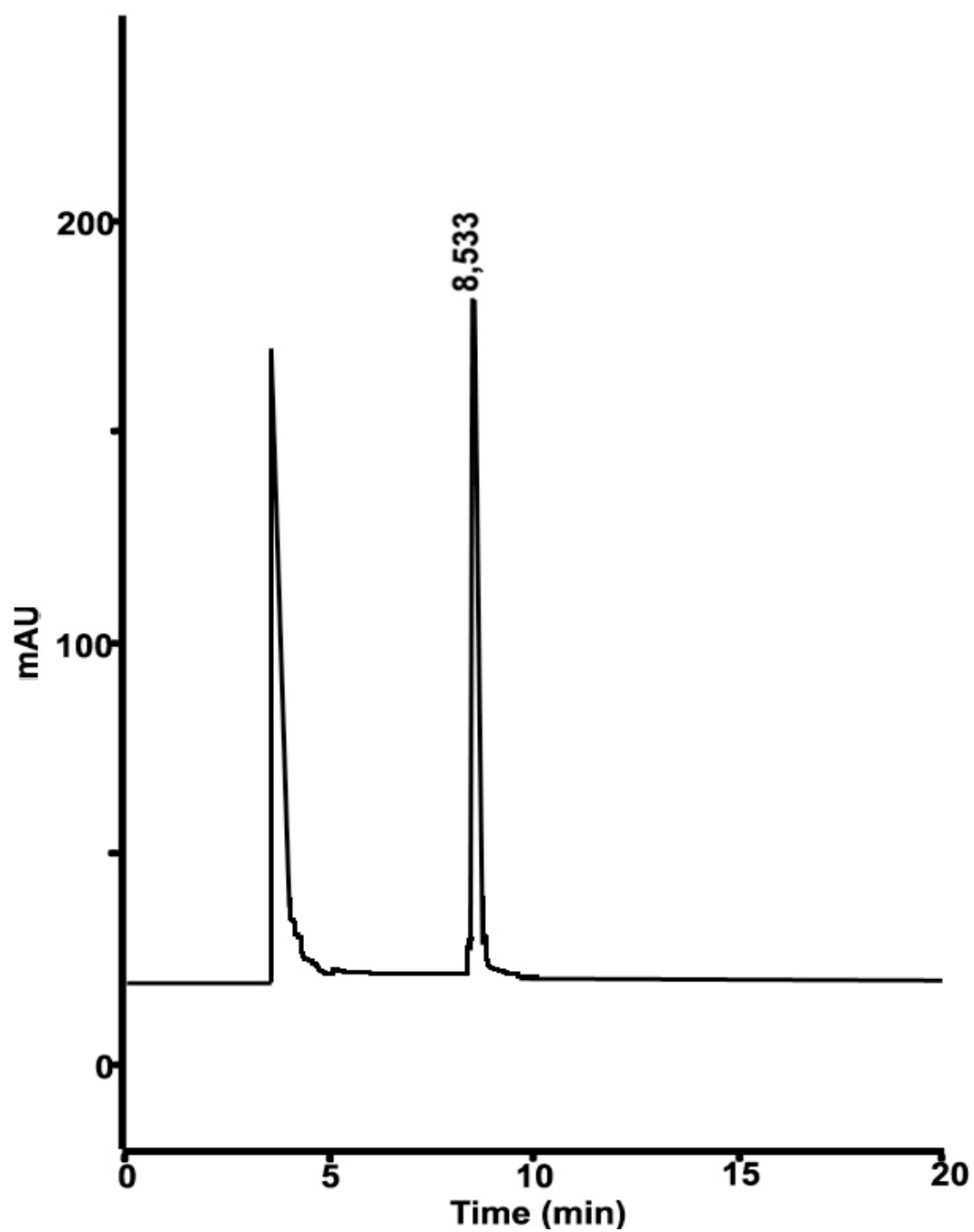
Zahvaljujem se tudi vsem ostalim, ki so mi kakorkoli pomagali pri nastanku diplomskega dela in tudi pri samem študiju.

Hvala vsem!

PRILOGE

Priloga A

Kromatogram standarda askorbinske kisline s koncentracijo 20 µg/ml



Priloga B

Kromatogram askorbinske kisline določene s predhodnjo redukcijo z reducentom TCEP
pri obroku homogeniziranem pri pH 2,5

