

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Uroš ZALAR

**VSEBNOST FENOLNIH SPOJIN V GRANATNEM
JABOLKU (*Punica granatum*)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Uroš ZALAR

VSEBNOST FENOLNIH SPOJIN V GRANATNEM JABOLKU (*Punica granatum*)

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

PHENOLIC CONTENT OF POMEGRANATE (*Punica granatum*)

GRADUATION THESIS
University study

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biokemijo in kemijo živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani ter v Laboratoriju za prehrambeno kemijo na Kemijskem inštitutu.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Nataša Poklar Ulrich, za somentorico dr. Irena Vovk in za recenzentko doc. dr. Lea Pogačnik.

Mentorica: prof. dr. Nataša Poklar Ulrich

Somentorica: dr. Irena Vovk

Recenzentka: doc. dr. Lea Pogačnik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Uroš Zalar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 634.64:547.56:543.06 (043):163.6 granatno jabolko/ <i>Punica granatum</i> /brazilsko geografsko poreklo/hrvaško
KG	geografsko poreklo/rastlinski ekstrakti/fenolne spojine/skupni fenoli/antioksidativna učinkovitost/TLC/kromatografske metode
AV	ZALAR, Uroš
SA	POKLAR ULRIH, Nataša (mentorica)/ VOVK, Irena (somentorica)/ POGAČNIK, Lea (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2011
IN	VSEBNOST FENOLNIH SPOJIN V GRANATNEM JABOLKU (<i>Punica granatum</i>)
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 60 str., 21 pregl., 33 sl., 41 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	

V okviru diplomskega dela smo pripravili ekstrakte fenolnih spojin iz granatnih jabolk z različnim geografskim poreklom (hrvaška Istra in Brazilija). Granatna jabolka smo razdelili na pet različnih delov (lupina, meso, membrana, sok, semena). Ekstrakcijo smo izvedli v dveh različnih topilih in sicer etanol : voda (70 : 30, v/v) ter čista voda. Koncentracijo skupnih fenolnih spojin smo v ekstraktih določali spektrofotometrično s pomočjo Folin-Ciocalteu metode. Antioksidativno učinkovitost smo določili z analizo sposobnosti lovljenja prostih radikalov DPPH. S pomočjo tankoplastne kromatografije smo v granatnem jabolku določili več fenolnih spojin. S plinsko kromatografijo smo določili vsebnost maščobnih kislin v semenih, z metodo oksidacije askorbinske kisline z oksidantom diklorofenol-indofenolom pa vsebnost vitamina C v soku granatnega jabolka. Med granatnimi jabolki brazilskega in hrvaškega porekla po pričakovanih ni bilo velike razlike v nobenem od preiskovanih parametrov. Večje razlike so bile med samimi deli granatnih jabolk. Pričakovano je največja vsebnost skupnih fenolnih spojin v lupinah granatnega jabolka.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 634.64:547.56:543.06 (043):163.6 pomegranate / <i>Punica granatum</i> / Brazilian geographical origin / Croatian
CX	geographical origin / plant extracts / phenolic compounds / total phenols / antioxidant efficiency / TLC/chromatography methods
AU	ZALAR, Uroš
AA	POKLAR ULRIH, Nataša (supervisor)/ VOVK, Irena (co-advisor)/ POGAČNIK, Lea (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva pot 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY	2011
TI	PHENOLIC CONTENT OF POMEGRANATE (<i>Punica granatum</i>)
DT	Graduation thesis (university studies)
NO	XI, 60 p., 21 tab., 33 fig., 41 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	

In the course of this graduation thesis we prepared extracts of pomegranates from two different origin (Brazil and Croatian Istria). We prepared five different fractions (peel, flesh, membrane, juice, seeds) out of each fruit. Extraction was performed by two different solvents, ethanol : water (70 : 30, v/v) and pure water. The concentration of total phenolic compounds was determined spectrophotometrically according to Folin-Ciocalteu method. Antioxidant activity of extracts was determined by scavenging activity of free DPPH· radical. Using thin-layer chromatography we determined which types of phenolic compounds are present in the pomegranate. We have also determined the content of fatty acids in seeds, using gas chromatography and content of vitamin C in juice, using oxidation method with oxidant dichlorophenol-indophenol. There were no significant differences in the results between pomegranates from different origin in any of our cases. More differences were on the other hand found among different pomegranate fractions. As expected, the highest content of phenolic compounds was determined in pomegranate peel.

KAZALO

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	3
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 GRANATNO JABOLKO (<i>Punica granatum</i>)	4
2.1.1 Zgodovina	4
2.1.2 Hranljivost	5
2.1.3 Sestava	5
2.2 ANTIOKSIDANTI	5
2.2.1 Vloga antioksidantov v rastlinah	5
2.2.2 Vloga antioksidantov pri ljudeh	6
2.3 FENOLNE SPOJINE	6
2.3.1 Delitev fenolnih spojin	7
2.3.1.1 Flavonoidi	7
2.3.1.2 Tanini	8
2.3.1.3 Antocianini	9
2.4 VITAMIN C	9
2.5 MAŠČOBNE KISLINE	9
2.6 KROMATOGRAFIJA	10
2.6.1 Tankoplastna kromatografija (TLC)	11
2.6.2 Plinska kromatografija (GC)	12
3 MATERIALI IN METODE	13
3.1 MATERIALI	13
3.1.1 Plodovi	13
3.1.2 Reagenti	13
3.1.3 Standardi različnih fenolnih spojin	14
3.1.4 Aparature	14
3.1.5 Pribor	16
3.1.6 Priprava raztopin	17
3.1.6.1 Priprava standardnih raztopin fenolnih spojin za TLC analizo	17
3.1.6.2 Priprava drugih raztopin	18
3.2 METODE	18
3.2.1 Priprava vzorca	18
3.2.2 Določanje skupnih fenolnih spojin v granatnem jabolku	19
3.2.2.1 Ekstrakcija	19
3.2.2.2 Folin-Ciocalteu metoda	20
3.2.2.3 Umeritvena krivulja (70 % etanol)	20
3.2.2.4 Umeritvena krivulja (destilirana voda)	21
3.2.3 Analiza DPPH	23

3.2.4 Določanje vsebnosti višjih maščobnih kislin v semenih granatnega jabolka s plinsko kromatografijo	23
3.2.5 Določanje vsebnosti l-askorbinske kisline in dehidroaskorbinske kisline (vitamina C)	24
3.2.6 Hidroliza ekstraktov frakcij granatnih jabolk	25
3.2.7 Kvalitativno določanje katehinov s TLC.....	25
3.2.7.1 Kvantitativno določanje katehina s TLC	26
3.2.8 Kvalitativno določanje fenolnih spojin s TLC	26
3.2.8.1 Določanje fenolnih spojin po detekciji z reagentom Naturstoff in ojačanju fluorescence z raztopino parafinsko olje : <i>n</i> -heksan (1 : 2; v/v).....	27
3.2.9 Določanje antioksidativne učinkovitosti z reagentom DPPH· s pomočjo TLC	27
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	28
4.1 VSEBNOST FENOLNIH SPOJIN V GRANATNEM JABOLKU.....	29
4.2 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI Z REAGENTOM DPPH·	34
4.3 DOLOČANJE VSEBNOSTI VITAMINA C.....	42
4.4 DOLOČANJE VSEBNOSTI VIŠJIH MAŠČOBNIH KISLIN V SEMENIH GRANATNEGA JABOLKA	43
4.5 KVALITATIVNO DOLOČANJE KATEHINOV S TLC	44
4.6 KVANTITATIVNO DOLOČANJE KATEHINA S TLC	46
4.7 VPLIV ČASA HIDROLIZE NA LOČEVANJE FENOLNIH SPOJIN	49
4.8 KVALITATIVNO DOLOČEVANJE FENOLNIH KISLIN IN FLAVONOIDOV S TLC	52
4.9 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI Z REAGENTOM DPPH· PO LOČBI S TLC	55
5 SKLEPI	58
6 POVZETEK	59
7 VIRI	61
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Delitev fenolnih spojin (Goodwin in Mercer, 1983)	7
Preglednica 2: Glavne maščobne kisline, njihova racionalna formula in izvor (Vrtačnik in Zupančič Brouwer, 2003)	10
Preglednica 3: Prostornine galne kisline, 70 % etanola, reagentov za umeritveno krivuljo v topilu 70 % etanol in povprečne vrednosti izmerjenih absorbanc pri 765 nm	21
Preglednica 4: Prostornine galne kisline, destilirane vode, reagentov za umeritveno krivuljo v topilu destilirana voda in povprečne vrednosti izmerjenih absorbanc pri 765 nm.....	22
Preglednica 5: Volumni (V) nanosov $10 \times$ razredčenih ekstraktov frakcij granatnih jabolk in standardov, koncentracije (γ) standardov ter masa (m) standardov, nanesenih na HPTLC celulozno ploščo	26
Preglednica 6: Volumni (V) nanosov hidroliziranih ekstraktov frakcij granatnih jabolk in standardov fenolnih spojin ter masa (m) nanesenih standardov na ploščo za razvijanje HPTLC silikagel 60	27
Preglednica 7: Volumen (V) nanosov ekstraktov frakcij in standardov ter masa (m) nanesenih standardov na ploščo HPTLC silikagel 60	28
Preglednica 8: Koncentracije skupnih fenolnih spojin (γ), vrednosti izmerjenih absorbanc (A_{765}) in faktor razredčitve (R) v frakcijah brazilskega in hrvaškega granatnega jabolka, topilo 70 % etanol	29
Preglednica 9: Koncentracije skupnih fenolnih spojin (γ), vrednosti izmerjenih absorbanc (A_{765}) in faktor razredčitve (R) v frakcijah brazilskega in hrvaškega granatnega jabolka, topilo destilirana voda	29
Preglednica 10: Vsebnost skupnih fenolnih spojin, podana kot masa galne kisline na gram liofiliziranega vzorca (mg/g) v vseh frakcijah brazilskega in hrvaškega granatnega jabolka v 70% etanolu in destilirani vodi	30
Preglednica 11: Koncentracija fenolnih spojin v reakcijski mešanici za frakcije brazilskega granatnega jabolka (γ), povprečne vrednosti izmerjenih absorbanc (\bar{A}_{517}) in % inhibicije radikal DPPH· v topilu 70 % etanol	36
Preglednica 12: Koncentracija fenolnih spojin v reakcijski mešanici za frakcije brazilskega granatnega jabolka (γ), povprečne vrednosti izmerjenih absorbanc (\bar{A}_{517}) in % inhibicije radikal DPPH· v topilu destilirana voda	37
Preglednica 13: Koncentracija fenolnih spojin v reakcijski mešanici za frakcije hrvaškega granatnega jabolka (γ), povprečne vrednosti izmerjenih absorbanc (\bar{A}_{517}) in % inhibicije radikal DPPH· v topilu 70 % etanol	38
Preglednica 14: Koncentracija fenolnih spojin v reakcijski mešanici za frakcije hrvaškega granatnega jabolka (γ), povprečne vrednosti izmerjenih absorbanc (\bar{A}_{517}) in % inhibicije radikal DPPH· v topilu destilirana voda	39
Preglednica 15: Vrednost ED _{50%} DPPH· za ekstrakte brazilskeh in hrvaških granatnih jabolk v topilu 70 % etanol	40
Preglednica 16: Vrednost ED _{50%} DPPH· za ekstrakte brazilskega in hrvaškega granatnega jabolka v topilu destilirana voda	40
Preglednica 17: Vsebnost vitamina C v sokovih brazilskega in hrvaškega granatnega jabolka	42

Preglednica 18: Mase semen, mase dodanega internega standarda (IS) in mase topila (masa <i>n</i> -heksana in metanola) za določanje vsebnosti maščobnih kislin v semenih granatnega jabolka.	43
Preglednica 19: Vsebnost maščobnih kislin (<i>w</i>) v semenih granatnega jabolka.	43
Preglednica 20: Masa katehina in višine vrhov za umeritveno krivuljo.	47
Preglednica 21: Vsebnosti katehina (<i>m</i>) v granatnih jabolkih hrvaškega in brazilskega porekla.	48

KAZALO SLIK

Slika 1: Granatno jabolko	4
Slika 2: Osnovna strukturalna formula flavonoidov	8
Slika 3: Brazilsko (BGJ) in hrvaško (HGJ) granatno jabolko	13
Slika 4: Camagovi horizontalni kadi za razvijanje plošč	15
Slika 5: Naprava za avtomatsko nanašanje vzorcev na plošče, Automatic TLC Sampler 415	
Slika 6: Camag-ov video dokumentacijski sistem DigiStore 2 z Reprostarjem 3 (komora za osvetljevanje) in digitalnim fotoaparatom - sistem za snemanje in arhiviranje slik tankoplastnih kromatogramov	16
Slika 7: Paralelni sintetizator Carousel 12 reaction station TM v katerem istočasno lahko poteka do 12 reakcij in učinkovito mešanje in gretje vzorcev	16
Slika 8: Shema ekstrakcijskega postopka	19
Slika 9: Ekstrakti frakcij brazilskih in hrvaških granatnih jabolk (od leve proti desni si sledijo: B sok, H sok, B lupina, H lupina, B membrana, H membrana, B meso, H meso, B semena, H semena)	20
Slika 10: Umeritvena krivulja odvisnosti absorbance pri 765 nm od masne koncentracije galne kisline v 70 % etanolu pri 25 °C	21
Slika 11: Umeritvena krivulja odvisnosti absorbance pri 765 nm od masne koncentracije galne kisline v destilirani vodi pri 25 °C	22
Slika 12: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v frakcijah brazilskih granatnih jabolk, topila: 70 % etanol in destilirana voda (mg galne kisline/g substrata)	31
Slika 13: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v frakcijah hrvaških granatnih jabolk, topila: 70 % etanol in destilirana voda (mg galne kisline/g substrata)	31
Slika 14: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v brazilskih in hrvaških granatnih jabolkih, topilo 70 % etanol	32
Slika 15: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v brazilskih in hrvaških granatnih jabolkih, topilo destilirana voda	32
Slika 16: Odvisnost % inhibicije radikala DPPH· od koncentracije fenolnih spojin (γ) za ekstrakt mesa hrvaškega granatnega jabolka	35
Slika 17: Vrednost ED _{50% DPPH·} ($\mu\text{g/mL}$) za ekstrakte brazilskega in hrvaškega granatnega jabolka v topilu 70 % etanol	40
Slika 18: Vrednost ED _{50% DPPH·} ($\mu\text{g/mL}$) za ekstrakte brazilskih in hrvaških granatnih jabolk v topilu destilirana voda	41
Slika 19: HPTLC celulozna plošča, razvita v topilu 1 – propanol : H ₂ O : ocetna kislina (4 : 2 : 1; v/v/v) po detekciji z reagentom DMACA, posneta z izvorom bele svetlobe. ..	44
Slika 20: HPTLC celulozna plošča, razvita v topilu H ₂ O, po detekciji z reagentom DMACA, posneta z izvorom bele svetlobe. ..	45
Slika 21: HPTLC celulozna plošča, razvita v topilu H ₂ O : 1 – propanol : ocetna kislina (80 : 20 : 1; v/v/v) po detekciji z reagentom DMACA, posneta z izvorom bele svetlobe. ..	46
Slika 22: Umeritvena krivulja odvisnosti višine vrha od mase katehina (ng)	47
Slika 23: Denzitogrami standarda katehina in ekstraktov frakcij granatnih jabolk hrvaškega in brazilskega porekla, posnet na HPTLC celulozni plošči razviti s topilom za razvijanje 1 – propanol : H ₂ O : ocetna kislina (4 : 2 : 1; v/v/v) pri 655 nm	48

Slika 24: TLC silikagel 60 plošča, razvita v topilu <i>n</i> -heksan : etil acetat : mravljična kislina (20 : 19 : 1; v/v/v), posneta z izvorom svetlobe z valovno dolžino 366 nm ..	49
Slika 25: HPTLC silikagel 60 plošča, razvita v topilu <i>n</i> -heksan : etil acetat : mravljična kislina (20 : 19 : 1; v/v/v), po detekciji z reagentom Naturstoff in ojačana z reagentom parafinsko olje : <i>n</i> -heksan (1 : 2; v/v) posneta z izvorom svetlobe z valovno dolžino 366 nm.....	50
Slika 26: HPTLC silikagel 60 plošča, razvita v topilu <i>n</i> -heksan : etil acetat : mravljična kislina (20 : 19 : 1; v/v/v), po detekciji z reagentom Naturstoff in ojačana z reagentom parafinsko olje : <i>n</i> -heksan (1 : 2; v/v) posneta z izvorom svetlobe z valovno dolžino 366 nm.....	50
Slika 27: HPTLC silikagel 60 plošča, razvita v topilu <i>n</i> -heksan : etil acetat : mravljična kislina (20 : 19 : 1; v/v/v), po detekciji z reagentom Naturstoff in ojačana z reagentom parafinsko olje : <i>n</i> -heksan (1 : 2; v/v) posneta z izvorom svetlobe z valovno dolžino 366 nm.....	51
Slika 28: HPTLC silikagel 60 plošča, razvita v topilu <i>n</i> -heksan : etil acetat : mravljična kislina (20 : 19 : 1; v/v/v), po detekciji z reagentom Naturstoff in ojačana z reagentom parafinsko olje : <i>n</i> -heksan (1 : 2; v/v) posneta z izvorom svetlobe z valovno dolžino 366 nm.....	51
Slika 29: HPTLC silikagel 60 plošča, razvita v topilu <i>n</i> -heksan : etil acetat : mravljična kislina (20 : 19 : 1; v/v/v), po detekciji z reagentom Naturstoff in ojačana z reagentom parafinsko olje : <i>n</i> -heksan (1 : 2; v/v) posneta z izvorom svetlobe z valovno dolžino 366 nm.....	52
Slika 30: HPTLC silikagel 60 plošča, razvita v topilu <i>n</i> -heksan : etil acetat : mravljična kislina (20 : 19 : 1; v/v/v), po detekciji z reagentom Naturstoff in ojačana z reagentom parafinsko olje : <i>n</i> -heksan (1 : 2; v/v) posneta z izvorom svetlobe z valovno dolžino 366 nm.....	53
Slika 31: HPTLC silikagel 60 plošča, razvita v topilu etil acetat : voda : mravljična kislina (85 : 15 : 10; v/v/v), po detekciji z reagentom Naturstoff in ojačana z reagentom parafinsko olje : <i>n</i> -heksan (1 : 2; v/v) posneta z izvorom svetlobe z valovno dolžino 366 nm.....	53
Slika 32: HPTLC silikagel 60 plošča, razvita v topilu <i>n</i> -heksan : etil acetat : mravljična kislina (20 : 19 : 1; v/v/v), posneta z izvorom svetlobe z valovno dolžino 366 nm (A) in po razprtosti in delovanju reagenta DPPH· pri beli svetlobi (B).	55
Slika 33: HPTLC silikagel 60 plošča, razvita v topilu etil acetat : voda : mravljična kislina (85 : 15 : 10; v/v/v), posneta z izvorom svetlobe z valovno dolžino 366 (A) in po razprtosti in delovanju reagenta DPPH· pri beli svetlobi (B).	56

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BGJ	Brazilsko granatno jabolko
DI	diklorofenol-indofenol
DMACA	4-dimetilaminocimetovialdehid
DPPH·	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
ED _{50%DPPH·}	koncentracija fenolnih spojin, ki je odgovorna za 50% zmanjšanje začetne količine prostih radikalov
FC	Folin-Ciocalteu
GC	plinska kromatografija
HGJ	hrvaško granatno jabolko
IS	interni standard
MEMK	metilni estri maščobnih kislin
R _F	retencijski faktor
SFS	skupne fenolne spojine
TLC	tankoplastna kromatografija

1 UVOD

Mnoge fenolne spojine rastlinskega izvora imajo antimikrobnii učinek (Abram in Donko, 1999), so dobri kelatorji kovinskih ionov in so učinkoviti antioksidanti. Poleg specifičnih učinkov posameznih fenolnih spojin naj bi ravno antioksidativni potencial prispeval k zmanjšani oksidaciji biološko pomembnih molekul ter tako ugodno vplival na zdravje. Predvidevanje, da imajo polifenoli pozitivne učinke na razne kronične degenerativne bolezni, kardiovaskularne bolezni in raka, je v zadnjem času povzročilo številne raziskave na tem področju.

Fenolne spojine so sekundarni metaboliti, ki nastajajo v rastlinskih celicah. Rastline ščitijo pred škodljivci in drugimi stresnimi dejavniki, prispevajo k barvi in okusu sadja ter zelenjave in so pomembne pri rasti in reprodukciji rastlin. Fenolne spojine imajo najmanj en aromatski obroč in eno ali več hidroksilnih skupin, ki so neposredno vezane na aromatski obroč. Naravni polifenoli se lahko pojavljajo kot enostavne molekule (fenolne kisline, fenilpropanoidi, flavonoidi) ali kot visoko polimerizirane spojine (lignini, melanini, tanini) (Viuda-Martos in sod., 2010).

Antioksidanti so spojine, s katerimi ob dodatku k živilskim proizvodom, še posebej tistim, ki vsebujejo maščobe, podaljšamo rok uporabnosti, kajti z njimi zaviramo lipidno peroksidacijo. Lipidna peroksidacija maščob in živilskih proizvodov, ki vsebujejo maščobe, povzroči kemijsko potvorbo in proizvaja proste radikale (peroksilni in hidroksilni radikali), ki so domnevno povezani s karcinogenezo, mutagenezo in staranjem. A vendar so bili do nedavnega v uporabi nekateri sintetični antioksidanti, kot sta butilirani hidroksianizol in butilirani hidroksitoluen, za katere je bilo ugotovljeno, da sta karcinogena. Prav zaradi teh dejstev je vse več povpraševanja po naravnih antioksidantih in njihovi izolaciji (Yasoubi in sod., 2007). Antioksidanti so učinkoviti že pri sorazmerno majhni koncentraciji in le v precej ozkem območju koncentracije. S povečanjem koncentracije nad optimalnim območjem, se učinkovitost antioksidanta zmanjšuje in lahko preide celo v prooksidativno delovanje (Frankič in Salobir, 2007).

V živilski industriji se kot dodatki hrani vedno več uporabljam naravne spojine. Največ se uporabljam polifenoli, predvsem kot barvila ali kot antioksidanti z namenom podaljšanja roka uporabnosti živil, saj zmanjšujejo oksidacijske sposobnosti maščob. Pri oksidaciji hrane ne predstavlja edinega problema žarka aroma, temveč se posledice kažejo tudi na zdravju ljudi (Caballero in sod., 2003).

Granatno jabolko je vir fenolnih spojin z visoko zmogljivostjo antioksidacije. Granatno jabolko znatno zmanjša arteriosklerozo, pomaga srčnim bolnikom, zmanjša peroksidacijo lipidov pri bolnikih z diabetesom tipa II in sistolični krvni tlak ter serumsko angiotenzijsko konvertazno aktivnost pri hipertenzivnih bolnikih. Na splošno pa se je granatno jabolko uporabljalo v zdravilstvu za odpravo parazitov in za zdravljenje razjed, diareje, acidoze, griže, krvavitev, mikrobnih infekcij in dihalnih bolezni. Tako lahko granatno jabolko vključimo v zdravo prehrano. Užitni deli granatnih jabolk se uživajo sveži ali stisnjeni kot sokovi, marmelade, paste in kot arome in barve v pijačah. Kot dodatki se splošno uporabljam v terapevtskih formulah in kozmetiki. (Viuda-Martos in sod., 2010).

Poleg fenolnih spojin so v granatnem jabolku pomembne tudi maščobne kisline, ki jih najdemo v semenih. Hernández in sodelavci (2000) navajajo, da so v semenih nasičene (8 %), mononenasičene (10 %), dvakrat nenasicičene maščobne kisline (10 %) maščobne kisline in konjugirana linolenska kislina (puničična kislina) (70 %).

1.1 NAMEN NALOGE

Namen diplomskega dela je bil pripraviti ekstrakte fenolnih spojin iz različnih delov granatnega jabolka (lupina, meso, membrana, sok, seme) z različnim geografskim porekлом (Brazilija in Hrvaška). V teh ekstraktih smo želeli določiti vsebnost skupnih fenolnih spojin in njihovo antioksidativno učinkovitost. S tankoplastno kromatografijo smo želeli določiti, katere so te fenolne spojine in katera od njih tudi prispeva k antioksidativni učinkovitosti. Naš namen je tudi bil ugotoviti, ali podnebje rasti oz. geografsko poreklo granatnega jabolka, vpliva na vsebnost skupnih fenolnih spojin in na antioksidativno učinkovitost ter vsebnost maščobnih kislin in vitamina C.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Predvidevamo, da velike razlike med vsebnostmi skupnih fenolnih spojin v brazilskih in hrvaških granatnih jabolkih ne bo.
- Največjo vsebnost fenolnih spojin pričakujemo v lupini ter mesu, manj pa v drugih delih plodu.
- Predvidevamo, da geografsko poreklo granatnega jabolka ne bo imelo velikega vpliva na antioksidativno učinkovitost in vsebnost vitamina C ter nasičenih maščobnih kislin.

2 PREGLED OBJAV

2.1 GRANATNO JABOLKO (*Punica granatum*)

Granatno jabolko je listopadni grm iz družine *Punicaceae*. V Evropi najbolj uspeva v Sredozemlju. Tip lista je kserofiten. Cvet je lepe rdeče barve in deluje okrasno. Plod ima debelo gladko lupino, v kateri je mnogo semen, ki so v predelih obdani s tankimi belkastimi stenami. Semena so oglata in prozorno rubinaste barve kakor granat. Semenske lupine so sočne in jih uživamo. V Sloveniji uspeva na Primorskem, prenese do -17 °C. V globoki zemlji dobro uspeva tudi brez namakanja. Razmnožujejo ga s potaknjenci, rodi v tretjem letu (Šiško, 1983).



Slika 1: Granatno jabolko

2.1.1 Zgodovina

Granatna jabolka izvirajo iz Perzije. Ker vsebujejo veliko pešk, so že od nekdaj simbol plodnosti. Boginja ljubezni Venera naj bi svojim ljubljencem podarjala granatna jabolka. V Evropi so granatna jabolka vse do renesanse uporabljali predvsem v zdravilstvu, na Bližnjem vzhodu od nekdaj v kulinariki. Danes jih na veliko gojijo v Franciji, Španiji, Izraelu, Ameriki in po vsej Aziji (Whiteman in Mayhew, 1998).

2.1.2 Hranljivost

Peške granatnih jabolk so bogate z vitaminom C in dober vir vlaknin. Njihova energijska vrednost je približno 72 kcal/301 kJ na 100 g (Whiteman in Mayhew, 1998).

2.1.3 Sestava

Granatno jabolko predstavlja vir naravnih antioksidantov, organskih kislin, fenolnih spojin, sladkorjev in drugih komponent. Najdominantnejša sladkorja v granatnem jabolku sta fruktoza (3,5 do 5,96 g/100g) in glukoza (3,4 do 6,40 g/100g). Saharoze in maltoze praktično ni zaznati. Vsebnost vitamina C se giblje od 0,09 do 0,40 mg/100g, vsebuje pa tudi minerale kot so: K, Na, Ca, Mn, Cu, Fe, Zn, Pb in Cd (Fadavi in sod., 2005).

2.2 ANTIOKSIDANTI

Živilski tehnologi so postavili definicijo, da so antioksidanti tiste sestavine živil oz. tisti dodatki živilom, ki so bodisi lovilci radikalov, tvorijo kelate s kovinskimi ioni ali pa kot reducenti kako drugače preprečujejo ali zmanjšujejo pojav žarkosti živil in drugih oksidativnih sprememb senzoričnih in prehranskih lastnosti živil. Dietetiki in nutricionisti pa definirajo antioksidante (endogene in eksogene) kot snovi, ki ščitijo telo pred kvarnim vplivom prostih radikalov, kovinskih ionov in raznih drugih oksidantov. Za živilske tehnologe so torej predvsem aditivi ali sestavine živil, ki podaljšujejo uporabnost le-teh, za tiste bolj v medicino in fiziologijo usmerjene strokovnjake pa so antioksidanti predvsem snovi, ki sodelujejo pri obrambi organizma pred potencialno škodljivimi oksidirajočimi snovmi (Vidrih in Kač, 2000).

2.2.1 Vloga antioksidantov v rastlinah

Rastline so izpostavljene sončnim žarkom, ki vključujejo med drugim tudi vidno in ultravijolično svetlobo, ki sta pomembni za rast in razvoj rastlin. Vidna svetloba daje rastlinam tudi energijo za pretvarjanje anorganskih snovi v organske. Sončni žarki so za rastline tudi nevarni, saj lahko poškodujejo rastlinsko tkivo in stalno sprožajo nastanek prostih radikalov, ki pa jih prisotni antioksidanti sproti nevtralizirajo. Za sintezo antioksidativnih snovi v rastlinah so odgovorni prav ultravijolični žarki; UV žarki inducirajo sintezo fenolnih spojin.

Sekundarni metaboliti (antioksidanti), ki ščitijo rastline pred škodljivimi vplivi sončnih žarkov, imajo več pomembnih vlog za obrambo rastlin. Ena izmed najpomembnejših je, da lahko v večji koncentraciji ščitijo rastline pred napadi virusov, bakterij, gliv in rastlinojedih živali. V primeru okužbe rastline ali ob napadu škodljivcev se gensko določena izgradnja sekundarnih metabolitov rastline zelo pospeši. V primeru, če je koncentracija sekundarnih metabolitov v rastlini zelo visoka, to lahko vodi v poškodbe lastnega tkiva. Prav zaradi tega se v rastlinah antioksidanti v večjih količinah ne kopijočijo v citoplazmi celic, ampak v ločenih predelkih, včasih ločeno v vakuolah, ali pa v tkivih, v katerih ni več živih celic. Vsebnost antioksidantov v rastlinah je lahko odvisna od genetskih in od ekoloških dejavnikov (Kreft in sod., 2000).

2.2.2 Vloga antioksidantov pri ljudeh

Ljudje smo izpostavljeni številnim škodljivim vplivom. Do tvorbe prostih radikalov prihaja že med presnovo. Tvorba prostih radikalov pa je večja ob izpostavljenosti stresu, nekaterim kemikalijam, sevanju, vplivu alkohola, cigaretnemu dimu, težkim kovinam, katranastim snovem izpušnih plinov ter prekajeni in zapečeni hrani. V našem organizmu sta glede na izvor dve vrsti antioksidantov: endogeni in eksogeni. Naše telo tvori endogene antioksidante, eksogene pa dobimo z uživanjem hrane. Ljudje jemo hrano tako rastlinskega kot živalskega izvora. Rastlinska hrana je značilnost našega evolucijskega razvoja, zaradi tega smo močno odvisni od antioksidativnih snovi rastlinskega izvora. V letih raziskav je bilo ugotovljeno, da obstaja povezava med eksogenimi antioksidanti hrane in med zaščito pred boleznimi srca in ožilja, nastankom raka in drugimi boleznimi, ki so povezane z oksidativnim stresom v telesu (Kreft in sod., 2000).

2.3 FENOLNE SPOJINE

Fenolne spojine so sekundarni metaboliti, ki nastajajo iz intermediarov glikolize in pentozafosfatnega cikla preko šikimatne ter po fenilpropanoidni poti v rastlinah (Randhir in sod., 2004). Te spojine imajo izjemno pomembno fiziološko in morfološko vlogo v rastlinah, saj so pomembne pri rasti in reprodukciji rastlin, prispevajo k obrambi rastlin pred škodljivci in drugimi stresnimi dejavniki ter prispevajo k barvi in senzoričnim karakteristikam sadja in zelenjave. Njihova vsebnost je lahko od 0,5 do 5,0 g na 100 g suhe mase rastlinskih tkiv. Pozitivne učinke fenolnih spojin pripisujejo njihovi antioksidativni učinkovitosti. (Sun in Ho, 2005; Srivastava in sod., 2006).

Fenolne spojine imenujemo tudi fenolne snovi, rastlinski fenoli, polifenoli ali polifenolne spojine. Mednje prištevamo vse tiste spojine, ki imajo vsaj en aromatski obroč in eno ali več hidroksilnih (-OH) skupin, direktno vezanih na aromatski obroč. V naravi običajno najdemo spojine z več hidroksilnimi skupinami (Abram in Simčič, 1997).

Polifenolne spojine se razlikujejo tudi po polarnosti. Manj polarne polifenolne spojine (npr. flavanoni, flavonoli) so dobro topne v kloroformu, diklorometanu, dietil etru ali etilacetatu. Bolj polarne polifenolne spojine pa so dobro topne v vodnih mešanicah z etanolom ali metanolom (npr. katehini) (Andersen in Markham, 2006).

2.3.1 Delitev fenolnih spojin

Za delitev fenolnih spojin se uporablja predvsem razdelitev po številu C-atomov v molekuli (Preglednica 1), (Goodwin in Mercer, 1983). Osnovni obroč je vedno sestavljen iz 6 C atomov (C_6), na katerega ja lahko vezanih od 1 do 4 C atomov (C_1 , C_2 , C_3 , C_4) na katere je lahko vezan naslednji obroč s 6 C atomi (C_6).

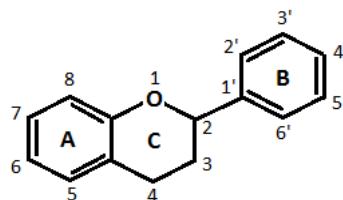
Preglednica 1: Delitev fenolnih spojin (Goodwin in Mercer, 1983).

Število C atomov	Osnovni skelet	Skupina
6	C_6	Fenoli
7	C_6C_1	Fenolne kisline
8	C_6C_2	Fenilocetne kisline
9	C_6C_3	Hidroksicimetne kisline Fenilpropeni Kumarini Izokumarini Kromoni
10	C_6C_4	Naftokinoni
13	$C_6C_1C_6$	Ksantoni
14	$C_6C_2C_6$	Stilbeni Antrakinoni
15	$C_6C_3C_6$	Flavonidi
18	$(C_6C_3)_2$	Lignani Neolignani
30	$(C_6C_3C_6)_2$	Biflavonidi
N	$(C_6C_3)_n$ $(C_6)_n$	Lignini Melanini
	$(C_6C_3C_6)_n$	Kondenzirani tanini

2.3.1.1 Flavonoidi

Flavonoidi so pri rastlinah najbolj razširjeni sekundarni produkti presnove. Kot pigmenti so prisotni v cvetovih, plodovih in včasih tudi v listih. Rumeni flavonoidi so halkoni, auroni in nekateri flavonoli, rdeči, modri ali škrlatni pa so antocianini. Prisotni so tudi kot brezbarvni kopigmenti, ki varujejo nestabilne antocianine. Absorbirajo lahko tudi tisti del UV spektra, katerega barvo zaznajo žuželke, ki jih cvet privabi, da izvedejo oprasitev ali razširjajo semena. Funkcije flavonoidov v rastlini so še zaščita pred škodljivimi insekti, virusi in glivicami, zavirajo delovanje različnih encimov, vplivajo na oksidacijske in redukcijske procese v celici, poleg tega pa varujejo celice pred poškodbami z UV žarki.

Vsi flavonoidi imajo enak biosintetski izvor, zato so njihove strukture zelo podobne. Skupen jim je skelet iz 15 ogljikovih atomov s $C_6C_3C_6$ strukturo, ki ga imenujemo 2-fenilbenzopiranski skelet (oz. 2-fenilkromanski skelet), prikazuje ga slika 2. Med seboj se razlikujejo po stopnji oksidacije piranskega obroča, po razporeditvi hidroksilnih in metoksi skupin ter po vezanih sladkorjih.



Slika 2: Osnovna strukturna formula flavonoidov

Flavonoidi so v naravi zelo pogosto v obliki glikozidov, le-te sestavlja do trije monosaharidi, najpogosteji so glukoza, galaktoza, ramnoza, aloza, arabinoza, ksiloza, apioza, glukoronska in galakturonska kislina. Sladkorna komponenta se v flavonoidih najpogosteje veže prek hidroksilne skupine na mestih C7 ali C3, pri čemer nastanejo O-glikozidi. Redkeje najdemo C-glikozide, pri katerih nastane vez med sladkorjem in ogljikom na mestih 6 ali 8 (Bruneton, 1999; Doljak in sod., 2005).

2.3.1.2 Tanini

Tanini so kompleksne polifenolne spojine, topne v alkoholu in acetolu, v vodi tvorijo koloidne sisteme, z beljakovinami pa netopne komplekse. Njihova molekulska masa znaša od 500 do 3000 Da. Razdelimo jih v hidrolizirajoče, kondenzirane in kompleksne čreslovine.

Hidrolizirajoči tanini so estri sladkorja (ali sorodnih poliolov) in različnega števila molekul fenolnih kislin. K hidrolizirajočim čreslovinam prištevamo galotanine, elagotanine in nekatere estre kavne kisline. Sladkor je najpogosteje glukoza, kislina v galotaninih je galna kislina, v elagotaninih pa galna, heksahidroksidifenska ali dehidroheksahidroksidifenska kislina. Kot estri so tanini v prisotnosti vode dokaj neobstojni.

Kondenzirane čreslovine ali proantocianidini so polimeri flavanov. Sestavljeni so iz flavan-3-olskih enot, ki so med seboj povezane s C-C vezmi na mestih 4-8 ali 4-6. Glede na to kakšen antocianidin nastane iz polimera pri segrevanju v kislem (cianidin, delfinidin ali pelargonidin), jih delimo v procianidine, prodelfinidine, propelargonidine. Najpogosteje kondenzirane čreslovine so procianidini, ki so polimeri katehina in (ali) epikatehina. Te čreslovine imenujemo katehinske čreslovine, ta izraz pa se pogosto uporablja za vse kondenzirane čreslovine.

Kompleksne čreslovine so sestavljene iz hidrolizirajočih čreslovin, kot so galotanine in elagotanine in iz procianidinov ali drugih flavanskih enot. Te vrste čreslovin so največkrat prisotne v rastlinah skupaj z galotanini. Primer kompleksne čreslovine je katehin-3-galat. K čreslovinam v širšem pomenu spadajo še snovi, ki imajo le delno čreslovinske lastnosti; to so npr. klorogenska kislina, rožmarinska kislina in florotanini. Klorogenska kislina je v rastlinah splošno razširjena (Galle Toplak, 2000; Bruneton, 1999; Doljak in sod., 2005).

2.3.1.3 Antocianini

Antocianini so najpomembnejša vodotopna skupina rastlinskih pigmentov, ki jih vidi človeško oko. So univerzalna rastlinska barvila, odgovorna za modro-vijolično barvo cvetnih listov in sadežev. Prav tako pa jih je možno zaznati v koreninah, steblih, listih in ovršnih listih v epidermalnih vakuolah.

Glavna mesta hidroksilacije so 3, 5 in 7 v obroču A in 3' in 5' v obroču B (slika 2). Metoksilne skupine se lahko pritrdijo na 5' in 3'. Antocianidini, ki se največkrat pojavljajo v sadju so pelargonidin, cianidin, delfinidin, peonidin, petunidin in malvidin. Ti so vsi hidroksilirani na mestih 3, 5 in 7.

Absorpcijski maksimum antocianinov je pri valovni dolžini 520 nm. Pri pH nad 4 pride do bledenja barv, oksidacija pa se odraža v rjavkastih barvah (Murkovic, 2003).

2.4 VITAMIN C

Zaradi antioksidativne lastnosti je vitamin C (vodotopni vitamin) ali L-askorbinska kislina v živilski industriji vsestransko uporaben, predvsem kot konzervans, ki ohranja barvo, aromo in teksturo proizvodov ter izboljša splošno obstojnost prehrambnih izdelkov. Kot antioksidant (tudi v obliki natrijeve in kalijeve soli) ga uporabljam pri proizvodnji piva, sadnih sokov, vina, konzerviranega sadja in zelenjave, pri prekajevanju mesnih izdelkov, v industriji moke za povečanje pecilne kvalitete in videza kruha. Estri L-askorbinske kisline, predvsem L-askorbil 6-palmitat se uporabljam za antioksidativno zaščito maščob in olj (Rudan-Tasič, 2000).

2.5 MAŠČOBNE KISLINE

Maščobne kisline so karboksilne kisline, ki imajo v molekuli najmanj štiri ogljikove atome. Ogljikovodik, na katerega je vezana karboksilna skupina je lahko nasičen ali nenasičen. Maščobne kisline so ključne gradbene enote bioloških molekul, lipidov, ki gradijo celične membrane, so pa tudi sestavine hormonov, ki uravnavaajo pravilno delovanje telesa. V preglednici 2 so predstavljene glavne maščobne kisline in njihov izvor.

Naravne maščobne kisline imajo v molekuli vedno sodo število ogljikovih atomov. Vzrok je v njihovi biosintezi, saj nastajajo iz acetatnih, CH_3CO , enot. Nenasičene maščobne kisline nastopajo kot trans izomeri. Nasičene maščobne kisline imajo nerazvezjano zgradbo, zato se lahko molekule zlagajo v strukturo, ki je pri sobni temperaturi trdna.

Molekule mononenasičenih maščobnih kislin, ki so npr. sestavine oljnega olja, so znatno bolj upognjene, zato se molekule težje približajo druga drugi, vezi med njimi so šibkejše, pri sobni temperaturi so tekočine, pri ohlajanju se strdijo. Polinenasičene maščobne kisline pa so tudi pri nižjih temperaturah tekočine (Vrtačnik in Zupančič Brouwer, 2003).

Preglednica 2: Glavne maščobne kislina, njihova racionalna formula in izvor (Vrtačnik in Zupančič Brouwer, 2003).

Nasičene maščobne kisline			
Trivialno ime	IUPAC ime	Racionalna formula	Vir
maslena kislina	butanojska kislina	CH ₃ CH ₂ CH ₂ COOH	maslo
kapronska kislina	<i>n</i> -heksanojska kislina	CH ₃ (CH ₂) ₃ CH ₂ COOH	palmovo in kokosovo maslo
kaprilska kislina	oktanojska kislina	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH ₂ COOH	maslo, palmovo in kokosovo maslo
kaprinska kislina	dekanojska kislina	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH ₂ COOH	maslo, palmovo in kokosovo maslo
lavrinska kislina	dodekanojska kislina	CH ₃ (CH ₂) ₉ CH ₂ COOH	maslo, palmovo in kokosovo maslo
miristinska kislina	tetradekanojska kislina	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ CH ₂ COOH	večina živalskih in rastlinskih maščob
palmitinska kislina	heksadekanojska kislina	CH ₃ (CH ₂) ₁₃ CH ₂ COOH	skoraj v vseh živalskih in rastlinskih maščobah
stearinska kislina	oktadekanojska kislina	CH ₃ (CH ₂) ₁₅ CH ₂ COOH	v živalskih maščobah, redko v rastlinskih
arašidna kislina	ajkozanojska kislina	CH ₃ (CH ₂) ₁₇ CH ₂ COOH	arašidno olje
Nenasičene maščobne kisline			
oleinska kislina	cis-9-oktadekanojska kislina	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	rastlinske in živalske maščobe
linolna kislina	9, 12-oktadekadienojska kislina	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	semena lanu, bombaža
linolenska kislina	9, 12, 15-oktadekatrienojska kislina	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	semena lanu

2.6 KROMATOGRAFIJA

Kromatografija je fizikalno-kemijska metoda za ločitev tekočih ali plinastih zmesi v prostorsko ločene cone. Osnova kromatografske ločbe je v razliki hitrosti migracije posameznih komponent pod vplivom mobilne faze (plin, tekočina) zaradi selektivnega zadrževanja (retencije) komponent na stacionarni fazi (trdna površina ali nemobilna tekočina).

Če s stacionarno fazo (kromatografskim medijem ali nosilcem) napolnimo stekleno, kovinsko ali plastično cev, imenovano kolona, govorimo o kolonski kromatografiji. Mobilna faza, ki jo iz rezervoarja kontinuirano dovajamo na zgornji del kolone, teče po koloni navzdol in z njo raztopljlene snovi, ki smo jih predhodno nanesli na vrh stacionarne faze. Zaradi specifičnih lastnosti stacionarne faze potujejo te snovi po koloni navzdol z

različno hitrostjo in končno ločeno iztekajo iz nje. Kadar pa je stacionarna faza nanesena v tanki plasti na stekleno ploščo ali folijo iz inertnega materiala, govorimo o tankoplastni kromatografiji (planarna kromatografija). Posebna oblika planarne kromatografije je papirna kromatografija, pri kateri delujejo celulozna vlakna kromatografskega papirja kot nosilec stacionarne faze, ki je lahko voda ali nepolarno topilo. Osnova ločevanja v kromatografskem sistemu je porazdelitev snovi (topljenca) med obema fazama, do katere pride zaradi različno močnih interakcij med topljencem in stacionarno ter mobilno fazo oziroma zaradi različne topnosti v stacionarni in mobilni fazi. To porazdelitev med stacionarno in mobilno fazo kvantitativno opiše porazdelitveni koeficient, ki je za določen sistem pri določeni temperaturi za vsako snov konstanten in predstavlja razmerje med molarno koncentracijo topljenca v stacionarni fazi in koncentracijo topljenca v mobilni fazi. Snov z višjim porazdelitvenim koeficientom bo počasneje potovala z mobilno fazo, medtem ko se snov z nižjim porazdelitvenim koeficientom ne bo zadrževala na stacionarni fazi oziroma v njej. Dveh snovi, ki imata enak porazdelitveni koeficient, s takim sistemom ne moremo ločiti in moramo izbrati drugega (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007).

2.6.1 Tankoplastna kromatografija (TLC)

Tankoplastna kromatografija je planarna separacijska tehnika. Ločevanje komponent vzorca poteka med potovanjem topila za razvijanje po tanki plasti sorbenta, ki je nanesen na primerni podlagi. Najpogosteje je to steklena plošča. Planarne tehnike so običajno odprti sistemi, kar pomeni, da poleg sorbenta in topila za razvijanje (eno topilo ali zmes topil), ki se uporablja za razvijanje kromatograma v kromatografski kadi, vpliva na ločevanje spojin tudi plinska faza v prostoru nad plastjo sorbenta. Zaradi odparevanja topil s sorbenta v prostor in zaradi različnih interakcij s sorbentom se med razvijanjem kromatograma spreminjajo lastnosti topila za razvijanje, ki zaradi kapilarnih sil potuje po plasti sorbenta. V plasti nastajajo gradienti. Tudi lastnosti sorbenta se med potovanjem topila za razvijanje spreminjajo. V plasti sorbenta se oblikuje psevdo-stacionarna faza.

Izraz mobilna faza se v tankoplastni kromatografiji uporablja le v primeru, da gre za eno komponento topilo. Za poimenovanje topila ali zmesi topil, ki se uporabljajo za razvijanje, je ustreznnejši izraz topilo za razvijanje, za poimenovanje kromatografskega materiala pa izraz sorbent.

Pred vsako analizo je potrebno najprej izbrati TLC plošče z ustreznim nanosom sorbenta. Danes se uporabljajo industrijsko pripravljene plošče, ki zagotavljajo kvalitetno materiala, pripravljene plošče pa so običajno tudi optično homogene, kar je zelo pomembno pri kvantitativnem vrednotenju kromatogramov z denzitometrom. Plasti sorbenta se pred uporabo lahko preparirajo z različnimi solmi ali pufri. Na ta način nastanejo plasti z novimi lastnostmi, na katerih se uspešno ločijo tudi nekatere strukturno zelo podobne spojine, ki jih na neprepariranih plasteh ni mogoče uspešno ločiti.

Izredno pomembno opravilo pri TLC je nanašanje vzorcev. Veliko napak nastane prav zaradi neustreznega nanašanja. Glede na tip in namen kromatografije (preparativna, kvalitativna, kvantitativna TLC oziroma HPTLC) je potrebno z ustrezno napravo za nanašanje nanesti na sorbent ustrezno množino vzorca. Ta je običajno od 10 ng do nekaj mg. Vzorce, raztopljene v primernem topilu, se lahko nanaša v točko ali črto. Za to se uporabljajo polavtomatski ali avtomatski nanašalci, ki močno olajšajo delo. Razdalje med

posameznimi nanosi morajo biti dovolj velike, da med razvijanjem ne pride do medsebojnega vpliva komponent sosednjih nanosov. Na TLC ploščah so razdalje med nanosi običajno med 10 in 20 mm, na HPTLC ploščah pa med 5 in 10 mm. Za nanašanje v črto se uporablajo igle, opremljene z dozatorji ter polavtomatski nanašalci za nanašanje z razprševanjem. Razdalje med nanosi morajo biti enake, pri vseh nanosih pa mora biti enaka tudi razdalja do spodnjega roba plošče.

Ločene sestavine vzorca so, odvisno od količine posamezne spojine, v obliki večjih ali manjših lis na plasti na različnih mestih med nanosom in mejo, do katere je pripravljalo topilo za razvijanje. Opazujejo se lahko v vidni ali UV svetlobi. Na plošči se lahko ločene spojine, ki svetlobe ne absorbirajo, potopijo ali orosijo s primernim reagentom s čimer se derivatizirajo v spojine, ki svetlubo absorbirajo v vidnem ali UV območju ali fluorescirajo in tako se poveča selektivnost in občutljivost metode. Množino posameznih ločenih komponent na plošči se lahko vizualno oceni, glede na velikost njihovih lis ali pa ovrednoti z denzitometrom (Prošek in Pukl, 1991).

2.6.2 Plinska kromatografija (GC)

Plinska kromatografija je kromatografska tehnika kjer je mobilna faza plin, stacionarna pa je tekočina ali trdna snov. Glede na fizikalno-kemijske pogoje je plinska kromatografija adsorpcijska (plin-trdno) ali ločevalna (plin-tekočina).

Preizkusni vzorec (zmes snovi) je uveden s tokom inertnega nosilnega plina v kromatografsko kolono, ki je napolnjena s trdno ali tekočo stacionarno fazo. Tekoča stacionarna faza se lahko absorbera na inertnem nosilec ali pa se immobilizira na steni kapilar (kapilarna kolona). Če je stacionarna faza tekoča zmes, poteka skozi kolono vzorec, ki se razdeli med stacionarno fazo in mobilno fazo nosilnega plina. Ločevanje zmesi spojin se izvaja pod pogojem, da imajo le-te različne topnosti v tekoči stacionarni fazi, tako je eluiranje odvisno od njihove topnosti. Prvi del, ki pride iz kolone je najmanj topen v stacionarni fazi. Ločene komponente so na izhodu pomešane le še z inertnim plinom (mobilna faza) in tako vstopajo v detektor. Detektor je lahko plamensko ionizacijski, foto-ionizacijski, masni spektrometer, detektor termične prevodnosti, itd. Izhodni signal je signal za zapis kromatograma (Horvat in Margeta, 2009).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Plodovi

- Granatna jabolka iz Brazilije
- Granatna jabolka iz hrvaške Istre

Na sliki 3 sta prikazani granatni jabolki, dveh različnih geografskih porekla, ki sta bili predmet raziskave.



Slika 3: Brazilsko (BGJ) in hrvaško (HGJ) granatno jabolko

3.1.2 Reagenti

- metanol (J. T. Baker, Nizozemska)
- *n*-heksan (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- etil acetat (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- mravljična kislina (Kemiika, Hrvaška)
- klorovodikova kislina 37 % (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- askorbinska kislina (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- diklorofenol-indofenol (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- parafinsko olje (Sigma - Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- 2 - aminoetyl difenilborinat (Fluka, Buchs, Švica)

- aceton (Sigma – Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- toluen (Carlo Erba, Italija)
- kloroform (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- ocetna kislina (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- 1 – propanol (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- etanol (96 % Merck, Darmstadt, Nemčija)
- reagent DPPH· (Sigma, Steinheim, Nemčija)
- reagent Folin-Ciocalteu (Fluka, Buchs, Švica)
- tekoči dušik (Messer Greisheim, Nemčija)
- borov triflourid (Sigma – Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- 4-dimetilaminocimetov aldehid ((E)-3-(4-dimetilaminofenil)prop-2-enol) (DMACA) (Merck, Darmstadt, Nemčija)

3.1.3 Standardi različnih fenolnih spojin

- kvercetin (Fluka, Buchs, Švica)
- protokatehujeva kislina (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- klorogenska kislina (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- galna kislina (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- *p*-kumarna kislina (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- *o*-kumarna kislina (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- ferulna kislina (Fluka, Buchs, Švica)
- kavna kislina (Fluka, Buchs, Švica)
- (+) - katehin (Carl Roth, Karlsruhe, Nemčija)
- (-) - epikatehin (Sigma – Aldrich, St. Luis, Missouri, ZDA)

3.1.4 Aparature

- analizna tehntica Sartorius
- tehntica (Mettler Toledo AT201, Švica)
- spektrofotometer (Hewlett-Packard 8453, ZDA)
- magnetno mešalo (IKA® RH basic KT/C, Nemčija)
- rotavapor (Büchi Rotavapor r-114, Švica)
- centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5415c, Nemčija)
- centrifuga (Rotanta 460R, Hettich, Nemčija)
- kromatografska kad (Camag) za horizontalno razvijanje plošč 20 cm × 10 cm
- kromatografska kad s prekatom (Camag) za vertikalno razvijanje plošč
- naprava za avtomatsko nanašanje Automatic TLC Sampler 4 (ATS 4, Camag) s 25 µL injekcijo in z razprševanjem inertnega plina (dušik), povezana z osebnim računalnikom s programsko opremo winCATS – Planar Chromatography Manager (verzija 1.4.1.8154)
- Camag-ov video dokumentacijski sistem DigiStore 2 z Reprostarjem 3 (komora za osvetljevanje) in digitalnim fotoaparatom je sistem za snemanje in arhiviranje slik tankoplastnih kromatogramov, ki poteka s pomočjo osebnega računalnika in programske opreme winCATS – Planar Chromatography Maneger (verzija

1.4.1.8154). Slike kromatografskih plošč so bile posnete z uporabo izvorov vidne svetlobe in svetlobe z valovno dolžino 254 nm in 366 nm

- naprava za potapljanje TLC plošč v reagente za derivatizacijo, Camag chromatogram immersion device III
- naprava za skeniranje TLC plošč, Camag TLC Scanner 3
- sušilnik za lase, Compact pro 2000 W, Rowenta
- sušilnik Sterimatic ST – 11, Instrumentaria, Zagreb
- paralelni sintetizator Carousel 12 reaction stationTM, v katerem istočasno lahko poteka do 12 reakcij in učinkovito mešanje ter gretje vzorcev



Slika 4: Camagovi horizontalni kadi za razvijanje plošč



Slika 5: Naprava za avtomatsko nanašanje vzorcev na plošče, Automatic TLC Sampler 4



Slika 6: Camag-ov video dokumentacijski sistem DigiStore 2 z Reprostarjem 3 (komora za osvetljevanje) in digitalnim fotoaparatom - sistem za snemanje in arhiviranje slik tankoplastnih kromatogramov



Slika 7: Paralelni sintetizator Carousel 12 reaction stationTM v katerem istočasno lahko poteka do 12 reakcij in učinkovito mešanje in gretje vzorcev

3.1.5 Pribor

- Stekleni inventar: erlenmajerice, čaše, bučke, merilne bučke, tehtalne ladjice, pipete, merilne pipete, viale (GC), epruvete, petrijevke, liji, merilni valji, steklene palčke
- Ostalo: rokavice (Purple Nitrile Exam Gloves, Kimberly-Clark), zaščitna halja, spatule, kapalke, tehtalne ladjice, avtomatske pipete, parafilm, aluminijasta folija, pincete
- HPTLC plošče silikagel 60, 20 cm 10 cm (Merck, št. artikla: 1.05641.0001)
- HPTLC plošče celuloza, 20 cm 10 × cm (Merck, št. artikla: 1.05786.0001)
- TLC plošče silikagel 60, 20 × 10 cm (Merck, št. artikla: 1.04367.1000)

3.1.6 Priprava raztopin

3.1.6.1 Priprava standardnih raztopin fenolnih spojin za TLC analizo

- Standardna raztopina ferulne kisline: natehtali smo 1,03 mg ferulne kisline in jo s 4 mL metanola kvantitativno prenesli v 10 mL merilno bučko, ki smo jo nato z metanolom dopolnili do oznake.
- Standardna raztopina galne kisline: natehtali smo 1,09 mg galne kisline in jo s 4 mL metanola kvantitativno prenesli v 10 mL merilno bučko, ki smo jo nato z metanolom dopolnili do oznake.
- Standardna raztopina *p*-kumarne kisline: natehtali smo 1,06 mg *p*-kumarne kisline in jo s 4 mL metanola kvantitativno prenesli v 10 mL merilno bučko, ki smo jo nato z metanolom dopolnili do oznake.
- Standardna raztopina *o*-kumarne kisline: natehtali smo 1,08 mg *o*-kumarne kisline in jo s 4 mL metanola kvantitativno prenesli v 10 mL merilno bučko, ki smo jo nato z metanolom dopolnili do oznake.
- Standardna raztopina klorogenske kisline: natehtali smo 1,07 mg klorogenske kisline in jo s 4 mL metanola kvantitativno prenesli v 10 mL merilno bučko, ki smo jo nato z metanolom dopolnili do oznake.
- Standardna raztopina kavne kisline: natehtali smo 1,06 mg kavne kisline in jo s 4 mL metanola kvantitativno prenesli v 10 mL merilno bučko, ki smo jo nato z metanolom dopolnili do oznake.
- Standardna raztopina protokatehujeve kisline: natehtali smo 1,10 mg protokatehujeve kisline in jo s 4 mL metanola kvantitativno prenesli v 10 mL merilno bučko, ki smo jo nato z metanolom dopolnili do oznake.
- Standardna raztopina kvercetina: natehtali smo 1,03 mg kvercetina in ga s 4 mL metanola kvantitativno prenesli v 10 mL merilno bučko, ki smo jo nato z metanolom dopolnili do oznake.
- Standardna raztopina (+) - katehina: natehtali smo 1,00 mg (+) - katehina in ga s 4 mL metanola kvantitativno prenesli v 10 mL merilno bučko, ki smo jo nato z metanolom dopolnili do oznake.
- Standardna raztopina (-) - epikatehina: natehtali smo 1,00 mg (-) - epikatehina in ga s 4 mL metanola kvantitativno prenesli v 10 mL merilno bučko, ki smo jo nato z metanolom dopolnili do oznake.
- Standardna raztopina (+) - katehina ($\gamma = 0,005 \text{ mg/mL}$): iz viale s koncentracijo 0,1 mg/mL smo odpipetirali 0,5 mL raztopine z 1 mL stekleno merilno pipeto v 10 mL bučko. Nato smo bučko dopolnili do oznake z metanolom in premešali.

- Standardna raztopina (+) - katehina ($\gamma = 0,002 \text{ mg/mL}$): iz viale s koncentracijo 0,1 mg/mL smo odpipetirali 0,2 mL raztopine z 1 mL stekleno merilno pipeto v 10 mL bučko. Nato smo bučko dopolnili do oznake z metanolom in premešali.
- Interni standard za določanje višjih maščobnih kislin: Natehtali smo 0,0601 g C₁₇ (heptadekanojska kislina - 17:0) in dodali 6 mL topila (2 mL *n*-heksana in 4 mL metanola).

3.1.6.2 Priprava drugih raztopin

- 70 % etanol: V 50 mL merilno bučko smo dodali 36,5 mL 96 % etanola in do oznake dopolnili z destilirano vodo.
- Reagent Folin-Ciocalteu: V epruveto smo odpipetirali 3 mL reagenta Folin-Ciocalteu in 6 mL destilirane vode in epruveto zavili v aluminijasto folijo.
- 20 % Na₂CO₃ reagent: V merilno bučko smo natehtali 20 g Na₂CO₃ in dodali 80 g destilirane vode.
- Reagent DPPH[·] za spektrofotometrično metodo: V 50 mL merilno bučko smo natehtali 1,97 mg reagenta DPPH[·] in s 96 % etanolom dopolnili do oznake. Bučko smo zavili v aluminijasto folijo in jo postavili v hladilnik (T = 4 °C).
- Detekcijski reagent DPPH[·] za TLC: V 20 mL merilno bučko smo natehtali 8 mg reagenta DPPH[·] in dodali 20 mL metanola. Bučko smo zavili v aluminijasto folijo in jo postavili v hladilnik (T = 4 °C).
- Detekcijski reagent Naturstoff: V 100 mL merilno bučko smo dodali 1 g 2 – aminoethylnega estra difenilborne kisline in dopolnili do oznake z metanolom (Jork in sod., 2003)
- Reagent za pojačanje fluorescence: v 250 mL bučko smo dodali 70 mL parafinskega olja in 140 mL *n*-heksana.
- Reagent za hidrolizo: v 100 mL merilno bučko smo dodali 10 mL HCl, 40 mL destilirane vode in 50 mL metanola.
- Detekcijski reagent DMACA: v 200 mL merilno bučko smo natehtali 0,06 g 4 – dimetilaminocimetovega aldehyda, in dodali 13 mL 37 % klorovodikove kisline in dopolnili do oznake z etanolom (Glavnik in sod., 2009).
- Diklorofenol-indofenol (DI): 200 mg DI smo raztopili v 8 mL vrele destilirane vode. Kvalitativno smo prelili v 500 mL merilno bučko in dopolnili do oznake.

3.2 METODE

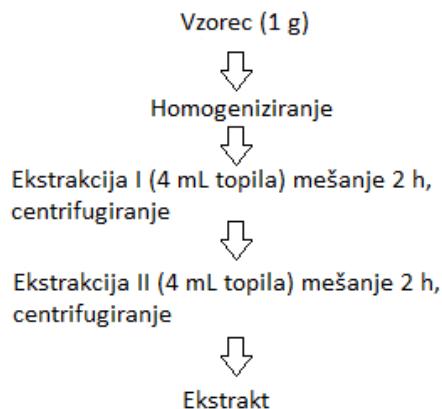
3.2.1 Priprava vzorca

Granatna jabolka z geografskim poreklom Brazilija so bila kupljena na Ljubljanski tržnici, granatna jabolka s poreklom Hrvaška pa so bila nabранa v hrvaški Istri, v vasi Marasi. Do nadaljnega dela smo jih shranili v hladilniku pri 4 °C. Vsa granatna jabolka smo razrezali in razdelili na 5 različnih frakcij: lupina, meso, membrana med mesom in semen, sok smo iztisnili iz ovoja okoli semena in semena. Po tej obdelavi smo ločene frakcije liofilizirali pri temperaturi -20 °C in tlaku 0,02 bar do krhkosti. Vse vzorce smo nato hranili v zamrzovalniku pri temperaturi -20 °C. Vzorcev semen za določanje maščobnih kislin nismo liofilizirali, ampak smo jih le zamrznili na -20 °C. Vzorce sokov za določanje vitamina C smo prav tako le zamrznili na -20 °C.

3.2.2 Določanje skupnih fenolnih spojin v granatnem jabolku

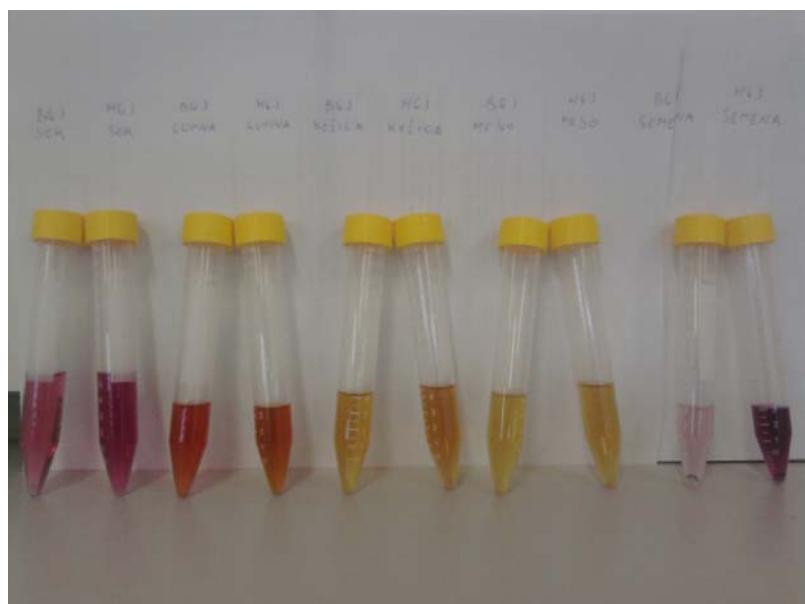
3.2.2.1 Ekstrakcija

Terilnico smo najprej ohladili s tekočim dušikom, zatem smo dodali vzorec, ki je bil shranjen pri -20 °C in ga homogenizirali do prahu. Obenem smo v terilnico dodajali tudi tekoči dušik za boljše homogeniziranje. V epruveto smo odtehtali 1 g homogeniziranega vzorca in dodali 4 mL topila (70 % etanol oz. voda) in dobljeno suspenzijo stresali 2 uri pri 23 °C na stresalniku. Zatem smo suspenzijo centrifugirali 10 min pri $11800 \times g$ RCF. V drugo epruveto smo odpipetirali supernatant in epruveto ovili v aluminijasto folijo. Ostanku pa smo dodali 4 mL topila in ga na stresalniku 2 uri stresali pri 23 °C, ga nato centrifugirali 10 min pri $11800 \times g$ RCF, odpipetirali supernatant v epruveto ovito z aluminijasto folijo, ostanek pa zavrgli. Dobljeno suspenzijo smo še enkrat 10 min centrifugirali pri $11800 \times g$ RCF in tako dobili bistre ekstrakte v 70 % etanolu oz. v vodi.



Slika 8: Shema ekstrakcijskega postopka

Na sliki 9 so prikazani ekstrakti frakcij brazilskeh in hrvaških granatnih jabolk.



Slika 9: Ekstrakti frakcij brazilskih in hrvaških granatnih jabolk (od leve proti desni si sledijo: B sok, H sok, B lupina, H lupina, B membrana, H membrana, B meso, H meso, B semena, H semena)

Na sliki 9 vidimo razlike v barvah med različnimi ekstrakti frakcij granatnih jabolk in med obema, brazilskim in hrvaškim granatnim jabolkom. Očitna je razlika v barvi ekstrakta lupin in mesa granatnih jabolk obeh porekel, saj je ekstrakt lupine v obeh primerih bolj rdečkast, medtem ko je ekstrakt mesa rumenkasto rjav. Barva ekstrakta lupin in mesa se med obema granatnima jabolkoma ne razlikuje bistveno. Podobno barvo kot meso imajo tudi ekstrakti membrane, pri čemer ima malo močnejšo barvo ekstrakt membrane hrvaškega granatnega jabolka. Večja razlika v barvi je pri sokovih, saj je barva brazilskega granatnega jabolka nežna roza-vijolična, barva hrvaškega pa temnejše-vijolična. Največja razlika v barvi je pri semenih, saj je ekstrakt semena brazilskega granatnega jabolka bledo svetlo roza, hrvaški pa temno vijolične barve. Opazimo, da je v vseh frakcijah razlika med brazilskim in hrvaškim granatnim jabolkom v tem, da je barva bolj intenzivna pri vseh ekstraktih hrvaškega granatnega jabolka.

3.2.2.2 Folin-Ciocalteu metoda

Določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin (SFS) je potekalo s pomočjo reagenta Folin-Ciocalteu (FC), po pritejenem postopku, ki ga je opisal Gutfinger (1981). Metoda: V centrifugirko z 0,20 mL vzorca smo dodali 0,125 mL reagenta FC, mešali 3 minute, dodali 0,125 mL 20 % Na_2CO_3 , mešali in dodali 0,550 mL destilirane vode in premešali. Centrifugirko smo nato centrifugirali 10 minut pri $8200 \times g$ RCF. Po 40 minutah smo izmerili absorbanco pri 765 nm proti slepemu vzorcu. Spleti vzorec: v centrifugirko z 0,20 mL topila za ekstrakcijo smo dodali 0,125 mL reagenta FC, mešali 3 minute, dodali 0,125 mL 20 % Na_2CO_3 , mešali in dodali 0,550 mL destilirane vode ter premešali. Centrifugirko smo nato centrifugirali 10 minut pri $8200 \times g$ RCF. Po 40 minutah smo izmerili absorbanco pri 765 nm.

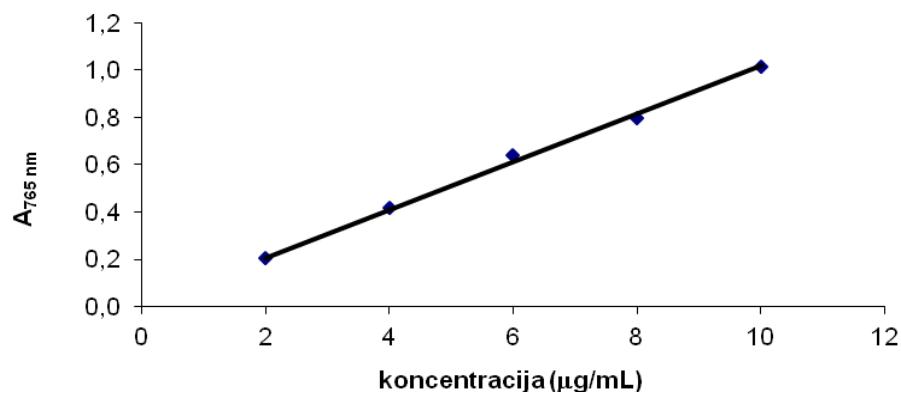
3.2.2.3 Umeritvena krivulja (70 % etanol)

Za pripravo umeritvene krivulje (odvisnost absorbance od koncentracije) smo uporabili galno kislino. V 10 mL merilno bučko smo zatehtali 10 mg galne kisline in bučko do oznake dopolnili s 70 % etanolom. Nato smo odpipetirali 1 mL tako pripravljene raztopine galne kisline v 10 mL merilno bučko in jo dopolnili s 70 % etanolom. Koncentracija tako pripravljene raztopine galne kisline je bila 0,1 mg/mL. Pripravili smo 15 mikrocentrifugirk in v paralelkah pripravili naslednje raztopine galne kisline:

Preglednica 3: Prostornine galne kisline, 70 % etanola, reagentov za umeritveno krivuljo v topilu 70 % etanol in povprečne vrednosti izmerjenih absorbanc pri 765 nm.

$V_{\text{galne kisline}} (\mu\text{L})$	$V_{70\% \text{EtOH}} (\mu\text{L})$	$V_{\text{FC reagenta}} (\text{mL})$	$V_{\text{Na}_2\text{CO}_3} (\text{mL})$	$V_{\text{destilirane vode}} (\text{mL})$	$\bar{A}_{765} (\text{nm})$
20	180	0,125	0,125	0,550	0,2048
40	160	0,125	0,125	0,550	0,4172
60	140	0,125	0,125	0,550	0,6387
80	120	0,125	0,125	0,550	0,7956
100	100	0,125	0,125	0,550	1,0154

Iz izmerjenih absorbanc pri 765 nm za ustrezne masne koncentracije galne kisline smo narisali umeritveno krivuljo. Z linearno regresijo smo določili smerni koeficient premice k , ki je bil $0,1019 \pm 0,001$ pri 25°C .



Slika 10: Umeritvena krivulja odvisnosti absorbance pri 765 nm od masne koncentracije galne kisline v 70 % etanolu pri 25°C

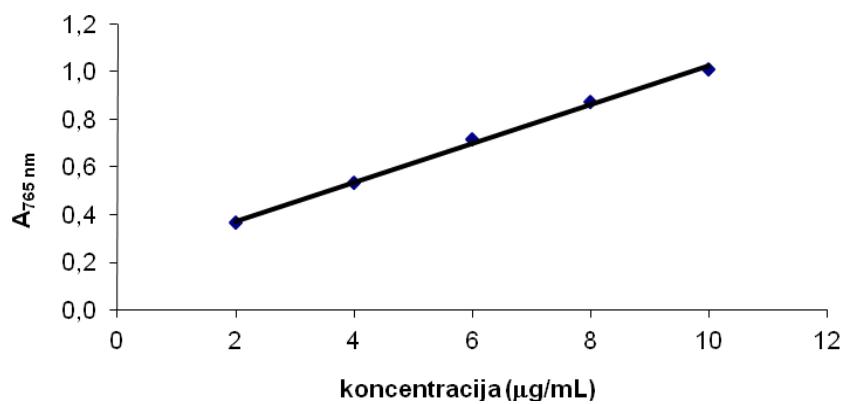
3.2.2.4 Umeritvena krivulja (destilirana voda)

Za pripravo umeritvene krivulje (odvisnost absorbance od koncentracije) smo uporabili galno kislino. V 10 mL meritno bučko smo zatehtali 10 mg galne kisline in bučko do oznake dopolnili z destilirano vodo. Nato smo odpipetirali 1 mL tako pripravljene raztopine galne kisline v 10 mL meritno bučko in jo dopolnili z destilirano vodo. Koncentracija tako pripravljene raztopine galne kisline je bila 0,1 mg/mL. Pripravili smo 15 mikrocentrifugirk in v paralelkah pripravili naslednje raztopine galne kisline:

Preglednica 4: Prostornine galne kisline, destilirane vode, reagentov za umeritveno krivuljo v topilu destilirana voda in povprečne vrednosti izmerjenih absorbanc pri 765 nm.

$V_{\text{galne kisline}} (\mu\text{L})$	$V_{\text{destilirane vode}} (\mu\text{L})$	$V_{\text{FC reagenta}} (\text{mL})$	$V_{\text{Na}_2\text{CO}_3} (\text{mL})$	$V_{\text{destilirane vode}} (\text{mL})$	\bar{A}_{765} (nm)
20	180	0,125	0,125	0,550	0,3670
40	160	0,125	0,125	0,550	0,5315
60	140	0,125	0,125	0,550	0,7157
80	120	0,125	0,125	0,550	0,8731
100	100	0,125	0,125	0,550	1,0097

Iz izmerjenih absorbanc pri 765 nm za ustrezne masne koncentracije galne kisline smo narisali umeritveno krivuljo. Z linearno regresijo smo določili smerni koeficient premice k , ki je bil $0,0813 \pm 0,001$ pri 25°C .



Slika 11: Umeritvena krivulja odvisnosti absorbance pri 765 nm od masne koncentracije galne kisline v destilirani vodi pri 25°C

Masno koncentracijo SFS v vzorcih s 70 % etanolom smo izračunali po enačbi:

$$\gamma_{\text{g.k.}} = \bar{A}_{765} / k \quad \dots(1)$$

Masno koncentracijo SFS v vzorcih z destilirano vodo smo izračunali po enačbi:

$$\gamma_{\text{g.k.}} = (\bar{A}_{765} - n) / k \quad \dots(2)$$

Vsebnost SFS v vzorcih smo izrazili kot maso galne kisline na gram vzorca. Izračunali smo jo iz koncentracije SFS v reakcijski mešanici, razredčitvi ekstrakta in mase vzorca.

3.2.3 Analiza DPPH·

Analizo sposobnosti lovljenja prostih radikalov smo povzeli po metodi, ki so jo opisali Brand-Williams in sodelavci (1995). Metoda temelji na spektrofotometričnem sledenju spremembe barve stabilnega prostega radikala DPPH·, ki absorbira svetlobo pri 517 nm.

V kiveto smo najprej odpipetirali 1,450 mL pripravljene raztopine DPPH· (0,1 mmol/l), dodali 0,05 mL raztopine ekstrakta našega vzorca ter pri 23 °C po 30 minutah izmerili absorbanco pri valovni dolžini 517 nm proti slepemu vzorcu (96 % etanol). Vsako meritev smo opravili v treh paralelkah. Izmerili smo tudi absorbanco kontrolnega vzorca, kjer smo v kivete k 1,450 mL raztopine DPPH· dodali 0,05 mL topila (70 % etanol in destilirana voda).

Sposobnost lovljenja prostih radikalov smo izrazili kot delež inhibicije (%):

$$\% \text{ inhibicije DPPH} \cdot = [(A_{k517} - A_{517})/A_{k517}] \times 100 \quad \dots(3)$$

Kjer je A_{k517} absorbanca kontrolnega vzorca in A_{517} absorbanca vzorca pri 517 nm.

3.2.4 Določanje vsebnosti višjih maščobnih kislin v semenih granatnega jabolka s plinsko kromatografijo

Maščobno kislinsko sestavo vzorcev smo določili s plinsko kromatografijo. Za to analizo je bilo potrebno predhodno pripraviti metilne estre maščobnih kislin (MEMK). Določili smo jih z metodo *in situ* transesterifikacije, kjer ni potrebna predhodna ekstrakcija maščob iz vzorca (Park in Goins, 1994). Maščobne kisline smo določali le v semenih. Zamrznjena semena smo v mešalniku zmleli, nato v 10 mL steklene viale odtehtali približno 0,5 g vzorca (točne vrednosti so v preglednici 17), mu dodali 100 µL internega standarda (mase so v preglednici 17) in mešanico topil 300 µL diklormetana in 3 mL 0,5 M natrijevega hidroksida. To zmes smo 1 uro segrevali pri 90 °C v vodni kopeli, jo nato ohladili, dodali 3 mL borovega triflourida in 10 minut segrevali v vodni kopeli pri 90 °C. Zmes smo nato ohladili, dodali 3 mL 10 % natrijevega klorida in 1,5 mL *n*-heksana. Zatem smo zmes stresali na stresalniku 1 minuto, nato pa 10 minut centrifugirali pri 4000 rpm. Po centrifugiranju smo odpipetirali *n*-heksansko plast v 1,5 mL viale. Metil estre maščobnih kislin smo določili s plinsko kromatografijo.

Delež MEMK smo določili s plinsko kromatografijo z uporabo plinskega kromatografa Agilent Technologies 6890, s plinsko ionizacijskim detektorjem (FID) in kapilarno kolono HP-88 (100 mm × 0,25 mm × 0,2 µm).

Ločevanje in detekcija sta potekala pri naslednjih pogojih:

- temperaturni program: 150 °C/10min; 2 °C/min do 180 °C, 3 °C do 240 °C (0 minut),
- temperatura injektorja: 250 °C,
- temperatura detektorja: 280 °C,
- injektor: split: splitless: 1:30, volumen 0,5 µL,
- nosilni plin: He, 2,3 mL/min,
- make-up plin: N₂, 45 mL/min
- plin skozi detektor: H₂, 40 mL/min, sintetični zrak (21 % O₂) 450 mL/min.

Po končani analizi smo s pomočjo internega standarda iz kromatografskih vrhov izračunali koncentracije posamezne maščobne kisline:

$$w(\text{mg}/100 \text{ g}) = (A_i \times F_{Ai} \times m_{17} \times 100) / (A_{17} \times F_{Ai17} \times m_{vz}) \quad \dots(4)$$

w = koncentracija posamezne maščobne kisline (mg/100 g)

A_i = površina vrha posamezne maščobne kisline

F_{AI} = koeficient posamezne maščobne kisline (molska masa maščobne kisline/molska masa metilnega estra maščobne kisline)

m₁₇ = masa internega standarda (C17:0) (mg)

A₁₇ = površina internega standarda

F_{AI17} = koeficient internega standarda (molska masa C17:0/molska masa metilnega estra heptadekanojske kisline C17)

m_{vz} = masa vzorca (g)

3.2.5 Določanje vsebnosti l-askorbinske kisline in dehidroaskorbinske kisline (vitamina C)

Dehidroaskorbinska kislina skupaj z askorbinsko kislino predstavlja vitamin C, saj se v telesu v oksido-reduksijskih reakcijah reverzibilno pretvarjata (Poredos, 2006).

Princip: Askorbinska kislina je močan reducent in kot tako jo lahko določimo s titracijo z oksidanti ali tako, da dodamo oksidant v prebitku in ta prebitek reduciramo nazaj z reducentom. Najpogosteje izvedemo direktno titracijo, in sicer z oksidantom 2,6 diklorofenol-indofenolom (DI). Kvantitativno reakcijo motijo drugi reducenti, kot so fenoli, železovi in bakrovi ioni itd., zato je bila potrebna hitra izvedba.

Izvedba: V erlenmajerico smo odpipetirali 2 mL soka in razredčili z destilirano vodo do 150 mL, dodali 5 mL 10 % ocetne kisline in titrirali z reagentom DI do zelo nežne roza barve, ki je bila obstojna 15 sekund.

Slepi vzorec: Ker voda in ocetna kislina porabita nekaj DI-barvila za svojeobarvanje do nežne roza barve, smo morali to napako odšteti, zato smo vzporedno z vzorcem naredili

slepi vzorec. 150 mL vode smo nakisali s 5 mL 10 % ocetne kislino in titrirali iz mikrobirete kot pri vzorcu, vendar le po 0,1 mL reagenta DI.

Standardizacija DI-raztopine: Pripravili smo raztopino, ki je vsebovala 0,24 mg askorbinske kislino v 1 mL. 5 mL te raztopine (1,2 mg askorbinske kislino) smo odpipetirali v erlenmajerico, dodali 150 mL destilirane vode in 5 mL 10 % ocetne kislino in titrirali z DI-raztopino. Tako smo po formuli 5 izračunali faktor DI (f_{DI}), po formulah 6 in 7 pa vsebnost vitamina C v soku granatnega jabolka (Plestenjak in Golob, 2003).

$$f_{DI} = 5 \text{ mL}/V_{DI} \text{ (mL)} \quad \dots(5)$$

$$V_{DI} \text{ (mL) za } 2 \text{ mL soka} = V_{\text{glavne titracije}} \text{ (mL)} - V_{\text{slepega vzorca}} \text{ (mL)} \quad \dots(6)$$

$$1 \text{ mL DI} = 0,24 \text{ mg vitamina C}$$

$$m_{\text{vitamina C}} \text{ (mg) /L soka} = ((V_{DI} \text{ (mL)} \times f_{DI} \times 0,24)/V_{\text{soka}} \text{ (mL)}) \times 1000 \quad \dots(7)$$

3.2.6 Hidroliza ekstraktov frakcij granatnih jabolk

Postopek hidrolize, ki so ga opisali Nuutila in sodelavci (2002) smo priredili, saj smo uporabljali grelec z magnetnim mešalom in povratnim hlajenjem (Carousel, slika 7), ki je omogočil lažjo izvedbo hidrolize. V epruveto Caurosel smo natehtali 50 mg ekstrakta frakcije, dodali 5 mL reagenta za hidrolizo (10 mL HCl, 40 mL destilirane vode in 50 mL metanola) in 2 mg askorbinske kislino kot antioksidanta za povečanje izkoristka, jo postavili v napravo Carousel, nastavili termostat na 80 °C, v epruveto smo dali magnetno mešalo, na vrhu epruvete pa je bil vodni hladilnik. Potek hidrolize smo spremljali 24 ur tako, da smo vsaki dve uri (po 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 18 h in 24 h) odpipetirali po 0,5 mL raztopine, to prenesli v viale in na podlagi TLC analize izbrali optimalni čas hidrolize.

3.2.7 Kvalitativno določanje katehinov s TLC

Katehine smo določali, kot so opisali Vovk in sodelavci (2005), in sicer smo na HPTLC celulozne plošče velikosti 20 cm × 10 cm, ki smo jih naprej razvili v kadi z destilirano vodo in nato 5 minut sušili s sušilnikom za lase, nato smo z avtomatskim nanašalcem ATS 4 10 mm od spodnjega roba v črte z dolžino 6 mm, nanesli raztopine standardov in 10 × razredčene ekstrakte frakcij granatnih jabolk. Volumni nanosov so podani v preglednici 5. Plošče smo razvijali v horizontalni kromatografski kadi (sendvič konfiguracija) za plošče 20 cm × 10 cm. V kanal kadi smo nalili 6 mL topila za razvijanje. Uporabili smo tri različna topila za razvijanje in sicer: 1 – propanol : H₂O : ocetna kislina (4 : 2 : 1; v/v/v), 1 – propanol : H₂O : ocetna kislina (20 : 80 : 1; v/v/v) in H₂O.

Kromatografsko ploščo z nanosi smo v kad položili tako, da je bila plast sorbenta obrnjena navzdol. Topilo za razvijanje se je zaradi površinske napetosti prenašalo iz kanala preko steklene ploščice na rob plasti sorbenta. Ploščo smo razvijali do razdalje 6 cm od nanosov. Topilo za razvijanje smo nato s kromatografske plošče odstranili s tokom toplega zraka. Da so ločene spojine (lise) na površini sorbenta postale vidne, smo posušeno kromatografsko ploščo za 5 sekund potopili v detekcijski reagent DMACA, jo posušili s tokom toplega zraka in nato počakali 5 minut preden smo kromatograme posneli z video dokumentacijskim sistemom, pri čemer smo uporabili belo svetlobo.

3.2.7.1 Kvantitativno določanje katehina s TLC

Na HPTLC celulozno ploščo smo nanesli različne volumne $10 \times$ razredčenih ekstraktov frakcij ter različne volumne in koncentracije standardov. Podatki o vseh 10 nanosih so podani v preglednici 5. Po končani kromatografiji pod pogoji navedenimi v prejšnjem poglavju, smo katehine detektirali z detekcijskim reagentom DMACA.

Preglednica 5: Volumni (V) nanosov $10 \times$ razredčenih ekstraktov frakcij granatnih jabolk in standardov, koncentracije (γ) standardov ter masa (m) standardov, nanesenih na HPTLC celulozno ploščo.

Nanos	V (μl)	γ (μg/μl)	m (ng)
HGJ semena	3,0		
HGJ sok	6,0		
Standard katehin	1,0	0,002	2
Stadndard epikatehin	4,0		
HGJ membrana	5,0		
Standard katehin	2,0	0,002	4
HGJ meso	4,0		
HGJ lupina	1,0		
Standard katehin	6,0	0,002	12
BGJ semena	4,0		
BGJ sok	8,0		
Standard katehin	4,0	0,005	20
BGJ membrana	3,0		
Standard katehin	5,0	0,005	25
BGJ meso	2,0		
BGJ lupina	1,0		
Standard katehin	6,0	0,005	30
BGJ lupina	4,0		

3.2.8 Kvalitativno določanje fenolnih spojin s TLC

Fenolne spojine smo določali po metodi, ki so jo opisali Simonovska in sodelavci (2003), in sicer tako, da smo na HPTLC silikagel 60 plošče velikosti $20 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$, ki smo jih predhodno razvili v topilu kloroform : H_2O (1 : 1; v/v) in 30 minut sušili v sušilniku pri 110°C , z avtomatskim nanašalcem ATS 4 10 mm od spodnjega roba v črte z dolžino 5 mm, nanesli raztopine standardov fenolnih spojin in ekstrakte frakcij granatnih jabolk. V kanal horizontalne kadi (sendvič konfiguracija) smo odpipetirali 6 mL topila za razvijanje *n*-heksan : etil acetat : mravljična kislina (20 : 19 : 1; v/v/v). V naslednjem primeru pa etil acetat : voda : mravljična kislina (85 : 15 : 10; v/v/v), v tank kadi pa 15 mL tega topila.

Pri topilu *n*-heksan : etil acetat : mravljična kislina (20 : 19 : 1; v/v/v) smo uporabili vzorce po 18 urah hidrolize, pri topilu etil acetat : voda : mravljična kislina (85 : 15 : 10; v/v/v) pa smo uporabili $10 \times$ razredčene ekstrakte frakcij. Plošče smo razvijali do razdalje 6 cm od nanosov. Nato smo s kromatografske plošče odstranili topilo za razvijanje tako, da smo jo

posušili v toku toplega zraka (sušilnik za lase). Detekcijo smo izvedli tako, da smo posušeno kromatografsko ploščo za 5 sekund potopili v detekcijski reagent Naturstoff, jo posušili s tokom toplega zraka, po 15 minutah dokumentirali s Camagovim video dokumentacijskim sistemom, za še večje ojačanje fluorescence pa smo ploščo za 5 sekund potopili v raztopino parafinsko olje : *n*-heksan (1 : 2; v/v) in jo posušili s tokom toplega zraka. Nato smo z video dokumentacijskim sistemom z uporabo svetlobe z valovno dolžino 254 nm in 366 nm posneli in arhivirali slike tankoplastnih kromatogramov.

3.2.8.1 Določanje fenolnih spojin po detekciji z reagentom Naturstoff in ojačanju fluorescence z raztopino parafinsko olje : *n*-heksan (1 : 2; v/v)

Na HPTLC silikagelno ploščo smo nanesli različne volumne ekstraktov frakcij ter različne volumne standardov fenolnih spojin s koncentracijo 0,1 mg/mL. Vsi nanosi so podani v preglednici 6. Vseh nanosov je bilo 19. Po končani kromatografiji smo fenolne spojine detektirali z detekcijskim reagentom Naturstoff in fluoresenco ojačali z reagentom parafinsko olje : *n*-heksan (1 : 2; v/v).

Preglednica 6: Volumni (*V*) nanosov hidroliziranih ekstraktov frakcij granatnih jabolk in standardov fenolnih spojin ter masa (*m*) nanesenih standardov na ploščo za razvijanje HPTLC silikagel 60.

Nanos	<i>V</i> (µl)	<i>m</i> (ng)
Kvercetin	3,0	30
Protokatehujeva kislina	2,0	20
Klorogenska kislina	2,0	20
Galna kislina	2,0	20
<i>p</i>-kumarna kislina	5,0	50
<i>o</i>-kumarna kislina	5,0	50
Ferulna kislina	2,0	20
Kavna kislina	2,0	20
Katehin	1,0	10
HGJ semena	10,0	
HGJ sok	10,0	
HGJ membrana	10,0	
HGJ meso	10,0	
HGJ lupina	10,0	
BGJ semena	10,0	
BGJ sok	10,0	
BGJ membrana	10,0	
BGJ meso	10,0	
BGJ lupina	10,0	

3.2.9 Določanje antioksidativne učinkovitosti z reagentom DPPH[·] s pomočjo TLC

Antioksidativno učinkovitost ekstraktov frakcij in hidroliziranih ekstraktov frakcij smo določali s ploščo razvito po metodi za fenolne spojine, opisani v poglavju 3.2.8, pri čemer smo detekcijo izvedli z reagentom DPPH·.

Kromatograme smo razvijali do razdalje 6 cm od nanosov. Nato smo s kromatografske plošče odstranili topilo za razvijanje tako, da smo jo posušili v toku toplega zraka. Nato smo z video dokumentacijskim sistemom z uporabo svetlobe z valovno dolžino 366 nm posneli in arhivirali slike tankoplastnih kromatogramov brez vpliva reagenta DPPH·.

Na kromatografsko ploščo smo nanesli različne volumne $10 \times$ razredčenih ekstraktov frakcij in hidroliziranih ekstraktov frakcij po 18 urah hidrolize ter različne volumne standardov s koncentracijo 0,1 mg/mL. Podatki o vseh 18 nanosih so v preglednici 7.

Preglednica 7: Volumen (V) nanosov ekstraktov frakcij in standardov ter masa (m) nanesenih standardov na ploščo HPTLC silikagel 60.

Nanos	V (μl)	m (ng)
Kvercetin	3,0	30
Protokatehujeva kislina	2,0	20
Klorogenska kislina	2,0	20
Galna kislina	2,0	20
p-kumarna kislina	5,0	50
o-kumarna kislina	5,0	50
Ferulna kislina	2,0	20
Kavna kislina	2,0	20
HGJ semena	10,0	
HGJ sok	10,0	
HGJ membrana	10,0	
HGJ meso	10,0	
HGJ lupina	10,0	
BGJ semena	10,0	
BGJ sok	10,0	
BGJ membrana	10,0	
BGJ meso	10,0	
BGJ lupina	10,0	

Pripravljen reagent DPPH· smo s pomočjo vpihanja zraka razpršili po plošči ter počakali 15 minut na delovanje antioksidantov na naših nanosih, nato pa smo tankoplastni kromatogram slikali z video dokumentacijskim sistemom z uporabo bele svetlobe in sliko arhivirali.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 VSEBNOST FENOLNIH SPOJIN V GRANATNEM JABOLKU

Vzorce brazilskega in hrvaškega granatnega jabolka smo si preskrbeli v jesenskem času. V ekstraktih vseh frakcij obeh granatnih jabolk smo določali skupne fenolne spojine s Folin-Ciocalteu metodo. Metoda temelji na oksidaciji fenolnih spojin v alkalnem mediju, ki nato s pomočjo reagenta Folin-Ciocalteu daje modro obarvan kompleks. Vrednosti absorbanc A_{765} ter koncentracije SFS (γ) v posameznih frakcijah v topilu 70 % etanol podaja preglednica 8. Preglednica 9 pa podaja vrednosti absorbanc A_{765} , koncentracije SFS (γ) in faktorje razredčitve (R), ki predstavljajo kolikokrat je posamezna frakcija razredčena, pri posameznih frakcijah v topilu destilirana voda.

Preglednica 8: Koncentracije skupnih fenolnih spojin (γ), vrednosti izmerjenih absorbanc (A_{765}) in faktor razredčitve (R) v frakcijah brazilskega in hrvaškega granatnega jabolka, topilo 70 % etanol.

Brazilsko granatno jabolko					
Ekstrakt	A_{765}	A_{765}	A_{765}	$\gamma(\mu\text{g/mL})$	R
Lupina	0,458	0,460	0,410	21,75	1000
Meso	0,303	0,318	0,316	15,32	1000
Membrana	0,491	0,500	0,513	24,60	1000
Sok	0,375	0,377	0,378	1,85	100
Semena	0,868	0,871	0,874	0,42	10

Hrvaško granatno jabolko					
Ekstrakt	A_{765}	A_{765}	A_{765}	$\gamma(\mu\text{g/mL})$	R
Lupina	0,513	0,499	0,506	24,83	1000
Meso	0,437	0,437	0,435	21,41	1000
Membrana	0,337	0,337	0,337	16,50	1000
Sok	0,370	0,365	0,367	1,80	100
Semena	0,256	0,256	0,256	6,29	1000

Preglednica 9: Koncentracije skupnih fenolnih spojin (γ), vrednosti izmerjenih absorbanc (A_{765}) in faktor razredčitve (R) v frakcijah brazilskega in hrvaškega granatnega jabolka, topilo destilirana voda.

Brazilsko granatno jabolko					
Ekstrakt	A_{765}	A_{765}	A_{765}	$\gamma(\mu\text{g/mL})$	R
Lupina	0,377	0,389	0,401	10,94	1000
Meso	0,479	0,475	0,475	16,30	1000
Membrana	0,357	0,355	0,355	8,87	1000
Sok	0,262	0,254	0,257	0,28	100
Semena	0,385	0,396	0,398	0,11	10

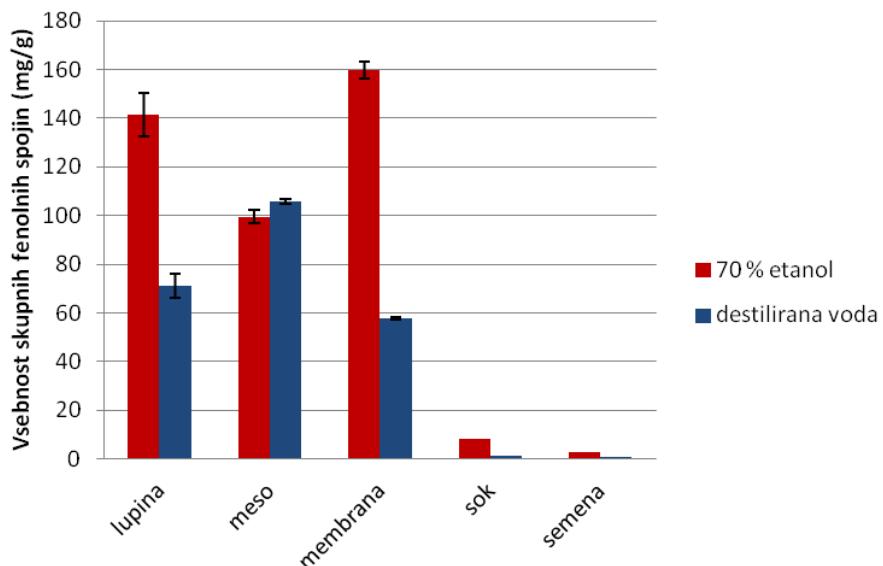
Hrvaško granatno jabolko					
Ekstrakt	A_{765}	A_{765}	A_{765}	$\gamma(\mu\text{g/mL})$	R
Lupina	0,367	0,363	0,368	9,51	1000
Meso	0,352	0,352	0,353	8,67	1000
Membrana	0,257	0,256	0,262	2,90	1000
Sok	0,216	0,218	0,217	0,34	100
Semena	0,420	0,416	0,417	1,27	1000

Vsebnost SFS v vzorcih brazilskega in hrvaškega granatnega jabolka v vseh frakcijah prikazuje preglednica 10. Vsebnost fenolnih spojin smo izrazili kot maso galne kisline (v mg) na gram substrata.

Preglednica 10: Vsebnost skupnih fenolnih spojin, podana kot masa galne kisline na gram liofiliziranega vzorca (mg/g) v vseh frakcijah brazilskega in hrvaškega granatnega jabolka v 70% etanolu in destilirani vodi.

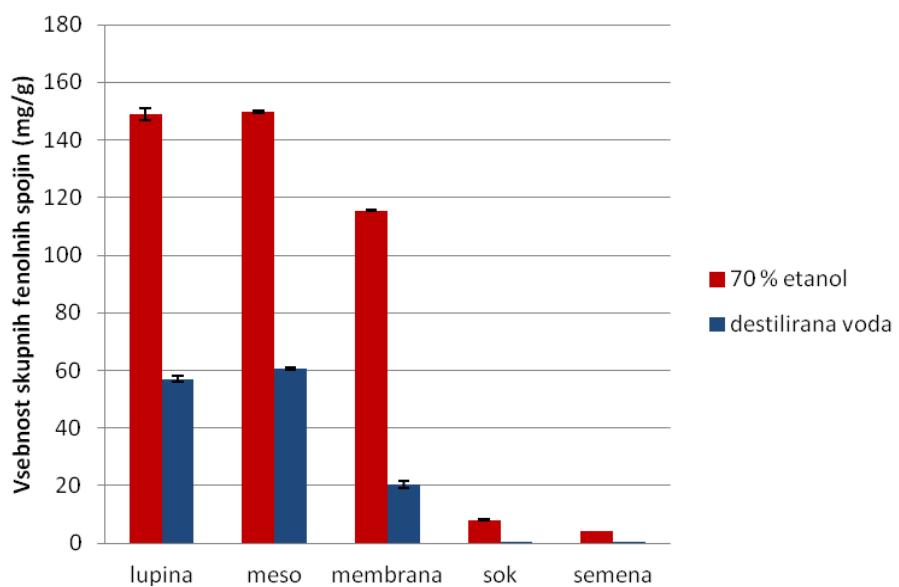
Vsebnost skupnih fenolnih spojin (mg/g)		
Ekstrakt	Brazilsko granatno jabolko	Hrvaško granatno jabolko
Topilo: 70 % etanol		
Lupina	141,4 ± 9,0	149,0 ± 2,0
Meso	99,6 ± 2,6	149,9 ± 0,4
Membrana	159,9 ± 3,4	115,5 ± 0,2
Sok	8,3 ± 0,04	8,1 ± 0,1
Semena	2,8 ± 0,01	4,1 ± 0,01
Topilo: destilirana voda		
Lupina	71,1 ± 4,7	57,0 ± 1,0
Meso	105,9 ± 1,0	60,7 ± 0,3
Membrana	57,7 ± 0,4	20,3 ± 1,3
Sok	1,3 ± 0,1	0,2 ± 0,03
Semena	0,6 ± 0,02	0,5 ± 0,01

Na sliki 12 so grafično prikazane vrednosti SFS v frakcijah brazilskeh granatnih jabolk v topilih 70 % etanol in destilirana voda.



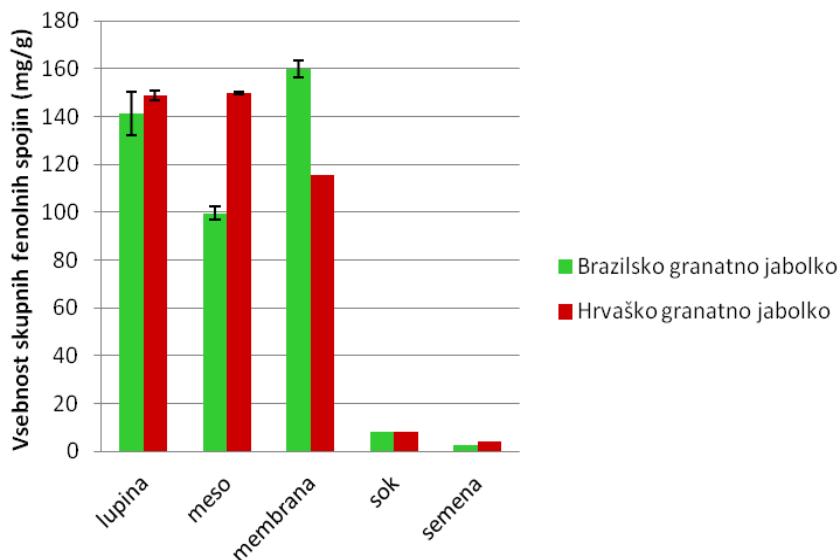
Slika 12: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v frakcijah brazilskeh granatnih jabolk, topila: 70 % etanol in destilirana voda (mg galne kisline/g substrata)

Na sliki 13 so grafično prikazane vrednosti SFS v frakcijah hrvaških granatnih jabolk v topilih 70 % etanol in destilirana voda.



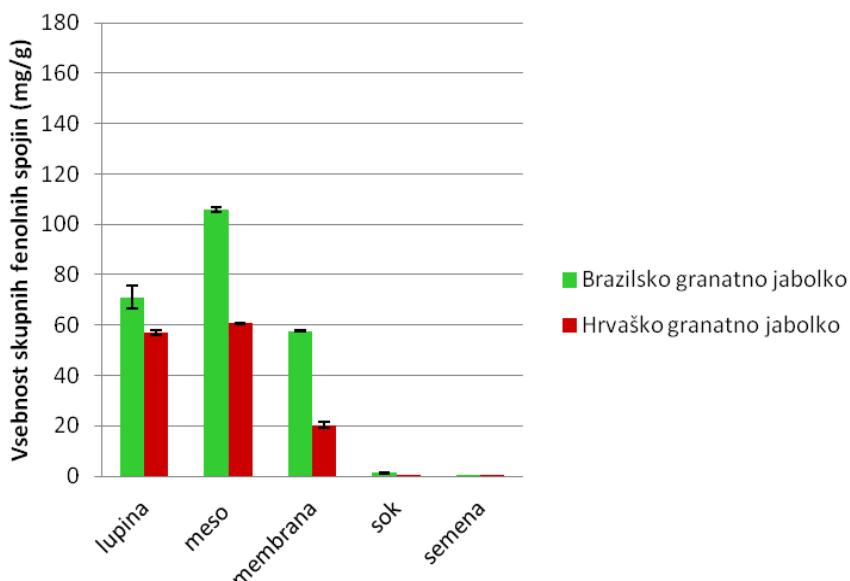
Slika 13: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v frakcijah hrvaških granatnih jabolk, topila: 70 % etanol in destilirana voda (mg galne kisline/g substrata)

Na sliki 14 je grafična primerjava med vsebnostjo SFS v brazilskih in hrvaških granatnih jabolkih v 70 % etanolu.



Slika 14: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v brazilskih in hrvaških granatnih jabolkih, topilo 70 % etanol

Na sliki 15 je grafična primerjava med vsebnostjo SFS v brazilskih in hrvaških granatnih jabolkih v destilirani vodi.



Slika 15: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v brazilskih in hrvaških granatnih jabolkih, topilo destilirana voda

Rezultati vsebnosti skupnih fenolnih spojin (SFS) so zanimivi. Če primerjamo vsebnost SFS v ekstraktih s topilom 70 % etanol (slika 14), lahko ugotovimo, da med brazilskimi in hrvaškimi granatnimi jabolki ni velike razlike. Vsebnosti SFS so tako rekoč enake v oben sadežih tako rekoč enake v frakcijah lupina, sok in semena. Razlike med sadežema so v frakciji meso, kjer je več SFS v HGJ, in v frakciji membrana, kjer je več SFS v BGJ. V članku Pande in Akoh (2009) navajata, da so vsebnosti SFS za semena $89,2 \pm 7,1$ mg/100 g, sok $164,4 \pm 6,4$ mg/100 g, lupino $311,3 \pm 10,8$ mg/100 g pri čemer so rezultati podani na 100 g sveže mase sadeža. Naše vsebnosti pa so precej višje, kar do $159,9 \pm 3,4$ mg/g v frakciji membrana BGJ, oziroma za primerjavo z navedenimi vrednostmi 15990 ± 340 mg/100 g. Ker so naši rezultati podani kot mg/g liofiliziranega vzorca jih tako le stežka primerjamo, ugotovimo pa, da je prav tako največ SFS v lupini in najmanj v semenih. Razlike v vsebnosti SFS med posameznimi frakcijami so manjše kot v našem primeru, kjer je razlika v vsebnosti SFS med lupino in sokom ter semenim zelo velika, v objavljeni literaturi pa je ta razlika manjša. Te razlike lahko pripisemo drugačnemu načinu ekstrakcije, delu s svežimi in ne liofiliziranimi granatnimi jabolki, času obiranja, zrelosti, geografskemu poreklu itd. Gil in sodelavci (2000) pa navajajo, da je vsebnost SFS v soku granatnega jabolka, prej shranjenega v zamrzovalniku, 1808 ± 26 mg/L, kar je približno 1,8 mg SFS v 1 g soka. Ta rezultat je nekoliko nižji od našega ($8,1 \pm 0,1$ mg/g pri HGJ in $8,3 \pm 0,04$ mg/g pri HGJ), kar pa je razumljivo, saj je bil naš vzorec liofiliziran, njihov pa je bil le zamrznjen 9 mesecev na -20 °C. Zelo podobne vrednosti SFS navajajo tudi Sepúlveda in sodelavci (2010), ki so v soku čilskega granatnega jabolka s področja Cerrillos de Tamaya, določili $1918,8 \pm 120,3$ mgGAE/L. V granatnih jabolkih s področja Piedra Colgada so določili vsebnost SFS $1397,7 \pm 51,4$ mgGAE/L, s področja Huechún pa $933,5 \pm 60,6$ mgGAE/L. Ti podatki kažejo na to, kar lahko potrdimo tudi v našem primeru, in sicer, da je vsebnost SFS v granatnih jabolkih odvisna od geografskega porekla. Vsebnosti SFS v frakcijah meso in membrane pa v literaturi nismo zasledili.

Torej, v literaturah avtorji navajajo različne vsebnosti SFS v granatnih jabolkih. Velik vpliv na rezultate posameznih avtorjev imajo postopki določevanja SFS, ki vključujejo tudi pripravo vzorca. V našem primeru smo vzorec razrezali, zamrznili na -20 °C, ga po enem tednu liofilizirali in ga zatem shranili na -20 °C. Nato pa smo napravili dvojno ekstrakcijo z mešanjem v dveh različnih topilih. V nekaterih primerih, ki jih zasledimo v literaturi, pa so izvedli ekstrakcijo iz čisto svežega granatnega jabolka, v drugih iz zamrznjenega, v tretjih pa iz globoko zamrznjenih (-80 °C) granatnih jabolk. Tudi ekstrakcija je potekala v drugačnih pogojih, saj so jo v večini primerov delali s pomočjo topila metanol.

Naslednja primerjava je primerjava vsebnosti SFS v vodnih ekstraktih iz brazilskih in hrvaških granatnih jabolk. Tu ugotovimo, da ni večjih razlik v vsebnosti SFS med frakcijami lupina, sok in semena. Razlike so pri frakcijah meso in membrana, kjer je večja vsebnost SFS na strani BGJ. Vsebnost SFS v frakcijah sok in semena so zelo nizke. Različne vsebnosti SFS v različnih delih, frakcijah granatnih jabolk lahko pripisemo različni kemijski sestavi delov, prav tako pa je zanimivo vprašanje, v katerem zrelostnem obdobju bi bile koncentracije SFS najvišje in v katerem najnižje, saj bi s tem lahko dosegali največje učinkovitosti pri ekstrakciji le teh.

Če primerjamo vsebnost SFS v ekstraktih s topilom 70 % etanol in ekstraktih s topilom destilirana voda pa ugotovimo, da je vsebnost SFS v vseh primerih višja v ekstraktih s

topilom 70 % etanol, razen v frakciji meso iz brazilskega granatnega jabolka, kjer je vsebnost SFS v topilu destilirana voda le malo nad ekstraktom s topilom 70 % etanol. Tudi v literaturi je etanol naveden kot boljše topilo z boljšim izkoristkom kot pa voda, saj Yasoubi in sodelavci (2007) navajajo, da ima najboljši izkoristek kot topilo aceton (35 %), nekoliko slabši je metanol (31 %), etanol je s 23 % izkoristkom tretji po učinkovitosti, voda pa je precej slabša, saj ima le 12 % izkoristek. Povsem na dnu je topilo etil acetat z borim izkoristkom 0,2 %. Te ekstrakcije so bile narejene v frakciji lupina iranskih granatnih jabolk. Glede primernosti topila za ekstrakcijo SFS lahko trdimo, da je bolj primeren 70 % etanol kot pa destilirana voda, saj je v veliki večini primerov v ekstraktu s topilom 70 % etanol ostalo več fenolnih spojin kot pa v primeru topila destilirana voda. Razlika med vsebnostjo SFS v brazilskih oz. hrvaških granatnih jabolk je najverjetneje posledica geografskih razmer, sestave oz. vrste zemlje, na kateri uspevajo, časa obiranja, stopnje zrelosti itd.

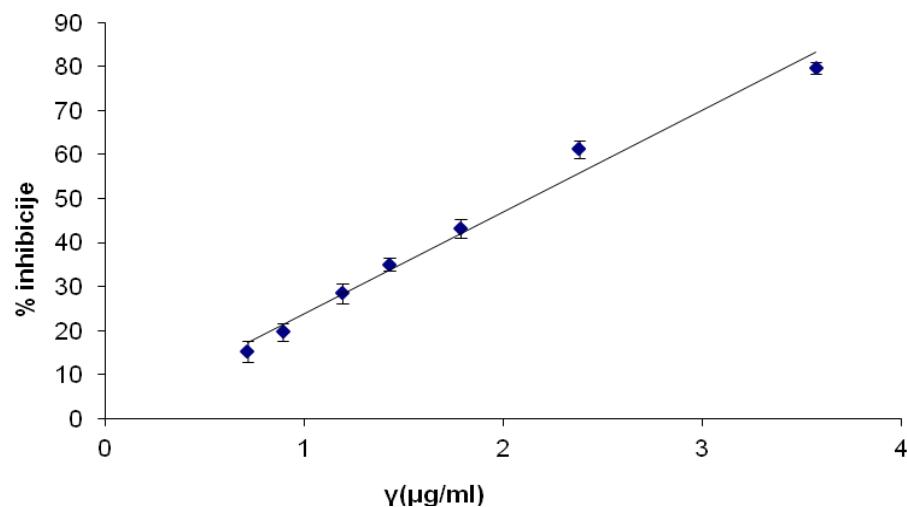
4.2 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI Z REAGENTOM DPPH

Antioksidativno učinkovitost ekstraktov smo določali z reagentom DPPH[·]. Metoda temelji na zmanjšanju vsebnosti reaktivne oblike radikala DPPH[·] v raztopini na račun prisotnosti antioksidanta, ki odda vodikov atom radikalu. Količina DPPH[·], ki ostane po določenem času v raztopini, je obratno sorazmerna antioksidativni učinkovitosti fenolnih spojin (Kulišič in sod., 2004). Rezultate smo interpretirali kot koncentracijo fenolnih spojin v reakcijski mešanici, ki povzroči 50 % inhibicijo radikala DPPH[·] (ED_{50%} DPPH[·]). Le to smo izračunali po enačbi:

$$\text{ED}_{50\% \text{ DPPH}^{\cdot}} = (50\%) / k \quad \dots(8)$$

V enačbi k predstavlja smerni koeficient premice, ki pokaže odvisnost % inhibicije radikala DPPH[·] od koncentracije fenolnih spojin. Naklon premice (smerni koeficient) smo določili z metodo linearne regresije. Če je naklon premice večji je nižja vrednost ED_{50%} in posledično boljša sposobnost lovljenja prostih radikalov.

Na sliki 16 je kot primer prikazana odvisnost deleža inhibicije radikala DPPH[·] od koncentracije fenolnih spojin v ekstraktu.



Slika 16: Odvisnost % inhibicije radikala DPPH[·] od koncentracije fenolnih spojin (γ) za ekstrakt mesa hrvaškega granatnega jabolka

V preglednicah 11 in 12 so podane koncentracije fenolnih spojin, povprečne absorbance in % inhibicije radikala DPPH[·] za ekstrakte brazilskega granatnega jabolka v topilih 70 % etanol in destilirana voda.

Preglednica 11: Koncentracija fenolnih spojin v reakcijski mešanici za frakcije brazilskega granatnega jabolka (γ), povprečne vrednosti izmerjenih absorbanc (\bar{A}_{517}) in % inhibicije radikala DPPH[·] v topilu 70 % etanol.

Frakcija	γ (µg/mL)	\bar{A}_{517}	% inhibicije DPPH [·]
Lupina	0,48	0,993	3,81
	0,81	0,899	12,59
	1,04	0,856	16,98
	1,45	0,746	27,82
	2,42	0,594	42,72
	3,63	0,399	61,42
	4,83	0,250	75,78
Meso	0,26	0,905	10,11
	0,34	0,855	15,01
	0,51	0,751	25,39
	0,85	0,687	31,75
	1,02	0,660	34,49
	1,28	0,588	41,59
	1,70	0,471	53,17
Membrana	0,82	0,821	10,41
	0,91	0,788	14,19
	1,37	0,702	23,49
	1,64	0,624	31,94
	2,05	0,528	42,57
	2,73	0,393	57,28
	4,10	0,204	78,09
Sok	0,62	0,908	6,50
	1,23	0,836	13,93
	2,06	0,753	22,49
	3,08	0,659	32,14
	6,17	0,406	58,25
	7,71	0,272	72,04
	10,28	0,178	81,69
Semena	1,40	0,763	23,05
	1,75	0,670	32,39
	2,34	0,624	37,02
	3,51	0,445	55,08
	7,02	0,167	83,85

Preglednica 12: Koncentracija fenolnih spojin v reakcijski mešanici za frakcije brazilskega granatnega jabolka (γ), povprečne vrednosti izmerjenih absorbanc (\bar{A}_{517}) in % inhibicije radikala DPPH[·] v topilu destilirana voda.

Frakcija	γ (µg/mL)	\bar{A}_{517}	% inhibicije DPPH [·]
Lupina	0,18	0,966	1,48
	0,36	0,896	8,61
	0,61	0,824	15,95
	0,91	0,690	29,64
	1,82	0,429	56,20
	2,43	0,280	71,39
	3,65	0,107	89,11
Meso	0,27	0,835	5,39
	0,36	0,806	8,68
	0,54	0,773	12,38
	0,91	0,668	24,32
	1,09	0,647	26,61
	1,36	0,536	39,31
	1,81	0,442	49,99
Membrana	0,30	0,762	10,53
	0,33	0,752	11,65
	0,37	0,746	12,38
	0,42	0,710	16,61
	0,49	0,675	20,67
	0,99	0,465	45,34
	1,48	0,291	65,77
Sok	0,09	0,917	5,53
	0,19	0,875	9,94
	0,31	0,812	16,40
	0,47	0,730	24,85
	0,94	0,522	46,30
	1,18	0,447	50,01
	1,57	0,339	65,05
Semena	2,61	0,893	8,44
	3,26	0,848	13,06
	4,35	0,786	19,36
	6,53	0,687	29,56
	8,70	0,627	35,71

V preglednicah 13 in 14 so podane koncentracije fenolnih spojin, povprečne absorbance in % inhibicije DPPH[·] radikala za ekstrakte hrvaškega granatnega jabolka v topilih 70 % etanol in destilirana voda.

Preglednica 13: Koncentracija fenolnih spojin v reakcijski mešanici za frakcije hrvaškega granatnega jabolka (γ), povprečne vrednosti izmerjenih absorbanc (\bar{A}_{517}) in % inhibicije radikala DPPH[·] v topilu 70 % etanol.

Frakcija	γ (µg/mL)	\bar{A}_{517}	% inhibicije DPPH [·]
Lupina	0,83	0,893	16,88
	1,18	0,816	24,03
	1,66	0,726	32,46
	2,07	0,641	40,32
	2,76	0,529	50,80
	4,14	0,300	72,16
	5,52	0,125	88,36
Meso	0,71	0,826	15,22
	0,89	0,782	19,67
	1,19	0,697	28,47
	1,43	0,632	35,05
	1,78	0,553	43,19
	2,38	0,377	61,30
	3,57	0,199	79,59
Membrana	0,69	0,846	14,71
	0,92	0,808	18,54
	1,10	0,770	22,33
	1,38	0,690	30,45
	1,83	0,614	38,11
	2,75	0,431	56,54
	5,50	0,108	89,09
Sok	0,60	0,807	9,85
	1,20	0,734	17,96
	2,00	0,678	24,20
	3,00	0,545	39,11
	6,01	0,348	61,07
	7,51	0,278	68,94
	10,01	0,222	75,18
Semena	2,10	0,714	28,22
	2,62	0,621	37,58
	3,49	0,568	42,93
	6,99	0,317	68,11
	10,48	0,158	84,09

Preglednica 14: Koncentracija fenolnih spojin v reakcijski mešanici za frakcije hrvaškega granatnega jabolka (γ), povprečne vrednosti izmerjenih absorbanc (\bar{A}_{517}) in % inhibicije radikala DPPH[·] v topilu destilirana voda.

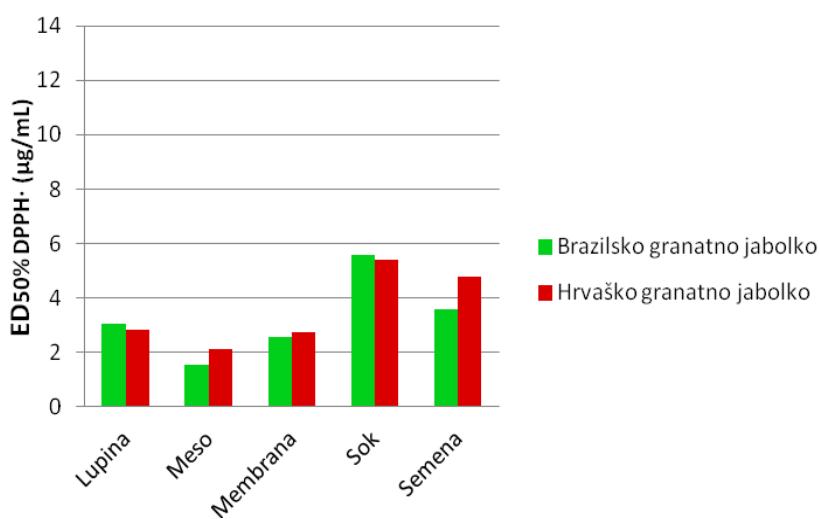
Frakcija	γ (µg/mL)	\bar{A}_{517}	% inhibicije DPPH [·]
Lupina	0,32	0,993	9,39
	0,53	0,913	16,65
	0,79	0,822	25,02
	1,06	0,729	33,48
	1,58	0,542	50,58
	2,11	0,416	62,07
	3,17	0,233	78,74
Meso	0,29	0,866	11,03
	0,48	0,787	19,07
	0,58	0,752	22,76
	0,72	0,681	30,05
	0,96	0,567	41,77
	1,45	0,419	56,93
	2,89	0,092	90,59
Membrana	0,12	0,850	9,78
	0,16	0,808	14,22
	0,19	0,785	16,67
	0,24	0,741	21,32
	0,32	0,662	29,80
	0,48	0,530	43,71
	0,97	0,251	73,42
Sok	0,01	0,862	21,32
	0,02	0,814	25,76
	0,04	0,766	30,11
	0,06	0,707	35,47
	0,11	0,547	50,11
	0,14	0,467	57,35
	0,19	0,399	63,61
Semena	2,54	0,781	24,08
	4,24	0,683	33,60
	6,35	0,569	44,67
	8,47	0,463	54,93
	12,71	0,318	69,06

V preglednicah 15 in 16 so podane vrednosti ED_{50% DPPH} za ekstrakte brazilskih in hrvaških granatnih jabolk v topilih 70 % etanol in destilirana voda.

Preglednica 15: Vrednost ED_{50% DPPH} za ekstrakte brazilskih in hrvaških granatnih jabolk v topilu 70 % etanol.

Frakcija	ED _{50% DPPH} (µg/mL)	ED _{50% DPPH} (µg/mL)
Lupina	3,05 ± 0,3	2,83 ± 0,2
Meso	1,56 ± 0,2	2,13 ± 0,3
Membrana	2,58 ± 0,3	2,76 ± 0,1
Sok	5,57 ± 0,3	5,40 ± 0,1
Semena	3,58 ± 0,1	4,80 ± 0,2

Na sliki 17 so prikazane vrednosti ED_{50% DPPH} za ekstrakte BGJ in HGJ v 70 % etanolu.

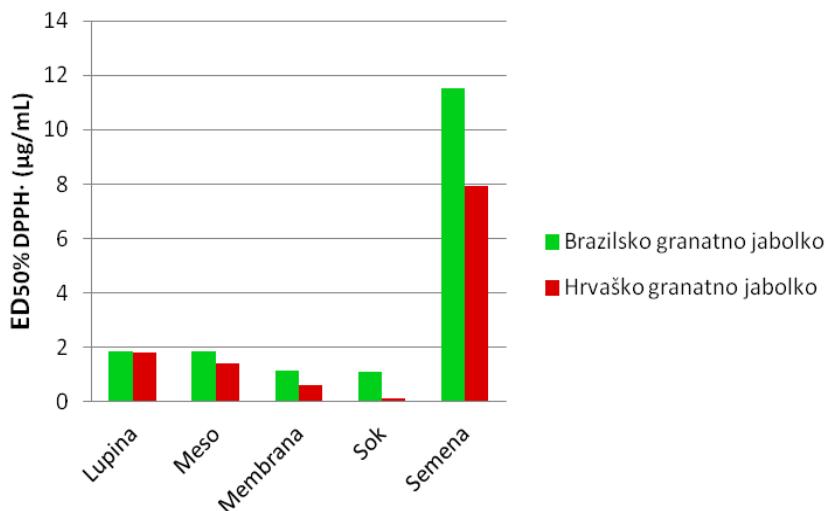


Slika 17: Vrednost ED_{50% DPPH} (µg/mL) za ekstrakte brazilskega in hrvaškega granatnega jabolka v topilu 70 % etanol

Preglednica 16: Vrednost ED_{50% DPPH} za ekstrakte brazilskega in hrvaškega granatnega jabolka v topilu destilirana voda.

Frakcija	ED _{50% DPPH} (µg/mL)	ED _{50% DPPH} (µg/mL)
Lupina	1,85 ± 0,2	1,79 ± 0,2
Meso	1,85 ± 0,2	1,42 ± 0,1
Membrana	1,12 ± 0,1	0,62 ± 0,1
Sok	1,12 ± 0,2	0,12 ± 0,1
Semena	11,54 ± 0,3	7,93 ± 0,2

Na sliki 18 so prikazane vrednosti $ED_{50\% DPPH}$ za ekstrakte BGJ in HGJ v destilirani vodi.



Slika 18: Vrednost $ED_{50\% DPPH}$ ($\mu\text{g/mL}$) za ekstrakte brazilskeh in hrvaškeh granatnih jabolk v topilu destilirana voda

Na slikah 17 in 18 vidimo, da kažejo ekstrakti obeh granatnih jabolk v posameznih frakcijah podobne rezultate v lovljenju prostih radikalov.

Na sliki 17 je vidno, da imajo ekstrakti s topilom 70 % etanol obeh granatnih jabolk podobno sposobnost lovljenja prostih radikalov. Najboljšo sposobnost lovljenja prostih radikalov je pokazal ekstrakt mesa brazilskega granatnega jabolka, najslabšo pa ekstrakt soka brazilskega granatnega jabolka, saj ima najvišjo vrednost $ED_{50\% DPPH}$.

Na sliki 18 pa izstopata ekstrakta semen obeh granatnih jabolk, saj imata najslabšo sposobnost lovljenja prostih radikalov. Najboljšo sposobnost lovljenja prostih radikalov pa kaže ekstrakt soka HGJ. Ostali ekstrakti so si med seboj zelo blizu.

Če primerjamo sliko 17 in sliko 18, opazimo, da se je s topilom destilirana voda ekstrahiralo več spojin katere imajo sposobnost lovljenja prostih radikalov. Med te spojine lahko poleg fenolnih spojin prištevamo še vitamin C ter druge spojine z antioksidativnim delovanjem. To drži v vseh frakcijah razen v frakciji semen, kjer je topilo 70 % etanol precej boljši kot pa destilirana voda. To, da je destilirana voda slabše topilo za ekstrakcijo fenolnih spojin z antioksidativnim delovanjem v semenih, je najverjetnejše posledica tega, da z vodo ekstrahiramo le zelo polarne fenolne spojine in jih je v semenih očitno manj kot v drugih frakcijah. Največja razlika je v frakcijah soka, kjer se pokaže destilirana voda kot odlično topilo za izolacijo fenolnih spojin in drugih spojin, katere imajo sposobnost lovljenja prostih radikalov. Tako ima najboljšo sposobnost lovljenja prostih radikalov sok HGJ s topilom destilirana voda, sledijo membrana HGJ v destilirani vodi, membrana in sok BGJ v destilirani vodi, meso HGJ v destilirani vodi ter šele nato je meso BGJ s topilom 70 % etanol.

Rezultati za frakcije ekstrahirane z destilirano vodo, kažejo, da ima HGJ boljšo sposobnost lovljenja prostih radikalov kot pa BGJ. Za frakcije ekstrahirane s 70 % etanolom pa tega,

katero granatno jabolko kaže boljšo sposobnost lovljenja prostih radikalov ne moremo trditi, saj je v nekaterih frakcijah boljše HGJ, v drugih spet BGJ. Razlogi za razlike so lahko različen geografski izvor, različne stopnje zrelosti ter čas obiranja.

Če primerjamo naše vrednosti $ED_{50\%DPPH}$, z vrednostmi, ki so jih navedli Sepúlveda in sodelavci (2010), lahko ugotovimo, da so le-te podobne, saj za sok granatnega jabolka navajajo vrednosti od 0,09 do 0,18 $\mu\text{g/mL}$, v našem primeru v frakciji sok HGJ pa imamo vrednost 0,12 $\mu\text{g/mL}$. Za ostale frakcije granatnega jabolka pa primerjalnih vrednosti v literaturi ni bilo na voljo.

Naši rezultati potrjujejo tudi teorijo, da sposobnost ekstraktov za lovljenje prostega radikala DPPH ni v povezavi s koncentracijo SFS. Vsebnost SFS je v lupini največja, v soku pa zelo majhna, a ima ekstrakt lupine slabšo sposobnost lovljenja prostih radikalov kot sok. Torej je pomembno, katera fenolna spojina je v ekstraktu in ne samo vsebnost SFS.

4.3 DOLOČANJE VSEBNOSTI VITAMINA C

Vsebnost vitamina C smo določali le v sokovih granatnih jabolk. Določali smo jo s pomočjo oksidanta diklor-fenol-indofenola. S pomočjo formul 5, 6, 7 smo izračunali vsebnosti vitamina C, kateri sta podani v preglednici 17.

Preglednica 17: Vsebnost vitamina C v sokovih brazilskega in hrvaškega granatnega jabolka.

Vsebnost vitamina C (mg/L)	
Brazilsko granatno jabolko	Hrvaško granatno jabolko
17,1	6,12

Iz preglednice 17 je razvidno, da je vsebnost vitamina C v BGJ veliko večja kot v HGJ. To razliko bi lahko pripisali različnim dejavnikom, in sicer: obdobju obiranja, stopnji zrelosti, času skladiščenja, geografskem izvoru granatnih jabolk ter drugim dejavnikom. Fadavi in sodelavci (2005), so v svoji študiji ugotovili, da granatna jabolka vsebujejo od 0,09 do 0,40 mg vitamina C/100g. V našem primeru so te vrednosti precej večje (1,71 oziroma 0,612 mg/100 g). Opara in sodelavci (2007) pa navajajo precej višje vsebnosti vitamina C v soku granatnega jabolka in sicer od 58,2 do 72,0 mg/100g. Te razlike so lahko posledice geografskega izvora, metod določanja vitamina C, časa skladiščenja vzorcev, obdelave vzorcev itd..

4.4 DOLOČANJE VSEBNOSTI VIŠJIH MAŠČOBNIH KISLIN V SEMENIH GRANATNEGA JABOLKA

Vsebnost višjih maščobnih kislin smo določali le v semenih granatnega jabolka. V preglednici 18 so mase natehtanih semen, internega standarda in topila.

Preglednica 18: Mase semen, mase dodanega internega standarda (IS) in mase topila (masa *n*-heksana in metanola) za določanje vsebnosti maščobnih kislin v semenih granatnega jabolka.

Geografsko poreklo	Paralelke	<i>m</i> vzorca (g)	<i>m</i> IS (g)	<i>m</i> topila (g)
Brazilsko granatno jabolko	1	0,5095	0,0620	4,2271
	2	0,5030	0,0700	4,2271
	3	0,5050	0,0740	4,2271
Hrvaško granatno jabolko	1	0,5083	0,0740	4,2271
	2	0,5149	0,0730	4,2271
	3	0,5181	0,0750	4,2271

S pomočjo formule za izračun vsebnosti maščobnih kislin, smo določili vsebnost naslednjih maščobnih kislin ter te vrednosti pretvorili v enote g/kg.

$$w(\text{mg}/100 \text{ g}) = (A_i \times F_{Ai} \times m_{17} \times 100) / (A_{17} \times F_{Ai17} \times m_{vz}) \quad \dots(9)$$

Preglednica 19: Vsebnost maščobnih kislin (*w*) v semenih granatnega jabolka.

Maščobna kislina	<i>w</i> BGJ (g/kg)	<i>w</i> HGJ (g/kg)
Palmitinska kislina (16:0)	$2,4 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,1$
Stearinska kislina (18:0)	$1,5 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,03$
Oleinska kislina (18:1)	$3,7 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,1$
Linolna kislina (18:2)	$4,5 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,2$
Konjugirana linolenska kislina (18:3) (puničična kislina)	$74,0 \pm 4,7$	$33,9 \pm 1,1$
Gadoleinska kislina (20:1)	$0,5 \pm 0,03$	/
Skupna vsebnost	$88,5 \pm 5,3$	$45,0 \pm 1,4$

Iz preglednice 19 je razvidno, da je v BGJ skupna vsebnost maščobnih kislin dvakrat večja kot v HGJ. Največja razlika je v vsebnosti konjugirane linolenske kisline (puničična kislina), saj je njena vsebnost v BGJ $73,950 \pm 4,660$ v primeru HGJ pa $33,918 \pm 1,130$. Pri ostalih vsebnostih ni velike razlike med vzorcema BGJ in HGJ.

V primeru BGJ lahko vidimo, da med nasičenimi maščobnimi kislinami rahlo prevladuje palmitinska kislina, kateri sledi stearinska kislina. Med nenasičenimi pa prevladuje

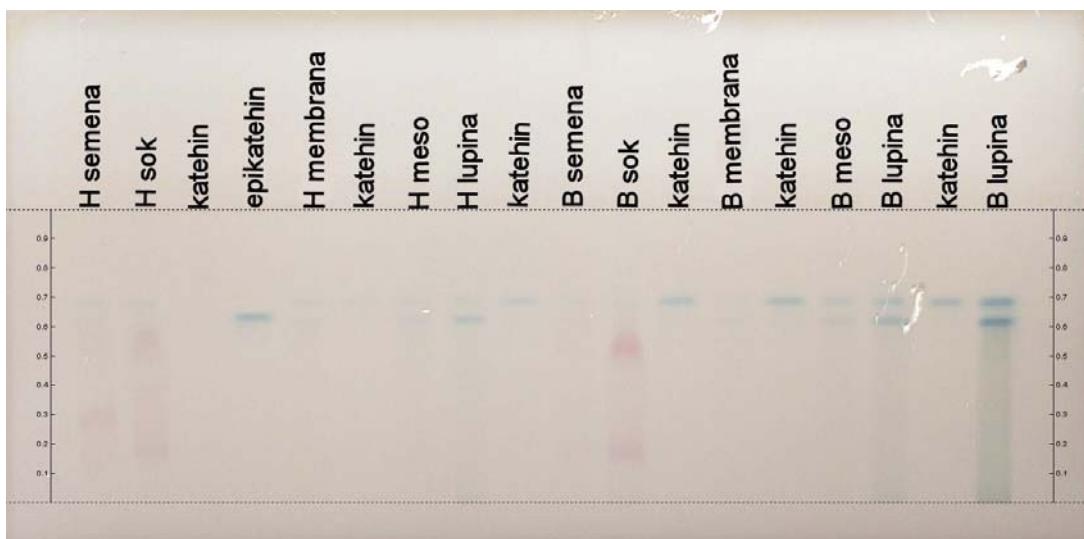
konjugirana linolenska kislina (punična kislina), ki je značilna za granatno jabolko. Njen delež je kar 83,6 %. Po vsebnosti sledijo med nenasičenimi maščobnimi kislinami: linolna kislina, oleinska kislina in gadoleinska kislina z vsebnostjo $0,495 \pm 0,030$ g/kg.

Pri HGJ pa opazimo nižje vrednosti maščobnih kislin. Tudi v tem primeru je med nenasičenimi maščobnimi kislinami na prvem mestu palmitinska, sledi pa stearinska kislina. Med nenasičenimi tudi v tem primeru močno prevladuje konjugirana linolenska kislina (punična kislina) a manj kot v BGJ saj je njen delež 76,2 %. Po vsebnosti sledita še drugi dve nenasičeni maščobni kislini, in sicer: linolna kislina in oleinska kislina. Gadoleinske v HGJ nismo zasledili.

Hernández in sodelavci (2000) so v študiji, v kateri so uporabili tri granatna jabolka iz različnih geografskih pokrajin Španije, določili naslednje vrednosti maščobnih kislin: Skupne vsebnosti so si sledile od $104,9 \pm 7,31$ g/kg prek $80,92 \pm 18,2$ g/kg do najmanjše vsebnosti $68,97 \pm 11,49$ g/kg. V istem vrstnem redu so si sledili tudi deleži konjugirane linolenske kisline (punična kislina): 79,3 %, 78,5 %, 66,76 %. Prav tako so določili tudi podobne vsebnosti ostalih maščobnih kislin. V nobenem vzorcu pa niso potrdili prisotnosti gadoleinske kisline.

4.5 KVALITATIVNO DOLOČANJE KATEHINOV S TLC

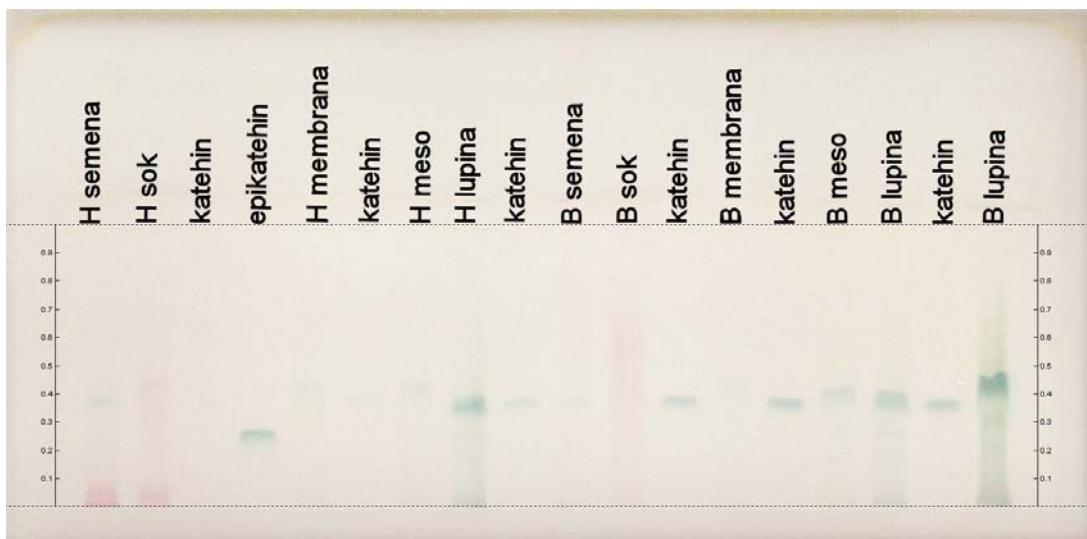
S tankoplastno kromatografijo smo s pomočjo komercialno dostopnih standardov kvalitativno določali vsebnost katehinov v granatnih jabolkih z geografskim poreklom Brazilija in Hrvaška. Za ločbo smo uporabili HPTLC celulozne plošče in tri različna topila za razvijanje 1 – propanol : H_2O : ocetna kislina (4 : 2 : 1; v/v/v), 1 – propanol : H_2O : ocetna kislina (20 : 80 : 1; v/v/v) in H_2O , za detekcijo pa v vseh primerih reagent DMACA.



Slika 19: HPTLC celulozna plošča, razvita v topilu 1 – propanol : H_2O : ocetna kislina (4 : 2 : 1; v/v/v) po detekciji z reagentom DMACA, posneta z izvorom bele svetlobe. Volumni nanesenih standardov in $10 \times$ razredčenih ekstraktov frakcij so v preglednici 5

Kot je prikazano na sliki 19, smo z razvijanjem v topilu 1 – propanol : H_2O : ocetna kislina (4 : 2 : 1; v/v/v) potrdili prisotnost katehina v vseh ekstraktih frakcij analiziranih vzorcev, saj imajo modrozeleno obarvane lise vzorcev enako R_F vrednost ($R_F = 0,71$), kot

modrozeleno obarvane lise standardov katehina ($R_F = 0,71$). Vidne so tudi razlike v vsebnosti katehina, na osnovi razlik v intenzivnosti lis. Tu nam je v veliko pomoč tudi preglednica 5, saj lahko s pomočjo podatkov o nanosih sklepamo o tem, v kateri frakciji se nahaja več katehina. Največ katehina je po slikah sodeč v lupini BGJ, takoj za to frakcijo pa je lupina HGJ. To lahko trdimo z gotovostjo saj sta nanosa enaka ($1 \mu\text{L}$) in najnižja med frakcijami. Vsebnostim v teh dveh frakcijah sledita frakciji mesa granatnih jabolk oben geografskih porekla, pri čemer lahko na osnovi intenzitete lis ter količino nanosov sklepamo, da je v primeru granatnega jabolka brazilskega porekla vsebnost katehina malo večja. Po tem pa se vsebnost katehina obrne v korist HGJ, saj je vsebnost katehina v frakciji membrana nekoliko večja pri HGJ, a tega ne moremo trditi z gotovostjo, saj je nanos vzorca v primeru membrane BGJ manjša ($3 \mu\text{L}$) kot v primeru HGJ ($5 \mu\text{L}$). Po vsebnosti katehina je naslednja frakcija po vrsti sok HGJ, zatem semena HGJ in semena BGJ, sledi pa najnižja vsebnost katehina in sicer v soku BGJ. Druga modrozelena lisa, ki leži nižje od lise, za katehin ima $R_F = 0,60$, lisa standarda epikatehina pa $R_F = 0,62$, zato smo žeeli preveriti, če je v ekstraktih naših frakcij tudi epikatehin. Za potrditev oziroma zavrnitev prisotnosti epikatehina v granatnih jabolkih smo zato razvili HPTLC celulozne plošče, z enakimi nanosi (slika 20 in 21) še z drugimi topili za razvijanje.



Slika 20: HPTLC celulozna plošča, razvita v topilu H_2O , po detekciji z reagentom DMACA, posneta z izvorom bele svetlobe. Volumni nanesenih standardov in $10 \times$ razredčenih ekstraktov frakcij so v preglednici 5



Slika 21: HPTLC celulozna plošča, razvita v topilu $\text{H}_2\text{O} : 1$ – propanol : ocetna kislina (80 : 20 : 1; v/v/v) po detekciji z reagentom DMACA, posneta z izvorom bele svetlobe. Volumni nanesenih standardov in 10 × razredčenih ekstraktov frakcij so v preglednici 5

V primeru razvijanja v vodi (slika 20) smo opazili modrozelene lise pod lisami katehina, za katere smo predvidevali, da so to lise epikatehina. Te lise se opazijo v frakcijah lupine obeh porekla granatnih jabolk in imajo $R_F = 0,30$, modrozelene lise standarda epikatehina na tej plošči pa imajo R_F vrednost nižjo, in sicer 0,26. S tem smo bili na poti, da ovržemo idejo o tem, da se epikatehin nahaja v granatnih jabolkih. Prav zaradi teh majhnih razlik v R_F vrednostih smo v topilu za razvijanje $\text{H}_2\text{O} : 1$ – propanol : ocetna kislina (80 : 20 : 1 ; v/v/v) razvili še eno HPTLC celulozno ploščo, ki je prikazana na sliki 21. Tu pa se jasno vidi, da ima modrozelena lisa standarda epikatehina precej nižji R_F (0,63) kot pa modrozelena lisa ($R_F = 0,75$), za katero smo predvidevali, da je epikatehin. S tem smo tudi ovrgli tezo o tem, da granatna jabolka vsebujejo epikatehin. Vsebnost katehina sta potrdila tudi kromatograma na slikah 20 in 21. Poyrazoğlu in sodelavci (2002) navajajo, da epikatehina v granatnih jabolkih niso zasledili, katehin pa so dokazali. Pande in Akoh (2009) pa sta v granatnih jabolkih dokazala prisotnost epikatehina.

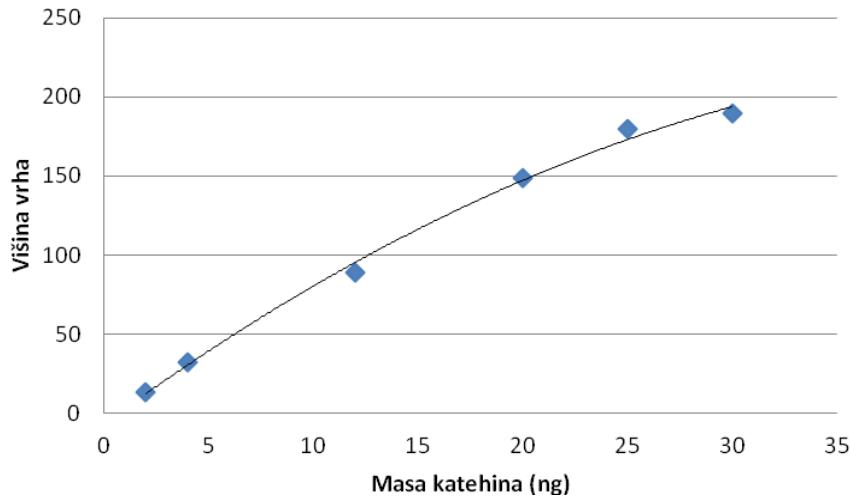
4.6 KVANTITATIVNO DOLOČANJE KATEHINA S TLC

Za kvantitativno določanje katehina smo uporabili ploščo, ki je na sliki 19, in jo z denzitometrom ter z uporabo programske opreme WinCATS ovrednotili. Tako smo dobili podatke, s katerimi smo lahko določili vsebnosti katehina v posameznih ekstraktih frakcij.

Za pripravo umeritvene krivulje smo na ploščo nanesli različne mase katehina.

Preglednica 20: Masa katehina in višine vrhov za umeritveno krivuljo.

m katehina (ng)	Višina vrha
2,0	13,17
4,0	32,36
12,0	88,91
20,0	148,82
25,0	179,95
30,0	189,21



Slika 22: Umeritvena krivulja odvisnosti višine vrha od mase katehina (ng)

S pomočjo umeritvene krivulje smo dobili enačbo s katero smo določili vsebnosti katehina v določenih ekstraktih frakcij. Enačba je naslednja:

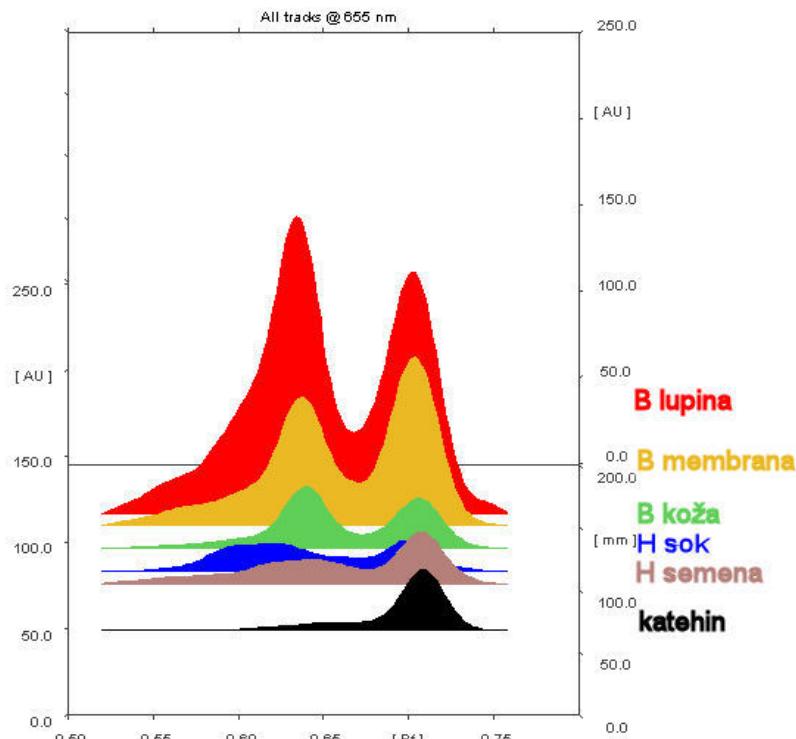
$$y = -6,65 + 9,725x - 0,1015x^2 \quad \dots(10)$$

V preglednici 21 smo podali rezultate o vsebnosti katehina v različnih frakcijah granatnih jabolk.

Preglednica 21: Vsebnosti katehina (m) v granatnih jabolkih hrvaškega in brazilskega porekla.

Frakcija granatnega jabolka (Hrvaška)	m (µg/g)
Semena	87,69
Sok	23,53
Membrana	70,55
Meso	82,87
Lupina	429,00

Frakcija granatnega jabolka (Brazilija)	m (µg/g)
Semena	49,00
Sok	14,57
Membrana	82,27
Meso	399,10
Lupina	1220,70

Slika 23: Denzitogrami standarda katehina in ekstraktov frakcij granatnih jabolk hrvaškega in brazilskega porekla, posnet na HPTLC celulozni plošči razviti s topilom za razvijanje 1 – propanol : H_2O : ocetna kislina (4 : 2 : 1; v/v/v) pri 655 nm

Na sliki 23 so v vseh frakcijah granatnega jabolka lepo vidni vrhovi katehina, ki imajo enak R_F kot standard katehina 0,71. V vseh frakcijah je še en vrh, katerega nismo identificirali. Po pričakovanjih je največ katehina v lupinah granatnih jabolk, v lupini BGJ je kar 1,22 mg katehina/g lupine, v lupini HGJ pa 0,429 mg katehina/g lupine. Sledijo frakcije meso, membrana, semena in sok z najmanjšo vsebnostjo in sicer v HGJ 23,53 µg katehina/g soka in v BGJ 14,57 µg katehina/g soka. Lahko zaključimo, da je granatno jabolko s poreklom Brazilija bolj bogato s katehinom, saj ga je v frakcijah lupina, meso in

membrana več kot v granatnem jabolku s področja hrvaške Istre. Res pa je, da je v frakcijah sok in semena bolj bogato HGJ a te razlike so manjše.

Poyrazoglu in sodelavci (2002) so zapisali, da je vsebnost katehina v soku granatnega jabolka $3,72 \pm 2,29$ mg katehina/L, kar je pod vrednostmi, do katerih smo prišli mi. Pande in Akoh (2009) pa sta zapisala, da so vrednosti katehina v lupini $118,3 \pm 6,8$ mg katehina/100g in v mesu $101,2 \pm 6,7$ mg katehina/100g. Te vrednosti, predvsem vrednosti katehina v lupini granatnega jabolka so precej primerljive z našimi, in sicer 122,07 mg/100g v lupini BGJ, nekoliko nižja pa je vsebnost katehina v frakciji meso 39,91 mg/100g.

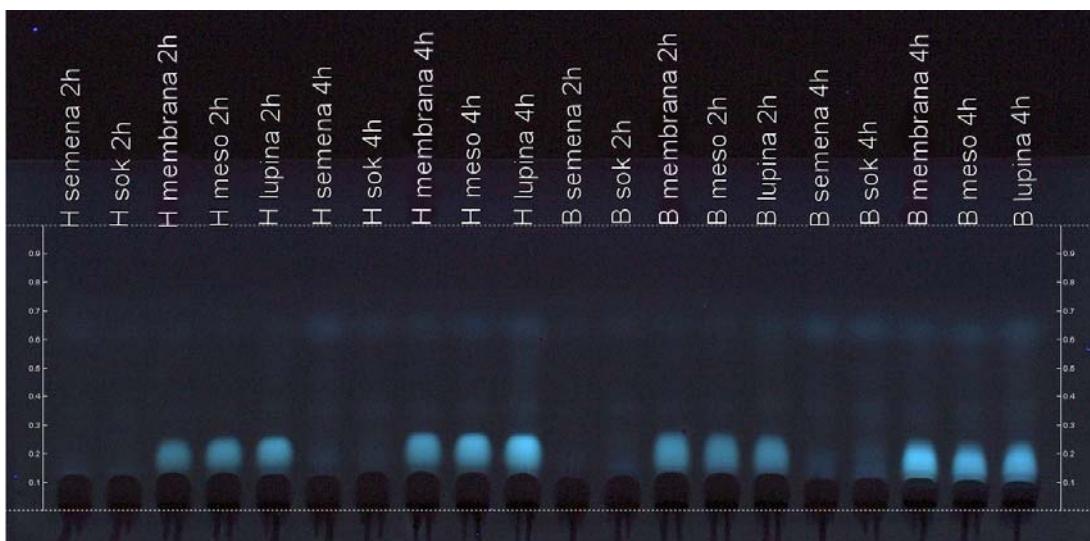
4.7 VPLIV ČASA HIDROLIZE NA LOČEVANJE FENOLNIH SPOJIN

Na sliki 24 so na TLC silikagelno ploščo nanešeni $10 \times$ razredčeni nehidrolizirani ekstrakti frakcij, topilo za razvijanje pa je *n*-heksan : etil acetat : mravljična kislina (20 : 19 : 1; v/v). Tu opazimo, da fenolne spojine iz nehidroliziranih ekstraktov niso potovale po sorbentu. Iz tega smo sklepali, da v ekstraktih frakcij ni prostih fenolnih kislin in flavonoidov. Zato smo izvedli hidrolizo in njen potek 24 ur spremljali v 2 urnih časovnih intervalih ter te hidrolizirane ekstrakte frakcij uporabili za določanje fenolnih spojin.

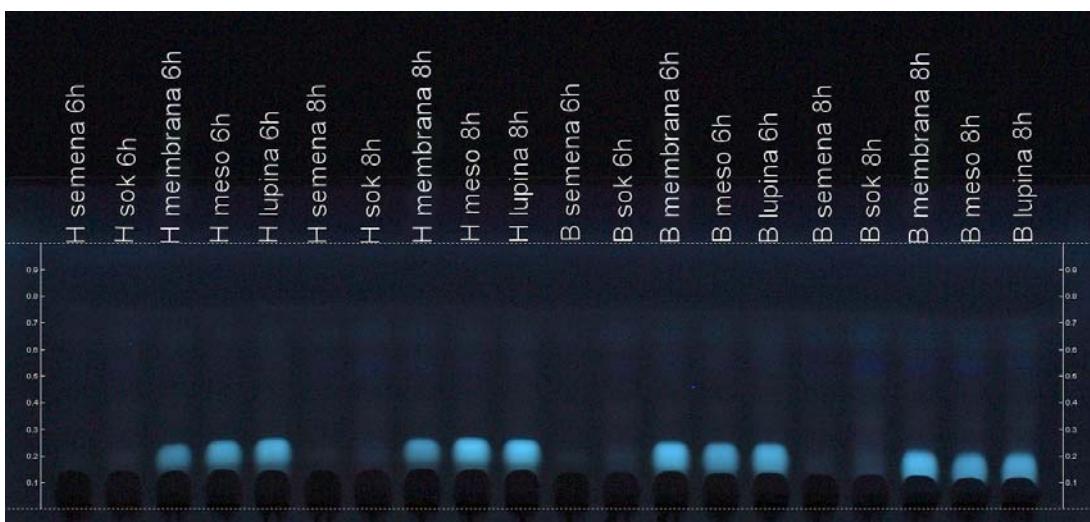


Slika 24: TLC silikagel 60 plošča, razvita v topilu *n*-heksan : etil acetat : mravljična kislina (20 : 19 : 1; v/v), posneta z izvorom svetlobe z valovno dolžino 366 nm

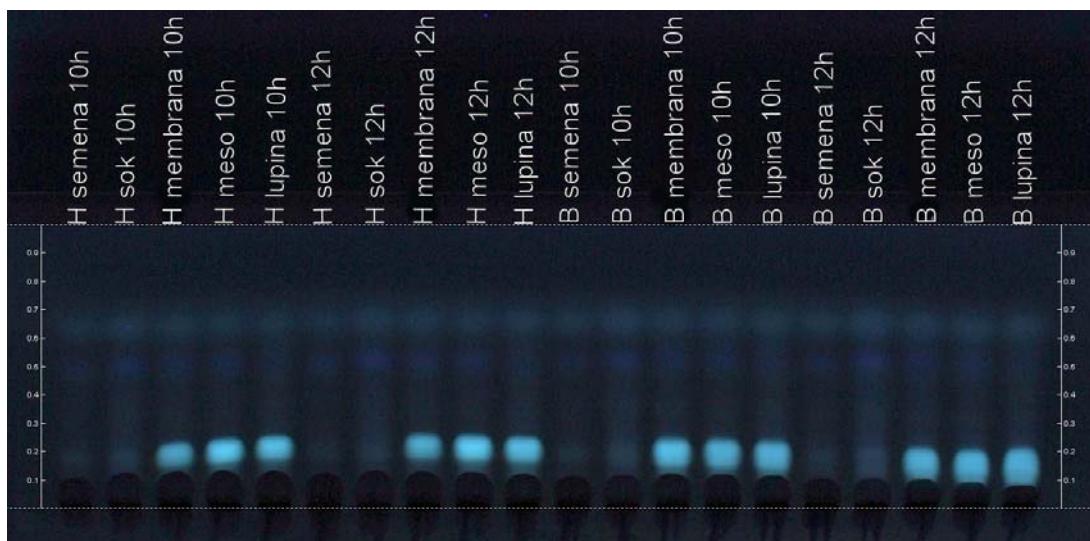
Na slikah 25, 26, 27, 28 in 29 so prikazane HPTLC silikagel 60 plošče, na katerih so naneseni ekstrakti frakcij (na ploščah 28 in 29 tudi standardi), ki so bili od 2 do 24 ur izpostavljeni hidrolizi.



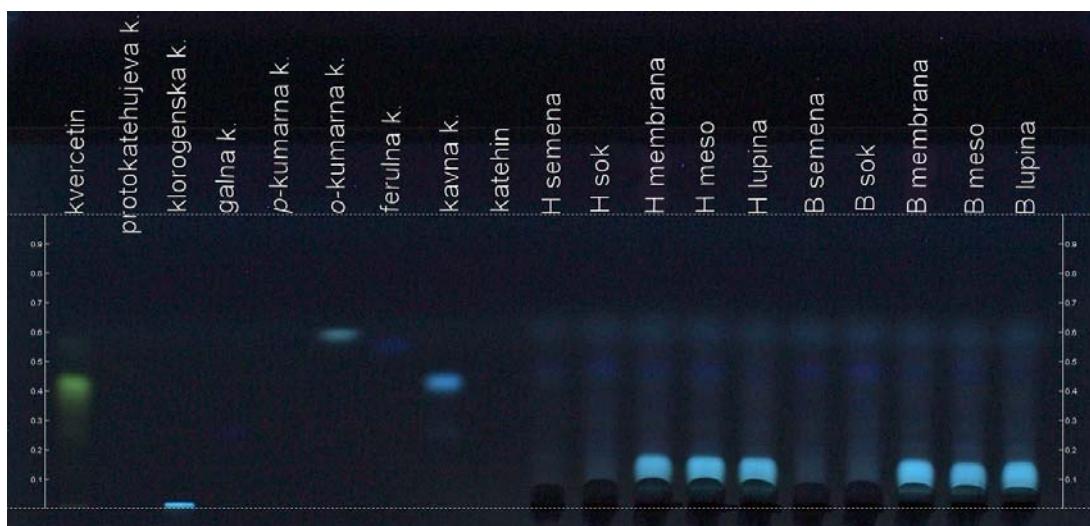
Slika 25: HPTLC silikagel 60 plošča, razvita v topilu *n*-heksan : etil acetat : mravljična kislina (20 : 19 : 1; v/v/v), po detekciji z reagentom Naturstoff in ojačana z reagentom parafinsko olje : *n*-heksan (1 : 2; v/v) posneta z izvorom svetlobe z valovno dolžino 366 nm. Naneseni so 2- (2h) in 4- (4h) urni hidrolizirani ekstrakti frakcij granatnih jabolk



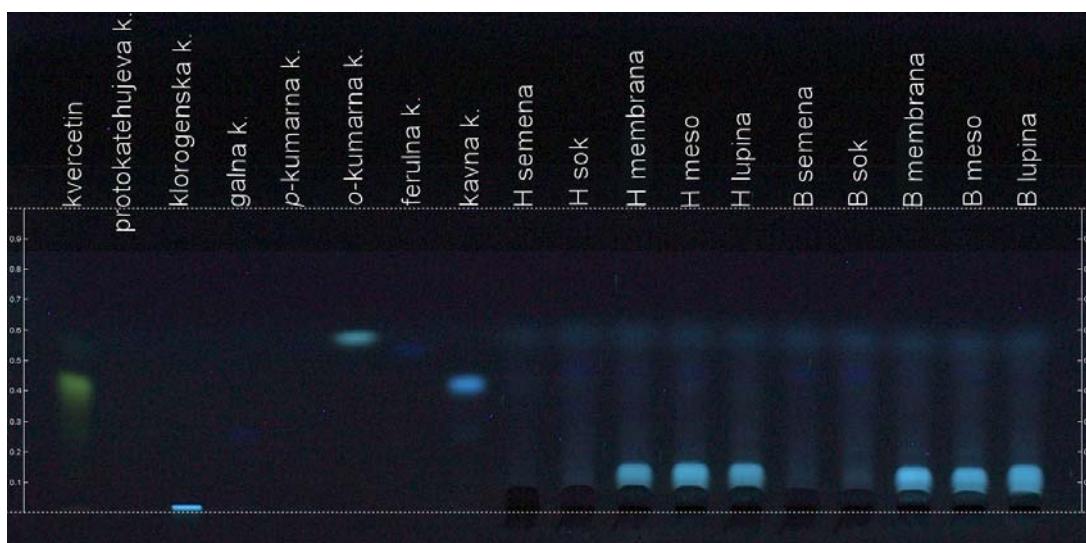
Slika 26: HPTLC silikagel 60 plošča, razvita v topilu *n*-heksan : etil acetat : mravljična kislina (20 : 19 : 1; v/v/v), po detekciji z reagentom Naturstoff in ojačana z reagentom parafinsko olje : *n*-heksan (1 : 2; v/v) posneta z izvorom svetlobe z valovno dolžino 366 nm. Naneseni so 6- (6h) in 8- (8h) urni hidrolizirani ekstrakti frakcij granatnih jabolk



Slika 27: HPTLC silikagel 60 plošča, razvita v topilu *n*-heksan : etil acetat : mravljična kislina (20 : 19 : 1; v/v/v), po detekciji z reagentom Naturstoff in ojačana z reagentom parafinsko olje : *n*-heksan (1 : 2; v/v) posneta z izvorom svetlobe z valovno dolžino 366 nm. Naneseni so 10- (10h) in 12- (12h) urni hidrolizirani ekstrakti frakcij granatnih jabolk



Slika 28: HPTLC silikagel 60 plošča, razvita v topilu *n*-heksan : etil acetat : mravljična kislina (20 : 19 : 1; v/v/v), po detekciji z reagentom Naturstoff in ojačana z reagentom parafinsko olje : *n*-heksan (1 : 2; v/v) posneta z izvorom svetlobe z valovno dolžino 366 nm. Naneseni so 18-urni hidrolizirani ekstrakti frakcij granatnih jabolk in standardi fenolnih spojin



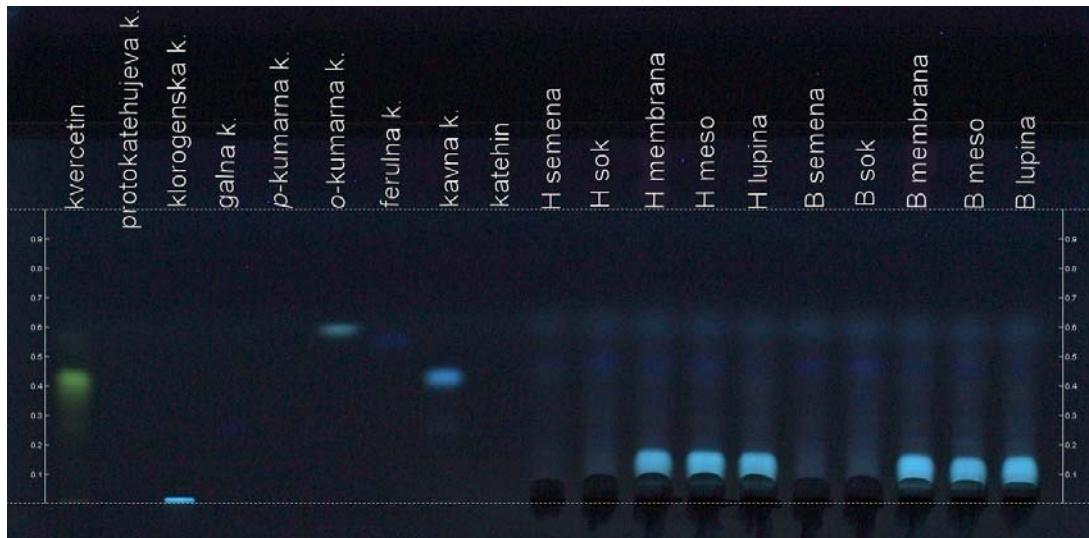
Slika 29: HPTLC silikagel 60 plošča, razvita v topilu *n*-heksan : etil acetat : mravljična kislina (20 : 19 : 1; v/v/v), po detekciji z reagentom Naturstoff in ojačana z reagentom parafinsko olje : *n*-heksan (1 : 2; v/v) posneta z izvodom svetlobe z valovno dolžino 366 nm. Naneseni so 24-urni hidrolizirani ekstrakti frakcij granatnih jabolk in standardi fenolnih spojin

Če primerjamo slike od 25 do 29, lahko ugotovimo, da ima hidroliza vpliv na fenolne spojine, saj se na ploščah hidroliziranih ekstraktov vidno pojavitajo razlike. Po hidrolizi, ki je potekala 2 uri, opazimo močno svetlo modro fluorescenco ($R_F = 0,15$) pri membrani, mesu in lupini BGJ in HGJ. Po 4 urah hidrolize se nekoliko močneje pojavijo svetlo modre lise ($R_F = 0,36$) nad močno svetlo modro fluorescenco, pojavijo se svetlo modre lise v višini *o*-kumarne kisline ($R_F = 0,61$). Po 6 urah hidrolize ekstraktov frakcij je plošča zelo podobna tisti po 4 urah. Drugače pa je po 8 urah, saj tu zaznamo rumenkaste lise ($R_F = 0,43$), kar nam dokaže prisotnost kvercetina v naših hidroliziranih ekstraktih frakcij. Komaj vidna svetlo modra lisa ($R_F = 0,43$) se prav tako pojavi v hidroliziranih ekstraktih vzorcev, kar bi pomenilo, da je prisotna kavna kislina. Pojavijo pa se tudi temno modre lise ($R_F = 0,48$), katere nismo uspeli identificirati. Po 10-ih in 12-ih urah se intenziteta vseh lis, ki fluorescirajo, ojača, po 18 urah se pojavijo še modre lise ($R_F = 0,27$), kar nakazuje na galno kislino. Pokazala pa se je tudi svetlo modra lisa ($R_F = 0,21$), katere nismo identificirali. Mnenja smo bili, da je hidroliza po 18 urah najbolj ugodna za identifikacijo fenolnih spojin, saj so lise najbolj vidne in lepo ločene. Hidroliza po 24 urah pokaže, da se fenolne spojine že izgubljajo, saj lise začnejo izgubljati fluorescenco. Tako smo s hidrolizo dokazali, da so fenolne kisline in flavonoidi vezani, kajti prostih nismo uspeli dokazati.

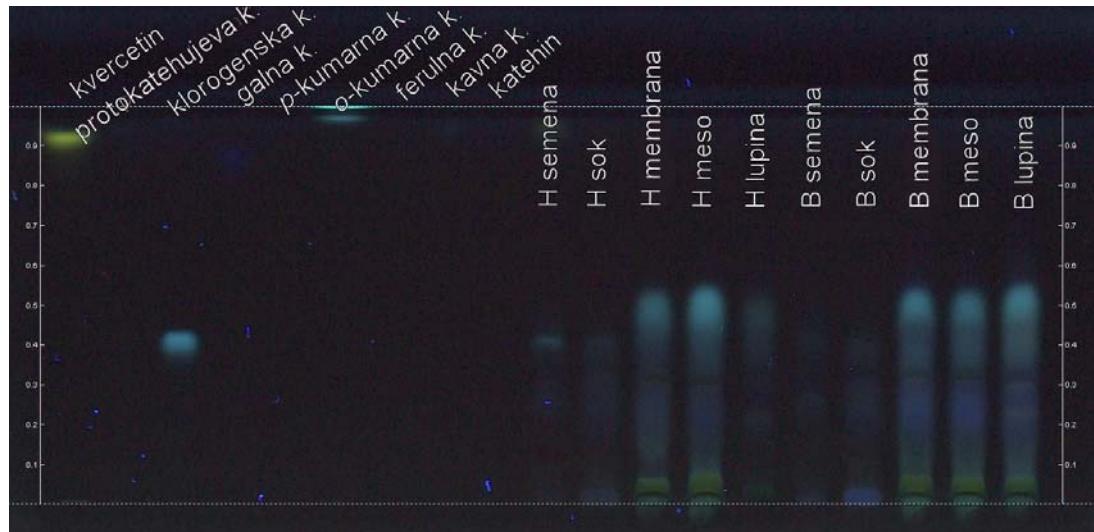
4.8 KVALITATIVNO DOLOČEVANJE FENOLNIH KISLIN IN FLAVONOIDOV S TLC

S tankoplastno kromatografijo smo s pomočjo komercialno dostopnih standardov kvalitativno določali vsebnost fenolnih kislin in flavonoidov v granatnih jabolkih geografskega porekla Brazilija in hrvaška Istra. Za ločevanje smo uporabili HPTLC silikagel 60 ploščo in dve različni topili za razvijanje *n*-heksan : etil acetat : mravljična kislina (20 : 19 : 1; v/v/v) in etil acetat : voda : mravljična kislina (85 : 15 : 10; v/v/v), za

detekcijo v obeh primerih reagent Naturstoff, za ojačanje fluorescence pa reagent parafinsko olje : *n*-heksan (1 : 2; v/v).



Slika 30: HPTLC silikagel 60 plošča, razvita v topilu *n*-heksan : etil acetat : mravljična kislina (20 : 19 : 1; v/v/v), po detekciji z reagentom Naturstoff in ojačana z reagentom parafinsko olje : *n*-heksan (1 : 2; v/v) posneta z izvorom svetlobe z valovno dolžino 366 nm. Naneseni so 18-urni hidrolizirani ekstrakti frakcij granatnih jabolk in standardi fenolnih spojin



Slika 31: HPTLC silikagel 60 plošča, razvita v topilu etil acetat : voda : mravljična kislina (85 : 15 : 10; v/v/v), po detekciji z reagentom Naturstoff in ojačana z reagentom parafinsko olje : *n*-heksan (1 : 2; v/v) posneta z izvorom svetlobe z valovno dolžino 366 nm. Naneseni so 10 × razredčeni ekstrakti frakcij granatnih jabolk in standardi fenolnih spojin

Kot je razvidno iz slike 30, smo kvercetin ($R_F = 0,43$) določili v vseh frakcijah granatnih jabolk, saj rumeno fluorescira. Galno kislino (modra lisa, $R_F = 0,27$) smo identificirali nad

močno svetlo modro neznano liso ($R_F = 0,15$), ki pa jo je v frakcijah semen komaj da zaznati. Tudi *o*-kumarna kislina ($R_F = 0,61$) je vidna prav tako v vseh vzorcih, fluorescira svetlo modro. Kavna kislina ($R_F = 0,43$) fluorescira svetlo modro pod neidentificirano ($R_F = 0,48$) temno modro liso. Iz slike 31 pa je razvidna prisotnost klorogenske kisline ($R_F = 0,41$), ki pa zelo niha od frakcije do frakcije. Nizka vsebnost je v frakcijah sokov oben granatnih jabolk in semen BGJ, prav tako pa tudi v frakciji lupina HGJ, več pa v semenih HGJ in v mesu, membranah oben granatnih jabolk in lupini BGJ. Protokatehujeve kisline, *p*-kumarne kisline in ferulne kisline nismo zaznali. Prav tako s tem sistemom nismo detektirali katehina. Močne svetlo modre fluorescence ($R_F = 0,15$) nismo uspeli identificirati, predvidevamo pa, da gre za fenolne spojine.

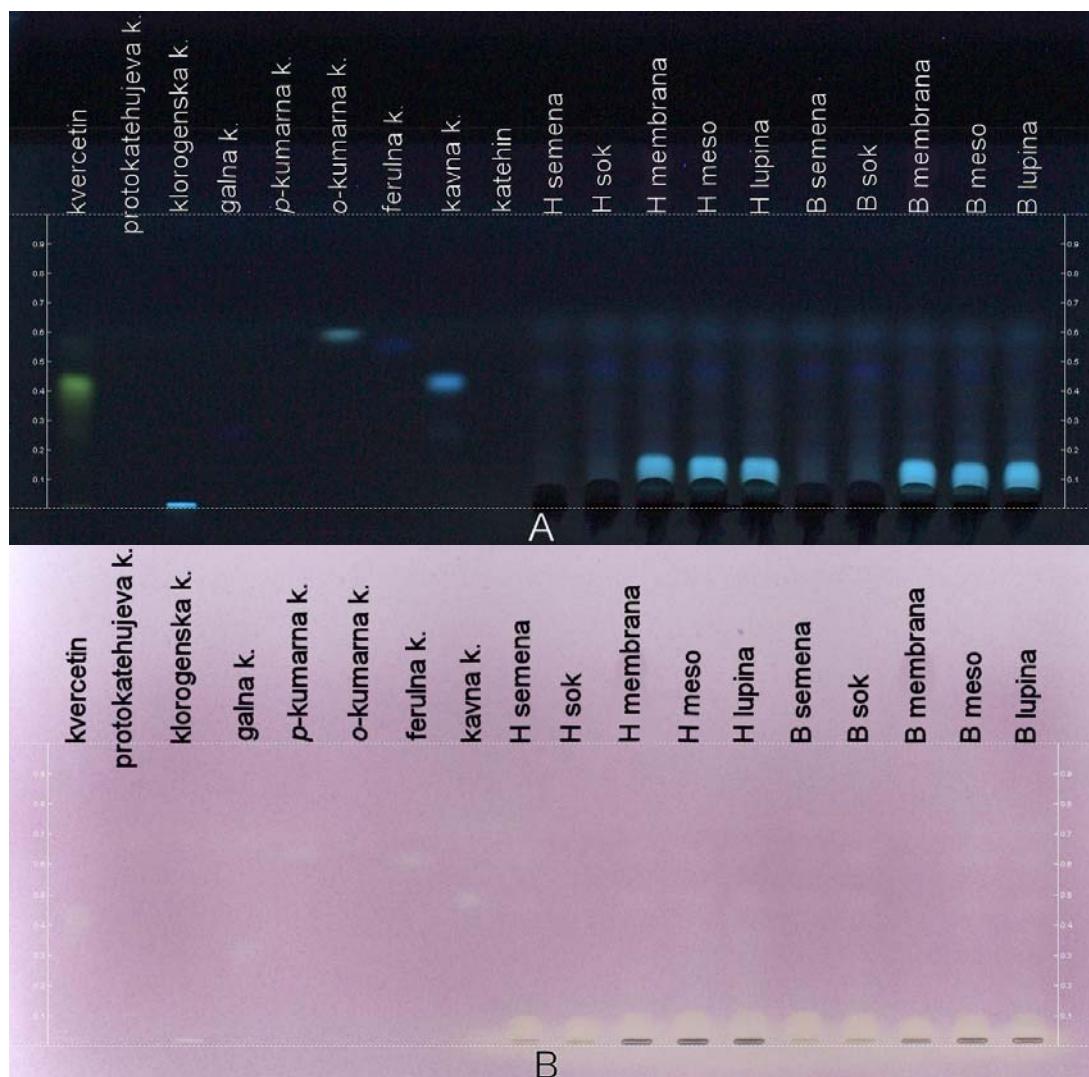
Poyrazoğlu in sodelavci (2002) navajajo, da so fenolne spojine v soku granatnega jabolka naslednje: galna kislina, protokatehujeva kislina, katehin, klorogenska kislina, kavna kislina, *p*-kumarna kislina, ferulna kislina, *o*-kumarna kislina, floridzin, in kvercetin. Za določevanje fenolnih spojin so uporabljali HPLC, vzorci pred analizo niso bili hidrolizirani. Vsebnosti fenolnih spojin so bile naslednje: galna kislina ($4,55 \pm 8,55$ mg/L), kvercetin ($2,50 \pm 1,96$ mg/L), klorogenska kislina ($1,24 \pm 1,42$ mg/L), floridzin ($0,99 \pm 1,47$ mg/L), protokatehujeva kislina ($0,84 \pm 0,64$ mg/L), kavna kislina ($0,78 \pm 0,79$ mg/L), *o*-kumarna kislina ($0,17 \pm 0,08$ mg/L), *p*-kumarna kislina ($0,06 \pm 0,07$ mg/L), ferulna kislina ($0,01 \pm 0,02$ mg/L).

Pande in Akoh (2009) pa sta v svoji študiji s pomočjo HPLC dokazala naslednje fenolne spojine v semenih: kavna kislina ($2,8 \pm 0,3$ mg/100 g), *p*-kumarna kislina ($1,4 \pm 0,9$ mg/100 g), ferulna kislina ($0,8 \pm 0,3$ mg/100 g), epikatehin $6,5 \pm 0,3$ mg/100 g) in kvercetin ($10,8 \pm 1,4$ mg/100 g), v mesu: kavna kislina ($14,4 \pm 1,4$ mg/100 g), *p*-kumarna kislina ($8,1 \pm 1,3$ mg/100 g), ferulna kislina ($2,0 \pm 0,1$ mg/100 g), katehin ($101,2 \pm 6,7$ mg/100 g), epikatehin ($11,7 \pm 1,9$ mg/100 g) in kvercetin ($77,1 \pm 6,5$ mg/100 g) in v lupini: kavna kislina ($19,7 \pm 2,7$ mg/100 g), *p*-kumarna kislina ($4,3 \pm 0,9$ mg/100 g), ferulna kislina ($17,7 \pm 2,3$ mg/100 g), katehin ($118,3 \pm 6,8$ mg/100 g), epikatehin ($26,1 \pm 3,4$ mg/100 g) in kvercetin ($94,3 \pm 8,3$ mg/100 g).

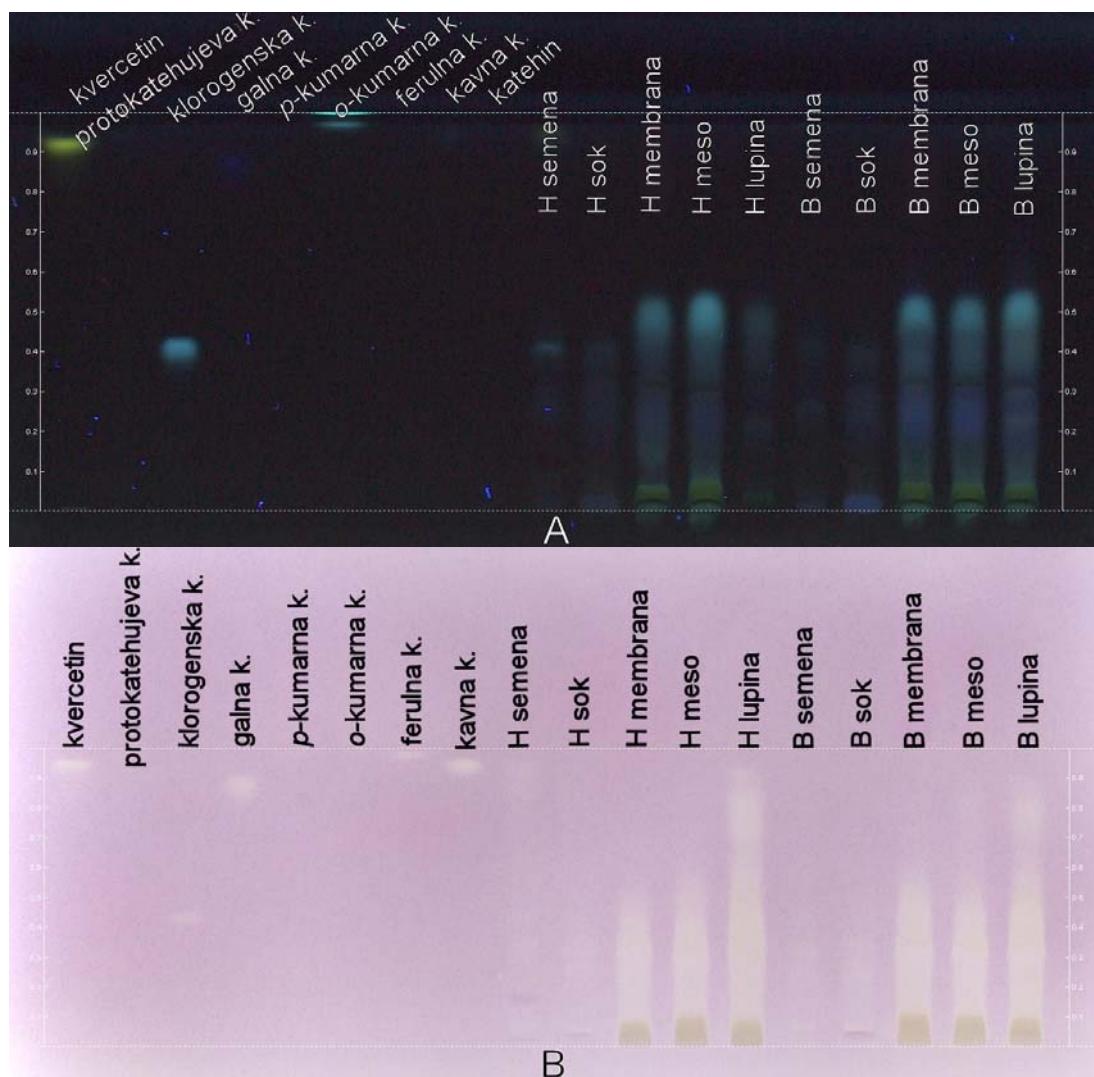
Če primerjamo naše rezultate z rezultati iz literature, opazimo ujemanje pri dokazovanju prisotnosti kvercetina in kavne kisline. Poleg tega so v oben objavljenih primerih dokazali prisotnost *p*-kumarne kisline in protokatehujeve kisline, ki jih mi nismo uspeli dokazati. Glede vsebnosti pa je poleg katehina najbolj zastopan kvercetin, sledjo pa galna kislina, kavna kislina, klorogenska kislina, ferulna kislina itd.. Primerjava objavljenih vsebnosti posameznih komponent z našimi rezultati, razen v primeru katehina ni mogoča, saj nimamo kvantitativnih podatkov, ampak lahko na osnovi vizualnega vrednotenja podamo le oceno, da je največja vsebnost kvercetina, sledijo pa klorogenska kislina, kavna kislina, *o*-kumarna kislina in galna kislina.

4.9 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE UČINKOVITOSTI Z REAGENTOM DPPH· PO LOČBI S TLC

Za določanje antioksidativne učinkovitosti fenolnih spojin smo na HPTLC silikagel 60 plošči nanesli komercialno dostopne standarde fenolnih spojin in naše hidrolizirane ekstrakte frakcij v prvem primeru in komercialno dostopne standarde fenolnih spojin ter 10 × razredčene ekstrakte vzorcev v drugem primeru. V prvem primeru smo za ločbo uporabili topilo za razvijanje *n*-heksan : etil acetat : mravljična kislina (20 : 19 : 1; v/v/v), v drugem pa etil acetat : voda : mravljična kislina (85 : 15 : 10; v/v/v). Po sušenju v toku toplega zraka smo po kromatogramih razpršili reagent DPPH· in počakali 15 minut na njegovo delovanje ter ovrednotili rezultate.



Slika 32: HPTLC silikagel 60 plošča, razvita v topilu *n*-heksan : etil acetat : mravljična kislina (20 : 19 : 1; v/v/v), posneta z izvorom svetlobe z valovno dolžino 366 nm (A) in po razprtvi in delovanju reagenta DPPH· pri beli svetlobi (B). Naneseni so 18-urni hidrolizirani ekstrakti frakcij granatnih jabolk in standardi fenolnih spojin



Slika 33: HPTLC silikagel 60 plošča, razvita v topilu etil acetat : voda : mravljična kislina (85 : 15 : 10; v/v/v), posneta z izvorom svetlobe z valovno dolžino 366 (A) in po razprtvi in delovanju reagenta DPPH-pri beli svetlobi (B). Naneseni so 10 × razredčeni ekstrakti frakcij granatnih jabolk in standardi fenolnih spojin

Za antioksidativno učinkovitost fenolnih spojin smo uporabili reagent DPPH, ki smo ga razpršili na razvite HPTLC silikagel 60 plošče. Iz slike 32 lahko razberemo, da kvercetin ne prispeva veliko k skupni antioksidativni učinkovitosti fenolnih spojin, saj ni belih lis v višini kvercetin standarda ($R_F = 0,42$). Enako lahko rečemo za protokatehujovo kislino ter ferulno kislino. Galna kislina ($R_F = 0,31$) mogoče prispeva, a se prav tu bela lisa vleče in ne moremo zagotovo trditi, da prispeva k antioksidativnosti. Ravno obratno pa velja za *p*-kumarno kislino ($R_F = 0,63$) in *o*-kumarno kislino ($R_F = 0,61$), ki prispevata k skupni antioksidativnosti, saj so bele lise v trakovih ekstraktov frakcij pri R_F vrednostih njunih standardov. Ne zasledimo ju le v hidroliziranih ekstraktih frakcij BGJ membrane in HGJ soka. Antioksidativna učinkovitost pa se kaže tudi z belimi lisami pri R_F vrednostih 0,48 za kavno kislino, v frakcijah BGJ lupina, meso, sok ter HGJ lupina, meso, membrana,

semena. Iz slike 33 lahko ugotovimo, da ima tudi klorogenska kislina ($R_F = 0,42$) vpliv na skupno antioksidativno učinkovitost v frakcijah obeh granatnih jabolk semena, v obeh poreklih pa v frakcijah membrana, meso, lupina ne moremo zagotovo reči, da je bela lisa posledica antioksidativne učinkovitosti klorogenske kisline, kajti bela lisa delovanja antioksidantov se razteza čez območje R_F vrednosti klorogenske kisline. Na slikah 32 in 33 pa so poleg že omenjenih fenolnih spojin, ki imajo antioksidativno učinkovitost tudi druge lise, ki so posledica antioksidativnega delovanja, a jih nismo uspeli identificirati.

5 SKLEPI

Na podlagi opravljenih analiz v okviru diplomskega dela lahko zaključimo:

- Granatna jabolka vsebujejo fenolne spojine v vseh svojih delih.
- Med obema granatnima jabolkoma z različnim geografskim poreklom smo opazili razliko v koncentraciji skupnih fenolnih spojin.
- Dokazali smo razlike v koncentracijah skupnih fenolnih spojin med različnimi deli granatnega jabolka.
- Geografsko poreklo lahko vpliva na koncentracijo skupnih fenolnih spojin v granatnem jabolku.
- Koncentracija skupnih fenolnih spojin v ekstraktih ni v povezavi z njihovo antioksidativno učinkovitostjo.
- Za ekstrakcijo fenolnih spojin je bolj primeren 70 % etanol kot pa destilirana voda.
- Destilirana voda je v tem primeru bolj primerna za ekstrakcijo fenolnih spojin z višjo antioksidativno učinkovitostjo.
- Najbolj zastopana maščobna kislina v granatnem jabolku je konjugirana linolenska kislina (punična kislina).
- Granatno jabolko geografskega izvora Brazilija je bogatejše po vsebnosti vitamina C od granatnega jabolka geografskega izvora Hrvaška.
- V granatnem jabolku s poreklom Brazilija je vsebnost konjugirane linolenske kisline dvakrat večja kot v granatnem jabolku s poreklom hrvaška Istra.
- V granatem jabolku so naslednje fenolne spojine: katehin, kvercetin, klorogenska kislina, galna kislina, *o*-kumarna kislina, in kavna kislina.
- V granatnem jabolku s poreklom Brazilija je večja vsebnost preiskovanih fenolnih spojin kot v granatnem jabolku s poreklom hrvaška Istra.
- Najbolj primeren čas hidrolize za določanje fenolnih kislin in flavonoidov je 18 ur.
- K antioksidativni učinkovitosti prispevajo naslednje fenolne spojine: kvercetin, galna kislina, *p*-kumarna kislina, *o*-kumarna kislina, kavna kislina in klorogenska kislina.

6 POVZETEK

V diplomski nalogi smo v ekstraktih granatnih jabolk (*Punica granatum*) določili koncentracijo skupnih fenolnih spojin. Granatno jabolko smo razdelili na 5 različnih frakcij: lupina, meso, membrana, sok, semena.

Hoteli smo pokazati razlike v vsebnosti skupnih fenolnih spojin med granatnimi jabolki z geografskim poreklom Brazilija in hrvaška Istra. Prav tako smo hoteli pokazati tudi razlike v vsebnosti skupnih fenolnih spojin med samimi deli granatnih jabolk. Uporabili smo dve različni topili, in sicer 70 % etanol in destilirano vodo, s čimer smo že zeleli pokazati različno sposobnost topila za ekstrakcijo fenolnih spojin. Primerjali smo tudi antioksidativne učinkovitosti ekstraktov. S pomočjo tankoplastne kromatografije (TLC) pa smo določevali, katere fenolne spojine so v granatnih jabolkih.

Ekstrakte fenolnih spojin smo pripravili s topilom 70 % etanol in s topilom destilirana voda, nato smo v vseh ekstraktih spektrofotometrično določili koncentracijo skupnih fenolnih spojin s pomočjo Folin-Ciocalteu metode. Rezultate vsebnosti skupnih fenolnih spojin smo podali kot ekvivalent galne kisline. Med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin med granatnima jabolkoma z obeh geografskih področij ni velike razlike. Razlike so v vsebnosti med posameznimi deli granatnega jabolka. Največjo koncentracijo skupnih fenolnih spojin smo določili v ekstraktu membrana (topilo 70 % etanol) brazilskega granatnega jabolka ($159,9 \pm 3,4$ mg galne kisline/g), najmanj pa v soku (topilo destilirana voda) hrvaškega granatnega jabolka ($0,2 \pm 0,03$ mg galne kisline/g). Na splošno so v ekstraktih lupine, mesa in membrane koncentracije skupnih fenolnih spojin visoke (od 99,6 do 159,9 mg galne kisline/g v topilu 70 % etanol), nizke pa so v ekstraktih sok in semena (od 2,8 do 8,3 mg galne kisline/g v topilu 70 % etanol).

Primerjali smo topila 70 % etanol in destilirano vodo ter prišli do zaključka, da je topilo 70 % etanol uspešnejši pri ekstrakciji fenolnih spojin in zato tudi bolj primeren, saj je v večini primerov kar za 50 % bolj učinkovit.

Antioksidativno učinkovitost ekstraktov smo dokazali z metodo lovljenja DPPH·-radikalov. Sposobnost lovljenja DPPH·-radikalov smo izrazili kot koncentracijo fenolnih spojin v ekstraktu, ki povzroči 50 % inhibicijo prostega DPPH· ($ED_{50\%DPPH}$) radikala. Boljša kot je sposobnost lovljenja prostih radikalov, nižja je vrednost $ED_{50\%}$. Opazili smo, da imajo vsi ekstrakti dobro sposobnost lovljenja prostih radikalov, nekoliko slabšo imata vodna ekstrakta semen obeh granatnih jabolk. V tem primeru pa lahko trdimo, da je destilirana voda učinkovitejše topilo za ekstrakcijo fenolnih spojin ali pa tudi drugih spojin z antioksidativnim delovanjem, saj so vrednosti $ED_{50\%}$ manjše v vseh primerih razen v ekstraktih semena obeh granatnih jabolk, kjer so motnje maščobne kisline v semenih. Vrednosti $ED_{50\%}$ so od 0,12 do 11,54 µg/mL v ekstraktih z destilirano vodo in od 1,56 do 5,57 µg/mL v ekstraktih s 70 % etanolom.

Sestavo skupnih fenolnih spojin smo določali s TLC na različnih ploščah in z različnimi topili za razvijanje. Tu smo dokazali prisotnost naslednjih fenolnih spojin: katehin, kvercetin, galna kislina, *o*-kumarna kislina, kavna kislina in klorogenska kislina ter druge, katerih nismo uspeli določiti. Z denzitometrom pa smo določili vsebnost katehina v vseh frakcijah obeh granatnih jabolk. Najvišjo vsebnost katehina smo določili v lupini brazilskih granatnih jabolk in sicer 1,22 mg/g.

Ugotovili smo, da hidroliza vpliva na identifikacijo fenolnih spojin, da je 18 urna hidroliza najbolj primerna za detekcijo fenolnih spojin in da po 24 urah hidrolize nekaterih fenolnih spojin ne moremo več detektirati.

Pri določevanju antioksidativne učinkovitosti s pomočjo DPPH· smo ugotovili katere fenolne spojine prispevajo k antioksidativni učinkovitosti. Ugotovili smo, da so te fenolne spojine naslednje: kvercetin, galna kislina, *p*-kumarna kislina, *o*-kumarna kislina, kavna kislina, klorogenska kislina in druge, katerih nismo določili.

V sokovih granatnih jabolk smo določevali vsebnost vitamina C ter prišli do zaključkov, da so granatna jabolka s področja Brazilije z njim bogatejša, saj je vsebnost vitamina C 17,1 mg/L, medtem ko je v granatnih jabolkih s področja hrvaške vsebnost vitamina C le 6,12 mg/L.

Pri določevanju vsebnosti maščobnih kislin smo po pričakovanju prišli do zaključka, da je v obeh granatnih jabolkih najbolj zastopana konjugirana linolenska kislina (puničična kislina). Določili smo tudi druge maščobne kisline, ki si sledijo po vsebnosti padajoče: linolna, oleinska, palmitinska, sterainska in gadoleinska kislina v brazilskem granatnem jabolku, v hrvaškem pa si za že omenjeno najbolj zastopano po vsebnosti padajoče sledijo: linolna, oleinska, palmitinska in stearinska kislina. Razlike med obema granatnima jabolkoma so predvsem v vsebnosti konjugirane linolenske kisline, ki je v brazilskih granatnih jabolkih ($74,0 \pm 4,7$ g/kg) dvakrat večja kot v hrvaških granatnih jabolkih ($33,9 \pm 1,1$ g/kg). V brazilskih granatnih jabolkih smo določili tudi gadoleinsko kislino, katere v hrvaških granatnih jabolkih nismo zaznali.

7 VIRI

- Abram V., Donko M. 1999. Tentative identification of polyphenols in *Sempervivum tectorum* and assessment of the antimicrobial activity of *Sempervivum* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 485-489
- Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. Farmacevtski vestnik, 48: 573-589
- Andersen Ø. M., Markham K. R. 2006. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. New York, CRC Press: 1237-1237
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 29: 25-30
- Bruneton J. 1999. Pharmacognosy, phytochemistry medical plants, 2nd ed. Paris, Lavoisier: 310-331, 370-389
- Doljak B., Kac J., Kreft S., Janeš D., Mlinarič A., Slanc P., Štrukelj B., Umek A. 2005. Vaje iz farmakognezije in farmacevtske biotehnologije, Ljubljana, Fakulteta za farmacijo, katedra za farmacevtsko biologijo: 33-33, 35-35
- Fadavi A., Barzegar M., Azizi M. H., Bayat M. 2005. Physicochemical composition of ten pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in Iran. Food Science and Technology International, 11: 113-119
- Frankič T., Salobir J. 2007. Antioksidanti v prehrani živali: pomen za živali in porabnike. V: Zbornik predavanj 16. posvetovanja o prehrani domačih živali »Zadravčevi-Erjavčevi dnevi«, Radenci, 8-9 nov. 2007. Murska Sobota, Kmetijsko gozdarski zavod: 27-40
- Galle Toplak K. 2000. Zdravilne rastline na Slovenskem, Ljubljana, Mladinska knjiga: 18-18, 21-22, 38-39
- Gil I. M., Tomas-Barberan A. F., Hess-Pierce B., Holcroft M. D., Kader A. A. 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and procesing. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 4581-4589
- Glavnik V., Simonovska B., Vovk I. 2009. Densitometric determination of (+)-catechin and (-)-epicatechin by 4-dimethylaminocinnamaldehyde reagent. Journal of Chromatography A, 1216: 4485-4491

- Goodwin T.W., Mercer E.I. 1983. Plant phenolics. Oxford, Oxford University Press: 528-566
- Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive oils. Journal of the American Oil Chemists Society, 58: 966-968
- Hernández F., Malgarejo P., Olías J.M., Artés F. 2000. Fatty acid composition and total lipid content of seed oil from three commercial pomegranate cultivars. CIHEAM – Options Méditerranéennes, Serie A, 42: 205-209
- Horvat A. J. M., Margita K. 2009. Instrumentalna analiza. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zavod za analitičku kemiju, 56-56
- Jork H., Funk W., Fischer W., Wimmer H. 1989. Dunnschicht-Chromatographie, Band 1a. Weinheim, VCH: 149-149
- Kreft I., Škrabanja V., Bonafaccia G. 2000. Temelji prehranskih in biotskih vplivov antioksidantov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 33-37
- Kulišič T., Radonič R., Katalič V., Miloš M. 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. Food Chemistry, 85: 633-640
- Murkovic M. 2003. Phenolic compounds. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 2. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 4507-4514
- Nuutila A. M., Kammiovirta K., Oksman-Caldentey K.-M. 2002. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. Food Chemistry, 76: 519-525
- Opara U. L., Al-Ani M. R., Al-Shuaibi Y. S. 2007. Physico-chemical properties, vitamin C content, and antimicrobial properties of pomegranate fruit (*Punica granatum* L.). Food and Bioprocess Technology, 2, 3: 315-321
- Pande G., Akoh C. C. 2009. Antioxidant capacity and lipid characterization of six Georgia-grown pomegranate cultivars. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57: 9427-9436
- Park W. P., Goins E. R. 1994. *In situ* preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acids composition in foods. Journal of Food Science, 59, 6: 1262-1266

- Plestenjak A., Golob T. 2003. Analiza kakovosti živil. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 3: 39-41
- Poredoš T. 2006. Stabilnost askorbinske in dehidroaskorbinske kisline v vodnih raztopinah. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 54-54
- Poyrazoğlu E., Gökmən V., Artik N. 2002. Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. Journal of Food Composition and Analysis, 15: 567-575
- Prošek M., Pukl M., 1991. Kvantitativna planarna kromatografija. Ljubljana, Kemijski inštitut Boris Kidrič: 8-15
- Randhir r., Lin Y.T., Shetty K. 2004. Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. Process Biochemistry, 39: 637-646
- Rudan-Tasič D. 2000. Vitamin C, vitamin E in koencim Q₁₀. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 39-51
- Rudan-Tasič D., Klofutar C. 2007. Fizikalno kemijske metode v živilstvu. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 24-27.
- Sepúlveda E., Cea I., Sáenz C. 2010. Phenolic characterization and antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) cv., Wonderful juice from three regions of Chile. V: FoodINNOVA 2010. International Conference on Food innovation, Valencia, 25-29 oktober 2010. Vol. 1. Valencia, Univerzidad Politecnica de Valencia, 1: 25-29
- Simonovska B., Vovk I., Andrešek S., Valentova K., Ulrichova J. 2003. Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. Journal of Chromatography A, 1016: 89-98
- Srivastava A., Harish S.R., Shivanandappa T. 2006. Antioxidant activity of sesame cake extract. Food Chemistry, 91: 312-219
- Sun T., Ho C.T. 2005. Antioxidant activities of buckwheat extracts. Food Chemistry, 90: 743-749
- Šiško M. 1983. Sadjarstvo. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 250-250

- Vidrih R., Kač M. 2000. Analitika antioksidantov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 101-114
- Viuda-Martos M., Fernández-López J., Pérez-Álvarez J.A. 2010. Pomegranate and its many functional components as related to human health: A review. Food Science and Food Safety, 9: 635-654
- Vovk I., Simonovska B., Vuorela H. 2005. Separation of eight selected flavan-3-ols on cellulose thin-layer chromatographic plates. Journal of Chromatography A, 1077: 188-194
- Vrtačnik M., Zupančič Brouwer N. 2003. Organska kemija. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije, 157-160
- Yasoubi P., Berzegar M., Sahari A. M., Azizi M. H. 2007. Total phenolic contents and antioksidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extracts. Journal of Agricultural Science and Technology, 9: 35-42
- Whiteman K., Mayhew M. 1998. The world encyclopedia of fruit. Leicester, Lorenz books: 108 - 109

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Nataši Poklar Ulrih in somentorici dr. Ireni Vovk za čas, vodenje, vsestransko pomoč in temeljiti pregled diplomske naloge.

Za podroben pregled naloge in čas se zahvaljujem recenzentki doc. dr. Lei Pogačnik.

Za vso tehnično in strokovno pomoč se zahvaljujem asist. Dr. Mihaeli Skrt.

Zahvaljujem se Lini Burkan za vso pomoč pri urejanju, iskanju literature in urejanju virov.

Za pomoč v laboratoriju na katedri za biokemijo in kemijo živil Oddelka za živilstvo, se zahvaljujem vsem, ki ste mi karkoli pomagali.

Zahvala za pomoč gre celotnem kolektivu v Laboratoriju za prehrambeno kemijo na Kemijskem inštitutu.

Zahvaljujem se tudi doc. dr. Rajku Vidrihu in kolektivu na katedri za tehnologije rastlinskih živil Oddelka za živilstvo, za pomoč v laboratoriju.

Iskreno se zahvaljujem staršema, bratu, Lenki ter sošolcem in prijateljem za vso pomoč , podporo, potrpljenje in razumevanje tekom študija.

Vsem skupaj Hvala.