

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Katarina ČERNELIČ

**PRIMERJAVA VSEBNOSTI LUTEINA IN
ZEAKSANTINA V RASTLINSKIH VZORCIH IN
PREHRANSKIH DOPOLNILIH S
KROMATOGRAFSKIMI METODAMI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Katarina ČERNELIČ

**PRIMERJAVA VSEBNOSTI LUTEINA IN ZEAKSANTINA V
RASTLINSKIH VZORCIH IN PREHRANSKIH DOPOLNILIH S
KROMATOGRAFSKIMI METODAMI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**COMPARISON OF LEVELS OF LUTEIN AND ZEAXANTHIN IN THE
VEGETABLE SAMPLES AND FOOD SUPPLEMENTS WITH
CHROMATOGRAPHIC METHODS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2013

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu senata Biotehniške fakultete in sklepa Senata Univerze z dne 08.10.2009 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje doktorata znanosti s področja živilstva. Za mentorico je bila imenovana višja strokovno-raziskovalna sodelavka dr. Breda Simonovska, in za somentorja prof. dr. Marjan Simčič.

Večina analiz je bilo opravljenih v Laboratoriju za prehrabeno kemijo, na Kemijskem inštitutu v Ljubljani. Poskus v intenzivni reji je bil opravljen v hlevih Perutnine Ptuj d.d., namenjenih redni proizvodnji. Analiza vzorcev z ramansko spektroskopijo pa je bila opravljena na Oddelku za spektroskopijo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Mentorica: dr. Breda Simonovska, višja strokovno-raziskovalna sodelovka

Somentor: prof. dr. Marjan Simčič

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Nataša POKLAR ULRIH

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Janez SALOBIR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Iztok Jože KOŠIR

Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za agrokemijo in pivovarstvo

Datum zagovora: 20.12.2013

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

Doktorandka:
Katarina ČERNELIČ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
DK UDK 543.544:641.1:577.1(043)=163.6
KG analizne metode/živila/kromatografske tehnike/lutein/zeaksantin /antioksidanti/
prehranska dopolnila/špinača/ohrovt/čemaž/dušikova atmosfera/raman spektroskopija
/antioksidativna mreža
AV ČERNELIČ, Katarina, prof. kem. in biol.
SA SIMONOVSKA, Breda (mentorica)/ SIMČIČ, Marjan (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in
biotehniških znanosti, področje: živilstvo
LI 2013
IN PRIMERJAVA VSEBNOSTI LUTEINA IN ZEAKSANTINA V RASTLINSKIH
VZORCIH IN PREHRANSKIH DOPOLNILIH S KROMATOGRAFSKIMI
METODAMI
TD Doktorska disertacija
OP XIV, 95 str., 7 pregl., 33 sl., 132 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Lutein in zeaksantin vsebujata vse več zanimanja zaradi njunega antioksidativnega delovanja. Namen raziskovanja je bil preučiti vplive različnih pogojev priprave rastlinskih vzorcev, kot so različna topila, dodatek sintetskih antioksidantov 3,5-di-*terc*-butil-4-hidroksitoluena (BHT), *terc*-butilhidrokinona (TBHQ) in trietilamonijevega acetata (TEAA) (pH 7) na določitev vsebnosti luteina in zeaksantina. Pri primerjavi ekstrakcij narejenih v zračni in dušikovi atmosferi, z dodatkom BHT in TBHQ v primerjavi s samim topilom, smo najvišjo vsebnost luteina dobili pri ekstrakciji v dušikovi atmosferi in dodanem antioksidantu TBHQ, prav tako je bil tudi izkoristek pri teh pogojih najvišji. Z uporabo acetona in njemu dodanega 1 M TEAA (pH 7) kot mobilne faze pri HPLC metodi smo izboljšali obstojnost luteina pri analizi. Pri eksperimentalnem delu smo uporabili majhen, reprezentativen vzorec in manj strupena topila za ekstrakcijo in kromatografijo. Prav tako smo primerjali različne pogoje pri alkalni hidrolizi luteinskih estrov v *Tagetes sp.* in zeaksanskih estrov v *Physalis alkekengi* za določevanje preiskovanih analitov luteina in zeaksantina s pomočjo HPLC metod. Ločbo karotenoidov ekstrakta špinače na TLC ploščah smo s pomočjo TLC-MS vmesnika potrdili z masnim detektorjem in dokazali smotrnost uporabe avtomatske kadičke pri TLC metodi za določevanje luteina. S pomočjo HPLC metode smo določili celokupno vsebnost luteina in zeaksantina v plazmi piščancev. V dveh prehranskih dopolnilih smo z ramansko spektrometrijo analizirali porazdelitev karotenoidov. S to metodo posameznih karotenoidov ne moremo ločiti, lahko pa določimo celokupno vsebnosti karotenoidov v določenem vzorcu. S to neinvazivno metodo se izognemo razpadu preiskovanih karotenoidov med eksperimentom.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dd
 DC UDC 543.544:641.1:577.1(043)=163.6
 CX analytical methods/foods/chromatographic techniques/carotenoids/lutein/zeaxanthin/antioxidants /food supplements/spinach/kale/wild garlic/nitrogen atmosphere/raman spectroscopy/antioxidant network
 AU ČERNELIČ, Katarina
 AA SIMONOVSKA, Breda (supervisor)/ SIMČIČ Marjan (co-advisor)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Food Science and Technology
 PY 2013
 TI COMPARISON OF LEVELS OF LUTEIN AND ZEAXANTHIN IN THE VEGETABLE SAMPLES AND FOOD SUPPLEMENTS WITH CHROMATOGRAPHIC METHOD
 DT Doctoral Dissertation
 NO XIV, 95 p., 7 tab., 33 fig., 132 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB Antioxidant activity within lutein and zeaxanthin had lately risen more and more interest. Main objective of this study was to examine influence of different conditions at preparation of plant samples with different solvents, addition of antioxidant 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluene (BHT), *tert*-butylhydroquinone (TBHQ) and 1M triethylammonium acetate (TEAA) (pH 7). Comparison to pure solvent and extraction made in air and nitrogen atmosphere, with addition of BHT and TBHQ, led to results with highest concentration of lutein when extraction is made in nitrogen atmosphere with addition of antioxidant TBHQ. Within same conditions also highest recovery was noted. Addition of 1M TEAA (pH 7) to acetone as mobile phase in HPLC method improved stability of lutein in the analysis. Within experimental phase small but representative sample was used with relatively non-toxic solvent for extraction and chromatography. Influence of different conditions was compared with alkaline hydrolysis of lutein esters in the *Tagetes sp.* and zeaxanthin esters in *Physalis alkekengi* to determine analytes of lutein and zeaxanthin with use of HPLC methods. Carotenoid separation within spinach extract on TLC plates were confirmed with using TLC - MS interface and detected with mass detector. Determination of lutein with TLC method proved better when made with automatic chamber in comparison to conventional one. Overall content of lutein and zeaxanthin in the chickens plasma was determined with use of HPLC method. Raman spectroscopy was used to determine distribution of carotenoids within food supplements. Problem with use of this method is inability of carotenoid separation. Still method proves useful and shows advantage for overall determination of carotenoid content within specific organism, when use of this non-invasive method avoids analytes decomposition between experiment.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	X
KAZALO SLIK	XIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XVI
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN RAZISKAV	3
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	4
2 PREGLED OBJAV.....	5
2.1 ZGODOVINA KAROTENOIDOV	5
2.2 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI KAROTENOIDOV	5
2.3 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI LUTEINA IN ZEAKSANTINA.....	8
2.4 BIOSINTEZA LUTEINA IN ZEAKSANTINA.....	8
2.5 KAROTENOIDI V RASTLINAH	10
2.5.1 Funkcija karotenoidov v rastlinah.....	10
2.5.1.1 Porazdelitev karotenoidov v rastlinah.....	10
2.5.1.2 Lutein in zeaksantin v rastlinah	11
2.5.2 Vnos luteina in zeaksantina v organizem.....	11
2.5.2.1 Špinača.....	12
2.5.2.2 Čemaž	13
2.5.2.3 Ohrovt	13
2.5.2.4 Žametnice.....	14
2.5.2.5 Navadno volčje jabolko	14
2.6 VPLIV LUTEINA IN ZEAKSANTINA NA ORGANIZEM.....	15
2.6.1 Absorpcija in transport luteina in zeaksantina	15
2.6.2 Nahajanje luteina in zeaksantina v organizmu	16
2.6.3 Bolezni povezane z delovanjem luteina in zeaksantina.....	16
2.6.3.1 Lutein in zeaksantin v očesu	16

2.6.3.2	Rakava obolenja.....	18
2.6.3.3	Koronarne srčne bolezni	18
2.7	ANTIOKSIDANTI.....	19
2.7.1	Oksidativni stres.....	19
2.7.2	Delovanje antioksidantov	19
2.7.2.1	Lipojska kislina	21
2.7.2.2	CoQ10.....	21
2.7.3	Antioksidativna mreža	21
2.7.4	Karotenoidi kot antioksidanti	22
2.7.5	Delovanje z drugimi antioksidanti.....	23
2.7.6	Razpad luteina in zeaksantina	23
2.8	KEMIJSKE ANALIZNE TEHNIKE	24
2.8.1	Ekstrakcija	24
2.8.2	Kromatografija.....	25
2.8.2.1	Tankoplastna kromatografija (TLC)	25
2.8.2.2	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC).....	26
2.8.2.3	Masna spektrometrija.....	27
3	MATERIALI IN METODE.....	29
3.1	KEMIKALIJE	29
3.2	NAPRAVE	29
3.3	DOLOČANJE LUTEINA V VZORCIH ŠPINAČE.....	30
3.3.1	Določanje luteina v vzorcih špinače na zraku in v dušikovi atmosferi	30
3.3.2	Določanje izkoristka pri ekstrakciji luteina iz špinače na zraku in v dušikovi atmosferi.....	30
3.3.3	Vpliv različnih časov ekstrakcije na vsebnost luteina pri ekstrakciji liofilizirane špinače z 1M TEAA (pH 7) v acetonu	30
3.3.4	Določanje luteina v vzorcih špinače z dodatkom sintetičnih antioksidantov ekstrakcijskemu topilu acetonu z 1M TEAA (pH 7)	31
3.3.5	Izvedba HPLC analiz.....	31
3.3.6	Izvedba TLC analiz.....	32
3.3.6.1	Analiza na HPTLC CNF254 ploščah.....	33
3.3.6.2	Analiza na HPTLC C18 RP	33
3.3.6.3	Izolacija violaksantina, neoksantina in luteina s pomočjo TLC plošč	33
3.3.7	Kvalitativno določanje karotenoidov s TLC-MS	33

3.3.8	Primerjava klasične in avtomatizirane kadičke pri določanju all-trans-luteina in β-karotena.....	34
3.4	IZVEDBA ANALIZ ZA DOLOČANJE LUTEINA V VZORCIH OZKOLISTNEGA OHROVTA IN ČEMAŽA	34
3.4.1	Izvedba HPLC analize	35
3.4.2	Izvedba TLC analiz v ekstraktih ozkolistnega ohrovta in čemaža	35
3.5	DOLOČANJE LUTEINA V ŽAMETNICAH IN ZEAKSANTINAV VOLČJEM JABOLKU	35
3.5.1	HPLC analize za določanje luteina v žametnicah in zeaksantina v volčjem jabolku	35
3.5.1.1	Časovni potek hidrolize v alkalnem mediju zeaksantinskih estrov v volčjem jabolku pri 60 °C z različnimi koncentracijama baze.....	35
3.5.1.2	Časovni potek hidrolize v alkalnem mediju luteinskih estrov v žametnicah pri 60 °C z različnimima koncentracijama baze.....	36
3.6	DOLOČANJE LUTEINA IN ZEAKSANTINAV V VZORCIH PIŠČANČJE PLAZME	36
3.6.1	Opis poskusov reje piščancev	36
3.6.2	Določanje luteina in zeaksantina v plazmi	37
3.7	DOLOČANJE LUTEINA V PREHRANSKIH DOPOLNILIH	37
3.7.1	Merjenje luteina in β-karotena s konfokalnim ramanskim mikroskopom. 37	
3.8	STATISTIČNA ANALIZA.....	38
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	39
4.1	METODE ZA DOLOČANJE KAROTENOIDOV.....	39
4.2	PRIPRAVA VZORCA ZA DOLOČANJE LUTEINA V VZORCU ŠPINAČE.....	39
4.2.1	Razvoj HPLC-UV metode za določanje karotenoidov v ekstraktu špinače 40	
4.2.2	TLC metode za določanje karotenoidov	45
4.2.2.1	TLC metoda za določanje karotenoidov na silica gel 60 CN F254s plošči	46
4.2.2.2	TLC metoda za določanje karotenoidov na RP18 HPTLC in plošči	46
4.2.2.3	Primerjava klasične in avtomatizirane kadičke (AK) pri določanju luteina in β -karotena	48
4.2.3	Določanje karotenoidov v ekstraktu špinače s pomočjo TLC-MS metode. 50	
4.2.4	Vpliv dodanih sintetičnih antioksidantov na ekstrakcijo v zraku in dušikovi atmosferi	54
4.2.5	Primerjava izkoristkov ekstraktij v prisotnosti zraka in pod dušikovo atmosfero	58

4.2.6	Vpliv časa ekstrakcije na vsebnost luteina pri ekstrakciji liofilizirane špinače s 15% 1M TEAA (pH 7) v acetonu	60
4.2.7	Vpliv dodanih sintetičnih antioksidantov ekstrakcijskemu topilu acetonu s 15% 1M TEAA (pH 7) na ekstrakcijo v zraku in dušikovi atmosferi	61
4.3	VSEBNOST LUTEINA V EKSTRAKTIH OZKOLISTNEGA OHROVTA IN ČEMAŽA	61
4.4	VPLIV RAZLIČNIH KONCENTRACIJ KOH PRI SAPONIFIKACIJI NA DOLOČANJE LUTEINA V ŽAMETNICAH IN ZEAKSANTINA V NAVADNEM VOLČJEM JABOLKU.....	63
4.5	VPLIV DODANEGA CoQ₁₀ IN LIPOJSKE KISLINE (ALA) V KRMO PIŠČANCEV NA VSEBNOST LUTEINA IN ZEAKSANTINA V PLAZMI PIŠČANCEV	65
4.6	MERJENJE KAROTENOIDOV V PREHRANSKIH DOPOLNILIH S KONFOKALNIM RAMAN MIKROSKOPOM.....	66
4.7	KOLIČINA ZAUŽITEGA LUTEINA IN ZEAKSANTINA S HRANO	73
5	SKLEPI.....	75
6	POVZETEK (SUMMARY)	77
6.1	POVZETEK.....	77
6.2	SUMMARY.....	79
7	VIRI.....	81
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Prikaz literaturnih objav priprave vzorca in uporabljene kolone za določanje luteina.	42
Preglednica 2: R_F vrednosti in relativne standardne deviacije luteina in β -karotena.	49
Preglednica 3: Koncentracija luteina ekstrahiranega iz štirih različnih liofiliziranih vzorcev špinače z etanolom, etanolom z 0,1 % TBHQ, etanolom z 0,1 % BHT v zračni in dušikovi atmosferi.	56
Preglednica 4: Izkoristki luteina iz štirih vzorcev špinače z etanolom, etanolom z 0,1 % TBHQ in etanolom z 0,1 % BHT, v temi v prisotnosti zraka in v temi v dušikovi atmosferi.	59
Preglednica 5: Vpliv časa ekstrakcije na vsebnost luteina pri ekstrakciji liofilizirane špinače s 15% 1M TEAA pH 7 v acetonu, v dušikovi atmosferi (Simonovska in sod., 2013).	60
Preglednica 6: Primerjava koncentracij luteina ekstrahiranega s 15 % TEAA v acetonu iz liofiliziranega vzorca špinače po 2 min vorteksiranja v zraku in 15 min mešanju z magnetnim mešalom v dušikovi atmosferi (Simonovska in sod., 2013).	61
Preglednica 7: Vsebnost luteina in zeaksantina (mg/L) v plazmi piščancev krmljenih z dodatkom CoQ ₁₀ , lipojske kisline (ALA) ter kombinacije CoQ ₁₀ in lipojske kisline.	66

KAZALO SLIK

Slika 1: Izoprenska enota	6
Slika 2: Strukturne formule all- <i>trans</i> -luteina (A) in all- <i>trans</i> -zeaksantina (B), β-karotena (C), neoksantina (D) in violaksantina (E).	7
Slika 3: Predhodniki spojin in glavni karoteni in ksantofili v biosintezi karotenoidov v rastlinah. Kratice: DMAPP – dimetilalil pirofosfat; GGPP - geranilgeranil pirofosfat; IPP - izopentenil pirofosfat (Kopsell in Kopsell, 2006).	9
Slika 4: Špinača (<i>Spinacia oleracea</i> L.).....	12
Slika 5: Čemaž (<i>Allium ursinum</i> L.).....	13
Slika 6: Ozkolistni ohrovt (<i>Brassica oleracea acephala</i> var. <i>sabellica</i>).....	14
Slika 7: Navadno volčje jabolko (<i>Physalis alkekengi</i>).....	15
Slika 8: <i>terc</i> - butilhidrokinon (TBHQ).....	24
Slika 9: 3,5-di- <i>terc</i> -butil-4-hidroksitoluen (BHT).....	24
Slika 10: Kromatogram ekstrakta špinače, pri 450 nm, ločenega na koloni Prontoasil C30: 1: neoksantin; 2: violaksantin; 3: lutein; 4: zeaksantin; 5: klorofil b; 6: klorofil a; 7: β-karoten.....	41
Slika 11: Kromatogram ekstrakta volčjega jabolka, pri 450 nm, HPLC ločbe prikaza prisotnosti zeaksantinskih estrov.....	43
Slika 12: Kromatogram ekstrakta žametnic, pri 450 nm, HPLC ločbe prikaza prisotnosti luteinskih estrov.	44
Slika 13: Kromatogram ekstrakta špinače, pri 450 nm, HPLC ločbe prikaza odsotnosti luteinskih estrov v vzorcu špinače.....	44
Slika 14: Ločba karotenoidov na Silica gel 60 CN F254s plošči: (a) pred izpostavitvijo HCl param in (b) po izpostavitvi HCl param. Topilo za razvijanje: kloroform:n-heksan:metanol (35:60:5, v/v/v). Nanos 1: lutein, nanos 2: ekstrakt špinače, nanos 3: violaksantin, nanos 4: neoksantin, nanos 5: lutein, nanos 6: β-karoten, nanos 7: ekstrakt špinače.....	46
Slika 15: Ločba karotenoidov na HPTLC C18 RP plošči: (a) pred izpostavitvijo HCl param in (b) po izpostavitvi HCl param. Mobilna faza: metanol:aceton:n-heksan (70:20:15, v/v/v). Nanos 1: lutein, nanos 2: ekstrakt špinače, nanos 3: violaksantin, nanos 4: neoksantin, nanos 5: lutein, nanos 6: β-karoten, nanos 7: ekstrakt špinače.....	47
Slika 16: Ločba karotenoidov in luteinskih in zeaksantinskih estrov na HPTLC C18 RP plošč. Mobilna faza: metanol:aceton:n-heksan (70:20:15, v/v/v).....	48
Slika 17: TLC denzitogram dveh karotenoidov (1) luteina in (2) β-karotena, posneta pri 450 nm po ločbi narejeni v klasični kadički (Camag) (A) in avtomatski kadički (Camag) (B).....	49
Slika 18: MS spekter luteina ($m/z = 551 - [MH^+ - H_2O]$) iz ekstrakta špinače.....	51
Slika 19: MS spekter violaksantina ($m/z = 601 - [MH^+]$) iz ekstrakta špinače.....	51
Slika 20: MS spekter neoksantina ($m/z = 583 - [MH^+ - H_2O]$) iz ekstrakta špinače.....	52
Slika 21: MS spekter β-karotena ($m/z = 537 - [MH^+]$) iz ekstrakta špinače.....	52
Slika 22: MS spekter feofitina a ($m/z = 871 - [MH^+ - Mg]$) iz ekstrakta špinače.....	53
Slika 23: MS spekter feofotina b ($m/z = 885 - [MH^+ - Mg]$) iz ekstrakta špinače.....	53
Slika 24: Shematski prikaz nekaterih možnih razgradnih poti luteina med ekstrakcijo z etanolom. Eliminacija radikalov (Reakcija 1), obnova luteina (Reakcija 2), lovljenje radikalov (Reakcija 3), nastanek peroksilnega adjukta (Reakcija 4) (Černelič in sod., 2013).....	57
Slika 25: Ločba karotenoidov v ekstraktu ozkolistnega ohrovta in čemaža na TLC C18 RP plošč. Mobilna faza: metanol:aceton:n-heksan (70:20:15, v/v/v). Nanos 1: ekstrakt volčjega jabolka, nanos 2: ekstrakt žametnic, nanos 3: standard luteina, nanos 4: ekstrakt čemaža, nanos 5: ekstrakt ozkolistnega ohrovta, nanos 6: standard β-karotena, nanos 7: standard luteina.....	62
Slika 26: Prikaz saponifikacije 10 mg časnih listov žametnic z 12,5 in 30 % KOH.....	64
Slika 27: Prikaz saponifikacije 50 mg zmletih lampinjončkov volčjega jabolka z 12,5 in 30 % KOH.....	64
Slika 28: Ramanski spekter etanola, raztopine luteina v etanolu in raztopine β-karotena v etanolu.....	68
Slika 29: Posnetek prereza prehranskega dopolnila A z optičnim mikroskopom z označenim predelom ramanskega mapiranja (A), integracija značilnega traku na območju mapiranja za lutein pri 1160 cm^{-1} (B) in 1533 cm^{-1} (C).....	69

Slika 30: Kromatogram ekstrakta prehranskega dopolnila A pri 450 nm, HPLC ločbe prikaza prisotnosti luteinskih estrov.	70
Slika 31: Posnetek prereza prehranskega dopolnila B z optičnim mikroskopom z označenim predelom ramanskega mapiranja (A), integracija značilnega traku na območju mapiranja za lutein pri 1160 cm^{-1} (B) in 1533 cm^{-1} (C).	71
Slika 32: Kromatogram ekstrakta prehranskega dopolnila B, pri 450 nm, HPLC ločbe prikaza prisotnosti prostega luteina.	72
Slika 33: Ramanski spektri umeritvene krivulje luteina.....	73

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ALA	α -lipojska kislina
AK	avtomatska kadička
APCI	ionizacija pri atmosferskem tlaku
ATP	adenozintrifosfat
BHT	3,5-di- <i>terc</i> -butil-4-hidroksitoluen
CoQ ₁₀	koencim Q ₁₀ , ubikinon
ESI	elektrosprej ionizacija
EtOAc	etil acetat
EtOH	etanol
FADH ₂	reducirani flavinadenindinukleotid
FDA	ameriški vladni urad za zdravila in prehrano, ki je pod okriljem ameriškega ministra za zdravje (angl. Food and Drug Administration)
GJC	kanalčki medcelični komunikacijski kanali
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. High Performance Liquid Chromatography)
HPTLC	tankoplastna kromatografija visoke ločljivosti (angl. High Performance Thin Layer Chromatography)
HPLC-MS	tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo (angl. High Performance Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry)
HDL	lipoprotein visoke gostote (angl. High density lipoprotein)
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
HO [•]	hidroksilni radikal
H ₂ O	voda
konc.	koncentrira-n/-o/-a
LMWA	nizkomolekularni antioksidanti (angl. Low molecular weight antioxidant)
LDL	lipoprotein nizke gostote (angl. Low density lipoprotein)
lutein	all- <i>trans</i> -lutein
m/z	razmerje mase in naboja
MtOH	metanol
MS	masna spektrometrija, masni spektrometer (angl. Mass Spectrometry)
³ O ₂	tripletni kisik
¹ O ₂	singletni kisik
O ^{•-}	superoksidni anionski kisikov radikal
R [•]	alkilni radikal
ROS	reaktivne kisikove spojine (angl. Reactive oxygen species)
ROO [•]	peroksilni radikal
ROOH	hidroperoksid
RSD	relativna standardna deviacija
TBHQ	<i>terc</i> -butilhidrokinon

TEA,	triethylamin
TEAA	triethylamonijev acetat
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoplastna kromatografija (angl. Thin-Layer Chromatography)
UV	ultravijolično
UV-VIS	ultravijolično-vidno
VLDL	lipoproteini zelo nizke gostote (angl. Very low density lipoprotein)
zeaksantin	all- <i>trans</i> -zeaksantin

1 UVOD

Sodobni način življenja, katerega slabost je nekvalitetno prehranjevanje, postaja tema marsikaterih znanstvenih študij. Posledično postajajo funkcionalna živila, ki preprečujejo nekatere bolezni, pomembna panoga živilske industrije. Karotenoidi so intenzivno obarvane spojine, ki jih sintetizirajo številne rastline in mikroorganizmi. Topni so v maščobah in so prisotni v naši prehrani, posebno veliko jih vsebujeta sadje in zelenjava. Raziskave v zadnjih letih dokazujejo, da karotenoidi pozitivno vplivajo na naše zdravje in preprečujejo razvoj kroničnih bolezni (Rao in Rao, 2007).

Čeprav je tripletni kisik nepogrešljiv za življenje na zemlji pa ima prisotnost singletnega kisika škodljiv vpliv na živa bitja. Najprej so se z uničujočo močjo kisika srečale rastline in nato še živali. Da so se lahko ohranile, so morale razviti obrambne mehanizme, ki so delovali na podlagi antioksidacijskih lastnosti posameznih spojin, kot so lutein, zeaksantin, glutation, vitamin C, vitamin E, koencim Q₁₀, lipojska kislina, in encimov, kot so razne katalaze, dismutaze in peroksidaze. Tako so v bitki za svoj obstanek razvile obrambni mehanizem v obliki kompleksnega sistema, ki sta ga prva opisala Packer in Colman v svoji knjigi *The Antioxidant Miracle* (1999) in ga poimenovala »antioksidativna mreža«. To mrežo sestavljajo različne spojine, od enostavnih molekul do velikih proteinskih kompleksov, ki posamezno, predvsem pa z medsebojnim koordiniranim delovanjem varujejo organizem. Istočasno je uporaba različnih antioksidantov nujna, ker molekule delujejo selektivno in ker nekatere bistveno lažje prodrejo v različne dele telesa.

Tudi karotenoida lutein in zeaksantin se raziskujeta predvsem zaradi njune antioksidativne vloge in zaradi pozitivnih učinkov pri preprečitvi starostnih obolenj oči in pri preprečitvi rakastih in srčno-žilnih obolenj, ki so posledica oksidativnega stresa. Dolgotrajna nizka raven antioksidantov v organizmu, privede do pojava tako imenovanega oksidativnega stresa, ki lahko poškoduje ali uniči celice.

Na podlagi obsežnih raziskav so številni znanstveniki skušali razložiti njihovo delovanje, vendar dokončnega odgovora še vedno ne poznamo. Pozitivno delovanje karotenoidov je tako lahko rezultat njihovega antioksidativnega delovanja, posledica njihovega vpliva na imunski

sistem ali vpliva na nadzor rasti celic in diferenciacijo ter stimulativen učinka na tvorbo medceličnih komunikacijskih kanalov (King in sod., 1997).

Zaradi pospešene urbanizacije in intenzivne industrijske proizvodnje smo vedno bolj podvrženi različnim oblikam stresa. Antioksidanta lutein in zeaksantin človek ni sposoben sintetizirati in ju mora v organizem vnesti s hrano (Canene- Adams in Erdman, 2009). Ustrezno načrtovana prehrana postaja vedno bolj pomemben faktor, pri preprečitvi in zaviranju raznih kroničnih bolezni. Količina teh ksantofilov, ki naj bi bili del vsakodnevne prehrane, je odvisna od vrste zaužite hrane. Poleg uživanja hrane, ki vsebuje lutein in zeaksantin (špinača, ohrovt) ju lahko dobimo tudi s prehranskimi dopolnili. Alkalno umiljenje (saponifikacija) je nujen korak pri določanju ksantofilov v rastlinskih materialih, s katerimi razestrimo ksantofile in odstranimo spojine, ki bi motile kromatografsko določanje. Pri rastlinskem materialu, kjer sta lutein in zeaksantin v prosti obliki pa se ponavadi uporablja cela vrsta različnih ekstrakcijskih pristopov. Poleg priprave vzorca za vrednotenje luteina in zeaksantina v preiskovanih vzorcih je potrebno razviti hitre in enostavne analizne metode. Kvalitativno in kvantitativno vrednotenje antioksidantov z nizko molekularno maso (LWMA, low weight molecules antioxidant) je postalo z razvojem sodobnih separacijskih tehnik in sklopitve z masno spektrometrijo enostavnejše in hitrejše. Kljub temu je pri podajanju zanesljivih rezultatov ostalo analitikom še veliko nerešenih problemov na področju priprave vzorcev, kromatografske ločbe in kvantifikacije analitov.

Tudi na Kemijskem inštitutu smo razvili vrsto novih analiznih metod na osnovi kromatografskih tehnik, kot so TLC, HPLC z UV detektorjem ali sklopljenim z masnim spektrometrom (MS) za določanje vsebnosti luteina in zeaksantina. Naš namen je bil, da razvijemo metodologijo, ki bo tudi pri realnih vzorcih, ne glede na matriks, nudila verodostojne rezultate. Pri tem je bilo potrebno optimizirati posamezna opravila, kot so izbira analizne tehnike, priprava vzorca za analizo in vrednotenje rezultatov. V sklopu tega sta imeli pomembno vlogo tako hitrost analize, kakor tudi učinkovita in hitra priprava vzorca.

Novost pri določevanju karotenoidov predstavlja ramanska spektroskopija, ki se počasi komercialno uveljavlja kot hitra, neinvazivna metoda za določanje karotenoidov v očesu in koži človeka. Z ramansko spektroskopijo lahko pridobimo podatke o oksidativnem stanju organizma oz. vnosu karotenoidov v organizem, ki nam preventivno pomagajo pri zgodnjem odkrivanju raka in drugih boleznih (Ermakov in sod., 2010). Kožo ljudi ali živali obsevamo z

laserskim žarkom pri valovni dolžini 473 nm in karotenoidi v koži generirajo značilen ramanski spekter. Intenziteta signala je proporcionalna glede na količino karotenoidov v koži. Glede nato, da so karotenoidi obstojni le v primeru dobre zaščite, lahko iz izmerjene koncentracije karotenov v koži sklepamo tudi na stopnjo antioksidativne zaščite v organizmu.

1.1 NAMEN RAZISKAV

Karotenoida lutein in zeaksantin, katerih pomen v organizmu je le deloma znan, človeški organizem ni sposoben sintetizirati in ju mora dobiti s hrano. Količina teh dveh ksantofilov, ki naj bi bila del vsakodnevne prehrane, je zelo odvisna od vrste zaužite hrane. Poleg z njima bogate hrane (špinača, ohrovt, paprika, jajca, itd.) ju lahko vnesemo v organizem tudi s prehranskimi dopolnili. Znano je, da so nekatere okrasne rastline, kot npr. žametnice (*Tagetes sp.*) bogat vir luteina, volčje jabolko (*Physalis alkekengi*) pa vir zeaksantina. Njuno pozitivno delovanje na organizem (preprečitev degeneracije rumene pege in s tem preprečitev starostnih obolenj oči ter antioksidativno delovanje in preprečitev mnogih rakastih obolenj) jima daje veliko težo pri njunem raziskovanju.

Vloga nekaterih karotenoidov, predvsem β -karotena, luteina, zeaksantina, likopena in vitamina A v prehrani človeka je tako pomembna in raznolika, da se bo število raziskav tako kemijskih, biokemijskih kot bioloških zagotovo povečevalo, posebej sedaj, ko želimo v okviru funkcionalne prehrane ugotoviti učinke kemijskih spojin na delovanje organizma.

Kljub intenzivnim raziskavam v zadnjih 25 letih je ostalo na tem področju še veliko neznank. Delno je temu kriva precejšnja občutljivost karotenoidov. Neustrezni postopki in nepazljivost pri pripravi vzorcev lahko povzročijo izredno velike napake pri njihovem določevanju. Brez poznavanja in eliminacije antioksidativnih in oksidativnih lastnosti karotenoidov ni mogoče dobiti verodostojnih rezultatov analiz. V okviru doktorskega dela smo zato razvili postopke, ki zmanjšujejo vpliv oksidacije pri ekstrakciji luteina in zeaksantina iz nekaterih rastlin iz naše bližnje okolice.

Namen naše raziskave je bil ohraniti koncentracijo karotenoidov v biološkem sistemu ali ekstraktu. Za zaščito pred oksidacijo in razpadom smo karotenoide v ta namen zaščitili pred oksidacijo in razpadom z dodatki naravnih ali umetnih antioksidantov. Uspelo nam je da smo

z dodatkom antioksidantov, z delom v zatemnjenih prostorih in v inertni atmosferi z nizkim parcialnim tlakom kisika izgube luteina med ekstrakcijo močno zmanjšali. S kromatografskimi metodami smo prvi določili vsebnost luteina v čemažu. Z ramansko spektroskopijo, ki bo v prihodnosti verjetno postala pomembna neinvazivna metoda za določanje karotenoidov pa smo želeli prikazati uporabnost te metode pri določanju karotenoidov v prehranskih dopolnilih.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Izkoristek prostega luteina in zeaksantina pri saponifikaciji je odvisen od koncentracije baze, časa ter temperature saponifikacije.
- Potrebne količine luteina in zeaksantina lahko posameznik enakovredno pridobi iz običajnih živil ali prehranskih dopolnil z dodatkom teh spojin.

V okviru doktorske naloge smo vključili še dodatne cilje:

- Z ramansko spektroskopijo bomo poskušali določiti celokupno vsebnost karotenoidov v prehranskih dopolnilih.
- Ekstrakcijo prostega luteina iz rastlinskih vzorcev bomo poskušali izboljšati, z dodatkom eksternega antioksidanta, z delom v atmosferi z nizkim parcialnim pritiskom kisika in zaščiteno pred svetlobo.
- Vpeljati metodo za določitev in določiti koncentracijo luteina in zeaksantina v plazmi piščancev krmljenih s krmo brez in z dodatkom antioksidantov.

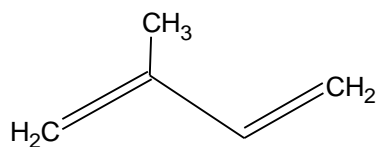
2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINA KAROTENOIDOV

Prve publikacije o naravnih pigmentih, danes znanih kot karotenoidi, segajo v začetek 19. stoletja, ko so jih opisali kot občutljive, neobstoje, lipofilne pigmente (Eugster, 1995). Leta 1907 so v laboratoriju Willstätterja določili točno molsko maso molekule karotena ($C_{40}H_{56}$) in ksantofila ($C_{40}H_{56}O_2$), ki so ju izolirali iz zelenih listov (Willstätter in Mieg, 1907, cit. po Eugster, 1995). Strukturne formule za β -karoten, zeaksantin in lutein so bile objavljene leta 1930 (Karrer in sod., 1930, cit. po Eugster, 1995). Za kemijsko strukturo β -karotena, je leta 1937 Karrer dobil Nobelovo nagrado za kemijo. Do leta 1971 je bilo identificiranih več kot 230 struktur karotenoidov (Isler, 1971, cit. po Eugster, 1995), vključno z izomerami in estri. Do leta 1993, je bilo identificiranih že 600 karotenoidov (Eugster, 1995). Do danes pa odkritih že več kot 700 karotenoidov v rastlinah, algah, glivah, bakterijah in drugih organizmih (Khachik in sod., 1999).

2.2 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI KAROTENOIDOV

Karotenoidi so tetraterpenoidi s 40 C-atomi, zgrajeni iz osmih izoprenskih enot (Slika 1). Osrednji linearni simetrični skelet je lahko cikliziran na enem ali na obeh koncih in ima lateralne metilne skupine. Skupna strukturna lastnost karotenoidov je dolg konjugiran sistem dvojnih vezi, ki služi kot kromofor, ki absorbira svetlobo in tako povzroči obarvanost z rumeno, oranžno in rdečo barvo (Deming in Erdman, 1999). Ciklizacija, hidrogenacija, dehidrogenacija, migracija dvojne vezi, skrajševanje ali podaljšanje verige, preureditev, izomerizacija, uvajanje kisika ali kombinacija teh procesov povzročijo raznolikost v strukturi karotenoidov in posledično tudi raznolikost njihovih funkcij. V naravi prevladujejo *all-trans* izomere, pojavljajo pa se tudi nekatere *cis* izomere. Izomerizacijo in oksidacijo pospešujejo kisik, kovine, toplota, svetloba in kisline (Rodriguez-Amaya, 2001), odražata pa se v spremembah absorpcijskih spektrov v vidnem območju med 300 in 550 nm.

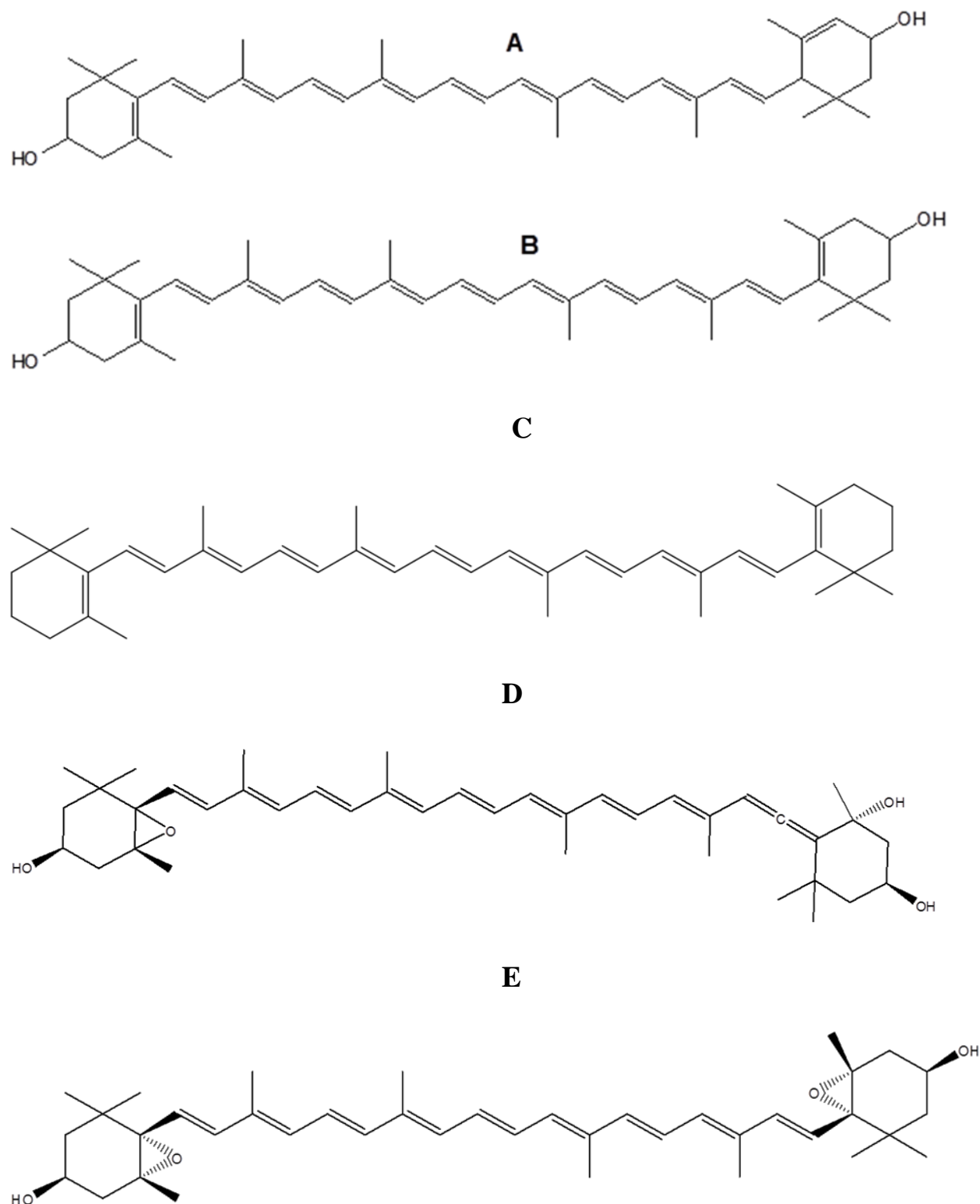


Slika 1: Izoprenska enota.

Figure 1: Isoprenic unit.

Strukturno karotene delimo na dve skupini:

- o ksantofile, derivate karotenov, ki vsebujejo kisik (lutein, zeaksantin, neoksantin, violaksantin).
- o karotene, ki so čisti ogljikovodiki (β -karoten, α -karoten, likopen) (Slika 2).



Slika 2: Strukturne formule all-*trans*-luteina (A) in all-*trans*-zeaksantina (B), β -karotena (C), neoksantina (D) in violaksantina (E).

Figure 2: Structural formulas of all-*trans* zeaxanthin (B), β -carotene (C), neoxanthin (D) in violaxanthin (E).

2.3 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI LUTEINA IN ZEAKSANTINA

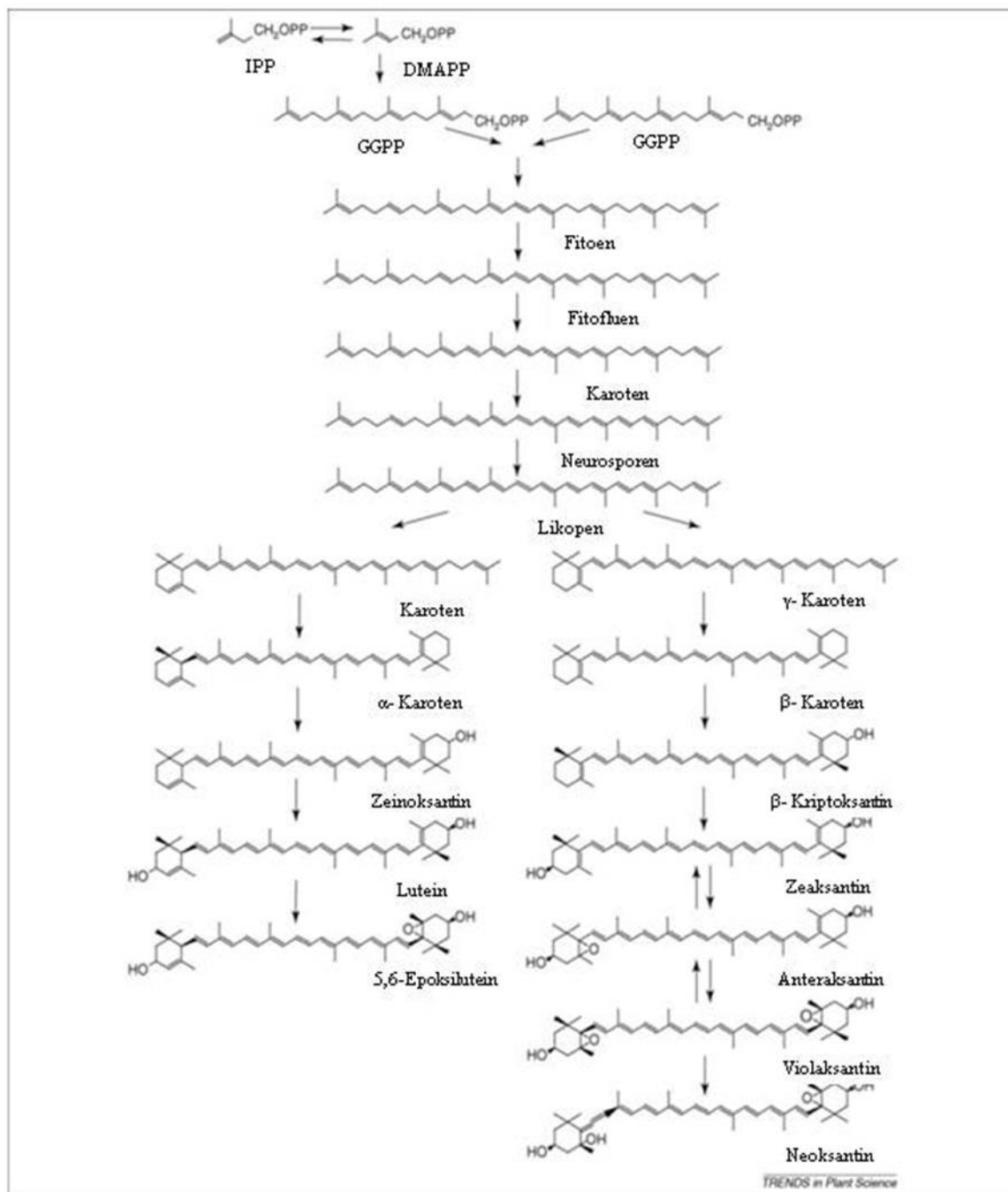
Beseda lutein izvira iz latinske besede »luteus« in pomeni rumen. Njegova molekulska formula je $C_{40}H_{56}O_2$, molska masa 568,871 g/mol. Predpisi Evropske unije z oznako E161 b dovoljujejo uporabo luteina kot barvila za živila.

Zeaksantin, strukturni izomer luteina, je začetek imena dobil po strokovnem poimenovanju za koruzo. Zea in grška beseda »xanthos«, ki pomeni rumeno. Predpisi evropske unije z oznako E161 h dovoljujejo uporabo zeaksantina kot barvila za živila.

V zelenih delih rastlin sta lutein in zeaksantin ponavadi nevezana, v plodovih in cvetovih pa zaestrena z nasičenimi višjimi maščobnimi kislinami (Britton, 1995), kot so lavrinska, miristinska, palmitinska in stearinska (Kayser, 1975). Zaradi vezave različnih kislin je njihova detekcija s HPLC dokaj otežena. V izogib temu je za določanje vsebnosti luteina in zeaksantina potrebno vzorec pred detekcijo umiliti v alkalnem mediju. Pri tem se prekine estrska vez in vsebnost ksantofilov določa v prosti obliki. To precej olajša njuno vrednotenje. Pri tem so zelo pomembni pogoji saponifikacije: koncentracija baze, temperatura in čas.

2.4 BIOSINTEZA LUTEINA IN ZEAKSANTINA

Biosinteza najbolj pomembnih karotenoidov je že dokaj dobro proučena in je prikazana na Sliki 3. Poteka v stromi (matriks kloroplasta), in sicer po poti izoprenoidov. Začne se z mevalonom, ki se pretvori v izopentenil pirofosfat (C5). S kondenzacijo petih molekul izopentenil pirofosfata nastane geranilgeranil pirofosfat (C20). Sledi kondenzacija dveh molekul geranilgeranil pirofosfata v fitoen (C40) in desaturacija do likopena. Iz likopena lahko s ciklizacijo nastaneta α in β -karoten, ki se s hidroksilacijo pretvorita v zeaksantin oz. lutein in naprej z epoksidacijo v violaksantin oz. neoksantin (Bartley in Scolnik, 1995).



Slika 3: Predhodniki spojin in glavni karoteni in ksantofili v biosintezi karotenoidov v rastlinah. Kratice: DMAPP – dimetilalil pirofosfat; GGPP - geranilgeranil pirofosfat; IPP - izopentenil pirofosfat (Kopsell in Kopsell, 2006).

Figure 3: Precursor compounds and major carotenes and xanthophylls in the carotenoid biosynthetic pathway in plants. Abbreviations: DMAPP - dimethylallyl pyrophosphate; GGPP - geranylgeranyl pyrophosphate; IPP - isopentenyl pyrophosphate (Kopsell and Kopsell, 2006).

2.5 KAROTENOIDI V RASTLINAH

2.5.1 Funkcija karotenoidov v rastlinah

Karotenoidi se sintetizirajo in skladiščijo v fotosintetskem aparatu višjih rastlin, kjer so vključeni v žetvenih kompleksih. V kloroplastih imajo ksantofili pomembno vlogo pri fotosintezi zaradi sposobnosti absorpcije svetlobe v valovnem območju od 400 do 500 nm in zaradi možnosti prenesti jo na klorofile. S tem razširjajo spektralni obseg, kjer poteka fotosinteza. Karotenoid, ki absorbira svetlobno energijo, preide v kratkotrajno vzbujeno singletno stanje. Nekaj energije odda in preide na nižji energetske nivo. Tak karotenoid, na nižnjem energetske nivoju, je ključen za prenos energije na klorofil, ki preide na vzbujeno singleto stanje. Vzbujeni klorofil lahko sodeluje v fotokemičnih reakcijah ali pa odda energijo v obliki fluorescence ali toplote in se vrne v osnovno stanje (Šircelj, 2008; Demmig-Adams in Adams, 1996).

Za rastline je antioksidativna funkcija karotenoidov in sposobnost oddvajanja odvečne svetlobe iz fotosinteznega aparata izredno pomembna. Če v fotosintezni aparat preide več svetlobe, kot jo lahko porabi za fotosintezo, ta v prisotnosti kisika tvori singletni kisik in škodljive radikale. Karotenoidi odvečno energijo odstranijo kot toploto in tako preprečijo nastanek škodljivih fotoproduktov.

2.5.1.1 Porazdelitev karotenoidov v rastlinah

V rastlinskih celicah se karotenoidi nahajajo v membranah kloroplastov, predvsem v listih in v vseh ostalih zelenih delih rastlin, vendar je njihova barva zamaskirana z zeleno barvo klorofilov. Večinoma so prisotni enaki karotenoidi v podobnih razmerjih. Luteina je okoli 45 %, β -karotena od 25 % do 30 %, violaksantina približno 15 % in neoksantina okoli 15 %. Po navadi so prisotni še zeaksantin, α -karoten, anteraksantin in lutein-5,6-epoksid (Britton in Khachik, 2009). Nahajajo se tudi v stromi kromoplastov v rumeno, oranžno in rdeče obarvanih tkivih, kjer služijo predvsem za privabljanje opraševalcev in raznašalcev semen. Karotenoidi so

lahko prisotni v visokih koncentracijah, vendar jih po barvi kaj lahko zamenjamo z antociani, betalaini ali kinoni.

2.5.1.2 Lutein in zeaksantin v rastlinah

Največ luteina se nahaja v zelenjavi, kot sta špinača in ohrovt, kjer je dokaj malo zeaksatina (Perry in sod., 2009; O'Connell in sod., 2007). Razlog za nižjo koncentracijo zeaksantina, kljub temu da nastane iz β -karotena, ki je v rastlinah koncentracijsko močan predstavnik karotenoidov, je zaradi njegove lahke transformacije v anteraksantin in violaksantin (Rodriguez-Amaya, 2001), preko tako imenovanega ksantofilnega cikla, s katerim se odvaja odvečna energija iz fotosinteznega aparata. Po do sedaj znanih podatkih je največ luteina v žametnicah (*Tagetes sp.*), zeaksantina pa v goji jagodah (*Lycium barbarum*) in volčjem jabolku (*Physalis alkekengi*) (Weller in Breithaupt, 2003). Za razliko od goji jagod, žametnice in volčje jabolko nista direktno prisotni v prehrani človeka, ampak služita kot vir za pridobivanje luteina in zeaksantina. Med drugim se žametnice industrijsko uporablja v prehrani kokoši, zaradi česar je lutein preko jajc in mesa neposredno zastopan v prehrani človeka.

Špinača se pogosto uporablja za pridobivanje violaksantina in neoksantina, največkrat s pomočjo tankoplastne kromatografije (TLC), ker njuna standarda nista dostopna na tržišču (Inbaraj in sod., 2006; Gandul-Rojas in sod., 1999).

2.5.2 Vnos luteina in zeaksantina v organizem

Prehod ksantofilov iz rastlinskega materiala v organizem je zelo odvisen od kompleksnosti vzorca in interakcij z drugimi spojinami. Znano je, da se z milejšo obdelavo hrane, npr. temperaturnim segrevanjem in mehansko homogenizacijo (pasiranje, rezanje) razbijejo celične stene in tako olajša sprostitev karotenoidov iz intracelularnih organelov celic. Prekinejo se vezi med karotenoidom in proteini ter inaktivirajo oksidirajoči encimi, ki povzročajo razgradnjo karotenoidov (Deming in Erdman, 1999).

Nekateri raziskovalci zagovarjajo stališče, da je lutein organizmu bolj dostopen iz rastlinskega materiala, kjer ga je več, drugi, da je njegova biorazpoložljivost boljša iz jaje in špinače kot iz prehranskih dopolnil (Chung in sod., 2004). S hitrejšim načinom življenja in večjim zavedanjem o vplivih karotenoidov, se implicirano znanje kaže na prehranskih dopolnilih, kjer je pričakovati veliko biorazpoložljivost karotenoidov iz prehranskih dopolnil, saj je določen karotenoid ponavadi raztopljen v olju za lažji vnos v organizem (Mortensen, 2009).

2.5.2.1 Špinača

Špinača (*Spinacia oleracea* L.) (Slika 4) spada v družino ščirovk (*Amaranthaceae*), prihaja iz zahodne Azije in je vsesplošno razširjena po svetu, kot ena najbolj uporabnih rastlin v prehranski industriji. Vsebuje vitamine A, C (Toledo in sod., 2003), vitamin B (Zhang in sod., 2005), balastne snovi, kalij, baker, cink, kalcij, mangan, magnezij, železo, natrij, fosfor, beljakovine, nitrate (Gupta in Wagle, 1988).



Slika 4: Špinača (*Spinacia oleracea* L.).

Figure 4: Spinach (*Spinacia oleracea* L.).

2.5.2.2 Čemaž

Čemaž ali divji česen (*Allium ursinum* L.) (Slika 5) spada v družino lukovk (*Alliaceae*) in je trajnica z zdravilnimi učinki. Čemaž ima podobne lastnosti kot česen, uporablja se predvsem v ljudski medicini, ker ureja prebavo, odvaja odvečno vodo iz telesa, čisti kri, kožo in dihala, preprečuje nastajanje krvnih strdkov, niža in ureja krvni pritisk, znižuje nivo holesterola, pospešuje celjenje kože, je naravni antibiotik in antimikot (Toman in Toman Turuk, 2013). Do sedaj v nobenem viru ni bilo zaslediti povezave čemaža z luteinom in zeaksantinom.



Slika 5: Čemaž (*Allium ursinum* L.).

Figure 5: Wild garlic (*Allium ursinum* L.).

2.5.2.3 Ohrovt

Ohrovt (Slika 6) spada v družino kapusnic (*Brassicaceae*). Poznamo tri različne tipe ohrovta: brstični, listni, glavni. Ohrovt vsebuje veliko vitamina C, E, B6 in K, veliko folne kisline ter minerale, kot so kalij, kalcij in železo.



Slika 6: Ozkolistni ohrovt (*Brassica oleracea acephala* var. *sabellica*)

Figure 6: Scotch kale (*Brassica oleracea acephala* var. *sabellica*)

2.5.2.4 Žametnice

Žametnice so okrasne rastline, ki prihajajo iz Mehike in pripadajo družini nebinovk (*Asteraceae*). Mednje spadajo *Tagetes patula* in *Tagetes erecta*. V žametnicah se lutein nahaja v cvetnih listih in čaši. Po sedaj znanih podatkih, so te okrasne rastline najbogatejši vir luteina (Tsao in sod., 2004) in sicer ga vsebujejo 90 % od vseh prisotnih karotenoidov v rastlini in sicer naj bi *Tagetes patula* vsebovala 132 mg luteina/100 g, *Tagetes erecta* pa 68 mg luteina/100 g (Piccaglia in sod., 1998). Večina luteina v cvetovih žametnic je v zaestreni obliki (80-100 %), z miristinsko, lavrinsko, palmitinsko ali stearinsko kislino (Piccaglia in sod., 1998). Za kvantitativno določanje je zaradi zaestrenosti z višjimi maščobnimi kisljinami, potrebno vzorec pred analizo alkalno umiliti (saponificirati). Poleg pridobivanja luteina iz žametnic, se le te uporabljajo tudi kot dodatek krmi kokošim, s čimer se poveča količina luteina in se kaže v bolj rumenem obarvanju piščančje kože, mesa in jajc.

2.5.2.5 Navadno volčje jabolko

Navadno volčje jabolko (Slika 7) je okrasna rastlina, katero v azijskih državah poznajo po diuretičnih in antiseptičnih lastnostih. Po do sedaj znanih podatkih poleg goji jagod (*Lycium barbarum*), ki vsebujejo 82,4 mg zeaksantina/100 g, vsebuje najvišjo koncentracijo zeaksantina in sicer se v ovoju volčjega jabolka nahaja 54,89 mg zeaksantina/100 g in 6,39 mg zeaksantina/100 g v plodu volčjega jabolka, ki je zaestren z višjimi maščobnimi kislinami, predvsem s palmitinsko (Weller in Breithaupt 2003).



Slika 7: Navadno volčje jabolko (*Physalis alkekengi*).

Figure 7: Chinese lantern (*Physalis alkekengi*).

2.6 VPLIV LUTEINA IN ZEAKSANTINA NA ORGANIZEM

2.6.1 Absorpcija in transport luteina in zeaksantina

Karotenoidi se sprostijo iz matriksa hrane z žvečenjem in v želodcu s pomočjo želodčne kisline in prebavnih encimov v lipidno fazo. S pomočjo encimov trebušne slinavke in prisotnosti žolčnih soli se v tankem črevesju tvorijo miceli, temu sledi absorpcija preko enterocitov in nalaganje na lipoproteine (Krinsky in sod., 1958; Loane in sod., 2008) ter transport do Golgijevega aparata, kjer nastanejo ciklomikroni. Vključena v ciklomikrone se lutein in zeaksantin po limfnem sistemu prenašata po telesu (Canene-Adams in Erdman, 2009). Ker sta lutein in zeaksantin topna v maščobah, lahko njuno absorpcijo povečamo z vnosom olja in

drugih maščob. Slaba stran tega je, da s preprečevanjem transporta holesterola po organizmu, posledično preprečujemo tudi pot karotenoidov (During in sod., 2005).

2.6.2 Nahajanje luteina in zeaksantina v organizmu

Nekateri karotenoidi so del vsakodnevne prehrane človeka in ščitijo njegovo zdravje (Stahl in Sies, 2005). Od velike skupine karotenoidov, jih je po do sedaj znanih podatkih le 50 v naši prehrani in od tega le 25 dokazanih v človeškem organizmu (Khachik in sod., 1995). Najpogosteje zastopani so lutein, zeaksantin, likopen, α -karoten, β -karoten in β -criptoksantin (Karpia in sod., 2008). Zaradi hidrofobne narave se lutein in zeaksantin nahajata v lipidnem delu membrane ali pa tvorita komplekse s specifičnimi proteini, ki so običajno povezani z membrano.

Obe spojini sta v nižjih koncentracijah tako v človeški krvi, kot v različnih človeških tkivih, v jetrih, trebušni slinavki (Sechrist in sod., 2002), maščobnem tkivu, nadledvični žlezi, prostati, ledvicah, pljučih, možganih in koži (Deming in Erdman, 1999). V jetrih, nadledvični žlezi in reproduktivnih organih, naj bi bilo do desetkrat več karotenoidov kot v ostalih organih (Canene-Adams in Erdman, 2009). Povišana koncentracija karotenoidov se ponavadi pokaže že po 24 do 48 urah po zaužitju hrane (Canene-Adams in Erdman, 2009). Po drugi strani nezadostno uživanje luteina in zeaksantina privede do relativno hitrega padca njunih koncentracij v vseh delih človeškega organizma z izjemo oči, kjer naj bi se vzdrževala približno konstantna koncentracija, kar potrjuje njuno pomembnost za ta organ. Raziskave o delovanju luteina in zeaksantina v človeškem organizmu se intenzivno nadaljujejo.

2.6.3 Bolezni povezane z delovanjem luteina in zeaksantina

2.6.3.1 Lutein in zeaksantin v očesu

Starostna degeneracija rumene pege je v razvitem svetu najpogostejši vzrok za slepoto (Wegner in Khoramnia, 2011). Verjetnost, da zbolimo, se z leti povečuje. Zaradi vse daljše povprečne življenjske dobe je prizadetih čedalje več ljudi. Lutein in zeaksantin se v očesu nahajata predvsem na mrežnici in v rumeni pegi (Khachik in sod., 2002; Alves-Rodrigues in Shao, 2004), poleg tega še v leči, roženici in ciliarniku, kjer varujeta oko pred foto poškodbami (Eye Disease Case Control Study Group, 1993).

V rumeni pegi (*macula lutea*), ki je mesto najostrejšega vida, je koncentracija luteina in zeaksantina najvišja v organizmu. Optični sistem očesa zbere žarke v rumeni pegi, ki je v premeru velika le 0,5 mm, poškodbe so za ostrino vida lahko usodne. Za čim boljši vid in absorpcijo svetlobe, je mrežnica razmeroma gladka plast (vendar ukrivljena) in vsebuje na svetlobo občutljive čepke in paličice ter pridružene nevrone. Rumena pega je vdolbina v mrežnici nasproti leče in vsebuje številne čepke. Pri človeku omogoča barvni vid in ostrino vida (npr. za branje, pisanje, prepoznavanje obrazov). Lutein in zeaksantin sta potrebna za brezhibno delovanje očesa ter za preprečevanje poškodb rumene pege in mrežnice.

Vpliv luteina in zeaksantina se ne kaže samo v preprečevanju degeneracije rumene pege ampak tudi v preprečevanju nastanka sive mreže (Olmedilla in sod., 2003). Roženica in leča učinkovito absorbirata večino UV svetlobe, ki je kriva za nastanek prostih radikalov v leči, kateri povzročajo poškodbe proteinov, kar s časoma vodi do nastanka sive mreže. Skoraj 60 % modre svetlobe absorbirajo pigmenti v mrežnici, ki delujejo preventivno kot filtri, ki preprečujejo prekomerni količini modre svetlobe do fotoreceptorjev, ter kot antioksidanti oziroma lovilci prostih radikalov. Modra svetloba nima tako negativnega učinka na molekule kot UV svetloba, vendar spodbuja nastanek singletnega kisika, ki škodljivo deluje na molekule, posebej na nenasičene maščobne kisline, ki se nahajajo v fotoreceptorjih.

Molekule zeaksantina se v mrežnici presenetljivo pojavljajo kot mezo-izomer (3R, 3'R), katerega v telo vnesemo kot (3R, 3'S) izomer, ki ni prisoten v hrani (Bone in sod., 1993). V nekaterih delih mrežnice je višja koncentracija luteina in manjša koncentracija (3R, 3'S) zeaksantina in obratno, iz česar se predpostavlja, da (3R, 3'S) oblika zeaksantina nastane iz luteina z izomerizacijo (Bone in sod., 1997) ali pa iz zeaksantina z izomerizacijo ali oksidacijo, kot oksidativni metabolit (Khachik in sod., 1999).

2.6.3.2 Rakava obolenja

Tumor (beseda izhaja iz latinščine, kar pomeni oteklino oz. zadebelitev) označuje katerokoli nenormalno maso tkiva, ki je lahko maligno (rakotvorno) ali benigno (nerakotvorno). Literatura (Ren in Zhang, 2008) navaja, da imajo karotenoidi zmožnost inhibiranja proliferacije tumorskih celic, zmanjšajo možnosti nastanka in napredovanje raka pljuč, prsi, prostate, črevesja, glave, materničnega vratu in jajčnikov (Rock, 2009). Karotenoidi imajo sposobnost inducirati komunikacijo med celicami s pomočjo medceličnih kanalčkov, ki naj bi bili ključni v preprečevanju raka. (Khachik in sod., 1999).

Vendar pa je pomembno zavedanje, da je interpretacija rezultatov študij, ki opredelijo povezave med rakom in zaužitjem karotenoidov lahko zavajajoča. Večina karotenoidov v prehrani prispevata zelenjava in sadja. Ta živila so kompleksna in poleg karotenoidov vsebujejo številne sestavine, ki so prav tako biološko aktivne. Posamezniki z večjim deležem sadja in zelenjave v prehranskih navadah, imajo posledično tudi višje koncentracije karotenoidov v plazmi, Le ti pa ponavadi kažejo tudi druga pozitivna zdravstvena vedenja, kot npr omejeno uživanje alkohola, ne kadijo, in imajo povečano fizično aktivnost (Brady in sod., 1996).

2.6.3.3 Koronarne srčne bolezni

Najbolj znana koronarna bolezen ožilja je ateroskleroza, ki jo pospešujejo številni dejavniki, npr. dednost, sladkorna bolezen, kajenje in previsoka telesna teža. Karotenoidi s svojo sposobnostjo ujetja prostih radikalov in singletnega kisika preprečujejo oksidacijo LDL in tako svojemu glavnemu prenašalcu po telesu preprečujejo oksidacijo in posledično njegovo nalaganje v stenah žil (Johnson in Krinsky, 2009).

Potrebno je dodati, da lutein in zeaksantin do sedaj nista bila deklarirana kot esencialna nutrienta in tako ni določene priporočljive dnevne doze. Prav tako je potrebno dodati, da EFSA (European Food Safety Authority) na podlagi predloženih podatkov ugotavlja, da ni dokazov za vzpostavitev povezave med uživanjem luteina in vzdrževanjem normalnega vida (EFSA, 2012), kakor tudi ni ugotovljena povezava med uživanjem luteina v kombinaciji z zeaksantinom in ohranjanjem vida (EFSA, 2011). Prav tako ni ugotovljene povezave med uživanjem koencima

Q10 in zaščito pred oksidacijami DNK, beljakovin in lipidov (EFSA, 2010a) in ni podatkov, o povezavi med uživanjem alfa-lipoične kisline in zaščito lipidov pred oksidativnimi poškodbami (EFSA, 2010b).

2.7 ANTIOKSIDANTI

Antioksidanti, ki deluje v obrambnem mehanizmu, imajo svoj specifičen redoks potencial. Z leti se je klasična definicija, ki je bila podana z razmerjem med reducirano in oksidirano obliko določenega redoks para, dopolnila in se prilagodila tudi redoks potencialu okolja v celici.

2.7.1 Oksidativni stres

Definiran je kot porušeno ravnotežje med antioksidanti in oksidanti v prid slednjih (Sies, 1991). Do oksidativnega stresa v bioloških sistemih pride, če je sistem dlje časa izpostavljen oksidantom ali če je prišlo do zmanjšanja antioksidativne sposobnosti organizma. Proti učinkom oksidativnega stresa se organizem bori z obrambnim mehanizmom imenovanim antioksidativna mreža, v katerega so vključeni antioksidanti, ki jih organizem sintetizira sam oz. jih vnese v organizem s hrano. Če organizem ne uspe zaustaviti negativnega delovanja, pride do vnetij, kroničnih bolezni in hitrejšega staranja organizma. V primeru, da takšno stanje traja dalj časa in organizem ne najde ustrezne rešitve, pride do poškodb na DNA, beljakovinah in maščobah. Takšno stanje pa lahko vodi do še večjih poškodb, kot so mutagenost, karcinogenost, poškodbe membran, lipidne peroksidacije, oksidacije proteinov in njihove fragmentacije.

2.7.2 Delovanje antioksidantov

Antioksidante delimo na več načinov. Glede na vnos v telo jih delimo na endogene (glutation, CoQ₁₀, sečna kislina, lipojska kislina, melatonin) in eksogene (karotenoidi, vitamin E, vitamin C, itd.). Glede na delovanje jih delimo na encimske (superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza in glutation reduktaza) in neencimske (karotenoidi, askorbinska kislina, vitamin E

in CoQ₁₀). Glede na fizikalno-kemijske lastnosti jih delimo v vodotopne (askorbinska kislina), maščobotopne (karotenoidi, tokoferol, CoQ₁₀) in topne tako v vodi kot v maščobah (lipojska kislina in glutation). Glede na izvor lahko antioksidante delimo tudi na naravne antioksidante (karotenoidi, flavonoidi) in na sintetične antioksidante, v katere sodijo BHT (6-diterciarni butil-p-hidroksitoulen), TBHQ (2-terciarni butil-hidrokinon), BHA (3-terciarni butil-4-hidroksianizol) in PG (propilgalat). Naravni antioksidanti, kot so karotenoidi, fenolne komponente (flavonoidi, fenolne kisline, alkoholi, tokoferoli) in askorbinska kislina se pogosto nahajajo v rastlinah, sintetični antioksidanti so pogosto uporabni kot aditivi v hrani, saj zavirajo oksidacijo, so poceni in široko uporabni.

V boju s prostimi radikali organizem uporablja antioksidante z različnimi mehanizmi delovanja (Sies, 1993). V mrežo so vključeni trije mehanizmi, ki podpirajo antioksidativno zaščito: direktna zaščita, prekinjanje verižnih reakcij in popravljanje že storjenih poškodb.

Zaščitni mehanizem nastopi takoj, ko se v organizmu pojavijo reaktivni radikali in prva obrambna naloga antioksidativne mreže je zmanjševanje nastajanja vodikovega peroksida. To funkcijo prevzamejo encimi peroksidaze, sodelujejo pa tudi karotenoidi.

Prekinjanje mehanizma verižne oksidacije poteka, ko antioksidanti reagirajo s prostimi radikali in jih nevtralizirajo. Večina teh antioksidantov ima majhno molekulsko maso, nekateri so lipofilni (karotenoidi, vitamin E, CoQ₁₀), drugi hidrofilni (askorbinska kislina, bilirubin). Učinkovitost antioksidanta se kaže v tem, da se lahko nevtralizira v reakcijah z drugimi prostimi radikali in jih spremeni v stabilen produkt ali pa tudi sam reagira z lipidi in sproži novo radikalsko verižno reakcijo. Tu pride do izraza pomen antioksidativne mreže, po kateri se antioksidanti regenerirajo v njihovo reducirano stanje. Antioksidativna učinkovitost je odvisna od njihove koncentracije, aktivnosti in okolja, v katerem se nahajajo.

Tretja obrambna linija je odstranjevanje poškodovanih molekul med oksidativnim napadom in zamenjavo poškodovanih struktur z novimi. Vloga in mesto posameznega antioksidanta v mreži sta odvisni od njegovega potenciala (Buettner in Jurkiewicz, 1996).

Čim večji negativni redukcijski potencial ima spojina, tem lažje bo oddala elektrone spojini z manj negativnim ali pozitivnim redukcijskim potencialom in se pri tem sama oksidirala. Čeprav je redukcijski potencial odločilni dejavnik pri tem, kako bo neka spojina učinkovala kot

antioksidant, se je pokazalo, da k celotni učinkovitosti prispevajo tudi druge fizikalno-kemijske značilnosti. Hidrofilnost oz. lipofilnost sta pomembni lastnosti antioksidantov, saj je od njiju odvisno, ali bo ta lahko prišel do mesta delovanja oz., kako dobro se bo absorbiral v organizmu.

2.7.2.1 Lipojska kislina

Lipojska kislina je univerzalni antioksidant, saj je zaradi svoje kemijske strukture sposobna delovati tako v oksidirani obliki, kot v reducirani, vodnem in v maščobnem mediju (Kagan in sod., 1992; Islam, 2009). Je močno reducirajuča komponenta, ki ima sposobnost povrniti številne antioksidante nazaj v aktivno obliko. Neposredno regenerira CoQ10, glutation in askorbinsko kislino (Packer in sod., 1995; Biewenga in sod., 1997).

2.7.2.2 CoQ10

CoQ10 je kemijsko spojina sestavljena iz dveh delov, iz polarnega dela molekule (kinolni obroč) in nepolarnega dela molekule (izoprenske enote). Glede na število izoprenskih enot ločimo koencime od Q1 do Q12. Pri človeku in nekaterih drugih sesalcih se nahaja kinon z desetimi izoprenskimi enotami (Lester in Crane, 1959). Organizem si pri normalnem delovanju sam zagotovi zadostno količino potrebnega CoQ10, vendar so raziskave pokazale, da lahko kot posledica bolezni, uživanja nekaterih zdravil predvsem statinov (Littarru in Langsjoen, 2007), nepravilne prehrane in staranja (Kalen in sod., 1989) pride do zmanjšanja koncentracij.

2.7.3 Antioksidativna mreža

Živa bitja so v bitki za svoj obstanek izdelala obrambni mehanizem v obliki kompleksnega sistema, ki ga je Packer s Colmanom prvi v knjigi *The Antioxidant Miracle* (1999) poimenoval »antioksidativna mreža«. Njegovo mnenje je, da noben antioksidant ne deluje sam, ampak je vključen v mrežo vseh prisotnih antioksidantov in da ta mreža varuje organizem pred bolezenskimi stanji in upočasnjuje staranje. To mrežo sestavlja veliko različnih substanc, od

enostavnih molekul do makromolekul, ki v medsebojno koordiniranem delovanju varujejo organizem. Skupino LMWA sestavlja ogromno število antioksidantov, ki so sposobni preprečiti oksidativno poškodbo z direktno ali indirektno reakcijo z reaktivnimi kisikovimi spojinami (ROS). Številni nizkomolekularni antioksidanti lahko v organizem vstopijo s hrano, npr. karotenoidi, nekatere LMWA molekule se sintetizirajo v celici (glutation). Istočasna uporaba različnih antioksidantov je nujna, ker molekule na nek način pomagajo ena drugi, delujejo selektivno in pa tudi zato, ker nekatere bistveno lažje prodrejo v določene dele telesa kot druge molekule.

2.7.4 Karotenoidi kot antioksidanti

Karotenoidi so pomembni, ker so sposobni dezaktivirati singletni kisik in vezati peroksi radikale. Razumevanje delovanja karotenoidov je pomembno zaradi njihove sposobnosti inaktivacije singletnega kisika $^1\text{O}_2$ na fizikalni način. Pri tem se energija vzbujenega kisika prenese na molekulo karotenoida, pri čemer se molekula kisika vrne v stabilno osnovno energetska stanje. Energija vzbujenega kisika prenešana na molekulo karotenoida se razprši skozi rotacijo in vibracijske interakcije med vzbujenim karotenoidom in okoljem, da se ponovno vzpostavi osnovno stanje karotenoida in sprosti se energija (Stahl in Sies, 1999). V fizikalnem procesu inaktivacije singletnega kisika molekula karotenoida deluje kot katalizator in v procesu ne razpade, pač pa lahko po vzpostavitvi osnovnega stanja ponovno vstopi v proces inaktivacije singletnega kisika. Pri tem lahko pride do izomerizacije zaradi nižjega osnovnega stanja izomerne oblike. Karotenoidna inaktivacija singletnega kisika je vseskozi nadzorovana s konstantnim difuznim prehajanjem novih karotenoidov. Sposobnost inaktivacije singletnega kisika je pri karotenoidih povezana s konjugiranim sistemom dvojnih vezi. Daljši kot je, večja zmožljivost pripada določenemu karotenoidu (Stahl in Sies, 1999).

Karotenoidi so sposobni inhibirati reakcijo nastanka prostih radikalov pri nizkih koncentracijah in nizkem parcialnem tlaku kisika. Tako naj bi preprečevali maščobno peroksidacijo membran. Če je pri reakciji prisoten kisik, lahko pride do njihove avtooksidacije (Tapiero in sod., 2004).

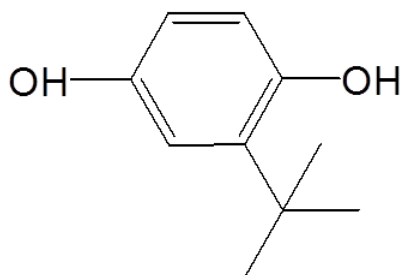
2.7.5 Delovanje z drugimi antioksidanti

Zaščita karotenoidov pred oksidativnim razpadom je možna v prisotnosti drugih antioksidantov v sistemu. Zmanjšanje degradacije ksantofilov v prisotnosti antioksidantov nizkih molskih mas, kot sta α -tokoferol in vitamin C, je bilo pokazano v liposomih in ARPE-19 celicah (Wrona in sod., 2003). Karotenoidni kationski radikal je lahko reduciran in tako ponovno recikliran za opravljanje svojih funkcij s pomočjo α -tokoferolov, askorbatov ali melaninov (Edge in sod., 2000). Tudi karotenoidi med seboj delujejo sinergistično. Likopen je sposoben reducirati radikalske katione luteina in zeaksantina (Edge in sod., 1998). To potrjujejo tudi študije na pacientih s starostnimi poškodbami oči, ki se jim zmanjša koncentracija likopena v plazmi, ne pa tudi luteina ali zeaksantina (Cardinault in sod., 2005).

2.7.6 Razpad luteina in zeaksantina

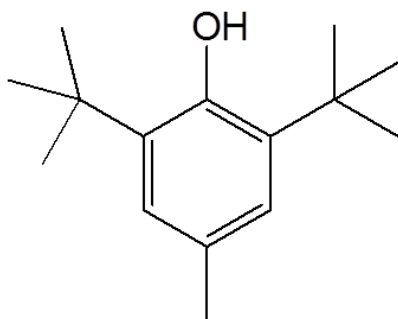
Lutein je zelo občutljiv na svetlobo in zrak, zato je potrebna posebna skrb pri pripravi in analizi vzorca. Karotenoidi so podvrženi izomerizaciji, včasih pa tudi strukturnim modifikacijam, razgradnji zaradi toplote, sončne ali UV svetlobe, kislin ali encimov (Britton, 2008).

Lutein in zeaksantin sta spojinoma večinoma stabilni v alkalnih pogojih, problem je le pri karotenoidnih aldehydih, kjer ob prisotnosti acetona pride do nastanka arktefaktov (Britton, 2008). Zaradi problema razgradnje karotenoidov ob prisotnosti kisika je dostikrat pri analizi karotenoidov potrebno dodati antioksidant ali delati v toku dušika, ki preprečuje razpad analita. Največkrat se zato uporablja sintetični antioksidant BHT (Slika 8) (Britton, 2008; Oliver in Palou, 2000). Poleg BHT-ja se uporabljajo še pirogalol ali askorbil palmitat (Schiedt in Liaaen-Jensen, 1995). TBHQ (Slika 9) se pogosto uporablja za zaščito maščob in olj (Hao in sod., 2007), medtem ko ga je Orset in sod. (1999) uporabil za stabilizacijo β -karotena pri sušenju z razprševanjem (spray-drying), Nuutila in sod. (2002) pa za stabilizacijo flavonoidov pri ekstrakciji iz čebule.



Slika 8: *tert*-butilhidrokinon (TBHQ).

Figure 8: *tert*-butylhydroquinone (TBHQ).



Slika 9: 3,5-di-*tert*-butil-4-hidroksitoluen (BHT).

Figure 9: 3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluene (BHT).

2.8 KEMIJSKE ANALIZNE TEHNIKE

2.8.1 Ekstrakcija

Ekstrakcija tekoče-tekoče temelji predvsem na razliki v topnosti spojine v dveh topilih, ki se med seboj ne smeta mešati. Pri ekstrakciji trdno-tekoče pa preide spojina iz trdne zmesi v tekočo fazo s pomočjo topila. Po končani ekstrakciji se mora topilo, v katerega se analit ekstrahira, enostavno odstraniti iz vzorca. Ekstrakcijo se lahko ponavlja večkrat s svežim topilom. Pri ekstrakciji luteina in zeaksantina iz vzorcev se najpogosteje uporabljajo topila etanol (Prommuak in sod. 2008.), aceton (Liu in sod., 2007), tetrahidrofuran (Lefsrud in sod., 2007), metanol–THF (1:1(v/v)) (Hart in Scott, 1995).

2.8.2 Kromatografija

Leta 1906 je ruski botanik M. Cvet razvil metodo za določevanje rastlinskih barvil z uporabo kolon napoljenih s kalcijevim karbonatom (CaCO_3). S spiranjem vsebine kolone z organskim topilom je ob dodatku rastlinskega ekstrakta ločil več barvnih pasov. Od tod izvira tudi ime analizne tehnike »kromatografija« (barva, zapis). Danes kromatografija predstavlja najbolj razširjeno analizno tehniko, s katero se zmes spojin v vzorcu loči na posamezne komponente. Glede na obliko stacionarne in mobilne faze razlikujemo več kromatografskih tehnik.

Najpomembnejši parametri za karakterizacijo neke kromatografske tehnike so: učinkovitost, selektivnost in resolucija med izbranimi komponentami. Učinkovitost je odvisna od dimenzije kolone, hitrosti pretoka, velikosti delcev itd. Selektivnost izhaja iz fizikalno kemijskih lastnosti komponent v vzorcu ter mobilne in stacionarne faze. Za doseganje dobre selektivnosti moramo dobro poznati kemijske pojave. Za definicijo selektivnosti in učinkovitosti nekega kromatografskega sistema zadostuje samo ena komponenta, medtem ko pri resoluciji vedno govorimo o ločbi med dvema izbranimi komponentama. Resolucija je praktičen dokaz učinkovitosti in selektivnosti kromatografskega sistema. V praksi se srečamo še s parametrom, ki ga imenujemo kapaciteta kolone. Ta faktor je v tesni povezavi z ostalimi faktorji. Pomeni količino vzorca, ki ga lahko naenkrat vnesemo v kolono ali na ploščo, da ločba lahko poteče. Pri praktičnem delu moramo zelo paziti, ker učinkovitost kolone s povečevanjem koncentracije vzorca hitro pada.

2.8.2.1 Tankoplastna kromatografija (TLC)

Tankoplastno tekočinsko kromatografijo (Thin Layer Chromatography) uvrščamo med planarne separacijske tehnike. Njena prednost je sočasna analiza različnih vzorcev in referenčnih standardov ter različni načini detekcije. Na stekleni plošči, aluminijasti ali plastični foliji, je nanešena tanka plast stacionarne faze. Vzorce nanašamo 1 do 2 cm od spodnjega roba plošče, ki jo nato postavimo v kromatografsko kad, ki ima dno pokrito s topilom za razvijanje. Ločene sestavine vzorca se na plošči, odvisno od količine posamezne spojine, pojavijo v obliki večjih ali manjših madežev. Za razliko od ostalih kromatografskih metod, kjer ločba poteka

zvezno od vnosa vzorca do detekcije, pri TLC ločimo posamezne faze, ki vsaka zase vpliva na končni rezultat.

Prvo pomembno opravilo je nanašanje vzorcev. Glede na tip kromatografije (preparativna, TLC, HPTLC) se na ploščo nanese ustrezna količina vzorca, kar običajno ustreza območju od 10 ng do nekaj mg. Strokovno najpomembnejše opravilo je razvijanje kromatogramov. Plošče se razvija v posebnih kromatografskih kadeh. Po končanem razvijanju ploščo vzamemo iz kadi in posušimo. Pri tem je potrebno paziti, da ne pride do razpada komponent. Končna faza TLC analize je vrednotenje razvitih plošč. Razvite kromatografske lise opazujemo v vidni ali UV svetlobi. Včasih je potrebno ločene substance derivatizirati s primernim reagentom v spojine, ki fluorescirajo ali selektivno absorbirajo svetlobo. Za kvalitativno in semikvalitativno določanje zadošča že vizualno ocenjevanje, medtem ko se kvantitativne podatke dobi z merjenjem z analognimi denzitometri ali digitalno kamero. Pri tem lahko merimo spremembe difuzno odbite svetlobe (remisija) oziroma difuzno prepuščene svetlobe (transmisija). V praksi največ uporabljamo HPTLC plošče, ki imajo manjše in bolj homogene delce sorbenta in tudi tanjšo plast, zato je separacija boljša, lise bolj ostre, meja detekcije pa nižja (Prošek in Pukl, 1991).

2.8.2.2 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Pri HPLC je mobilna faza tekoča, stacionarna faza pa napolnjena v koloni. Ločba je posledica različnih interakcij in porazdelitvenih koeficientov med stacionarno in tekočo fazo. Glede na te pojave razdelimo tekočinsko kromatografijo na več podskupin: normalno fazno, reverzno fazno, afinitetno, kiralno, ionsko in izključitveno kromatografijo. Danes večina ločb poteka na reverzno faznih sistemih, pri katerih je stacionarna faza nepolarna, medtem ko je mobilna faza polarna. Kot mobilna faza se uporablja v glavnem kombinacija vode, pufrov in organskih topil, predvsem metanola in acetonitrila. V principu se najprej eluirajo bolj polarne komponente. Ker je ločba odvisna od ionske moči, lahko na ločbo vplivamo tudi s spremembo temperature kolone in pH-jem mobilne faze.

Pri delu s HPLC komponente vzorca oziroma topljence raztopimo v primernem topilu in s pomočjo mobilne faze potiskamo skozi kolono. HPLC se je razvila iz kolonske kromatografije, pri čemer so pri kolonski kromatografiji uporabljene gravitacijske sile nadgradile črpalke, ki

dosegajo tudi do več barov nadtlaka. Najpomembnejši del sistema je kolona, kjer poteka ločba. Po končani ločbi komponente ovrednotimo s pomočjo detektorja. Danes imamo na razpolago vrsto detektorjev, ki za identifikacijo in kvantifikacijo uporabljajo različne fizikalno-kemijske lastnosti ločenih komponent. Največkrat so to UV/VIS, RI in fluorescenčni detektorji. V zadnjih nekaj letih so bili razviti novi tipi vmesnikov, ki omogočajo enostavne in učinkovite povezave med HPLC in masnim spektrometrom, kot sta na primer elektrosprej (ESI) in APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation). Rezultat kromatografske ločbe je kromatogram, na katerem so ločene spojine prikazane s kromatografskimi vrhovi.

Za kvalitativno in kvantitativno HPLC določevanje karotenoidov so bile razvite številne nove metode. Prevladujejo upraba RP HPLC metode še posebej po uvedbi C30 kolon (Sander in sod. 2000), ki omogoča boljše ločevanje geometrične in strukturne izomere v primerjavi s C18 kolonami.

2.8.2.3 Masna spektrometrija

S kombinacijo kromatografije, masne spektrometrije in računalništva je postala sodobna analizna kemija učinkovita tako na področju kvalitativne kot kvantitativne analize kemije. Pri sodobni masni spektrometriji je treba poskrbeti za pet glavnih sklopov. Ti so: vnos vzorca, ionizacija, separacija vzorca, detekcija in obdelava podatkov.

Pri kromatografiji uporabljamo masne spektrometre, kjer se nastali ioni ločijo s pomočjo magnetnega ali električnega polja na osnovi razmerja masa/naboj (m/z). Ločeni ioni se merijo s pomočjo fotopomnoževalk in se zapišejo v obliki masnega spektra. V smeri x je nanešena masa, v smeri y ionski tok in v smeri z zaporedni masni spekter. Pri kombinaciji s HPLC se zaradi velike količine mobilne faze uporabljata ionizacija z elektrorazprševanjem (ESI) in kemijska ionizacija pri atmosferskem tlaku (APCI). Izbira ionizacije je pogojena z izbiro mobilne faze in fizikalno-kemijskimi lastnostmi merjenih vzorcev. ESI zahteva polarno mobilno fazo in molekule z dipolnimi momenti (Bruins, 1991).

Pri APCI mobilno fazo z vzorcem vodimo skozi segreto kapilaro in jo razpršimo v obliki spreja z velikim pretokom dušika. Nastali aerosol vodimo mimo električno nabite igle z napetostjo v

KV, ki povzroči elektronski oblak in ionizira molekule dušika. Ionizirane molekule dušika nato ionizirajo molekule vzorca. Prednost APCI je v robustnosti in ionizaciji. Slabost tega ionizatorja je v tem, da zaradi visokih temperatur pogosteje nastanejo fragmentirani ioni, medtem ko z ESI, ki jo štejemo med mehke tehnike ionizacije, v glavnem dobimo molekulske ione (Zaikin in Halket, 2006).

Masni spektrometri imajo lahko tudi večje število masnih analizatorjev. V tem primeru govorimo o tandemski (MS/MS) spektrometriji. Kombinacija več zaporednih masnih analizatorjev je zelo pomembna pri identifikaciji posameznih molekul in selektivnosti meritve. Velikokrat se pod istim signalom skriva večje število popolnoma različnih ionov, ki imajo skoraj identično maso, zato ni mogoče samo z eno stopnjo ločbe ločiti iskane komponente. To bi lahko dosegli z masnimi spektrometri, ki merijo absolutne mase na 5 decimalk natančno, a so za vsakdanje delo predragi in prepočasni. Zato raje v prvi stopnji izberemo značilen molekulski vrh, ga osamimo in ga nato v drugi stopnji razbijemo na fragmente in te fragmente v tretji stopnji pomerimo. V večini primerov lahko z analizo tako nastalih fragmentov kvantitativno in kvalitativno določimo vsebnost analita v območju mg/kg (ppm) ali celo $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb). Večstopenjska fragmentacija je zelo primerna za analizo bioloških vzorcev, ker je zveza med koncentracijo in odzivom linearna na izredno širokem območjem.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 KEMIKALIJE

Etilacetat (99,5 %), n-propanol (99,5 %), n-heksan (99,8 %), natrijev klorid (99 %), 1-propanol, 37 % klorovodikovo kislina in BHT smo kupili od proizvajalca Merck (Darmstadt, Nemčija), aceton (99,5 %), etanol (99,8 %), TBHQ in trietilamonijev aceta (TEAA) so bili pridobljeni od Sigme-Aldrich (St. Louis, Missouri, ZDA), metanol (99,8 %) in acetonitril (99,9 %) od Mallinckrod Baker (Deventer, Nizozemska). Uporabljali smo tudi bi-destilirano vodo. Analizirali smo prehransko dopolnilo A in prehransko dopolnilo B, oba kupljena v lekarni v Ljubljani.

3.2 NAPRAVE

- mikro-dismembrator S (Sartorius, Göttingen, Nemčija) 1 min pri 1700 obratih,
- vorteksLab Dancer (IKA, Staufen, Nemčija) s konstantno hitrostjo 2800 obratov/min,
- centrifuga Centric 322 A (Tehtnica, Železniki, Slovenija) 4000 obratov/min,
- analitska tehtnica (Sartorius AG, Goettingen, Nemčija),
- rotavapor (R-114) s črpalko (V-700), vodno kopeljo (B-400) in kontrolno konzolo pritiska (V-850) (Büchi Labortechnik, Flaviil, Švica),
- ultrazvočna kopel Sonis 3 GT (Iskra Pio d.o.o., Šentjernej, Slovenija),
- liofilizator Micro Modulyo (IMA Edwards, Bologna, Italija),
- spektrofotometer Lambda 45 UV/VIS (Perkin-Elmer, Massachusetts, Amerika),
- apparatus Carousel 12 Plus (Radleys, Saffron Walden, Velika Britanija),
- avtomatske kadičke Automatic Developing Chamber 2 (ADC2) (Camag, Muttentz, Švica).

3.3 DOLOČANJE LUTEINA V VZORCIH ŠPINAČE

3.3.1 Določanje luteina v vzorcih špinače na zraku in v dušikovi atmosferi

Štirim različnim vzorcem špinače kupljenih na ljubljanski tržnici smo odstranili peclje in jih 24 ur liofilizirali pri $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Suhe liste smo zmleli s tekočim dušikom v Mikro-Dismembrator S. Vzorce špinače smo natehtali v paralelkah po 10 mg in dodali 10 mL etanola (A), etanola z 0,1 % TBHQ (B) oziroma etanola z 0,1 % BHT (C). Ekstrakcija luteina je potekala eno uro pri sobni temperaturi. Eksperiment smo naredili v Carouselu 12 Plus v steklenih epruveh zaščitenih pred svetlobo z alufolijo v zračni in dušikovi atmosferi s pomočjo magnetnih mešal. Po končani ekstrakciji smo vzorec centrifugirali 5 minut pri 4000 obratih/minuto. Zatehte standardov za pripravo osnovnih raztopin luteina so bile: 65 $\mu\text{g/mL}$ luteina v etanolu; 60 $\mu\text{g/mL}$ luteina v etanolu z 0,1 % TBHQ, in 57 $\mu\text{g/mL}$ luteina v etanolu z 0,1 % BHT. Rezultate smo preračunali na koncentracijo analiziranih osnovnih raztopin standardov, ki smo jim predhodno izmerili absorbanco s pomočjo spektrofotometra in za specifični absorpcijski koeficient luteina pri 445 nm uporabili 2550 dm^2/g (Craft in Soares, 1992). Raztopine so bile shranjene pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analize.

3.3.2 Določanje izkoristka pri ekstrakciji luteina iz špinače na zraku in v dušikovi atmosferi

Določanje izkoristka luteina je potekalo podobno kot v točki 3.3.1 Določanje luteina v vzorcih špinače na zraku in v dušikovi atmosferi, le da smo pri določanju izkoristka v vzorcu špinače dodali 1 mL standardne raztopine luteina s koncentracijo 0,5 $\mu\text{g/mL}$.

3.3.3 Vpliv različnih časov ekstrakcije na vsebnost luteina pri ekstrakciji liofilizirane špinače z 1M TEAA (pH 7) v acetonu

Vzorcem špinače, smo odstranili peclje in ga 24 ur liofilizirali pri $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Suhe liste smo zmleli s tekočim dušikom v Mikro-Dismembrator S, jih natehtali v paralelkah po 10 mg in dodali 10

mL acetona z 1M TEAA (pH 7). Ekstrakcijo smo izvajali 5, 10, 30, 45, 60 in 120 minut v Carouselu 12 Plus v steklenih epruvetah v dušikovi atmosferi s pomočjo magnetnih mešal. Po končani ekstrakciji smo vzorec centrifugirali 5 minut pri 3500 obratov/minuto. Natehta standardov za pripravo osnovne raztopine luteina je bila 1 mg/2 mL diklorometana. Osnovno raztopino luteina smo prenesli v 50 ml bučko ter dopolnili do oznake z etanolom (približno 20 µg/ml). Osnovno raztopino smo 10 krat redčili in ji pred injiciranjem v HPLC sistem izmerili absorbanco na spektrofotometru.

3.3.4 Določanje luteina v vzorcih špinače z dodatkom sintetičnih antioksidantov ekstrakcijskemu topilu acetonu z 1M TEAA (pH 7)

Priprava vzorcev do izvedbe ekstrakcije in priprava standardnih raztopin je potekala kot v prejšnjem poglavju. Pri ekstrakciji smo uporabili 10 mg vzorca špinače in dodali 10 mL acetona z 1 M TEAA (pH 7), acetona z 1 M TEAA (pH 7) in dodanim 0,1 % TBHQ ter acetona z 1 M TEAA (pH 7) in dodanim 0,1 % TBHQ. Ekstrakcija z vorteksiranjem v 50 ml plastičnih epruvetah je potekala 2 min v zračni atmosferi, medtem ko je 15 min ekstrakcija v Carouselu 12 Plus potekala v dušikovi atmosferi. Po končani ekstrakciji smo vzorec centrifugirali 5 minut pri 3500 obratih/minuto.

3.3.5 Izvedba HPLC analiz

HPLC-VIS analiza proučevanih spojin je potekala na HPLC sistemu Surveyor (Thermo Finnigan, ZDA) s termostatiranim avtomatskim vzorčevalnikom, kvarterno črpalko in detektorjem z nizom diod. Volumen uporabljene zanke je bil 100 µL. Separacija je potekala pri 25 °C na koloni iz nerjavečega jekla ProntoSIL C30 (250 x 4.6 mm, I.D. 5 µm; Bischoff Chromatography, Nemčija) s predkolono C18 (Phenomenex, ZDA). Karotenoide smo detektirali z UV detektorjem s pretočno celico 10 mm optične poti pri 450 nm valovne dolžine. Mobilna faza je bila aceton-voda, če ni drugače omenjeno.

Pri določanju analitov v ekstraktu špinače, ozkolistnega ohrovtu in čemaža smo uporabili gradientno elucijo iz acetona (topilo A) in vode (topilo B). Gradient: 0-25 min, 80 % - 95 % A;

25 - 30 min, 95 % A; 30 - 32 min, 95 % - 100 % A; 32 - 37 min, 100 % A, 37 - 40 min, 100 % - 80 % A, 40 - 42 min, 80 % A.

Za dokazovanje estrov smo uporabili gradientno izpiranje po naslednji shemi: 0 - 12 min, 100 % A; 12 - 15 min, 100 % - 20 % A; 15 - 28 min, 20 % A; 28 - 32 min, 20 % - 100 % A; 32 - 40 min, 100 % A, pri čemer je bila komponenta A mešanica topil acetona : destilirana voda (90:10, v/v), komponenta B pa etilacetat. Pretok je bil 1 mL/min, valovna dolžina detekcije 450 nm, volumen injiciranja pa 20 µL.

Pri določanju analitov v ekstraktu špinače pri uporabi acetona z 1 M TEAA (pH 7) smo uporabili izokratno elucijo iz acetona (topilo A) in 0,1 M trietilamonijev acetat 9:1 (v/v) (topilo B). Volumen injiciranja je bil 10 µL.

3.3.6 Izvedba TLC analiz

Pri TLC analizi smo uporabljali naslednje TLC naprave proizvajalca Camag (Muttenez, Švica): avtomatski nanašalec (Automatic TLC Sampler 4-ATS4) s 25-mL brizgo, polavtomatski nanašalec Linomat IV s 100-mL brizgo, denzitometer (TLC Scanner 3) ter sušilnik za lase. Prav tako je bila vertikalna kad za razvijanje plošč velikosti 20 cm x 10 cm od proizvajalca Camag.

Za TLC analizo smo uporabili Merck-ove steklene HPTLC CN_{F254} (10x10cm) plošče z 200 µm debelino nanosa, HPTLC RP-18 (10x10cm) plošče z 200 µm debelino nanosa in HPTLC RP-18_{F254S} (10x10cm) z 200 µm debelino nanosa, razen če v tekstu ne piše drugače. Plošče so bile predhodno sprane z metanolom v nasičeni vertikalni kadi s prekatom. Nanose na plošče smo nanašali s hitrostjo 150 nL/s z uporabo Automatic TLC Sampler ATS 4 (Camag, Muttenez; Switzerland). Plošče so bile razvite v nasičeni kadički z dvojnimi prekatom (20 minut pred ločbo) 10 cm x 10 cm plošče (Camag). Po ločbi in hitrem sušenju na zraku, so bile plošče izpostavljene param 37 % klorovodikove kisline (HCl). Plošče so bile dokumentirane pred in po zadnjem koraku z DigiStore 2 Documentation System (Camag) povezanim z Reprostarjem 3 s podporo računalniškega programa winCATS Version 1.4.1.8154. WinCATS program smo uporabili tudi za snemanje in vrednotenje denzitogramov. Slike so bile obdelane z računalniškim programom VideoScan TLC/HPTLC Evaluation različice 1.02.00.

3.3.6.1 Analiza na HPTLC CNF254 ploščah

TLC analiza ekstrakta špinače je bila narejena na 10 cm x 10 cm HPTLC CN_{F254} ploščah z 10 mL topila. Plošče so bile razvite do višine 8 cm z mešanico topil za razvijanje: kloroform: *n*-heksan: metanol (35:60:5, v/v/v).

3.3.6.2 Analiza na HPTLC C18 RP

Analizo ekstrakta špinače in ločbo luteina, neoksantina, violaksantina, β -karotena, klorofila a in klorofila b smo naredili tudi na silikagelnih C18 RP HPTLC ploščah, pri čemer je mešanica topil metanol:aceton:*n*-heksan (70:20:15, v/v/v) po plošči potovala 9 cm. To ločbo smo uporabili za določitev spojin z MS preko MS-vmesnika.

3.3.6.3 Izolacija violaksantina, neoksantina in luteina s pomočjo TLC plošč

Za izolacijo luteina, violaksantina in neoksantina smo na 5 cm x 10 cm C18 RP TLC_{F254} odrezano ploščo z linomatom V, 10 mm od spodnjega roba in z začetkom 10 mm od levega roba, nanegli 30 mm dolgo črto 200 μ L ekstrakta špinače (1mg liofilizirane špinače/1 mL etanola). Ločba je potekala v napol nasičeni vertikalni kadički s filter papirjem z 10 mL topila. Razvito ploščo smo na hitro posušili v toku hladnega zraka s sušilcem za lase. Nato smo lise neoksantina, violaksantina in luteina postrgali s pomočjo spatule v epruveto, ekstrahirali vsakega posebej z metanolom in 5 minut centrifugirali pri 4000 obratih/minuto. Supernatant smo skoncentrirali s pomočjo rotacijskega uparjevalnika pod znižanim tlakom. Dobljene raztopine so nam služile kot referenčne raztopine pri TLC in HPLC analizah.

3.3.7 Kvalitativno določanje karotenoidov s TLC-MS

TLC-MS analizo smo izvedli na silikagelnih RP C18 HPTLC ploščah. 150 μ L ekstrakta špinače je bilo nanešeno v 30 mm črto, 10 mm od levega roba in 10 mm od spodnjega roba. Ploščo, katero smo predhodno sprali z metanolom in posušili, smo razvili v mešanici topil za razvijanje

metanol:aceton:heksan (70:20:15, v/v/v). Ploščo smo položili na TLC-MS vmesnik, ki je bil iz vhodnega dela preko cevke vezan na HPLC, na izhodnem delu pa vezan na LCQ-MS. Za HPLC-MS(-MS) analize smo uporabili sistem sestavljen iz HPLC sistema (Surveyor LC črpalka 1.3 SP2, Thermo Finnigan in Surveyor 1.3), SP2 avtomatskim vzorčevalnikom s 25 μ L zanko) sklopljenega z masnim spektrometrom Finnigan Mat LCQ (Thermo) z ionsko pastjo. Uporabili smo APCI ionski izvor, pri čemer smo detektirali pozitivno nabite ione. Za identifikacijo in preverjanje čistosti eluiranih kromatografskih vrhov smo vzorce analizirali s sistemom LCQ (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA). Uporabili smo kemijsko ionizacijo s pozitivnimi ioni pri atmosferskem tlaku. Napetost elektrostatskega razpršilnika (angl. spray voltage) smo nastavili na 4,0 kV, temperaturo kapilare in APCI grelca pa na 200 °C oziroma 400 °C. Pretok razpršilnega plina (angl. sheat gas) in pomožnega plina (angl. auxiliary gas) sta bila nastavljeni na 80 oziroma 5 enot.

Po korakih smo kontinuirano z metanolom (HPLC črpalka je poganjala topilo metanol z 1,0 % očetno kislino po celotnem sistemu s pretokom 0,5 mL/min) ekstrahirali iskane spojine.

3.3.8 Primerjava klasične in avtomatizirane kadičke pri določanju *all-trans*- luteina in β - karotena

TLC analiza standardne raztopine luteina in β - karotena, z nanosom od 25 to 200 ng/liso je bila narejena na 10 cm x 10 cm HPTLC Silica gel 60 ploščah z 10 mL topila. Plošče so bile razvite v navadni in avtomatski kadički (Automatic Developing Chamber 2 (ADC2), Camag) s topilom za razvijanje n-heksan:aceton:2-propanol (80:20:0,5, v/v/v).

3.4 IZVEDBA ANALIZ ZA DOLOČANJE LUTEINA V VZORCIH OZKOLISTNEGA OHROVTA IN ČEMAŽA

Ozkolistni ohrovt je lastne pridelave iz Krškega leta 2010, čemaž pa smo nabrali v okolici Katarine nad Ljubljano, spomladi 2010. Oba vzorca smo polili s tekočim dušikom, liofilizirali in zmleli s dismembratorjem. Natehte po 10 mg vzorca smo 1 uro ekstrahirali v zaprtih 50 mL centrifugirkah, zaščitenih pred svetlobo z alufolijo z etanolom oziroma etanolom z 0,1 % TBHQ (10 mL).

3.4.1 Izvedba HPLC analize

Izvedba je potekala kot je opisano v poglavju 3.3.5 Izvedba HPLC analiz.

3.4.2 Izvedba TLC analiz v ekstraktih ozkolistnega ohrovta in čemaža

Izvedba je potekala, kot je opisano v poglavju 3.3.6.2 Analiza na HPTLC C18 RP, le da smo ekstrakta ozkolistnega ohrovta in čemaža nanесли na TLC C18 RP ploščo.

3.5 DOLOČANJE LUTEINA V ŽAMETNICAH IN ZEAKSANTINAV VOLČJEM JABOLKU

3.5.1 HPLC analize za določanje luteina v žametnicah in zeaksantina v volčjem jabolku

Analiza proučevanih spojin po hidrolizi v alkalnem mediju vzorcev, je potekala na HPLC sistemu Surveyor (Thermo Finnigan, ZDA) s termostatiranim avtomatskim vzorčevalnikom, kvarterno črpalko in detektorjem z nizom diod. Volumen uporabljene zanke je bil 100 μ L. Separacija je potekala pri 25 °C na koloni iz nerjavečega jekla ProntoSil C30 (250 x 4,6 mm I.D.; 5 μ m; Bischoff Chromatography, Nemčija) s predkolono C18 (Phenomenex; ZDA), detekcija pri valovni dolžini 450 nm z UV detektorjem (Spectromonitor 3200, TSP) s pretočno celico z 10 mm optične poti. Analizo smo izvedli z enostavno izokratsko elucijo iz acetona in vode v razmerju (85:15, v/v) ali (90:10, v/v).

3.5.1.1 Časovni potek hidrolize v alkalnem mediju zeaksantinskih estrov v volčjem jabolku pri 60 °C z različnimi koncentracijama baze

Na dismembratorju smo zmleli posušene ovoje volčjega jabolka. Po 50 miligramov vzorca smo natehtali v epruvete in saponificirali 10, 20, 30 40, 50, 60, 70 in 80 minut v 2 mL 12,5 in 30 % KOH v etanol:voda (4:1, v/v) pri 60 °C. Po končani saponifikaciji smo epruvete odstranili iz

vodne kopeli, na hitro ohladili v hladni vodi, vsebino epruvete prenesli v 10-mL bučko, dodali 3 mL etilacetata in do oznake dopolnili z etanolom, premešali in centrifugirali. Alikvot 1 mL supernatanta smo odpipetirali v epruveto, dodali 1 mL 10 % vodne raztopine NaCl in 1 mL etilacetata, vzorce vorteksirali 30 sekund in počakali, da sta se plasti ločili. V drugo epruveto smo odpipetirali 1 mL zgornjega sloja, mu dodali 1 mL 10 % vodne raztopine NaCl, vorteksirali 30 sekund in zgornji sloj prenesli v 1,5 mL vialo.

3.5.1.2 Časovni potek hidrolize v alkalnem mediju luteinskih estrov v žametnicah pri 60 °C z različnimima koncentracijama baze

Na dismembratorju smo zmleli posušene venčne liste žametnice. Po 10 miligramov vzorca smo natehtali v epruvete in saponificirali 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 in 80 minut v 2 mL 30 % in 12,5 % KOH v etanol:voda (4:1, v/v) pri 60 °C. V nadaljevanju je postopek potekal kot je opisano v poglavju 3.5.1.1.

3.6 DOLOČANJE LUTEINA IN ZEAKSANTINAV V VZORCIH PIŠČANČJE PLAZME

3.6.1 Opis poskusov reje piščancev

Rastoče piščance stare 1 dan smo razdelili v štiri skupine. V vsaki skupini je bilo 50 živali. Prva skupina je bila kontrolna (SK) in je vseh 41 dni reje dobivala standardno krmo. Ostale testne skupine smo po začetnih dveh tednih krmili s krmo obogateno s prehranskimi dodatki in sicer je druga skupina dnevno prejela 5 mg/kg krmne mešanice CoQ₁₀ (SQ), tretja skupina 50 mg/kg krmne mešanice lipojske kisline (SALA) in četrta skupina je prejela kombinacijo obeh antioksidantov 5 mg/kg krmne mešanice CoQ₁₀ in 50 mg/kg krmne mešanice lipojske kisline (SQALA). Vsi ostali pogoji reje so bili v vseh štirih skupinah enaki. Vzorci krvi so bili odvzeti 16., 28. in 40. dan. V vsaki skupini je bilo naključno izbranih 14 živali (7 vsakega spola) in iz *vene cutaneae ulnaris* jim je bilo odvzeto po 2 mL krvi, ki je služil za pripravo plazme. Vzorci so bili shranjeni pri -80 °C do pričetka analize. Koncentracije zeaksantina in luteina smo določili iz sedmih vzorcev.

3.6.2 Določanje luteina in zeaksantina v plazmi

Priprava standardne raztopine: 10 mg luteina v prahu in 10 mg standarda CoQ₁₀ smo natehtali v 20-mL bučki in ju raztopili v etanolu. Za kvantitativno določanje s HPLC-UV smo pripravili delovne raztopine v območju od 0,05 do 50 µg luteina in CoQ₁₀/mL. V 4-mL centrifugirko smo dali 200 µL plazme in 400 µL topila (heksan:1-propanol (1:1, v/v)). Vzorec smo 1 minuto vorteksirali in nato 15 minut centrifugirali pri 4000 obratih/min. Po končanem centrifugiranju smo zgornji sloj odpipetirali v 2 mL vialo in vzorce analizirali. Vsebnost CoQ₁₀ smo merili pri 280 nm, lutein in zeaksantin pa pri 450 nm. Za detekcijo smo uporabili kolono Luna 3µ C18(2), 100 mm x 3,00 mm s 3 µm velikimi delci (Torrance, California, Amerika), ki je imela predkolono Phenomenex C18 (Torrance, California, Amerika). Mobilna faza je bila sestavljena iz metanola (topilo A), 1-propanola (topilo B) in vode (topilo C). Potekala je gradientna ločba t = 0 min, 85 % A, 15 % C; t = 1 min, 85 % A, 15 % C, t = 5 min, 40 % A, 60 % B; t = 10 min, 40 % A, 60 % B; t = 11 min, 85 % A, 15 % C; t = 16 min, 85 % A, 15 % C s pretokom 0,5 mL/min in injiciranim volumnom 20 µL. Za evaluacijo rezultatov smo uporabili programsko opremo ChromQuest 4.2.

3.7 DOLOČANJE LUTEINA V PREHRANSKIH DOPOLNILIH

Z ramansko spektroskopijo smo pregledali porazdelitev luteina in luteinskih estrov v dveh prehranskih dopolnilih iz Lekarne Ljubljana. Z mikroskopom smo posneli prereza prehranskih dopolnil, ki sta bila v obliki tablete. Prehransko dopolnilo A ima deklarirano vsebnost luteina 6 mg na tableto, prehransko dopolnilo B pa 5 mg luteina na tableto. Koncentracije standardnih raztopin luteina, β-karotena in topila etanol pa so bile posnete v HPLC vialah.

3.7.1 Merjenje luteina in β-karotena s konfokalnim ramanskim mikroskopom.

Standardni raztopini luteina in β-karotena v etanolu ter prehranski dopolnili A in B s predvideno znano vsebnostjo luteina smo merili z WiTec alpha3000R konfokalnim raman mikroskopom s pomočjo laserja pri 532 nm direktno na vzorec skozi 0,9 N.A. 100X krovno

steklo. Ramanski odziv je bil zbran z istim objektivom, skozi 50 mm luknjo in razpršen pri 600 L/mm skozi Andor Newton detektor v EMCCD.

3.8 STATISTIČNA ANALIZA

V poskusih zbrane vrednosti za posamezne opazovane parametre smo uredili s programsko opremo Microsoft Excel 2007. Iz urejenih podatkov smo s programskim paketom SPSS izračunali osnovne statistične parametre. Povprečne vrednosti za eksperimentalne skupine so bile izračunane z uporabo Duncanovega testa in so primerjane pri 5 % tveganju.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 METODE ZA DOLOČANJE KAROTENOIDOV

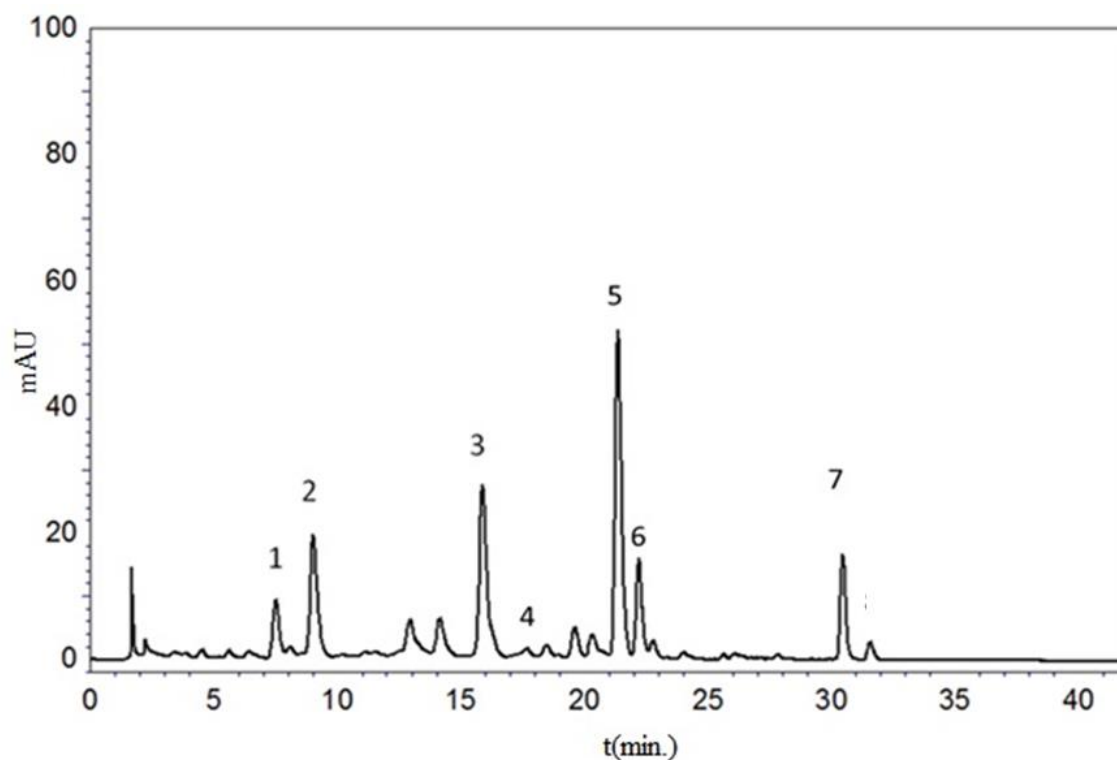
Različne kromatografske tehnike se uspešno uporabljajo za ločitev in kvantifikacijo različnih koncentracij karotenoidov v vzorcih plazme, zelenjave, sadja in prehranskih dodatkov. Dandanes prevladuje HPLC metoda sklopljena s PDA ali MS detektorjem (Schoefs, 2004; Oliver in Palou, 2000; Ren in Zhang, 2008; Taylor in sod., 2006; Bunea in sod., 2008), vendar nam TLC metode včasih dajo dodatno informacijo o analitu in nam predstavljajo alternativno in dopolnilno metodo pri določanju različnih vzorcev (Rodić in sod., 2012).

4.2 PRIPRAVA VZORCA ZA DOLOČANJE LUTEINA V VZORCU ŠPINAČE

Priprava testne raztopine za določanje luteina iz vzorca špinače je ključnega pomena. Ekstrakcijo luteina smo naredili iz liofiliziranega materiala, da smo se izognili morebitnemu encimskemu delovanju, do katerega bi lahko prišlo med shranjevanjem. Tudi iz literaturnih virov je razvidno, da je liofilizacija najbolj zanesljiva metoda za določanje karotenoidov, pri kateri se le ti ohranjajo v samem materialu (Lefsrud in sod., 2008). Obstaja tudi tendenca za uporabo manjših količin vzorca: od 20 g svežega rastlinskega materiala leta 1986 (Khachik in sod. 1986), 0,5 g leta 2003 (Glaser in sod. 2003) do 30 mg liofiliziranega materiala leta 2005 (Serrano in sod. 2005). Pri našem delu je dobro zmlet in homogeniziran material predstavljal reprezentativen vzorec navkljub majhnim zatehtam (10 mg), kar je posledično pomenilo manjšo porabo topil. Izbira etanola kot ekstrakcijskega topila, pa poleg primerljivih ali celo višjih rezultatov vsebnosti luteina pri ekstrakciji iz vzorcev špinače (Simonovska in sod., 2013), predstavlja najmanj toksično, okolju prijazno in cenovno ugodno topilo. Hidroliza v alkalnem mediju ni bila potrebna, saj se lutein v vzorcu špinače, ohrovtu in čemaža nahaja v prosti in ne v zaestreni obliki z maščobnimi kislinami. To smo dokazali s TLC in HPLC metodo.

4.2.1 Razvoj HPLC-UV metode za določanje karotenoidov v ekstraktu špinače

Večina v literaturi opisanih (Bunea in sod., 2008; Kopsell in sod., 2006; Tsao in Yang, 2006; Lefsrud in sod., 2007) separacij karotenoidov v rastlinskih vzorcih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti na reverzni fazi navaja uporabo C18 HPLC kolone. Pri našem delu smo uporabili C30 HPLC kolono, ki nam v primerjavi s C18 da boljšo ločbo med luteinom in zeaksantinom ter med violaksantinom in neoksantinom, kar smo v pregledani literaturi (Aruna in Baskaran, 2010) opazili kot problem. V literaturi opisane analize so bile izvedene tako z izokratsko kot gradientno elucijo, pri čemer je bil uporabljen dokaj širok spekter različnih topil za določanje luteina in zeaksantina (Preglednica 1). V sklopu doktorskega dela smo dosegli s separacijo glavnih karotenoidov: luteina, β -karotena, violaksantina in neoksantina v špinači z gradientno ločbo, pri sobni temperaturi. Kot mobilno fazo smo uporabili mešanico topil acetona in destilirane vode pri pretoku 1,0 mL/min v 34 minutah. Tako smo uspeli na bazni liniji med seboj ločiti lutein in zeaksantin, dihidroksikarotenoida, ki se razlikujeta samo v položaju ene dvojne vezi. Kot je razvidno iz Slike 10, so na kromatogramu ekstrakta špinače vidni še drugi vrhovi, katerim pa nismo posvečali pozornosti. Enako kolono in mobilno fazo iz acetona in vode so uporabili že Putzbach in sod. (2005), ki pri opisu HPLC analize ekstrakta špinače niso poročali o ločbi violaksantina, neoksantina in zeaksantina, verjetno zaradi drugačne gradientne elucije.



Slika 10: Kromatogram ekstrakta špinače, pri 450 nm, ločenega na koloni Prontosil C30: 1: neoksantin; 2: violaksantin; 3: lutein; 4: zeaksantin; 5: klorofil b; 6: klorofil a; 7: β -karoten.

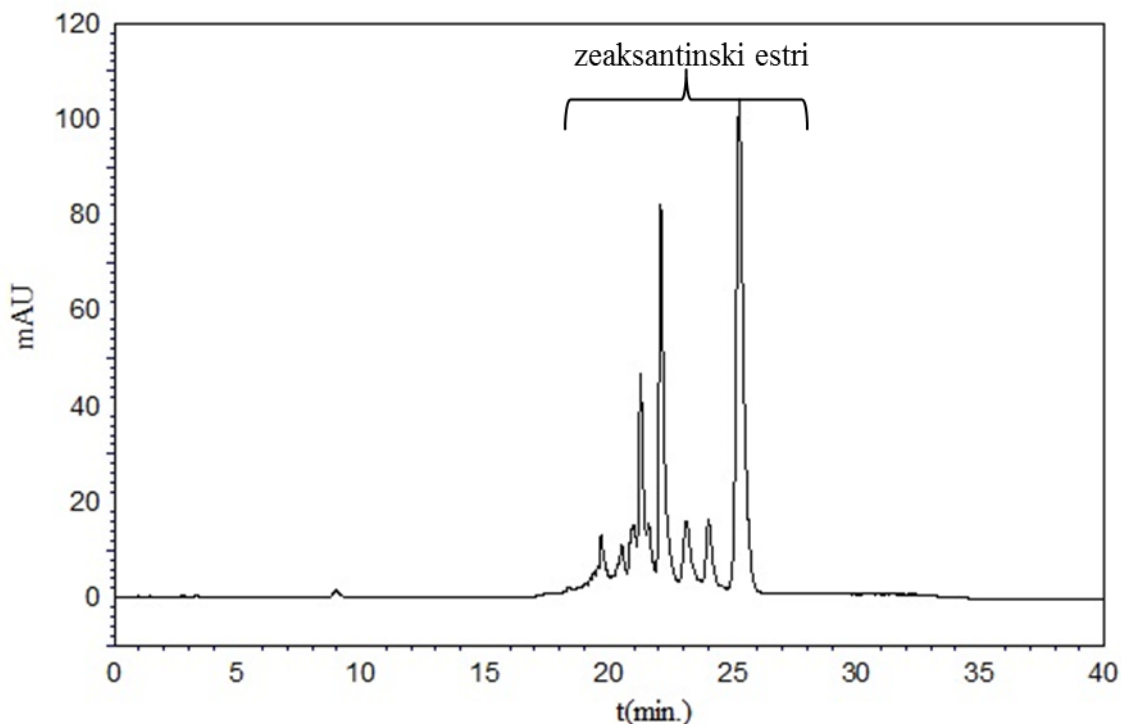
Figure 10: Chromatogram of a spinach extract, at 450 nm, separated on column Prontosil C30,: 1: neoxanthin; 2: violaxanthin; 3: lutein; 4: zeaxanthin; 5: chlorophyll b; 6: chlorophyll a; 7: β -carotene.

Preglednica 1: Prikaz literaturnih objav priprave vzorca in uporabljene kolone za določanje luteina.

Table 1: Literature review of sample preparation and used column for the determination of lutein.

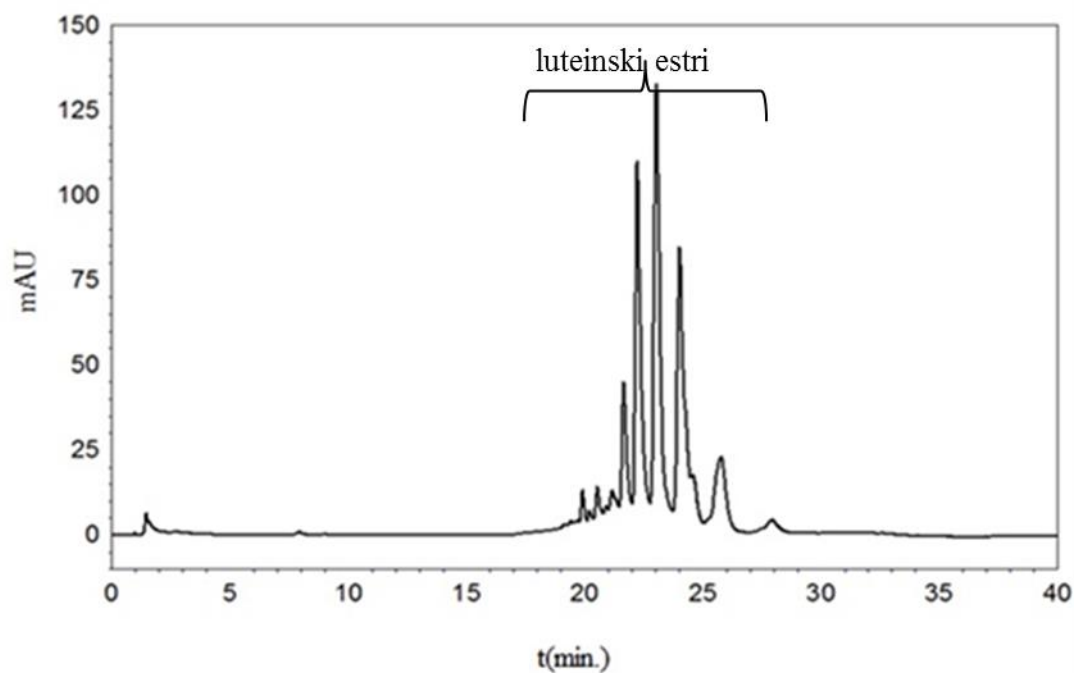
Reference	Kolona	liofilizacija	Priprava vzorca	Mobilna faza	Vsebnost luteina in zeaksantina
Bunea in sod., 2008	C18 Lichrosorb (250 x 4.4mm) 5µm	da	Ekstrakcija z metanol:etilacetat:petrol eter:(1:1:1, v/v/v), nato saponifikacija s 30 % KOH v metanolu	acetonitril:voda (9:1, v/v), z 0,25 % TEA (topilo A) in etil acetat z 0,25 % TEA (topilo B)	5,22 mg luteina /100 g špinače
Kopsell in sod.,2006	Vydac RP C18 (250 x 4,6mm) 5µm	da	Hidratacija, ekstrakcija s THF z BHT-jem, iniciranje v metanolu	75 % acetonitril, 20 % metanol, 5 % heksan, 0.05 % BHT, 0,013 % TEA (v/v) (topilo A) in 50 % acetonitril, 25 % THF, 25 % heksan, 0,013 % TEA (v/v) (topilo B)	od 6,49 do 12,98 mg luteina/100 g sveže mase (13 različnih sort)
Tsao in Yang, 2006	Waters Spherisorb ODS2, (150 x 4,6 mm) 5 µm	ne	Ekstrakcija z acetonom (6h), iniciranje v etilacetatu	acetonitril:metanol (9:1, v/v) (topilo A) in etil acetat (topilo B)	3,7 mg luteina/100 g sveže špinače, 12,3 mg luteina/100 g svežega ohrovta
Lefsrud in sod.,2007	Vydac RP C18 (250 x 4,6mm) 5µm,	da	Hidratacija, ekstrakcija s THF, z BHT-jem, iniciranje v metanolu	75 % acetonitril, 20 % metanol, 5 % heksan, 0,05 % BHT, 0,013 % TEA (v/v) (topiloA) in 50 % acetonitril, 25 % THF, 25 % heksan, 0,01 3 % TEA (v/v) (topilo B)	od 6,9 do 15,1 mg luteina/100 g svežega ohrovta
Liu in sod., 2007	Waters ODS-1 (250 x 4,6mm) 5µm	da	Ekstrakcija z aceton in dodatkom BHT, iniciranje v metanolu	acetonitril in metanol in Tris-HCl pufer (0,1 M; pH 8).	11,9 mg luteina/100 g sveže špinače, 2,7 mg zeaksantina/100 g sveže špinače

V literaturi ni podatkov, da bi bil lutein vezan z estrsko vezjo na višje maščobne kisline v vzorcu špinače. To smo potrdili s HPLC metodo, kjer smo pod enakimi pogoji ločili luteinske estre, zeaksantinske estre in lutein. Spodaj prikazani kromatogram (Slika 11) prikazuje ekstrakt volčjega jabolka in prisotnost zeaksantinskih estrov, ki se eluirajo med 15 in 25 minuto. Na kromatogramu ekstrakta žametnic (Slika 12) opazimo prisotnost luteinskih estrov med 15 in 25 minuto. Slika 13 prikazuje kromatogram ekstrakta špinače, kjer se lutein in drugi karotenoidi eluirajo med 7 in 11 minuto. Morebitno prisotnost estrov bi potrdili kromatografski vrhovi med 15 in 25 minuto. Z razvito HPLC metodo smo uspešno ločili karotenoide in klorofile, kateri so Dachtlerja in sod. (2001) ovirali pri določanju karotenoidov. Med drugim smo se s tako razvito metodo tudi izognili hidrolizi v alkalnem mediju.



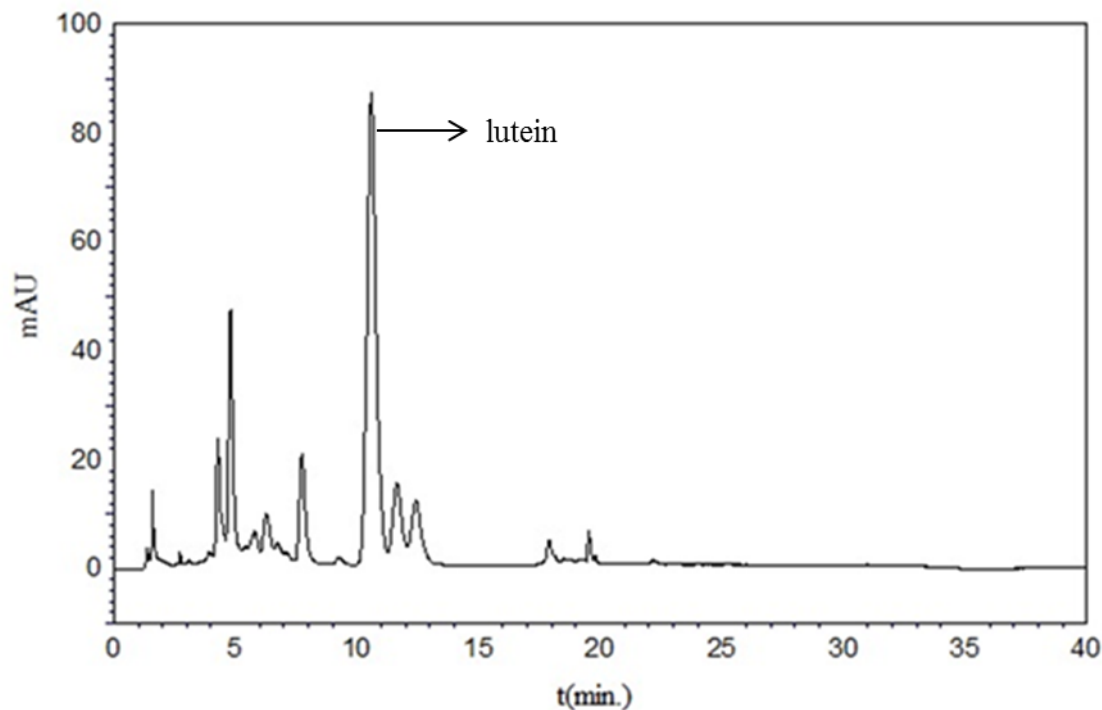
Slika 11: Kromatogram ekstrakta volčjega jabolka, pri 450 nm, HPLC ločbe prikaza prisotnosti zeaksantinskih estrov.

Figure 11: Chromatogram of a chinese lantern extract, at 450 nm, HPLC separation as demonstration for the presence of zeaxanthin esters.



Slika 12: Kromatogram ekstrakta žametnic, pri 450 nm, HPLC ločbe prikaza prisotnosti luteinskih estrov.

Figure 12: Chromatogram of marigold extract, at 450 nm, HPLC separation as demonstration for the presence of lutein esters.



Slika 13: Kromatogram ekstrakta špinače, pri 450 nm, HPLC ločbe za prikaz odsotnosti luteinskih estrov v vzorcu špinače.

Figure 13: Chromatogram of a spinach extract, at 450 nm, HPLC separation as demonstration for the absence of lutein esters in spinach extract

4.2.2 TLC metode za določanje karotenoidov

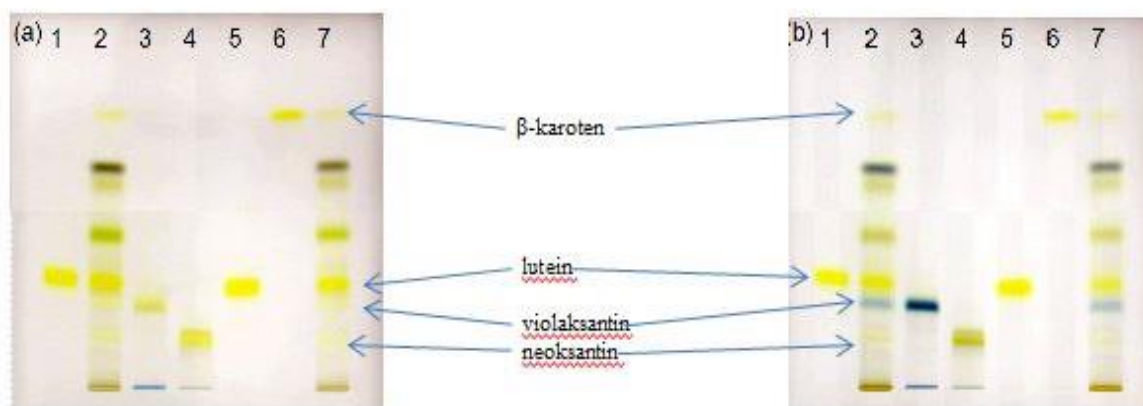
Za TLC ločbo karotenoidov se uporabljajo različne stacionarne faze in številna topila za razvijanje. V literaturi je najpogosteje opisana ločba karotenoidov na silikagelu kot nosilcu, nezaželen pa je aluminijeva TLC podlaga zaradi nestabilnosti karotenoidov (Britton, 2008). Največji pomanjkljivosti v primerjavi s HPLC metodo sta omejena resolucija in neobstočnost karotenoidov na TLC ploščah. Deloma se neostojnost luteina pri TLC analizah lahko prepreči z dodatkom antioksidanta BHT in še posebej TBHQ mobilni fazi (Rodić in sod., 2012). Prednosti TLC analiz pred HPLC analizami so predvsem nižji stroški, uporabnost za pregled karotenoidov neznane sestave, uporaba večjega števila topil v mobilni fazi (Schiedt, 1995) in enakih pogojih med analizo vzorca in standarda na istih ploščah. Ker imajo karotenoidi visok molarni absorpcijski koeficinet ϵ , so dobro obarvane lise na TLC ploščah vidne že s prostim očesom. Oko je sposobno ločiti karotenoide, katerih maksimuma absorpcije se razlikujeta za 4 do 5 nm, npr. med rumeno obarvanim luteinom ($\lambda_{\max}=446$ nm) in oranžnim zeaksantinom z maksimumom pri 450 nm (Britton, 2008).

Naš cilj je bil predstaviti ločbo glavnih karotenoidov v ekstraktu špinače s pomočjo TLC analzne metode, njihovo identifikacijo s TLC-MS in potrditev epoksidov s HCl testom.

Za kvalitativno določanje vsebnosti karotenoidov luteina, violaksantina, neoksantina, β -karotena v ekstraktu špinače smo razvili različni TLC metodi. Prva separacija je bila izvedena na silikagelni 60HPTLC CN_{F254s} plošči z uporabo topila za razvijanje kloroform:n-heksan:metanol (35:60:5, v/v/v) in druga na silikagelni RP18 HPTLC plošči z uporabo topila za razvijanje metanol:aceton:n-heksan (70:20:15 v/v/v). Obe separaciji sta potekali v nasičeni kadički, ki potencialno zmanjša vpliv okolice (vlaga, nasičenost, pretok zraka) na kromatografsko separacijo. Razvite plošče HPTLC CN_{F254s} in HPTLC C18 RP so bile po razvijanju izpostavljene HCl param.

4.2.2.1 TLC metoda za določanje karotenoidov na silica gel 60 CN F254s plošči

Iz Slike 14 je razvidno, da s TLC metodo ločimo lutein, violaksantin, neoksantin in β -karoten ekstrahiranih iz zeleno obarvanih rastlin. Ocenjujemo, da je metoda primerna za hitro kvalitativno ocenitev prisotnosti karotenoidov v iskanem vzorcu. Ob izpostavitvi plošče HCl param pride do spremembe barve iz rumene v zeleno v primeru neoksantina (monoepoksid) in iz rumene v modro v primeru violaksantina (diepoksid), lutein in β -karoten ostaneta iste barve (Eugster C.H. 1995). Ločba na ciano plošči nam daje lise z nižjimi RF vrednostnimi za bolj polarne molekule.



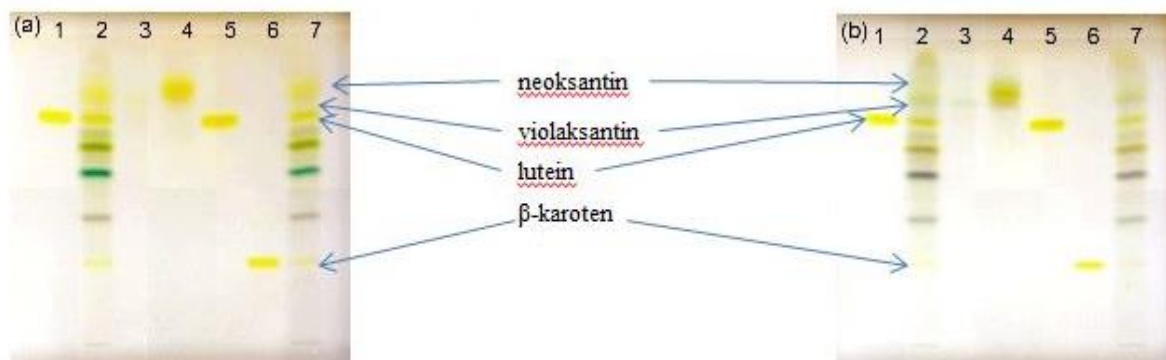
Slika 14: Ločba karotenoidov na Silica gel 60 CN F254s plošči: (a) pred izpostavitvijo HCl param in (b) po izpostavitvi HCl param. Topilo za razvijanje: kloroform:n-heksan:metanol (35:60:5, v/v/v). Nanos 1: lutein, nanos 2: ekstrakt špinače, nanos 3: violaksantin, nanos 4: neoksantin, nanos 5: lutein, nanos 6: β -karoten, nanos 7: ekstrakt špinače.

Figure 14: Separation of the carotenoids on the Silica gel 60 CN F254s plates: (a) before exposing to the HCl vapour and (b) after exposing to the HCl vapour. Developing system chloroform:n-hexane:methanol (35:60:5, v/v/v). Track 1: lutein, track 2: spinach extract, track 3: violaxanthin, track 4: neoxanthin, track 5: lutein, track 6: β -carotene, track 7: spinach extract.

4.2.2.2 TLC metoda za določanje karotenoidov na RP18 HPTLC in plošči

Pri uporabi RP TLC plošč se zaradi nepolarne stacionarne faze uporablja bolj polarna mobilna faza, običajno iz metanola, acetona, acetonitrila (Britton, 2008). Plošča je bila razvita z uporabo topila za razvijanje metanol:aceton:n-heksan (70:20:15, v/v/v), v nasičeni vertikalni kadički. Obstojnost karotenoidov je slabša kot na ciano ploščah. Poleg manjše obstojnosti je

tudi test s HCl parami pokazal manj intenzivno spremembo barve za neokasantin (monoepoksid) in violaksantin (diepoksid).

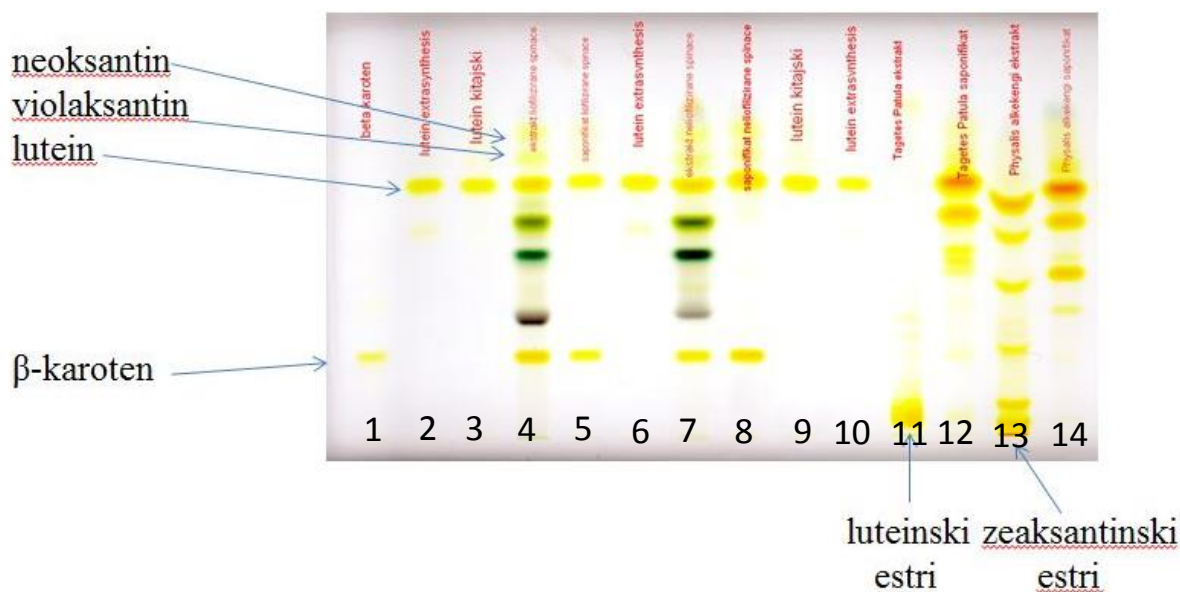


Slika 15: Ločba karotenoidov na HPTLC C18 RP plošči: (a) pred izpostavitvijo HCl param in (b) po izpostavitvi HCl param. Mobilna faza: metanol:acetona:n-heksan (70:20:15, v/v/v). Nanos 1: lutein, nanos 2:ekstrakt špinače, nanos 3: violaksantin, nanos 4: neokasantin, nanos 5: lutein, nanos 6: β-karoten, nanos 7: ekstrakt špinače.

Figure 15: Separation of the carotenoids on the HPTLC C18 RP plates: (a) before exposing to the HCl vapour and (b) after exposing to the HCl vapour. Developing system: methanol:acetone:n-hexane (70:20:15, v/v/v). Track 1: lutein, track 2: spinach test solution, track 3: violaxanthin, track 4: neoxanthin, track 5: lutein, track 6: β-carotene, track 7: spinach test solution.

Za hitre analize preiskovanega vzorca se priporoča uporaba HPTLC CN F254s, vendar ima ta ločba dve pomanjkljivosti, in sicer uporabo kloroforma, katerega se zaradi toksičnosti izogibamo in prevelik šum stacionarne faze pri TLC- MS analizi.

Poleg prikaza ločbe glavnih karotenoidov v ekstraktu špinače (Slika 15) na HPTLC RP18 plošči smo s to TLC metodo tudi prikazali uporabnost te metode pri dokazovanju proste oblike luteina in zeaksantina ter zaestrene oblike luteina in zeaksantina. Iz Slike 16 je razvidna ločba štirih karotenoidov: β-karotena (nanos 1), luteina (nanos 2,3,9,10) ter violaksantina in neokasantina (nanos 4). Lise, ki predstavljajo ekstrakt po alkalnem umiljenju žametnic (nanos 12) in volčjega jabolka (nanos 14), nakazujejo, da je bilo umiljenje v alkalnem mediju tako rekoč popolno saj pri nanosu ekstrakta po alkalnem umiljenju ne zaznamo lis, ki bi ustrezale estrom luteina in zeaksantina z maščobnimi kislinami. Prisotnost luteinskih estrov žametnic opazimo kot neločene lise na startu nanosa 11, prisotnost zeaksantinskih estrov volčjega jabolka pa kot neločene lise na startu nanosa 13.



Slika 16: Ločba karotenoidov in luteinskih in zeaksantinskih estrov na HPTLC C18 RP plošč. Mobilna faza: metanol:aceton:n-heksan (70:20:15, v/v/v).

Figure 16: Separation of the carotenoids and lutein and zeaxanthin esters on the HPTLC C18 RP plate. Developing system: methanol:acetone:n-hexane (70:20:15, v/v/v).

4.2.2.3 Primerjava klasične in avtomatizirane kadičke (AK) pri določanju luteina in β -karotena

Pri TLC se zaradi prisotnosti parne faze sestava mobilne faze med razvijanjem plošče spreminja. Na različnih delih plošče je njena sestava različna in je drugačna od mobilne faze, ki smo jo nalili v kadičko. Zaradi tega pri razvijanju plošč prihaja do nekontrolirane ločbe in slabše ponovljivosti kromatografiranja tudi znotraj posamezne plošče. Temu smo se poskusili izogniti z uporabo avtomatske kadičke (Automatic Developing Chamber 2 (ADC2), Camag), ki zaradi standardizacije in avtomatizacije omogoča konstantne pogoje ločbe. Vzpostavi se ponovljiv in konstanten pretok zraka s kontrolirano vlago in sestavo parne faze. Prav tako so vsi koraki razvijanja plošče avtomatizirani in dokumentirani. Manjša pomanjkljivost te metode je v tem, da se kontrola vlage v stacionarni fazi lahko izvaja samo pri uporabi silikagelnih plošč. Primerjavo ponovljivosti kromatografiranja pri uporabi navadne in avtomatske kadičke kaže Preglednica 2, kromatogram TLC analize pa Slika 17. RSD vrednosti za retencijska faktorja (R_F) pri razvijanju luteina in β -karotena v navadni kadički sta 3,70 % in 1,65 %, medtem ko je pri uporabi avtomatske kadičke ta vrednost manjša 2,48 % in

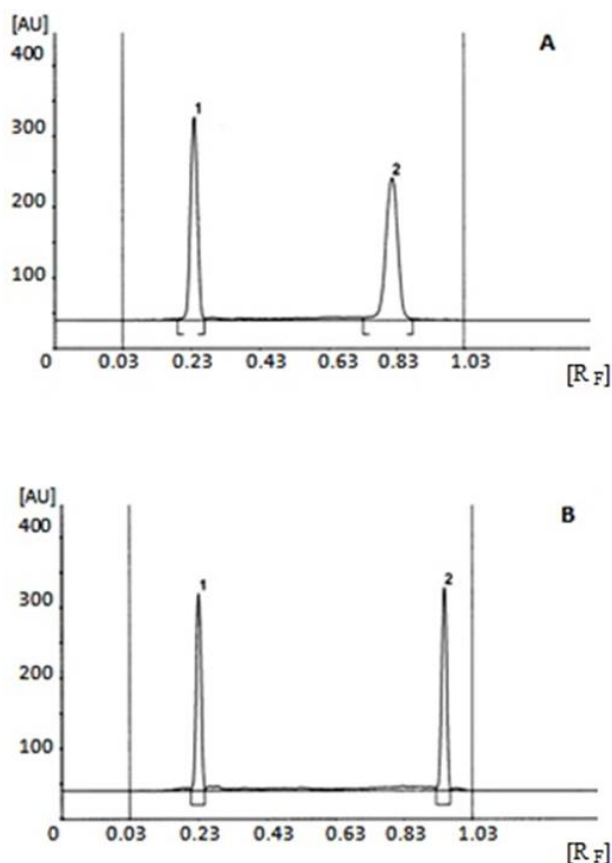
0,94 % (Jazbec-Križman in sod., 2013). Tako lahko potrdimo, da je boljša kvantitativna kromatografija rezultat konstantne, ponovljive sestave mobilne in plinske faze med kromatografiranjem v AK (avtomatska kadička).

Preglednica 2: R_F vrednosti in relativne standardne deviacije luteina in β -karotena.

Table 2: R_F values and their relative standard deviations of lutein and β -carotene.

Spojina	Parameter	Klasična TLC kadička	AK
Lutein	R_F (RSD)	0,25 (3,70 %)	0,23 (2,48 %)
β -karoten	R_F (RSD)	0,84 (1,65 %)	0,90 (0,94 %)

N = 48, 3 plošče z 18 nanosi v koncentracijskem območju od 25 to 200 ng/liso, ki so bile nanešene z avtomatskim nanašalcem in razviti v navadni in avtomatizirani kadički in izmerjene s TLC scanner 3 (vse od Camag, Mutenz, Switzerland).

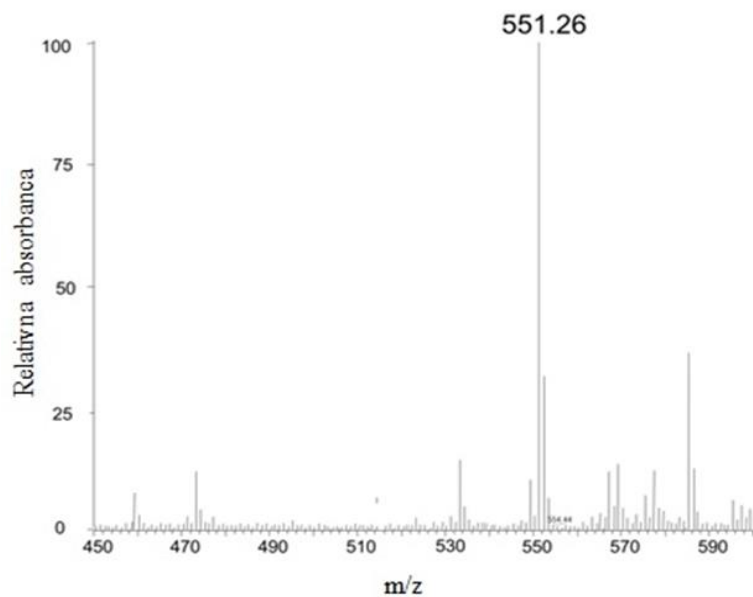


Slika 17: TLC denzitogram dveh karotenoidov (1) luteina in (2) β -karotena, posneta pri 450 nm po ločbi narejeni v klasični kadički (Camag) (A) in avtomatski kadički (Camag) (B).

Figure 17: TLC densitogram of two carotenoids, (1) lutein and (2) β -carotene, recorded at 450 nm after development in classical developing chamber (Camag) (A) and Automatic Developing Chamber 2 (Camag) (B).

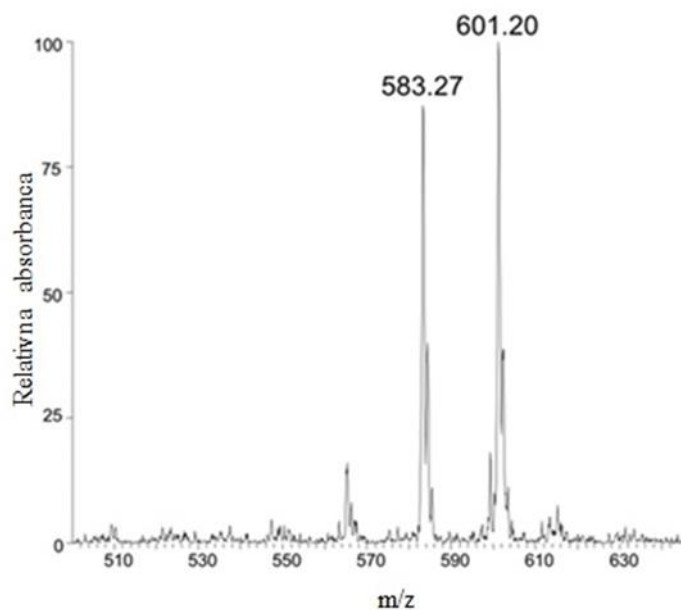
4.2.3 Določanje karotenoidov v ekstraktu špinače s pomočjo TLC-MS metode

Za dodatno potrditev spojin smo poleg HPTLC C18 RP in HPTLC CN plošč uporabili še masno spektroskopijo. Prisotnost karotenoidov na razviti plošči ekstrakta špinače smo potrdili s pomočjo TLC-MS vmesnika, pri čemer smo kot topilo za ekstrakcijo lise uporabili metanol, ob prisotnosti 1 % očetne kisline za povečanje ionizacije. APCI ionski izvor se je izkazal kot zelo učinkovit in zanesljiv način ionizacije molekul karotenoidov, medtem ko ESI ionski izvor ni omogočil ionizacije analiziranih molekul. S sklopljeno TLC-MS analizo smo potrdili prisotnost luteina (Slika 18), pri $m/z = 551$, ki ustreza $[MH^+ - H_2O]$ (Černelič in sod., 2010a). Podoben m/z spekter navajajo tudi Lienauin sod. (2003) ter Lakshminarayana in sod. (2008). Pott in sod. (2003) ter Aman in sod. (2005) so prav tako kot mi violaksantinu določili $m/z = 601$, ki ustreza $[MH^+]$ (Slika 19). Neoksantin smo detektirali pri $m/z = 583$, ki glede na literaturne podatke pripada $[MH^+ - H_2O]$ (Aman in sod., 2005 in Burmeister in sod., 2011) (Slika 20). Zaznali smo tudi $m/z = 537$ ion, ki je značilen za protoniran molekularni ion $[MH^+]$ β -karotena (Hagiwara in sod., 1998) (Slika 21). Za feofitin a in b (klorofil brez magnezija) smo enako kot Chen in sod. (2003) in Ishida (2011) zaznali protonirani molekularni ion z odcepljenim magnezijem $[MH^+ - Mg]$, in sicer smo za feofitin a določili $m/z = 871$ (Slika 22) in za feofitin b $m/z = 885$ (Slika 23).



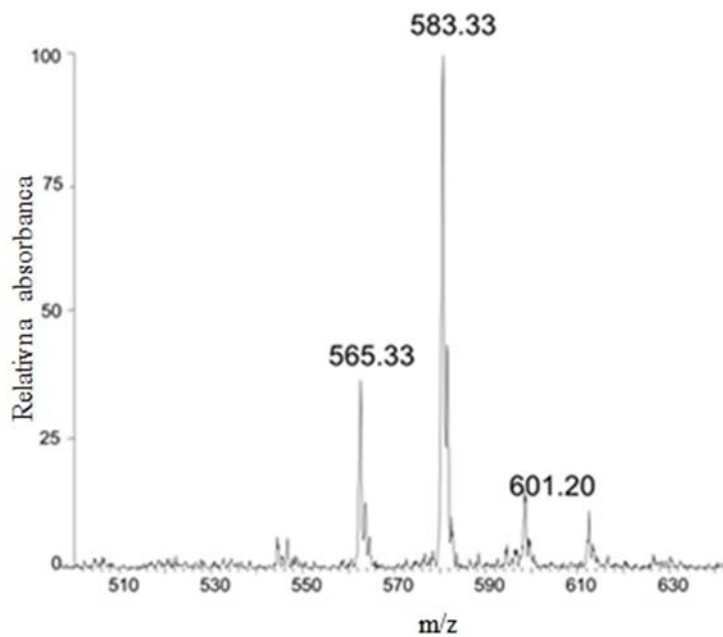
Slika 18: MS spekter luteina ($m/z = 551 - [MH^+ - H_2O]$) iz ekstrakta špinače.

Figure 18: MS spectrum of lutein ($m/z = 551 - [MH^+ - H_2O]$) from spinach extract.



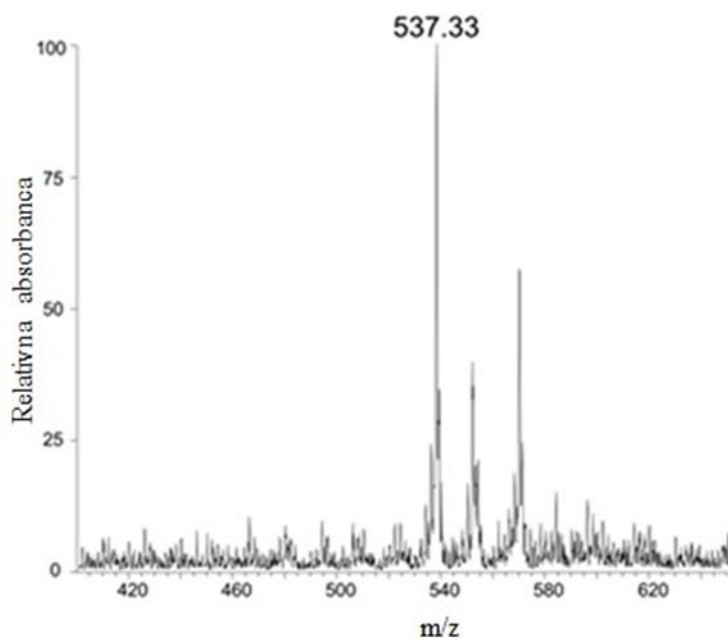
Slika 19: MS spekter violaksantina ($m/z = 601 - [MH^+]$) iz ekstrakta špinače.

Figure 19: MS spectrum of violaxanthin ($m/z = 601 - [MH^+]$) from spinach extract.



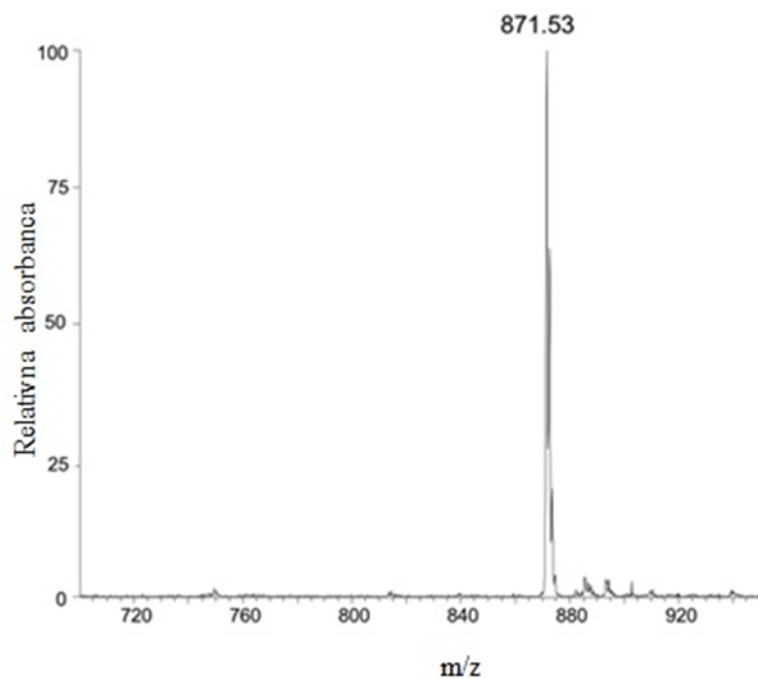
Slika 20: MS spekter neoksantina ($m/z = 583 - [MH^+ - H_2O]$) iz ekstrakta špinače.

Figure 20: MS spectrum of neoxanthin ($m/z = 583 - [MH^+ - H_2O]$) from spinach extract.



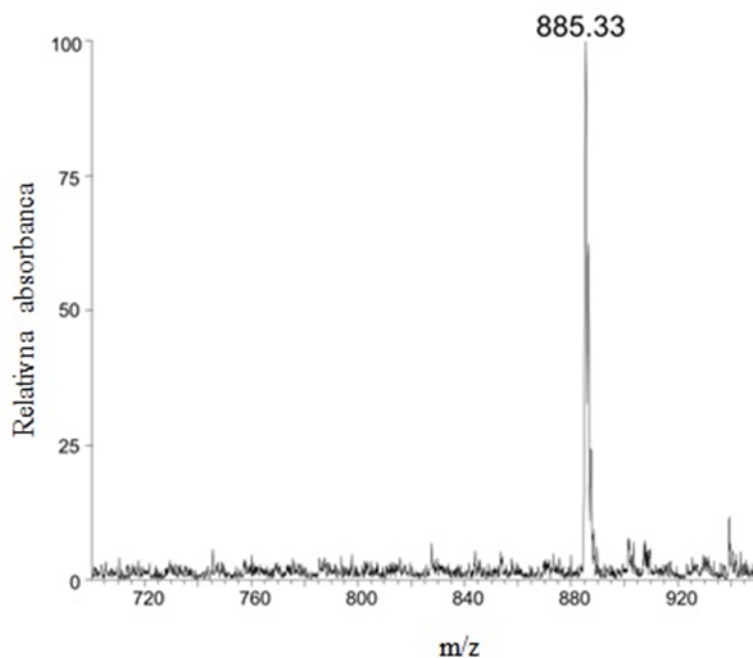
Slika 21: MS spekter β -karotena ($m/z = 537 - [MH^+]$) iz ekstrakta špinače.

Figure 21: MS spectrum of β -carotene ($m/z = 537 - [MH^+]$) from spinach extract.



Slika 22: MS spekter feofitina a ($m/z = 871 - [MH^+ - Mg]$) iz ekstrakta špinače.

Figure 22: MS spectrum of pheophytin a ($m/z = 871 - [MH^+ - Mg]$) from spinach extract.



Slika 23: MS spekter feofotina b ($m/z = 885 - [MH^+ - Mg]$) iz ekstrakta špinače.

Figure 23: MS spectrum of pheophytin b ($m/z = 885 - [MH^+ - Mg]$) from spinach extract.

TLC-MS vmesnik smo poskusili uporabiti tudi pri identifikaciji lis na HPTLC CN ploščah. Zaradi velikega šuma, ki je bil prisoten v m/z spektrih spojin ločenih na omenjenih ploščah, je bila take vrste identifikacija onemogočena, zato smo se poslužili klasičnega pristopa, pri katerem liso s pripadajočim analitom postrgamo, analit ekstrahiramo v metanol in metanolno raztopino analita direktno injiciramo v masni spektrometer.

4.2.4 Vpliv dodanih sintetičnih antioksidantov na ekstrakcijo v zraku in dušikovi atmosferi

Proučevali smo tudi, kako dodatek sintetičnih antioksidantov, kot sta BHT in TBHQ, vpliva na ekstrakcijo luteina iz špinače. BHT in TBHQ sta bila uporabljena pri ekstrakciji luteina iz špinače v zračni atmosferi (Černelič in sod., 2010b), ne pa pri ekstrakciji narejeni v dušikovi atmosferi, ki naj bi preprečevala izomerizacijo in uničenje karotenoidov (Inbaraj in sod., 2006).

Zaradi morebitnega prooksidativnega in antioksidativnega delovanja luteina med samo ekstrakcijo smo določili vpliv dodanih antioksidantov. S preliminarnim eksperimentom smo preverjali vpliv antioksidantov liofiliziranih in svežih vzorcev (Černelič in sod., 2010b). V treh vzorcih so bile določene višje vrednosti karotenoidov v svežih delih vzorcev in le pri enem v liofiliziranem delu vzorca. Predvidevamo, da liofilizacija ni nujno potrebna, če analiziramo sveže vzorce. Pri našem delu smo uporabljali liofilizirane vzorce, ker smo delali poskuse na istih vzorcih daljše časovno obdobje in smo se le tako lahko izognili morebitnemu delovanju encimov.

Po literaturnih podatkih naj bi špinača vsebovala od 3 do 13 mg luteina na 100 g svežega vzorca (Bunea in sod., 2008; Kidmose in sod., 2001; Tsao in Yang, 2006; Kopsell in sod., 2006). Pri proučevanju morebitnih razlik pri ekstrakciji luteina iz liofiliziranega vzorca špinače ob dodatku sintetičnih antioksidantov ekstrakcijskemu topilu v aparaturi Corosel 12 Plus smo prišli do rezultatov, ki so prikazani v Preglednici 3. Na koncu preglednice so podane srednje vrednosti meritev in izračunane primerjave med različno obdelanimi vzorci.

Povprečna vsebnost luteina v špinači pri ekstrakciji v zračni atmosferi je 7,16, 7,61 in 7,36 mg luteina na 100 g špinače, ko smo uporabili etanol, etanol z dodanim TBHQ oziroma etanol z

dodanim BHT v istem zaporedju. Pri ekstrakciji narejeni v dušikovi atmosferi je vsebnost nekoliko višja 7,74, 8,16 in 7,91 mg luteina na 100 g sveže špinače, pri ekstrakciji z etanolom, etanolom z dodanim TBHQ oziroma etanolom z dodanim BHT v istem zaporedju. Ti rezultati kažejo, da je ekstrakcija v dušikovi atmosferi dosti bolj učinkovita od ekstrakcije izvedene v zračni atmosferi. Primerjava ekstrakcij v zraku in v dušikovi atmosferi kaže, da je kisik iz zraka glavni krivec za nestabilnost karotenoidov in ima signifikanten vpliv na določitev izkoristka luteina iz vzorcev špinače kljub prisotnosti dodanega antioksidanta, saj antioksidanti, ki so dodani ekstrakcijski raztopini, zaščitijo lutein pred že obstoječimi prostimi radikali (Slika 24), medtem ko dušikova atmosfera ščiti lutein že pred nastankom hidroperoksidov in posledičnim nastankom peroksi radikalnih aduktov, ki bi lahko povzročili avtooksidacijo luteina (Černelič in sod., 2013).

V naših eksperimentih je lutein zaščiten pred prostimi radikali (Slika 24, Reakcija 1) in tudi pred luteinskimi radikali (Slika 24, Reakcija 2), vendar ta antioksidativna zaščita ne more preprečiti nastanka hidroperoksidov in avtooksidacije luteina v primeru, da je na razpolago dovolj kisika (Slika 24, Reakcija 4), zato je pri ekstrakciji v zračni atmosferi smotrni dodatek antioksidantov (Černelič in sod., 2013).

Ko lutein reagira s singletnim kisikom ($^1\text{O}_2$), lahko lutein preide v vzbujeno stanje. Dodatek antioksidantov omogoča, da se iz novo nastalega vzbujenega stanja lutein vrne nazaj na nižjo energetske raven, in tako naprej lovi singletni kisik (Slika 24, Reakcija 3) (Böhm in sod., 2012). Možno je da dodatek antioksidantov prepreči oksidacijo luteina, ki se lahko zgodi med ekstrakcijo. Dodatek antioksidanta TBHQ ekstrakcijskemu topilu nam da statistično boljšo antioksidativno zaščito pri ekstrakciji luteina v primerjavi s samim topilom ne glede na atmosferske pogoje (zrak ali dušikova atmosfera), medtem ko je v dušikovi atmosferi statistična razlika le pri dodatku antioksidanta TBHQ, ne pa pri dodatku BHT ($P < 0.05$). Višja učinkovitost sintetičnega antioksidanta TBHQ je lahko povezana z njegovo dodatno hidroksilno skupino ali s steričnimi učinki. Dodatek sintetičnega antioksidanta je dal v povprečju 6 % višji izkoristek pri ekstrakciji luteina iz špinače v primerjavi z ekstrakcijo izvedeno s samim topilom (Černelič in sod., 2013).

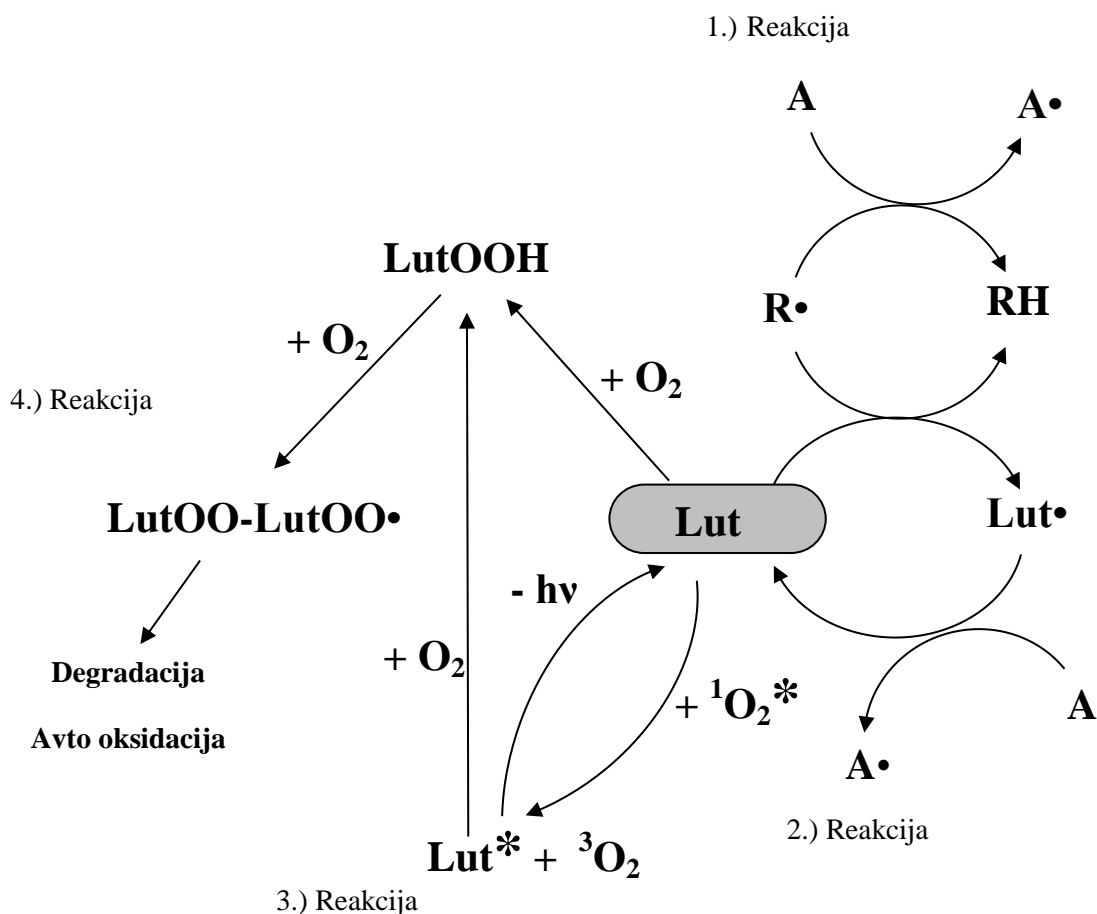
Preglednica 3: Koncentracija luteina ekstrahiranega iz štirih različnih liofiliziranih vzorcev špinacije z etanolom, etanolom z 0,1 % TBHQ, etanolom z 0,1 % BHT v zračni in dušikovi atmosferi.

Table 3: The concentration of luteine extracted from four different samples of lyophilized spinach with ethanol, ethanol with 0,1 % TBHQ and ethanol with 0,1 % BHT in air and nitrogen atmosphere.

Vzorec	Topilo	Lutein mg/100g	
		zrak	dušikova atmosfera
1	EtOH	8,49	9,52
	EtOH z 0,1 % TBHQ	9,22	10,67
	EtOH z 0,1 % BHT	8,80	9,82
2	EtOH	6,74	7,54
	EtOH z 0,1 % TBHQ	7,10	8,01
	EtOH z 0,1 % BHT	7,16	7,58
3	EtOH	5,57	6,26
	EtOH z 0,1 % TBHQ	6,10	6,26
	EtOH z 0,1 % BHT	5,81	6,37
4	EtOH	7,84	7,64
	EtOH z 0,1 % TBHQ	8,01	7,68
	EtOH z 0,1 % BHT	7,66	7,88
Srednja vrednost	EtOH	7,16 (100,0 %)	7,74 (108,1 %)
	EtOH z 0,1 % TBHQ	7,61 (106,2 %)	8,16 (113,9 %)
	EtOH z 0,1 % BHT	7,36 (102,7 %)	7,91 (110,5 %)

Za 100 % ekstrakcijo smo uporabili ekstrakcijo narejeno v zraku in brez prisotnosti antioksidantov.

Statistično značilne razlike pri ekstrakciji luteina iz špinacije ob prisotnosti zraka obstajajo med etanolom, etanolom z dodanim TBHQ-jem in etanolom z dodanim BHT-jem. Pri ekstrakciji izvedeni v dušikovi atmosferi obstajajo statistično značilne razlike med ekstrakcijo luteina izvedeno z etanolom in etanolom z dodanim TBHQ-jem, ne pa med etanolom in etanolom z dodanim BHT-jem ($p < 0,001$).



Slika 24: Shematski prikaz nekaterih možnih razgradnih poti luteina med ekstrakcijo z etanolom. Eliminacija radikalov (Reakcija 1), obnova luteina (Reakcija 2), lovljenje radikalov (Reakcija 3), nastanek peroksilnega adjukta (Reakcija 4) (Černelič in sod., 2013).

Figure 24: Schematic presentation of some possible path of lutein degradation during the extraction with ethanol. Elimination of radicals (Reaction 1), restoration of lutein (Reaction 2), quenching of radicals (Reaction 3), peroxy adducts (Reaction 4) (Černelič et al., 2013).

Kot dodatna pomembna potrditev zaščitne funkcije antioksidanta TBHQ so bili rezultati objavljeni v članku Orset in sod., (1999), kjer so ugotovili, da je pri shranjevanju β -karotena razpad le-tega pri procesu sušenja z razprševanjem ob dodatku antioksidanta TBHQ najmanjši, večji ob dodatku α -tokoferola, medtem ko dodatek antioksidanta BHT ni imel vpliva na stabilnost. Pri uporabi tokoferolacetata kot antioksidanta, je bila razgradnja β -karotena višja v primerjavi s kontrolno skupino.

4.2.5 Primerjava izkoristkov ekstrakcij v prisotnosti zraka in pod dušikovo atmosfero

Izkoristki ekstrakcij luteina v štirih vzorcih špinače s tremi različnimi topili so prikazani v Preglednici 4. Povprečni izkoristki pri ekstrakciji izvedeni v zraku so bili med 89,1 % in 93,6 %, pri ekstrakciji izvedeni v dušikovi atmosferi pa okoli 98 %. Najvišji izkoristek smo opazili pri ekstrakciji z dodanim antioksidantom TBHQ izvedeni v dušikovi atmosferi. Ti rezultati dodatno kažejo na občutljivost luteina med ekstrakcijo brez dodatnih antioksidantov in v atmosferi, kjer je prisoten kisik (Černelič in sod., 20013). Naša skoraj 100 % ekstrakcija je zelo preprosta in hitra v primerjavi s 30-urno ekstrakcijo, ki so jo izvedli Liu in sod., (2007) in z ekstrakcijo narejeno v štirih korakih, kot jo je opisal Kopsell s sodelavci (2006).

Preglednica 4: Izkoristki luteina iz štirih vzorcev špinače z etanolom, etanolom z 0,1 % TBHQ in etanolom z 0,1 % BHT, v temi v prisotnosti zraka in v temi v dušikovi atmosferi.

Table 4: Results for recovery of lutein extraction with ethanol, ethanol with 0,1 % TBHQ and ethanol with 0,1 % BHT protected from the light and protected from the light and under nitrogen.

Vzorec	Topilo	Izkoristek (%), (RSD)	
		zrak	dušikova atmosfera
1	EtOH	88,2	97,3
	EtOH z 0,1 % TBHQ	90,4	98,0
	EtOH z 0,1 % BHT	93,3	95,7
2	EtOH	93,9	97,8
	EtOH z 0,1 % TBHQ	96,4	93,4
	EtOH z 0,1 % BHT	92,1	97,1
3	EtOH	83,4	97,4
	EtOH z 0,1 % TBHQ	85,7	100,1
	EtOH z 0,1 % BHT	74,6	103,1
4	EtOH	90,9	99,6
	EtOH z 0,1 % TBHQ	95,4	102,0
	EtOH z 0,1 % BHT	95,5	95,4
Povprečje	EtOH	89,1 (4,3 %)	98,0 (0,9 %)
	EtOH z 0,1 % TBHQ	92,0 (5,3 %)	98,4 (3,2 %)
	EtOH z 0,1 % BHT	93,6 (1,8 %)	97,8 (3,2 %)

Statistično značilne razlike pri izkoristku ekstrakcije luteina iz špinače obstajajo med izkoristkom ekstrakcije izvedene v prisotnosti zraka in izkoristkom v dušikovi atmosferi ($p < 0,05$). Med izkoristki izvedenimi z različnimi topili v prisotnosti zraka ne obstajajo statistično značilne razlike, prav tako ni statistično značilnih razlik med izkoristki ekstrakcij s tremi različnimi topili izvedenimi v dušikovi atmosferi.

4.2.6 Vpliv časa ekstrakcije na vsebnost luteina pri ekstrakciji liofilizirane špinače s 15% 1M TEAA (pH 7) v acetonu

V nekaterih literaturnih virih poročajo o izgubi in degradaciji karotenoidov med HPLC analizo. Za boljše eluiranje luteina so uporabili dodatek trietilamina (TEA) ali amonijevega acetata v mobilno fazo (Oliver in Palou, 2000, Hart in Scott, 1995), ki pa ima tudi negativne vplive pri kromatografiji, kot so povišan tlak, »tailing« kromatografkega vrha. Temu se lahko izognemo z dodatkom 1 M TEAA (pH 7). Dodatek TEAA mobilni fazi naj bi stabiliziral eluiranje luteina skozi HPLC kolono in preprečil razpad luteina med samo kromatografijo (Simonovska in sod., 2013) iz česar lahko povzamemo, da TEAA deluje kot antioksidant in ščiti lutein pred njegovim razpadom pri HPLC analizi. Pri ekstrakciji liofilizirane špinače v acetonu s 15% 1 M TEAA (pH 7) izvedene v dušikovi atmosferi pri različnih časih, smo ugotovili, da čas ekstrakcije od 5 do 120 min nima bistvenega vpliva na določeno vsebnost luteina. Najvišjo vrednost luteina ekstrahiranega iz špinače smo določili pri 60 minutni ekstrakciji (Preglednica 5).

Preglednica 5: Vpliv časa ekstrakcije na vsebnost luteina pri ekstrakciji liofilizirane špinače s 15% 1M TEAA pH 7 v acetonu, v dušikovi atmosferi (Simonovska in sod., 2013).

Table 5: Effect of extraction time on the lutein yield obtained by extraction of lyophilized spinach with the mixture of 15 % 1 M TEAA pH 7 in acetone, under nitrogen (Simonovska et al., 2013).

Ekstrakcijski čas (min)	Lutein (mg/100g)	RSD (%), n=3
5	7,00	3,99
10	6,98	0,61
30	7,01	3,54
45	6,98	0,01
60	7,28	0,4
120	6,98	0,86

4.2.7 Vpliv dodanih sintetičnih antioksidantov ekstrakcijskemu topilu acetonu s 15% 1M TEAA (pH 7) na ekstrakcijo v zraku in dušikovi atmosferi

Pri 2 min ekstrakciji luteina v acetonu s 1 M TEAA (pH 7), in topilu z dodanima 0,1 % TBHQ in 0,1 % BHT iz vzorcev špinače v zračni atmosferi smo določili pozitiven vpliv dodanih antioksidantov (Preglednica 6), medtem ko se pri 15 min ekstrakciji luteina iz špinače v dušikovi atmosferi vpliv dodanih antioksidantov ni pokazal. Iz rezultatov lahko sklepamo, da pri uporabi acetona, kot ekstrakcijskega topila, kakor v eksperimentih z ekstrakcijskim topilom etanol in njemu dodanima TBHQ in BHT, antioksidanti zaščitijo lutein pred kisikom, pri ekstrakciji narejeni v dušikovi atmosferi, pa vpliv antioksidantov ni opažen, zaradi odsotnosti kisika.

Preglednica 6: Primerjava koncentracij luteina ekstrahirane s 15 % TEAA v acetonu iz liofiliziranega vzorca špinače po 2 min vorteksiranja v zraku in 15 min mešanjem z magnetnim mešalom v dušikovi atmosferi (Simonovska in sod., 2013).

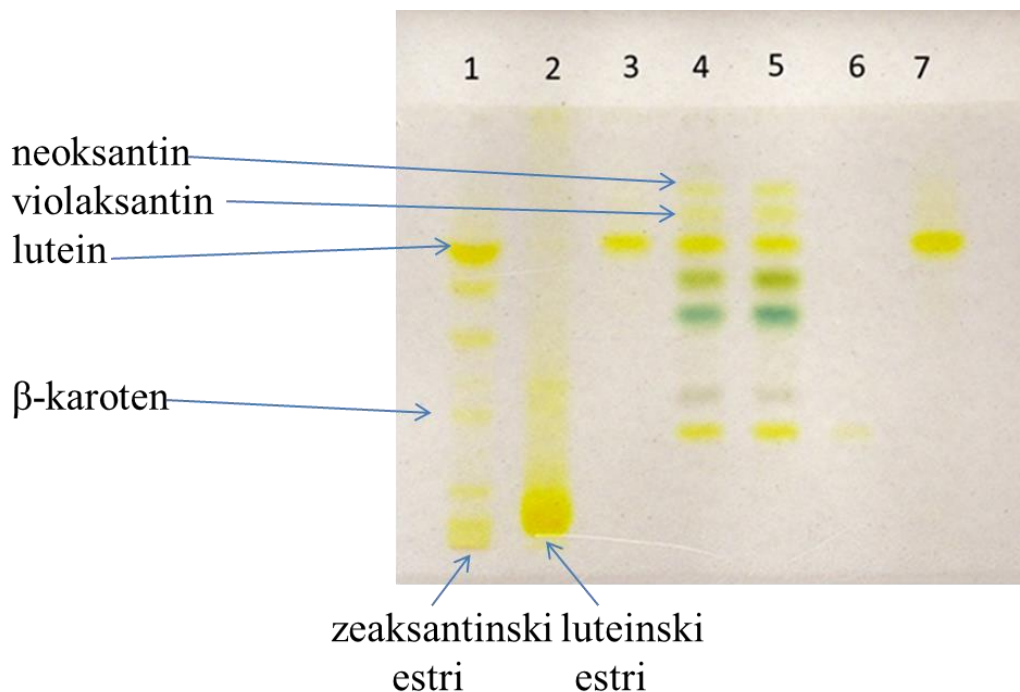
Table 6: Comparison of lutein yields obtained from lyophilized spinach sample at extractions performed with 15 % TEAA in acetone by 2 min vortexing or 15 min magnetic stirring under nitrogen (Simonovska et al., 2013).

Topilo	Lutein mg/100g (RSD)	
	Zrak	dušikova atmosfera
aceton	11,7 (2,28)	14,1(2,10)
aceton z 0,1 % TBHQ	13,5 (1,56)	13,8(4,55)
aceton z 0,1 % BHT	13,9 (1,43)	13,9(2,37)

4.3 VSEBNOST LUTEINA V EKSTRAKTIH OZKOLISTNEGA OHROVTA IN ČEMAŽA

Ekstrakta ozkolistnega ohrovta in čemaža smo nanegli na TLC RP18 ploščo (Slika 25). Na podlagi primerjave R_F vrednosti lis standarda luteina lahko potrdimo prisotnost prostega luteina v ekstraktu čemaža in v ekstraktu ozkolistnega ohrovta. Za dodatno potrditev smo na

ploščo nanesti ekstrakt volčjega jabolka s prisotnostjo zeaksantinskih estrov in ekstrakt žametnic s prisotnostjo luteinskih estrov.



Slika 25: Ločba karotenoidov v ekstraktu ozkolistnega ohrovta in čemaža na TLC C18 RP plošč. Mobilna faza: metanol:acetone:n-heksan (70:20:15, v/v/v). Nanos 1: ekstrakt volčjega jabolka, nanos 2: ekstrakt žametnic, nanos 3: standard luteina, nanos 4: ekstrakt čemaža, nanos 5: ekstrakt ozkolistnega ohrovta, nanos 6: standard β -karotena, nanos 7: standard luteina.

Figure 25: Separation of the carotenoids of kale and wild garlick on TLC C18 RP plate. Developing system: methanol:acetone:n-hexane (70:20:15, v/v/v). Track 1: chinese lantern extract, track 2: marigold extract, track 3: lutein standard, track 4: wild garlic extract, track 5: kale extract, track 6: β -carotene standard, track 7: lutein standard.

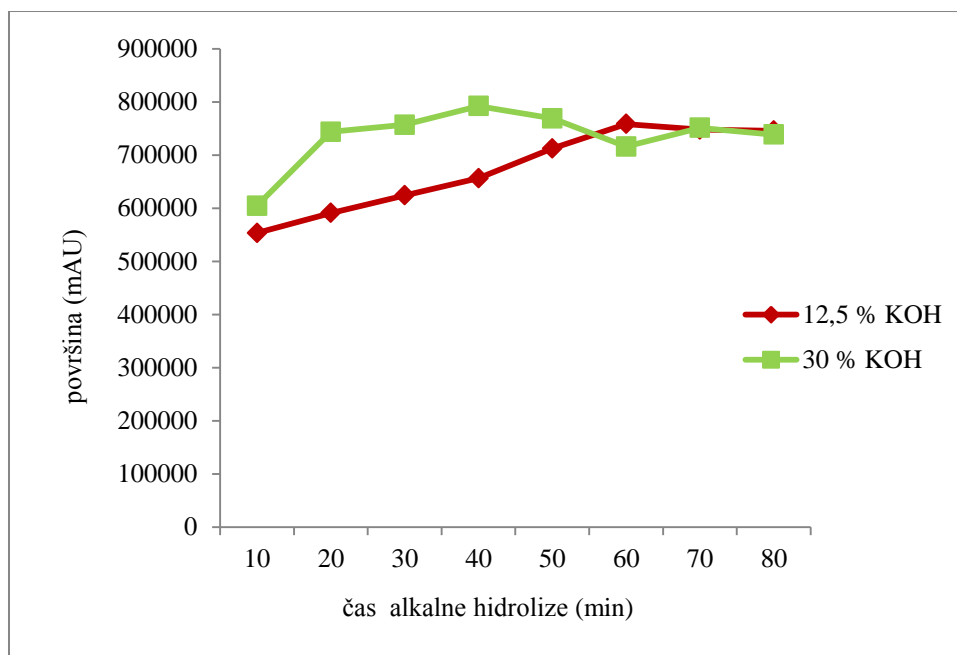
Za kvantitativno določitev vsebnosti luteina v ozkolistnem ohrovtu in čemažu smo uporabili HPLC metodo. Ekstrakcija ozkolistnega ohrovta in čemaža je bila izvedena z etanolom in etanolom z 0,1 % TBHQ. Vrh zeaksantina je bil komaj opazen, zato ga nismo upoštevali. Pri ekstrakciji iz ozkolistnega ohrovta z etanolom smo dobili 21,4 mg luteina na 100 g svežega vzorca in 21,8 mg luteina pri ekstrakciji istega vzorca z etanolom, z dodanim TBHQ. Pozitiven učinek dodanega antioksidanta TBHQ k ekstrakcijskemu topilu se je pokazal tudi pri analizi vzorca čemaža, kjer smo dobili 15,6 mg luteina, medtem ko smo pri ekstrakciji s samim etanolom dobili 14,7 mg luteina na 100 g svežega vzorca.

Rezultati HPLC analize nam kažejo, da vsebuje čemaž več, ozkolistni ohrovt pa celo dvakrat več luteina kot špinača.

4.4 VPLIV RAZLIČNIH KONCENTRACIJ KOH PRI SAPONIFIKACIJI NA DOLOČANJE LUTEINA V ŽAMETNICAH IN ZEAKSANTINA V NAVADNEM VOLČJEM JABOLKU

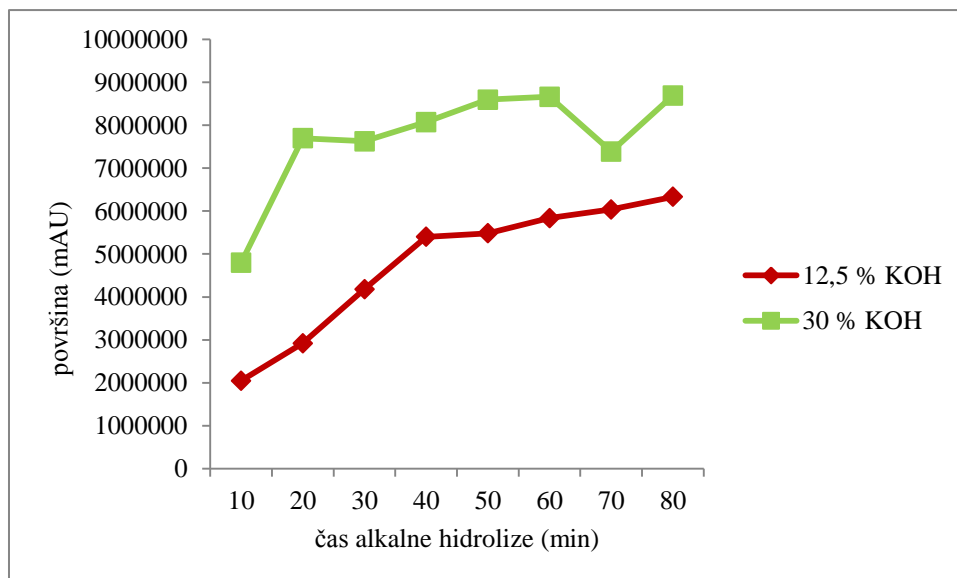
Pri saponifikaciji 10 mg suhega in zmletega vzorca žametnic s 12,5 in 30 % KOH in pri saponifikaciji 50 mg suhega zmletega vzorca volčjega jabolka prav tako s 12,5 in 30 % KOH smo ugotovili, da ob uporabi 30 % KOH nismo dobili nižjih rezultatov. Izmerjeni rezultati kažejo, da je uporaba bolj koncentrirane KOH zelo smiselna, ker omogoča hitrejšo in tudi popolno hidrolizo estrske vezi.

Nekateri literaturni viri navajajo saponifikacijo direktno na vzorec npr. k 1g vzorca *Tagetes patula* L. je bilo dodano 20 ml 15 % KOH, saponifikacija je potekala pri 60 °C 1 uro (Bhattacharyya in sod., 2010). Drugi literaturni viri pa navajajo, da se predhodno pripravljenemu ekstraktu doda 40 % KOH in saponifikacija je potekala pri 56 °C 20 minut (Pratheesh in sod., 2009), oz. 5-6% KOH pri sobni temperaturi 1-2 uri (Britton, 1995). Verjeten razlog za toliko različnih postopkov saponifikacije opisanih v literaturi je delno tudi v različni količini analiziranega vzorca. V primeru 10 mg žametnic ni bilo bistvenih razlik med uporabo 12,5 in 30 % KOH (Slika 26). V primeru volčjega jabolka (50 mg zatehte) pa je bila koncentracije baze pomembna. Glede na rezultate prikazane na Sliki 27, v primeru uporabe 12,5 % KOH hidroliza estrske vezi ni potekla do konca.



Slika 26: Prikaz saponifikacije 10 mg čašnih listov žametnic z 12,5 in 30 % KOH.

Figure 26: Saponification of 10 mg of grounded marigold petals with 12,5 and 30 % KOH.



Slika 27: Prikaz saponifikacije 50 mg zmlatih lampinjončkov volčjega jabolka z 12,5 in 30 % KOH.

Figure 27: Saponification of 50 mg grounded chinese lantern with 12,5 and 30 % KOH.

4.5 VPLIV DODANEGA CoQ₁₀ IN LIPOJSKE KISLINE (ALA) V KRMO PIŠČANCEV NA VSEBNOST LUTEINA IN ZEAKSANTINA V PLAZMI PIŠČANCEV

V sodelovanju s Perutnino Ptuj d.d., Fakulteto za kmetijstvo in biosistemske vede v Mariboru in Biotehniško fakulteto v Ljubljani smo izvedli poskus pri katerem smo preučevali vpliv raznih krmnih dodatkov na vzrejo piščancev broilerjev. Za nemoteno in ekonomično prirejo je pomembna antioksidacijska zaščita, ki jo predstavlja krma in razni dodatki. V krmi je več kot 50 % koruze, zato sta lutein in predvsem zeaksantin v znatni meri prisotna v krmi kokoši in piščancev. Zaradi svojih lastnosti lahko v času reje služita kot pokazatelja dela antioksidacijske zaščite. S tem namenom smo razvili analizno metodo, s katero smo ocenjevali koncentracijo luteina in zeaksantina v plazmi piščancev. S HPLC analizo smo ju določali, da bi ugotovili vpliv krmi dodanega CoQ₁₀ in ALA, ki imata močne antioksidativne lastnosti. Karotenoidi so v določenih pogojih glavni nosilci antioksidativne aktivnosti, vendar v bioloških sistemih niso pravi člen antioksidativne mreže (Hagen in sod., 2000). Za razliko od LMWA, ki se reducirajo in oksidirajo reverzibilno in se ne uničijo med preprečevanjem oksidacije spojin, karotenoidi reagirajo s singletnim kisikom, energija iz vzbujenega kisika pa se prenese na molekule karotenoidov in okolico. Pri tem procesu se molekula karotenoida ne uniči in je lahko večkrat uporabljena. Karotenoidi, ki v prisotnosti kisika reagirajo s prostimi radikali in pri tem niso zaščiteni z drugimi antioksidanti, so podvrženi peroksidaciji. Večja kot je koncentracija kisika, bolj so podvrženi uničenju.

CoQ₁₀ in lipojska kislina sta antioksidanta, ki jih organizem proizvaja sam. CoQ₁₀ je lipofilna molekula, lipojska kislina pa se nahaja tako v lipofilnem kot hidrofilnem okolju, poleg tega pa je s svojo majhno molekulsko maso sposobna prehajati skozi membrano (Packer in sod., 1995).

Morebitne razlike celokupne vsebnosti antioksidanta luteina in zeaksantina smo spremljali v treh časovnih intervalih reje piščancev v različnih skupinah s pomočjo gradientne HPLC metode. V Preglednici 7 so prikazane vrednosti luteina in zeaksantina v plazmi kontrolne skupine piščancev, skupini z dodanim CoQ₁₀ krmi piščancev, z dodano lipojsko kislino in z dodano mešanico CoQ₁₀ in lipojske kisline. Najnižja koncentracija luteina in zeaksantina je bila izmerjena pri 28 dnevju, a razlike niso bile statistično značilne. Pri 40. dnevju je opaziti nekoliko, statistično neznačilno višje vrednosti luteina in zeaksantina v vseh skupinah razen kontrolni. Pri vseh treh odvzemih smo nekoliko večjo koncentracijo luteina in zeaksantina

določili v piščancih, krmljenih z dodatkom lipojske kisline, vendar razlike med skupinami niso statistično značilne.

Preglednica 7: Vsebnost luteina in zeaksantina (mg/L) v plazmi piščancev krmljenih z dodatkom CoQ₁₀, lipojske kisline (ALA) ter kombinacije CoQ₁₀ in lipojske kisline.

Table 7: Lutein and zeaxanthin concentration (mg/L) in plasma of chickens fed feed supplemented with CoQ₁₀, lipoic acid and combination CoQ₁₀ and lipoic acid.

Čas reje (dan)	lutein in zeaksantin (mg/L)			
	kontrolna skupina	CoQ ₁₀	ALA	CoQ ₁₀ + ALA
16	22,28	23,08	24,78	22,93
28	16,33	16,43	17,96	16,26
40	15,74	20,87	21,51	19,88

4.6 MERJENJE KAROTENOIDOV V PREHRANSKIH DOPOLNILIH S KONFOKALNIM RAMAN MIKROSKOPOM

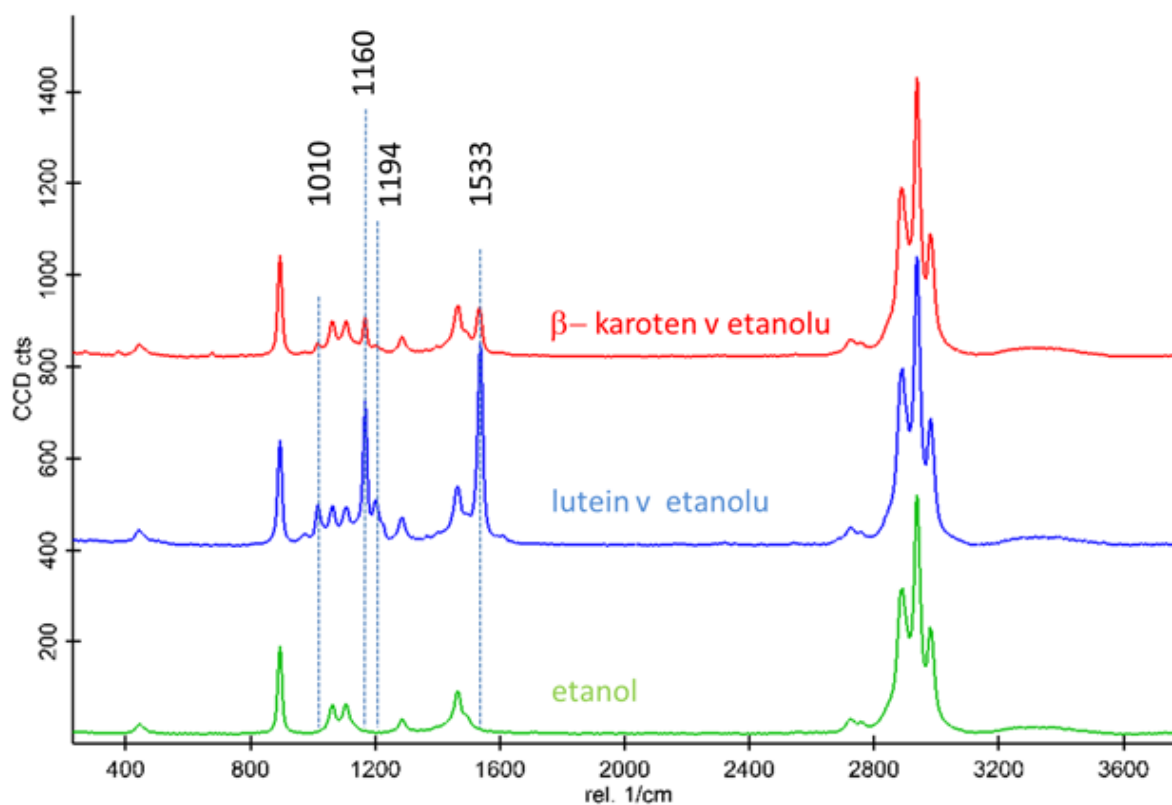
Raziskave s pomočjo ramanske spektroskopije karotenoidov nam daje koristne informacije o celokupnem telesnem antioksidativnem stanju. Karotenoidi se po organizmu prenašajo s pomočjo LDL, zato je njihova koncentracija v korelaciji z drugimi maščobotopnimi antioksidanti, kot npr. vitaminom E ali CoQ₁₀. Povišana koncentracija karotenoidov odraža višjo stopnjo antioksidativne zaščite. Metode resonančne ramanske spektroskopije se že vrsto let uporabljajo za raziskovanje karotenoidov v bioloških sistemih, tudi pri človeku. S to neinvazivno, hitro, varno in točno analizo kože človeka ugotovijo količino karotenoidov z uporabo optičnih signalov poznanih kot raman signali. Ti signali identificirajo karotenoide, ne da bi pri tem nastale motnje drugih molekul (Smidt, 2003).

Slika 28 predstavlja ramanske spektre etanola ter etanolnih raztopin luteina in β -karotena. Iz primerjave spektrov je razvidno, da so na spektru β -karotena poleg trakov, ki pripadajo etanolu, prisotni tudi trakovi značilni za karotenoide, in sicer trak, ki ustreza konjugirani C=C

raztezni vibraciji, C-C vibraciji vezani na C-CH₃ raztezanje ali C-H upogibanju v ravnini in CH₃ raztezanju (Rimai in sod., 1973). Vsi trije trakovi so tudi prisotni na spektru raztopine luteina.

V spektru raztopine luteina in β-karotena opazimo trakove pri 1533, 1194, 1160 in 1010 cm⁻¹, ker imata enako število konjugiranih vezi v osnovni verigi. Pri luteinu se konjugacija nadaljuje v obroč, zaradi česar opazimo intenzivnejši trak značilen za C-C vibracije pri 1194 cm⁻¹. Zaradi zelo podobnih ramanskih spektrov obeh antioksidantov težko ločimo med luteinom in β-karotenom v živilih, prehranskih dopolnilih oz. standardnih raztopinah, nam pa ta tehnika konfokalnega ramanskega mikroskopa lahko služi za celokupno vrednotenje karotenoidov v preiskovanem materialu.

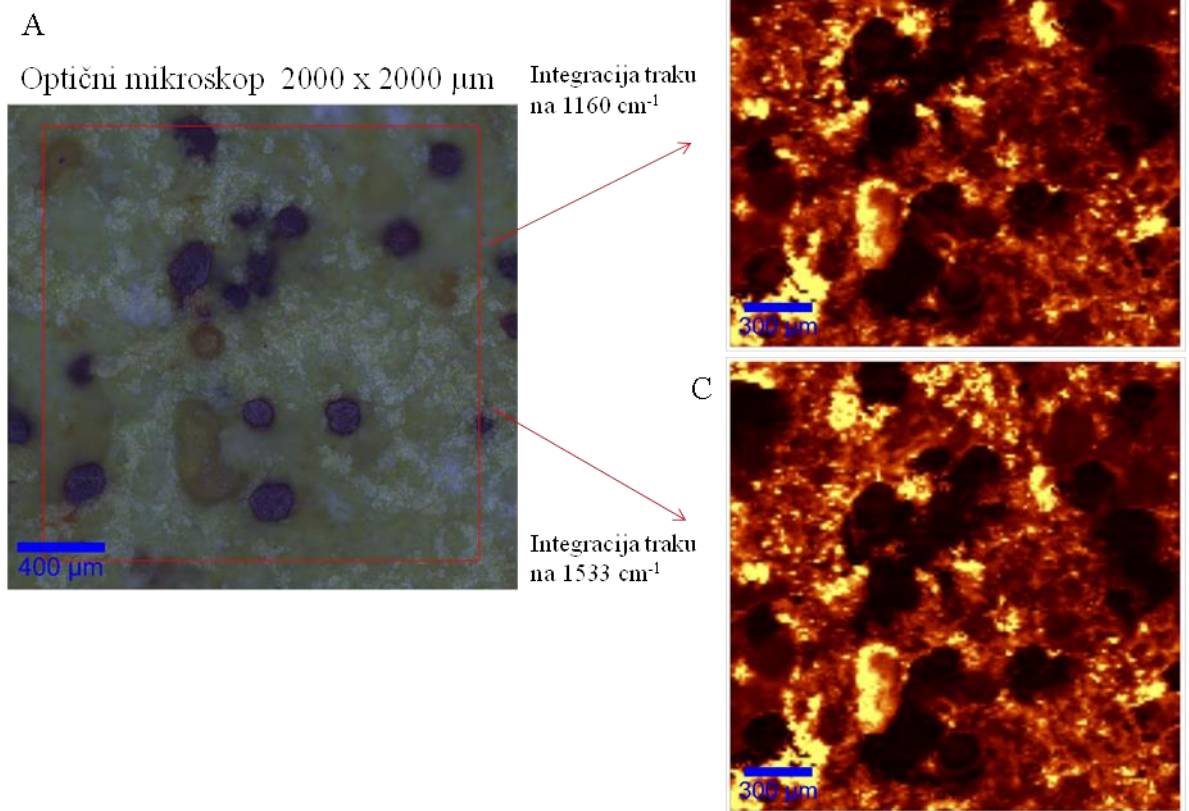
Pri ramanski analizi s pomočjo konfokalnega raman mikroskopa lahko vidimo porazdelitev iskane spojine v prehranskem dopolnilu v obliki tablete. Slika 29A prikazuje posnetek optičnega mikroskopa z 20-kratno povečavo preko območja 2000 x 2000 μm, na kateri so jasno razvidni skupki s premerom 200 μm, po integraciji ramanskih spektrov območja z visoko intenziteto traku pri 1160 cm⁻¹ (Slika 29B) in področja z visoko intenziteto traku pri 1533 cm⁻¹ (Slika 29C).



Slika 28: Ramanski spekter etanola, raztopine luteina v etanolu in raztopine β -karotena v etanolu.

Figure 28: The Raman spectrum of ethanol, lutein solution in ethanol and β -carotene solution in ethanol.

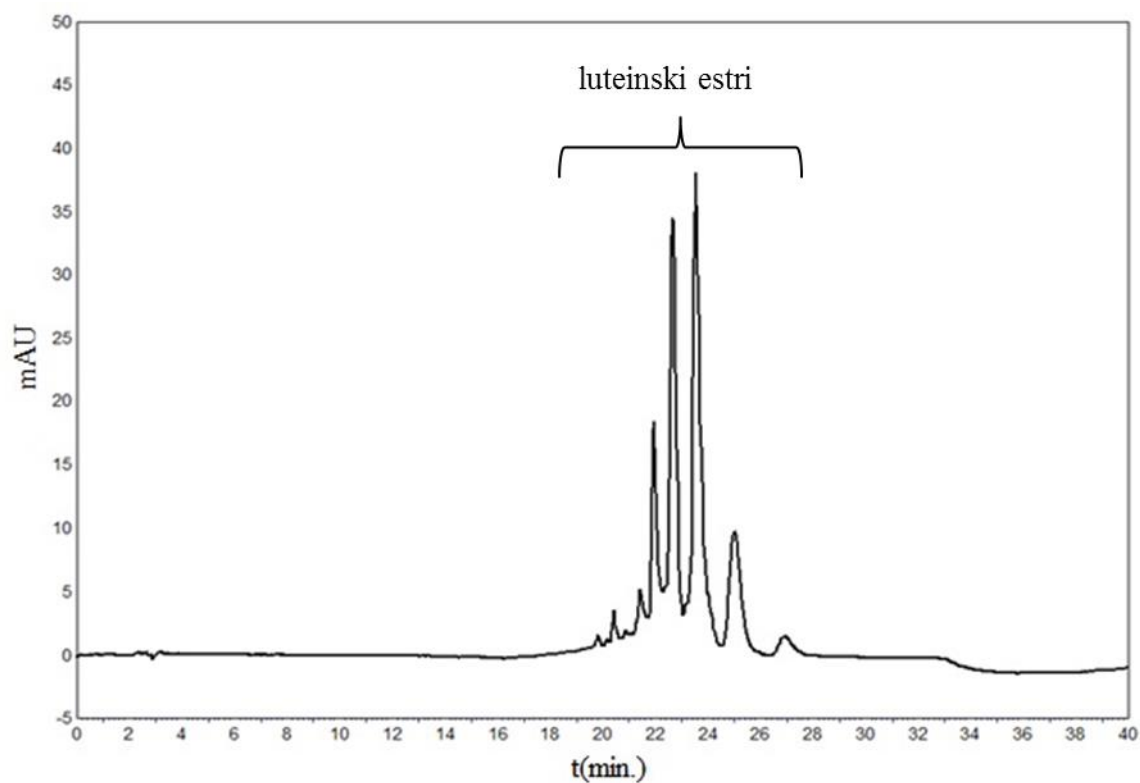
Mapiranje 2000 x 2000 μm



Slika 29: Posnetek prereza prehranskega dopolnila A z optičnim mikroskopom z označenim predelom ramanskega mapiranja (A), integracija značilnega traku na območju mapiranja za lutein pri 1160 cm^{-1} (B) in 1533 cm^{-1} (C).

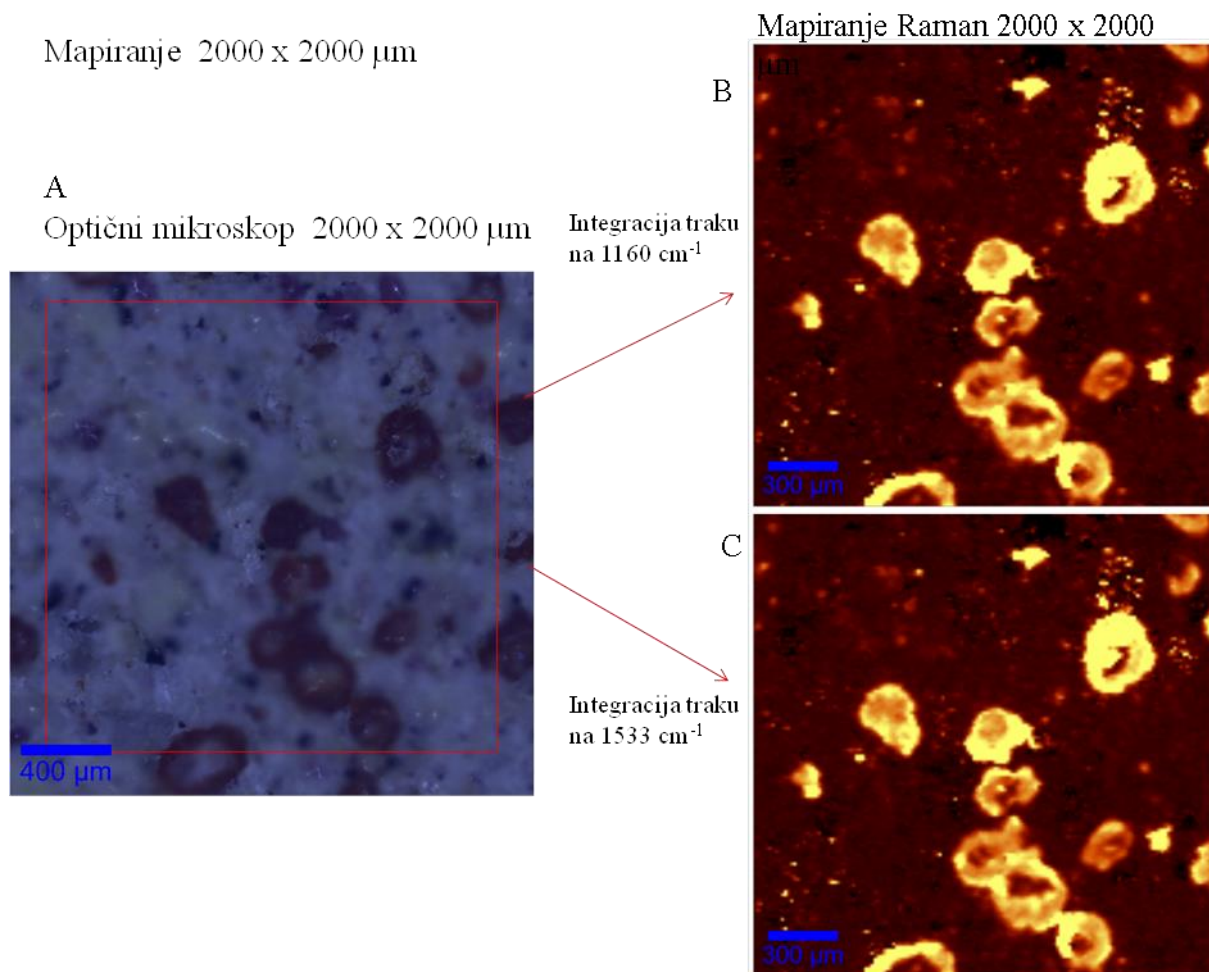
Figure 29: Recording of optical microscope cross-section of food supplements A indicating the raman mapping (A), integration characteristic band in the mapping of lutein in the 1160 cm^{-1} (B) and 1533 cm^{-1} (C).

S HPLC analizo smo v primeru prehranskega dopolnila A potrdili prisotnost zaestrenih oblik luteina (Slika 30), medtem ko smo v primeru prehranskega dopolnila B s HPLC analizo določili prosti lutein (Slika 32). Iz rezultatov analize je razvidno, da je lutein v prehranskem dopolnilu B v skupkih, ki so neenakomerno porazdeljeni in veliki od 100 – 400 μm , povprečno okrog 350 μm . Z ramansko analizo prehranskega dopolnila B smo opazili večje skupke velike do 400 μm (Slika 31), za katere lahko na podlagi analize jasno potrdimo, da so to območja, ki pripadajo prostemu nezaestrenemu luteinu, saj tako v primeru integracije traku pri 1160 cm^{-1} (Slika 31B), kot tudi integracije traku pri 1533 cm^{-1} (Slika 31C) dobimo visoko intenziteto trakov na istih območjih skupkov, ki so opazni že z optičnim mikroskopom.



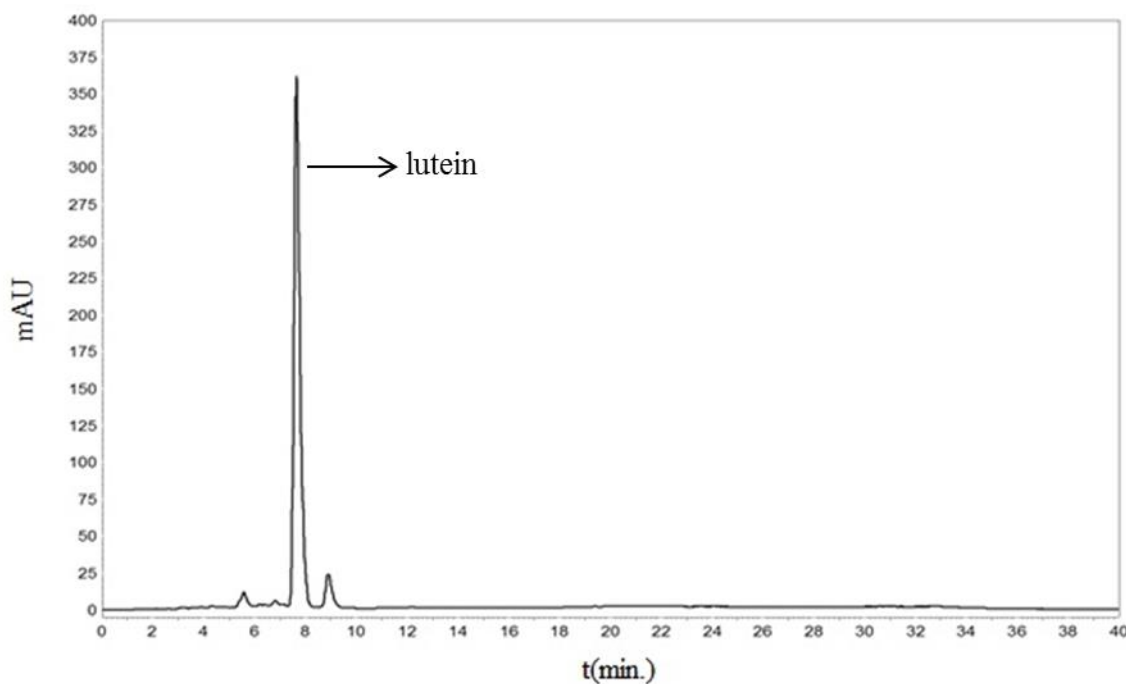
Slika 30: Kromatogram ekstrakta prehranskega dopolnila A pri 450 nm, HPLC ločbe prikaza prisotnosti luteinskih estrov.

Figure 30: Chromatogram of a food supplement A extract at 450 nm, HPLC separation as demonstration for the presence of lutein esters.



Slika 31: Posnetek prereza prehranskega dopolnila B z optičnim mikroskopom z označenim predelom ramanskega mapiranja (A), integracija značilnega traku na območju mapiranja za lutein pri 1160 cm^{-1} (B) in 1533 cm^{-1} (C).

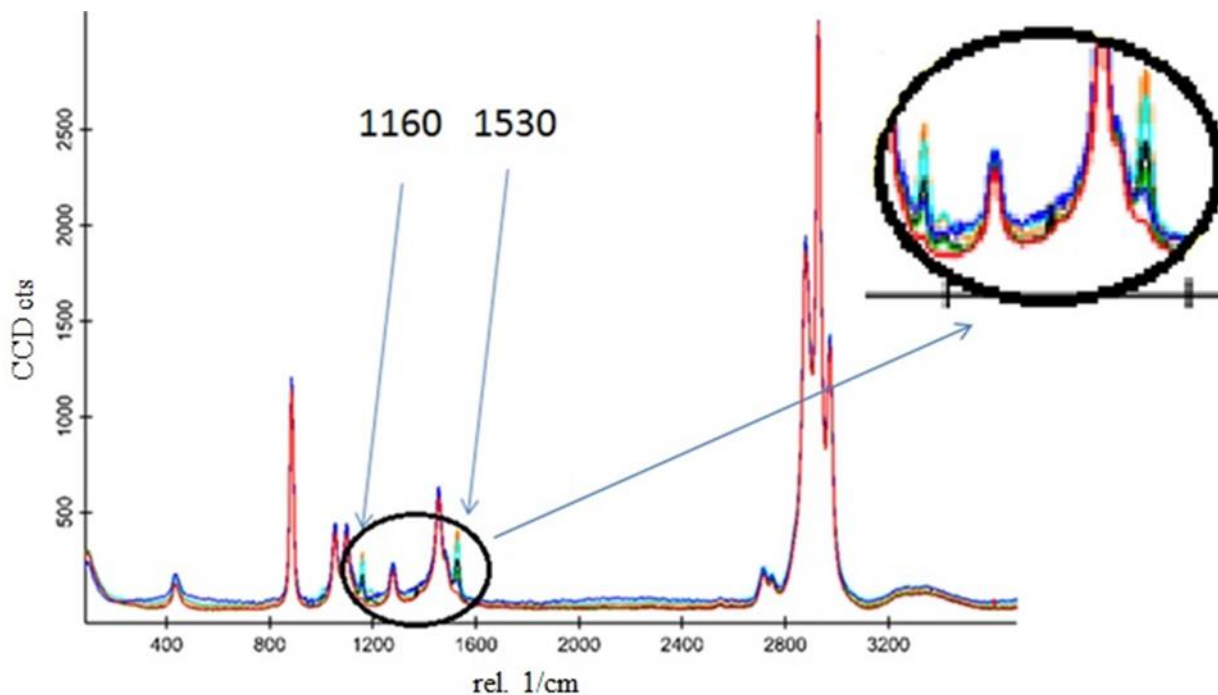
Figure 31: Recording of optical microscope cross-section of food supplements B indicating the raman mapping (A), integration characteristic band in the mapping of lutein in the 1160 cm^{-1} (B) and 1533 cm^{-1} (C).



Slika 32: Kromatogram ekstrakta prehranskega dopolnila B, pri 450 nm, HPLC ločbe prikaza prisotnosti prostega luteina.

Figure 32: Chromatogram of a food supplement B extract, HPLC separation as demonstration for the presence of free lutein.

S pripravo umeritvene krivulje luteina v etanolu, prikazano na Sliki 33, smo dokazali naraščanje intenzitete trakov pri 1160 cm^{-1} in 1530 cm^{-1} . Ker sta trakova 1160 cm^{-1} in 1530 cm^{-1} značilna za vse karotenoide bi lahko z ramansko spektroskopijo določevali le celokupno koncentracijo karotenoidov v vzorcu, medtem ko je za določitev vsebnosti posameznih karotenoidov še vedno potrebno izvesti HPLC analizo. Zelo verjetno pa bi z uporabo ramanske spektroskopije lahko hitro in neinvazivno določili vsebnost celokupnih karotenoidov v posameznem vzorcu.



Slika 33: Ramanski spektri umeritvene krivulje luteina.

Figure 33: Raman spectra of calibration curve of lutein.

4.7 KOLIČINA ZAUŽITEGA LUTEINA IN ZEAKSANTINA S HRANO

Raziskava v petih evropskih državah: Angliji, Irski, Španiji, Franciji in Nizozemski narejena na ljudeh od 25. do 45. leta starosti je pokazala, da je največji celokupni dnevni vnos petih karotenoidov: α in β -karotena, luteina, likopena in β -kriptoksantina pri Francozih, 16,1 mg/dan, in najmanjši pri Špancih, 9,5 mg/dan, medtem ko je povprečje 14 mg/dan. Irci in Angleži največ luteina vnesejo v organizem z uživanjem graha, medtem ko je pri ostalih največji izvor luteina špinača (O'Neill in sod., 2001). Po podatkih, ki jih je predstavil Riso s sod. (2004), naj bi s 150 mg špinače v organizem vnesli 9 mg luteina in 4 mg β -karotena.

Toksičnost luteina so proučevali na podganah, katerim so dali 4, 40 in 400 mg luteina/kg telesne teže. Tudi po 13 tednih ni bilo podatka o smrti, spremembi telesne teže, apetita, masi organov ali kakih drugih neželenih stranskih učinkih (Harikumar in sod., 2008).

Pri eksperimentu analiziranja špinače kupljene istega dne na ljubljanski tržnici in analiziranih v istem laboratoriju z istimi topili in pogoji dela smo dobili vrednosti od 5,5 do 8,5 mg luteina

v 100 g špinače analizirane zaščiteno pred svetlobo in od 6,3 do 10,7 mg luteina v 100 g špinače analizirane v dušikovi atmosferi in zaščitene pred svetlobo. Iz dobljenih rezultatov sklepamo, da je karotenoide zelo težko analizirati, zaradi njihovega razpada v prisotnosti kisika, svetlobe, kovin in kislin. Vsekakor z dobljenimi rezultati lahko trdimo, da že s 100 g zelene zelenjave zaužijemo zadostno dnevno količino karotenoidov.

S strani potrošnika je potrebno sprejeti v zakup dejstvo, da je večina naše hrane termično obdelane. Pri tem ni zanemarljiv podatek, da je večina sveže zelenjave in sadja v trgovinah izpostavljena fluorescenčni svetlobi. Primerjanje objavljenih rezultatov o vsebnosti količine luteina in zeaksantina je zahtevno, ker so različne analizirane vrste hrane različno obdelane in različno dolgo skladiščene pri različnih temperaturah in svetlobi, kar vpliva na končno vrednotenje.

5 SKLEPI

Na podlagi rezultatov lahko oblikujemo naslednje sklepe:

- Za določanje luteina, zeaksantina, neoksantina, violaksantina, klorofila b, klorofila a in β -karotena smo razvili HPLC gradientno metodo z uporabo acetona in destilirane vode, z detekcijo pri 450 nm, na koloni ProntoSil C30.
- Za določanje prisotnosti luteinskih estrov, zeaksantinskih estrov in luteina oz. zeaksantina smo razvili HPLC gradientno metodo z uporabo acetona, destilirane vode ter etilacetata, z detekcijo pri 450 nm, na koloni ProntoSil C30.
- Za določanje luteina in zeaksantina smo razvili HPLC gradientno metodo z uporabo metanola, 1-propanola in vode, z detekcijo pri 450 nm, na koloni Luna 3 μ C18(2).
- Za kvalitativno določanje luteina, β -karotena, neoksantina in violaksantina smo razvili TLC metode na 60 CN F254s plošči in na RP18 HPTLC plošči. Ločba na RP18 HPTLC nam omogoča prikaz prisotnosti zaestrene oblike luteina in zeaksantina. Luteina in zeaksantina nismo uspeli ločiti.
- Razvili smo metodo ločbe in detekcije neoksantina, violaksantina, luteina, klorofila b, klorofila a in β -karotena v špinači s sklopljeno tehniko TLC-MS.
- Pri eksperimentalnem delu smo uporabili majhen, a reprezentativen vzorec (10 mg) in uporabili relativno nestrupena topila za ekstrakcijo in kromatografijo.
- Pri ekstrakciji v atmosferskem zraku, TBHQ dodan ekstrakcijskemu topilu zviša izplen ekstrakcije za 6 %, medtem ko BHT za 3 % glede na referenčno ekstrakcijo v samem topilu.
- Pri ekstrakciji v dušikovi atmosferi smo v primerjavi z ekstrakcijo v atmosferskem zraku pri sobni temperaturi dobili 8 % višje vrednosti luteina pri ekstrakciji z etanolom, skoraj 14 % višje vrednosti pri ekstrakciji z etanolom z dodanim TBHQ-jem in 10,5 % višje vrednosti pri ekstrakciji z etanolom z dodanim BHT-jem.
- Najvišji izkoristek ekstrakcije luteina iz špinače smo določili pri ekstrakciji narejeni v dušikovi atmosferi in z dodanim antioksidantom TBHQ.

- Pri 5, 10, 30, 45, 60 in 120 min ekstrakciji vzorca špinače v acetonu z 1 M TEAA (pH 7) smo dobili primerljive vsebnosti luteina, najvišjo vrednost smo dobili pri 60 min ekstrakciji.
- Pri ekstrakciji v zračni atmosferi smo z dodanima 0,1 % TBHQ in 0,1 % BHT acetonu z 1 M TEAA (pH7) dobili višje vsebnosti luteina. Vpliv dodanih antioksidantov pri ekstrakciji v dušikovi atmosferi ni bil opažen.
- Določili smo vsebnost luteina v vzorcu čemaža in ozkolistnega ohrovta in pri obeh določili višjo vsebnost luteina pri ekstrakciji z etanolom z dodanim TBHQ glede na referenčno ekstrakcijo v etanolu.
- Pri saponifikaciji vzorca žametnic in volčjega jabolka s 12,5 in 30 % KOH smo ugotovili, da 30 % KOH omogoča hitrejšo in tudi popolno hidrolizo estrske vezi
- S pomočjo HPLC metode smo določili celokupno vsebnost luteina in zeaksantina v plazmi piščancev krmljenih z brez ali z dodatkom antioksidantov CoQ₁₀ in lipojske kisline. Statistično značilnih razlik med skupinami nismo ugotovili
- Z ramansko spektrometrijo smo prikazali porazdelitev luteina in luteinskih estrov v dveh prehranskih dopolnilih. Prepričani smo, da bi z razvojem te metode lahko določili koncentracijo karotenoidov v človeku na neinvaziven način preko merjenja na koži.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Človeški organizem marsikatero spojino z antioksidativnim učinkom ni sposoben sintetizirati, zato je zanj nujno potrebno uživanje rastlin oz. prehranskih dopolnil za delovanje in izboljšanje obrambnega mehanizma. Posledično se v zadnjih letih povečuje zanimanje za antioksidante, kot sta lutein in zeaksantin. Kljub povečanemu zanimanju pa v dosedanjih objavah nismo zasledili večjega poudarka na razvoju priprave vzorca in analitskih metod, ki bi bolj učinkovito prispevale k njunem ovrednotenju v preiskovanih materialih. Predvsem pri ekstrakciji, kjer sta lutein in zeaksantin ob prisotnosti kisika podvržena pro-oksidaciji, zato je bil namen pričujočega doktorskega dela izboljšati proces priprave vzorca in ugotoviti morebiten vpliv drugih antioksidantov na samo pripravo vzorcev rastlinskega izvora, kot tudi delovanje luteina in zeaksantina v antioksidativni mreži pri živalih.

S primerjavo rezultatov ekstrakcije luteina z etanolom in z etanolom z dodanim BHT oz. TBHQ izvedene v zračni atmosferi in v dušikovi atmosferi smo poskušali določiti vlogo različnih pogojev. Ekstrakcija narejena v dušikovi atmosferi in z dodanim antioksidantom TBHQ-jem, je dala najvišje vsebnosti luteina v špinači, pa tudi najvišji izkoristek. Vpliv antioksidantov je bil bolj izrazit pri ekstrakcijah, ki so bile izvedene v zračni atmosferi oziroma manjši v tistih, ki so bile izvedene v dušikovi atmosferi. Prišli smo do zaključka, da je pri delu z luteinom najbolje delati v dušikovi atmosferi z dodatkom TBHQ, saj le tako preprečimo oksidacijo luteina. Poleg špinače smo uporabnost postopka ekstrakcije preverili in dokazali tudi na drugih tipih rastlinskih vzorcev, kot sta ozkolistni ohrovt in čemaž. V slednjem smo prvi določili vsebnost luteina.

Glede na to, da je objavljenih že mnogo raziskav, kjer prikazujejo delovanje luteina in zeaksantina kot uspešnega nizkomolekularnega antioksidanta, smo v naši raziskavi poskušali ugotoviti vlogo luteina v antioksidativni mreži. Med rejo piščancev smo spremljali koncentracijo luteina in zeaksantina ob dodatku antioksidantov (CoQ₁₀, lipojska kislina) v krmo. V treh časovno različnih odvzemih vzorcev smo nekoliko, statistično neznačilno večjo vsebnost luteina in zeaksantina določili v skupini, ki ji je bila dodana lipojska kislina.

Razvili smo HPLC metodo z uporabo dvokomponentne mobilne faze acetona in vode in uporabo reverznofazne kolone za določanje sledečih analitov: luteina, zeaksantina, neoksantina, violaksantina, β -karotena, α -karotena, klorofila a in klorofila b. Metoda se je izkazala uporabna, tudi v primeru večjega števila analiz. Učinkovitost separacije HPLC metode smo dokazali tudi z MS detekcijo eluiranih kromatografskih vrhov. Razvili smo tudi HPLC metodo, s katero ločimo prisotnost zaestrene oz. proste oblike luteina in zeaksantina.

Prav tako smo razvili dve TLC metodi za ločitev luteina, violaksantina, neoksantina in β -karotena, tako na HPTLC CN kot na HPTLC RP18 ploščah. Na slednjih smo potrdili iskane spojine z masnim detektorjem direktno s plošč s pomočjo TLC-MS vmesnika. Na HPTLC RP18 ploščah smo razvili tudi metodo za ločitev zaestrenih in prostih oblik luteina oz. zeaksantina, vendar pa s TLC metodo nismo uspeli ločiti strukturna izomera luteina in zeaksantina.

Kromatografske metode smo nadgradili tudi z določanjem porazdelitve karotenoidov v prehranskem dopolnilu s pomočjo raman konfokalnim mikroskopom. Ta metoda za enkrat še ne omogoča določitve posameznega karotenoida v preiskovanem materialu, ampak lahko na neinvaziven način določimo le celokupno koncentracijo oz. porazdelitev karotenoidov v preiskovanem materialu. V živalskih organizmih pa bi z analizo karotenoidov s konfokalnim raman mikroskopom določili celokupno količino karotenoidov preiskovanega organizma, ki bi nam dalo pomemben podatek o delovanju antioksidativne mreže v preiskovanem organizmu.

6.2 SUMMARY

Human organism is not capable of synthesizing of many molecules with antioxidative capabilities, it is very important to ingest different vegetables or food supplements for function and improvement of defense mechanism. In the last past years there has been growing interest for antioxidants such as lutein and zeaxanthin. In spite of increased interest, we could not find sufficient emphasis in development of sample preparation and analytic methods that would more efficiently contribute to evaluation of investigated materials from current publications. Particularly with extraction, when lutein and zeaxanthin undergo to peroxidation in the presence of oxygen. One of intentions in this study was better sample preparation and determination of possible influence of other antioxidants on sample preparation from plants and influence of lutein and zeaxanthin within antioxidant net at animal.

We tried to determine role of various conditions with comparison of results when extracting lutein with solvent only and added BHT or TBHQ to solvent, made in air atmosphere and nitrogen atmosphere. Extraction made in nitrogen atmosphere with addition of antioxidant TBHQ, gave best recovery and highest content of lutein in spinach. Better influence of antioxidants was shown with extractions made in nitrogen atmosphere. Conclusion for best practice when working with lutein is use of nitrogen atmosphere with addition of TBHQ which results in prevention of pro-oxidative action of lutein itself. Efficiency of extraction on spinach sample was also confirmed on kale sample and wild garlic sample. Till now content of lutein in wild garlic was not reported in any research or publication.

Many publications show that lutein and zeaxanthin are successful low-molecular antioxidants. Determination of this research was to find influence of lutein within antioxidant net. While breeding of chicken, concentration of lutein and zeaxanthin was monitored when antioxidants (CoQ₁₀, lipoic acid) were added to chicken feed. Organism is capable of synthesize CoQ₁₀ and lipoic acid antioxidants by itself. CoQ₁₀ is lipophilic molecule and lipoic acid is found in both lipophilic and hydrophilic environment. Lipoic acid low molecular weight allows to penetrate cell membrane (Packer et al., 1995). Already known fact is that lipoic acid regenerates CoQ₁₀ molecule (Packer et al., 1995). In three different time collected samples, the somewhat,

statistically insignificantly higher concentration of lutein and zeaxanthin was analysed in the group in which lipoic acid was added.

HPLC analysis of the major carotenoids has been performed using a reversed-phase column, using acetone and water as a mobile phase. The method has been developed and used for the determination of main carotenoids: lutein, zeaxanthin, neoxanthin, violaxanthin, β -carotene, α -carotene, and chlorophyll a and b. Developed HPLC method is used to distinguish between the presence of esterified and free form of lutein and zeaxanthin.

Two TLC methods were developed for separation of lutein violaxanthin, neoxanthin and β -carotene on HPTLC CN and HPTLC RP18 plates. We have identified certain compounds with mass spectrometer directly from plates with use of TLC-MS interface. With method on HPTLC RP18 plates we also managed to separate esterified and free form of lutein and zeaxanthin.

In this research we have upgraded existing chromatographic methods by determination of distribution of carotenoids in the food supplements using raman confocal microscope. Current state of developed method does not allow determination of individual carotenoids in test sample. It can be non-invasive way to determine a concentration of overall and distribution of carotenoids in test sample.

7 VIRI

- Alves-Rodrigues A., Shao A. 2004. The science behind lutein. *Toxicology Letters*, 150: 57-83
- Aman R., Carle R., Conrad J., Beifuss U., Schieber A. 2005. Isolation of carotenoids from plant materials and dietary supplements by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1074: 99-105
- Aruna G., Baskaran V. 2010. Comparative study on the levels of carotenoids lutein, zeaxanthin and β -carotene in Indian spices of nutritional and medicinal importance. *Food Chemistry*, 123: 404-409
- Bartley G.E., Scolnik P.A. 1995. Plant carotenoids: Pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell*, 7: 1027-1038
- Bertram J.S. 1999. Carotenoids and gene regulation. *Nutrition Reviews*, 57: 182-191
- Bhattacharyya S., Datta S., Mallick B., Dhar P., Ghosh S. 2010. Lutein content and *in vitro* antioxidant activity of different cultivars of indian marigold flower (*Tagetes patula* L.) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 8259–8264
- Biewenga G., Haenen G.R., Bast A. 1997. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *General Pharmacology*, 29, 3: 315-331
- Bone R.A., Landrum J.T., Hime G.W, Cains A., Zamor J. 1993. Stereochemistry of the human macular carotenoids. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 34: 2033-2040
- Bone R.A., Landrum J.T., Friedes L.M., Gomez C.M., Kilburn M.D., Menendez E., Vidal I., Wang W. 1997. Distribution of lutein and zeaxanthin stereoisomers in the human retina. *Experimental Eye Research*, 64: 211-218
- Böhm F., Edge R., Truscott T.G. 2012. Interactions of dietary carotenoids with singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and free radicals: potential effects for human health. *Acta Biochimica Polonica*, 59: 27-33

- Bottino A., Degl'Innocenti E., Guidi L., Graziani G., Fogliano V. 2009. Bioactive compounds during storage of fresh-cut spinach: The role of endogenous ascorbic acid in the improvement of product quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 2925–2931
- Brady W.E., Mares-Perlman J.A., Bowen P., Stacewicz-Sapuntzakis M. 1996. Human serum carotenoid concentrations are related to physiologic and lifestyle factors. *Journal of Nutrition*, 126: 129-137
- Britton G. 1995. Example 1: Higher plants. V: Carotenoids. Vol. 1A: Isolation and analysis. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (eds.). Basel, Birkhäuser Verlag: 201-214
- Britton G., Khachik F. 2009. Carotenoids in food. V: Carotenoids. Vol. 5: Nutrition and health. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (eds.). Basel, Birkhäuser Verlag: 45-66
- Britton G. 2008. TLC of carotenoids. V: Thin layer chromatography in phytochemistry. Waksmundzka-Hajnos M., Sherma J., Kowalska T. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 544-572
- Bruins A.P. 1991. Mass spectrometry with ion sources operating at atmospheric pressure. *Mass Spectrometry Reviews*, 10: 53–77
- Buettner G.R., Jurkiewicz B.A. 1996. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiation Research*, 145: 532-541
- Bunea A., Andjelkovic M., Socaciu C., Bobis O., Neacsu M., Verhé R., Van Camp J. 2008. Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Food Chemistry*, 108: 649-656
- Burmeister A., Bondiek S., Apel L., Kühne C., Hillebrand S., Fleischmann P. 2011. Comparison of carotenoid and anthocyanin profiles of raw and boiled *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja* tubers. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24: 865-872
- Canene-Adams K., Erdman Jr. J.W. 2009. Absorption, transport, distribution in tissues and bioavailability. V: Carotenoids. Vol. 5: Nutrition and health. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (eds.). Basel, Birkhäuser Verlag: 115-144

- Cardinault N., Abalain J.H., Sairafi B., Coudray C., Grolier P., Rambeau M., Carre J.L., Mazur A., Rock E. 2005. Lycopene but not lutein nor zeaxanthin decreases in serum and lipoproteins in age-related macular degeneration patients. *Clinica Chimica Acta*, 357: 34-42
- Chen N., Bianchi T.S., Bland J.M. 2003. Novel decomposition products of chlorophyll-a in continental shelf (Louisiana shelf) sediments: formation and transformation of carotenol chlorin esters. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67: 2027-2042
- Chung H.-Y., Rasmussen H.M., Johnson E.J. 2004. Lutein bioavailability is higher from lutein-enriched eggs than from supplements and spinach in men. *Journal of Nutrition*, 134: 1887-1893
- Citak S., Sonmez S. 2010. Effects of conventional and organic fertilization on spinach (*Spinacea oleracea* L.) growth, yield, vitamin C and nitrate concentration during two successive seasons. *Scientia Horticulturae*, 126: 415-420
- Craft N.E., Soares J.H. 1992. Relative solubility, stability, and absorptivity of lutein and β -carotene in organic solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 431-434
- Černelič K., Simonovska B., Vovk I. 2009. Lutein in zeaksantin v špinači in ohrovtu. V: Slovenski kemijski dnevi 2009, Maribor, 24.-25. september. Glavič P., Brodnjak Vončina D. (ur.). Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 132-132
- Černelič K., Simonovska B., Vovk I., Albreht A. 2010a. TLC-MS method for detection of neoxanthin, violaxanthin, lutein and beta-carotene. V: 28th International symposium on chromatography, Valencia, 12.-16. September 2010. Valencia, Spanish Society of Chromatography and Related Techniques: 522-522
- Černelič K., Simonovska B., Vovk I. 2010b. The influence of adding antioxidants TBHQ and BHT to ethanol at extraction of lutein from spinach. V: Abstract book and final programme of 10th International nutrition & diagnostics conference, Prague, 4-7 September 2010. Pardubice, Univerzita Pardubice: 101-101

- Černelič K., Prosek M., Golc-Wondra A., Rodić Z., Simonovska B., Puklavec M. 2013. Influence of synthetic antioxidants on extraction of all-*trans*-lutein from spinach under air and nitrogen atmosphere. *Food and Nutrition Sciences*, 4: 195-200
- Dachtler M., Glaser T., Kohler K., Albert K. 2001. Combined HPLC-MS and HPLC-NMR on-line coupling for the separation and determination of lutein and zeaxanthin stereoisomers in spinach and in retina. *Analytical Chemistry*, 73: 667-674
- Deming D.M., Erdman Jr. J. W. 1999. Mammalian carotenoid absorption and metabolism. *Pure and Applied Chemistry*, 71: 2213-2223
- Demmig-Adams B., Adams W. 1996. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science*, 1: 21-26
- During A., Dawson H.D., Harrison E.H. 2005. Carotenoid transport is decreased and expression of the lipid transporters SR-BI, NPC1L1, and ABCA1 is down regulated in Caco-2 Cells treated with ezetimibe. *Journal of Nutrition*, 135: 2305-2312
- Edge R., Land E.J., McGarvey D., Mulroy L., Truscott T.G. 1998. Relative one-electron reduction potentials of carotenoid radical cations and the interactions of carotenoids with the vitamin E radical cation. *Journal of the American Chemical Society*, 120: 4087-4090
- Edge R., Land E.J., Rozanowska M., Sarna T., Truscott T.G. 2000. Carotenoid radical-melanin interactions. *Journal of Physical Chemistry B*, 104: 7193-7196
- Ermakov I.V., Scharifzadeh M., Bernstein P.S., Gellermann W. 2010. Application of resonance raman spectroscopy to the detection of carotenoids *in vivo*. V: Carotenoids: physical, chemical and biological functions and properties. Landrum J.T. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 87-109
- Eye Disease Case Control Study Group. 1993. Antioxidant status and neovascular age-related macular degeneration. *Archives of Ophthalmology*, 111: 104-109
- Eugster C.H. 1995a. History: 175 years of carotenoid chemistry. V: Carotenoids. Vol. 1A: Isolation and analysis. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (eds.). Basel, Birkhäuser Verlag: 1-12

- Eugster C.H. 1995b. Chemical derivatization: Microscale tests for the presence of common functional groups in carotenoids. V: Carotenoids. Vol. 1A: Isolation and analysis. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (eds.). Basel, Birkhäuser Verlag: 71-80
- EFSA-European Food Safety Authority. 2010a. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to coenzyme Q10 and contribution to normal energy-yielding metabolism (ID 1508, 1512, 1720, 1912, 4668), maintenance of normal blood pressure (ID 1509, 1721, 1911), protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage (ID 1510), contribution to normal cognitive function (ID 1511), maintenance of normal blood cholesterol concentrations (ID 1721) and increase in endurance capacity and/or endurance performance (ID 1913) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Journal, 8, 10: 1793, doi:10.2903/j.efsa.2010.1793: 27 str.
- EFSA-European Food Safety Authority. 2010b. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to alpha-lipoic acid and protection of body lipids from oxidative damage (ID 1434, 3134), maintenance of normal blood cholesterol concentrations (ID 3134), increased beta-oxidation of fatty acids (ID 3134), maintenance of normal blood glucose concentrations (ID 1435, 3162), and “regeneration of genes, regeneration of gene transcription and the influence to activity NF-kappa B” (ID 3133) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Journal, 8, 2: 1474, doi:10.2903/j.efsa.2010.1474: 18 str.
- EFSA-European Food Safety Authority. 2012. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to lutein and maintenance of normal vision (ID 1603, 1604, further assessment) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Journal, 10, 6: 2716, doi:10.2903/j.efsa.2012.2716: 17 str.
- EFSA-European Food Safety Authority. 2011. Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to lutein in combination with zeaxanthin, and maintenance of normal vision (ID 1606) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Journal, 9, 4: 2039, doi:10.2903/j.efsa.2011.2039: 14 str.

- Gandul-Rojas B., Cepero M.R., Míñquez-Mosquera M.I. 1999. Chlorophyll and carotenoid patterns in olive fruits, *Olea europaea* Cv. Arbequin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 2207–2212
- Glaser T., Lienau A., Zeeb D., Krucker M., Dachtler M., Albert K. 2003. Qualitative and quantitative determination of carotenoid stereoisomers in a variety of spinach samples by use of MSPD before HPLC-UV, HPLC-APCI-MS, and HPLC-NMR on-line coupling. *Chromatographia*, 57: S19-S25
- Gupta K., Wagle D.S. 1988. Nutritional and antinutritional factors of green leafy vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36: 472-474
- Hagen T.M., Vinarsky V., Wehr C.M., Ames B.N. 2000. (R)-alpha-lipoic acid reverses the age-associated increase in susceptibility of hepatocytes to tert-butylhydroperoxide both *in vitro* and *in vivo*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2: 473-483
- Hagiwara T., Yasuno T., Funayama K., Suzuki S. 1998. Determination of lycopene, α -carotene and β -carotene in serum by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry with selected-ion monitoring. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 708: 67-73
- Halliwell B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141: 312-322
- Hao P.-P. Ni J.-R., Sun W.-L., Huang W. 2007. Determination of tertiary butylhydroquinone in edible vegetable oil by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. *Food Chemistry*, 105: 1732–1737
- Harikumar K.B., Nimita C.V., Preethi K.C., Kuttan R., Shankaranarayana M.L., Deshpande J. 2008. Toxicity profile of lutein and lutein ester isolated from marigold flowers (*Tagetes erecta*). *International Journal of Toxicology*, 27: 1-9
- Hart D.J., Scott K.J. 1995. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chemistry*, 54: 101–111

- Inbaraj B.S., Chien J.T., Chen B.H. 2006. Improved high performance liquid chromatographic method for determination of carotenoids in the microalga *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Chromatography A*, 1102: 193-199
- Ishida N. 2011. Expanded separation technique for chlorophyll metabolites in Oriental tobacco leaf using non aqueous reversed phase chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218: 5810-5818
- Islam M.T. 2009. Antioxidant activities of dithiol alpha-lipoic acid. *Bangladesh Journal of Medical Science*, 8: 3-6
- Isler O. 1971. Carotenoids. Basel, Birkhäuser Verlag. Cit. po: Eugster C.H. 1995. History: 175 years of carotenoid chemistry. V: Carotenoids. Vol. 1A: Isolation and analysis. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (eds.). Basel, Birkhäuser Verlag: 1-12
- Jazbec-Križman P., Šmidovnik A., Golc Wondra A., Černelič K., Kotnik D., Križman M., Prošek M., Volk M., Holcman A., Nemeč Svete A. 2012. Quantitative determination of low molecular weight antioxidants and their effects on different antioxidants in chicken blood plasma. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 5: 743-754
- Jazbec-Križman P., Černelič K., Golc-Wondra A., Rodić Z., Prošek M., Prošek M. 2013. The importance of standardization in quantitative TLC - A retrospective and case studies. *JPC-Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 26: 299-305
- Johnson E.J., Krinsky N.I. 2009. Carotenoids and coronary heart disease. V: Carotenoids. Vol. 5: Nutrition and health. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (eds.) Basel, Birkhäuser Verlag: 287-300
- Kagan V.E., Shvedova A., Serbinova E., Khan S., Swanson C., Powell R., Packer L. 1992. Dihydropyridyl radical – a universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase. Reduction of peroxy, ascorbyl and chromanoxyl radicals. *Biochemical Pharmacology*, 44: 1637-1649
- Kalen A., Appelkvist E. L., Dallner G. 1989. Age-related changes in the lipid compositions of rat and human tissues. *Lipids*, 24: 579-584

- Karppia J., Nurmi T., Olmedilla-Alonso B., Granada-Lorencio F., Nyssönen K. 2008. Simultaneous measurement of retinol, α -tocopherol and six carotenoids in human plasma by using an isocratic reversed-phase HPLC method. *Journal of Chromatography B*, 867: 226–232
- Karrer P., Helfenstein A., Wehrli H., Wettstein A. 1930. Über die Konstitution des Lycopins und Carotins. *Helvetica Chimica Acta*, 13: 1084-1099. Cit. po: Eugster C.H. 1995. History: 175 years of carotenoid chemistry. V: Carotenoids. Vol. 1A: Isolation and analysis. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (eds.). Basel, Birkhäuser Verlag: 1-12.
- Kawazu Y., Okimura M., Ishii Tin Yui S. 2003. Varietal and seasonal differences in oxalate content of spinach. *Scientia Horticulturae*, 97: 203-210
- Kayser H. 1975. Fatty-acid esters of lutein in *Pieris brassicae* fed on natural and artificial diets. *Insect Biochemistry*, 5: 861-875
- Khachik F. 2006. Distribution and metabolism of dietary carotenoids in humans as a criterion for development of nutritional supplements. *Pure and Applied Chemistry*, 78: 1551–1557
- Khachik F., Bertram J.S., Huang M.-T., Fahey J.W., Talalay P. 1999. Dietary carotenoids and their metabolites as potentially useful chemoprotective agents against cancer. V: Antioxidant food supplements in human health. Packer L., Hiramatsu M., Yoshikawa T. (eds.). San Diego, Academic Press: 203-229
- Khachik F., Beecher G.R., Smith Jr. J.C. 1995. Lutein, lycopene, and their oxidative metabolites in chemoprevention of cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 59, Suppl. 22: 236-246
- Khachik F., Beecher G.R., Whittaker N. F. 1986. Separation, identification, and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34: 603-616
- Khachik F., Carvalho L., Bernstein P.S., Muir G.J., Zhao D.Y., Katz N.B. 2002. Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. *Experimental Biology and Medicine*, 227: 845-851

- Kidmose U., Knuthsen P., Edelenbos M., Justesen U., Hegelund E. 2001. Carotenoids and flavonoids in organically grown spinach (*Spinacia oleracea* L) genotypes after deep frozen storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81: 918-923
- King T.J., Khachik F., Bortkiewicz H., Fukushima L.H., Morioka S., Bertram J.S. 1997. Metabolites of dietary carotenoids as potential cancer preventive agents. *Pure and Applied Chemistry*, 69: 2135-2140
- Kopsell D.A., Lefsrud M.G., Kopsell D.E., Wenzel A.J., Gerweck C., Curran-Celentano J. 2006. Spinach cultivar variation for tissue carotenoid concentrations influences human serum carotenoid levels and macular pigment optical density following a 12-week dietary intervention. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 7998-8005
- Kopsell D.A., Kopsell D.E. 2006. Accumulation and bioavailability of dietary carotenoids in vegetable crops. *Trends in Plant Science*, 11: 499-507
- Krinsky N.I., Cronwell D.G., Oncley J.L. 1958. The transport of vitamin A and carotenoids in human plasma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 73: 233-246
- Lakshminarayana R., Aruna G., Sangeetha R.K., Bhaskar N., Divakar S., Baskaran V. 2008. Possible degradation/biotransformation of lutein *in vitro* and *in vivo*: isolation and structural elucidation of lutein metabolites by HPLC and LC-MS (atmospheric pressure chemical ionization). *Free Radical Biology and Medicine*, 45: 982-993
- Lefsrud M., Kopsell D., Wenzel A., Sheehan J. 2007. Changes in kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) carotenoid and chlorophyll pigment concentrations during leaf ontogeny. *Scientia Horticulturae*, 112: 136-141
- Lefsrud M., Kopsell D., Sams C., Wills J., Both A.J. 2008. Dry matter content and stability of carotenoids in kale and spinach during drying. *Hortscience*, 43: 1731-1736
- Lester R.L., Crane F.L. 1959. The natural occurrence of coenzyme Q and related compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 234: 2169-2175
- Lienau A., Glaser T., Tang G., Dolnikowski G.G., Grusak M.A., Albert K. 2003. Bioavailability of lutein in humans from intrinsically labeled vegetables determined by LC-APCI-MS. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 14: 663-670

- Littarru G.P., Langsjoen P. 2007. Coenzyme Q10 and statins: Biochemical and clinical implications. *Mitochondrion*, 7, Suppl. 1: S168-S174
- Liu Y., Perera C.O., Suresh V. 2007. Comparison of three chosen vegetables with others from South East Asia for their lutein and zeaxanthin content. *Food Chemistry*, 101: 1533-1539
- Loane E., Nolan J.M., O'Donovan O., Bhosale P., Bernstein P.S., Beatty S. 2008. Transport and retinal capture of lutein and zeaxanthin with reference to age-related macular degeneration. *Survey of Ophthalmology*, 53: 68-81
- Mortensen A. 2009. Supplements. V: Carotenoids. Vol. 5: Nutrition and health. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (eds.). Basel, Birkhäuser Verlag: 67-82
- Mortensen A., Skibsted L.H. 2000. Kinetics and mechanism of the primary steps of degradation of carotenoids by acid in homogeneous solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 279-286
- 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
- O'Connell O.F., Ryan L., O'Brien N.M. 2007. Xanthophyll carotenoids are more bioaccessible from fruits than dark green vegetables. *Nutrition Research*, 27: 258-264
- Oliver J., Palou A. 2000. Chromatographic determination of carotenoids in foods. *Journal of Chromatography A*, 881: 543-555
- Olmedilla B., Granado F., Blanco I., Vaquero M. 2003. Lutein, but not α -tocopherol, supplementation improves visual function in patients with age-related cataracts: a 2-y double-blind, placebo-controlled pilot study. *Nutrition*, 19: 21-24
- O'Neill M.E., Carroll Y., Corridan B., Olmedilla B., Granado F., Blanco I., Van den Berg H., Hininger I., Rousell A.M., Chopra M., Southon S., Thurnham D.I. 2001. A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study. *British Journal of Nutrition*, 85: 499-507

- Orset S., Leach G.C., Morais R., Young A.J. 1999. Spray-drying of the microalga *Dunaliella salina*: Effects on β -carotene content and isomer composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 4782–4790
- Packer L., Colman C. 1999. *The antioxidant miracle*. New York, John Wiley & Sons: 1-30
- Packer L., Witt E.H., Tritschler H.J. 1995. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology & Medicine*, 19: 227-250
- Perry A., Rasmussen H., Johnson E.J. 2009. Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22: 9-15
- Piccaglia R., Marotti M., Grandi S. 1998. Lutein and lutein ester content in different types of *Tagetes patula* and *T. erecta*. *Industrial Crops and Products*, 8: 45-51
- Pott I., Breithaupt D.E., Carle R. 2003 Detection of unusual carotenoid esters in fresh mango (*Mangifera indica* L. cv. 'Kent'). *Phytochemistry*, 64: 825-829
- Pratheesh V.B., Benny N., Sujatha C.H. 2009. Isolation, stabilization and characterization of xanthophyll from marigold flower- *Tagetes erecta* L. *Modern Applied Science*, 3: 19-28
- Prommuak C., De-Eknamkul W., Shotipruk A. 2008. Extraction of flavonoids and carotenoids from Thai silk waste and antioxidant activity of extracts. *Separation and Purification Technology*, 62: 444-448
- Prošek M., Pukl M. 1991. *Kvantitativna planarna kromatografija*. Ljubljana, Kemijski inštitut Boris Kidrič: 8-14
- Putzbach K., Krucker M., Albert K., Grusak M.A., Tang G., Dolnikowski G.G. 2005. Structure determination of partially deuterated carotenoids from intrinsically labeled vegetables by HPLC-MS and ^1H NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 671-677
- Rao A.V., Rao L.G. 2007. Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55: 207-216

- Ren D., Zhang S. 2008. Separation and identification of the yellow carotenoids in *Potamogeton crispus* L. *Food Chemistry*, 106: 410-414
- Rimai L., Heyde M.E., Gill D. 1973. Vibrational spectra of some carotenoids and related linear polyenes. Raman spectroscopic study. *Journal of the American Chemical Society*, 95: 4493–4501
- Riso P., Brusamolino A., Scalfi L., Porrini M. 2004. Bioavailability of carotenoids from spinach and tomatoes. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 14:150-156
- Rock C.L. 2009. Carotenoids and cancer.V: Carotenoids. Vol. 5: Nutrition and health. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (eds.). Basel, Birkhäuser Verlag: 269-286
- Rodić Z., Simonovska B., Albrecht A., Vovk I. 2012. Determination of lutein by high-performance thin-layer chromatography using densitometry and screening of major dietary carotenoids in food supplements. *Journal of Chromatography A*, 1231: 59– 65
- Rodriguez-Amaya. D.B. 2001. A guide to carotenoid analysis in foods. Washington, OMNI Research: 64 str.
- Sander L.C., Sharpless K.E., Pursch M. 2000. C30 stationary phases for the analysis of food by liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 880:189-202
- Schiedt K., Liaaen-Jensen S. 1995 Isolation and analysis. V: Carotenoids. Vol. 1A: Isolation and analysis. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (eds.). Basel; Birkhäuser Verlag, 81-108
- Schiedt K. 1995. Chromatography: Part III. Thin-Layer Chromatography, V: Carotenoids. Vol. 1A: Isolation and analysis. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (eds.). Basel, Birkhäuser Verlag, 131-144
- Schoefs B. 2004. Determination of pigments in vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1054: 217-226
- Sechrist J., Pachuski J., Sherma J. 2002. Quantification of lutein in dietary supplements by reversed-phased high-performance thin-layer chromatography with visible-mode densitometry. *Acta Chromatographica*, 12: 151-158

- Serrano J., Goñi I., Saura-Calixto F. 2005. Determination of beta-carotene and lutein available from green leafy vegetables by an in vitro digestion and colonic fermentation method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 2936-2940
- Sies H. 1991. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klinische Wochenschrift*, 69: 965-968
- Sies H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, 215: 213-219
- Simonovska B., Vovk I., Glavnik V., Černelič K. 2013. Effects of extraction and high-performance liquid chromatographic conditions on the determination of lutein in spinach. *Journal of Chromatography A*, 1276: 95-101
- Smidt C.R. 2003. Clinical screening study: Use of the pharmanex[®] biophotonic scanner to assess skin carotenoids as a marker of antioxidant status. Provo, Pharmanex: 5 str. <http://www.scannersuccess.com/nss-folder/scannerclinicals/Pharmanex%20Scanner%20Clinical.pdf> (junij, 2013)
- Stahl W. Sies H. 1999. Carotenoids: Occurrence, biochemical activities, and bioavailability. V: *Antioksidant food supplements in human health*. Packer L., Hiramatsu M., Yoshikawa T. (eds.). San Diego, Academic Press: 183-202
- Stahl W., Sies H. 2005. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1740: 101-107
- Šircelj H. 2008. Karotenoidi v fotosinteznem aparatu in odziv na stres. *Acta agriculturae Slovenica*, 91: 271-282
- Tapiero H., Townsend D.M., Tew K.D. 2004. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58: 100-110
- Taylor K.L., Brackenridge A.E., Vivier M.A., Oberholster A. 2006. High-performance liquid chromatography profiling of the major carotenoids in *Arabidopsis thaliana* leaf tissue. *Journal of Chromatography A*, 1121: 83-91

- Toledo M E.A., Ueda Y., Imahori Y., Ayaki. M. 2003. L-ascorbic acid metabolism in spinach (*Spinacia oleracea* L.) during postharvest storage in light and dark. *Postharvest Biology and Technology*, 28: 47-57
- Toman M.J., Toman Turuk D. 2013. Čemaž (*Allium ursinum* L.) in njegova zdravilna raba. Kamna Gorica, Daša Toman Turuk s.p.: 42 str.
- Tsao R., Yang R. 2006. Lutein in selected Canadian crops and agri-food processing by-products and purification by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1112: 202-208
- Tsao R., Yang R., Young J.C., Zhu H., Manolis T. 2004. Separation of geometric isomers of native lutein diesters in marigold (*Tagetes erecta* L.) by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1045: 65–70
- Wegner A., Khoramnia R. 2011. Cataract is a self-defence reaction to protect the retina from oxidative damage. *Medical Hypotheses*, 76: 741-744
- Weller P., Breithaupt D.E. 2003. Identification and quantification of zeaxanthin esters in plants using liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 7044–7049
- Willstätter R., Mieg W. 1907. Ueber die gelben begleiter des chlorophylls. *Liebigs Annalen der Chemie*, 355: 1-28. Cit. po: Eugster C.H. 1995. History:175 years of carotenoid chemistry. V: Carotenoids. Vol. 1A: Isolation and analysis. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. (eds.). Basel, Birkhäuser Verlag: 1-12
- Wrona M., Korytowski W., Roznanowska M., Sarna T., Truscott T.G. 2003. Cooperation of antioxidants in protection against photosensitized oxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 35: 1319-1329
- Zaikin V.G., Halket J. M. 2006. Derivatization in mass spectrometry: Soft ionization mass spectrometry of small molecules. *European Journal of Mass Spectrometry*, 12, 2: 79-11
- Zhang G.-F., Storozhenko S., Van Der Straeten D., Lambert. W.E. 2005. Investigation of the extraction behavior of the main monoglutamate folates from spinach by liquid

chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1078: 59–66

ZAHVALA

Delo sem opravila v Laboratoriju za prehrabeno kemijo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Posebna zahvala gre dr. Mirku Prošku za prenašanje znanja, vodenje, spodbujanje in vrednotenje rezultatov ter za vse nasvete.

Posebna zahvala gre tudi dr. Andreju Šmidovniku, dr. Alenki Golc-Wondra in Maji Milivojević-Fir za vso pomoč, nasvete in spodbude.

Za mentorstvo in življenjske izkušnje se zahvaljujem dr. Bredi Simonovski.

Za somentorstvo in nasvete se zahvaljujem prof. dr. Marjanu Simčiču.

Zahvaljujem se predsednici komisije prof. dr. Nataši Poklar Ulrich in članoma komisije prof. dr. Janezu Salobirju in doc. dr. Iztoku Jožetu Koširju za pregled doktorskega dela.

Za pomoč pri delu se zahvaljujem Mateji Puklavec, Zoranu Rodiću, Petri Jazbec-Križman, Alenu Albrehtu ter kolegom iz Laboratorija L-06.

Zahvaljujem se dr. Ivanu Jermanu za opravljene meritve z ramanskim spektrometrom.

Dr. Ireni Vovk se zahvaljujem za možnost opravljanja dela na Kemijskem inštitutu.

Hvala prijateljem Ivu, Mariji, Karolini in vsem ostalim, ki so mi stali ob strani.

Prav posebna zahvala gre družini za vse spodbude, podporo in pomoč v času študija.

Hvala Nejcju za vso potrpežljivost in ljubezen.