

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Miran HODNIK

**PRIMERJAVA ANTOOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI MODELNIH
ANTIOOKSIDANTOV IN PIJAČ DOLOČENE Z DPPH, ABTS IN
FOLIN-CIOTALTEU METODO**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**COMPARISON OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF MODEL
ANTIOXIDANTS AND BEVERAGES DETERMINED BY DPPH,
ABTS AND FOLIN-CIOTALTEU METHOD**

GRADUATION THESIS
Universtiy studies

Ljubljana, 2014

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Laboratorijsko delo je bilo v celoti opravljeno na Katedri za biokemijo in kemijo živil Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorja diplomskega dela je imenovan prof. dr. Blaž Cigić in za recenzentko prof. dr. Tatjana Košmerl.

Mentor: prof. dr. Blaž CIGIĆ

Recenzentka: prof. dr. Tatjana KOŠMERL

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

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

Miran Hodnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 663.094.3.097.8: 577.1: 543.637 (043)= 163.6
KG	pijače/antioksidanti/antioksidativna aktivnost/ fenolne spojine/analizne metode/ABTS/DPPH/Folin-Ciocalteu
AV	HODNIK, Miran
SA	CIGIĆ, Blaž (mentor) / KOŠMERL, Tatjana (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2014
IN	PRIMERJAVA ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI MODELNIH ANTIOKSIDANTOV IN PIJAČ DOLOČENE Z DPPH, ABTS IN FOLIN-CIOCALTEU METODO
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 62 str., 22 sl., 16 pregl., 59 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Nekatere raziskave kažejo, da imajo antioksidanti, ki jih najdemo v živilih, pozitiven učinek na zmanjšano pojavnost kroničnih bolezni, kot so rak, bolezni srca in ožilja. Zaradi tega obstaja velik interes, da se z različnimi <i>in vitro</i> metodami z merjenjem antioksidativne aktivnosti (AOA) ovrednoti antioksidativni potencial (AOP) živil. Najpogosteje uporabljene metode za določanje AOP v vzorcih živil in pijač so ABTS, DPPH in Folin-Ciocalteu. V okviru diplomske naloge smo analizirali kako topilo, v katerem merimo AOA, vpliva na določen AOP modelnih antioksidantov (MAO), nekaterih pijač in propolisa. Z radikalom ABTS smo določali AOP v metanolu, mQ vodi in v fosfatnem pufru pH 7,4. Po šestdeset minutni inkubaciji smo za vse MAO in pijače največji AOP določili v pufru pH 7,4, medtem ko med določenimi vrednostmi v metanolu in vodi ni bilo večjih razlik. Radikal DPPH ni topen v vodnih raztopinah, zato smo AOA merili v metanolu, v mešanici metanola in pufra pH 5 ter v mešanici metanola in pufra pH 7,4. Najmanjši AOP smo v vseh primerih določili v metanolu, medtem ko za večino MAO in pijač večjih razlik v določenem AOP pri pH 5 in pH 7,4 nismo določili. Določene vrednosti AOP smo izrazili kot troloksni ekvivalent in jih primerjali z rezultati pridobljenimi z metodo Folin-Ciocalteau (FC). Z izjemo klorogenske kisline in askorbinske kisline, kjer smo največji AOP določili s FC metodo, je pri ostalih MAO in vzorcih pijač meritev v fosfatnem pufru pH 7,4 z ABTS rezultirala v največjem določenem AOP.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND** Dn
- DC** UDC 663.094.3.097.8: 577.1: 543.637 (043)= 163.6
- KW** beverages/antioxidants/antioxidant activity/phenolic compounds/analitycal methods/ABTS/DPPH/Folin-Ciocalteu
- AU** HODNIK, Miran
- AA** CIGIĆ, Blaž (supervisor) / KOŠMERL, Tatjana (reviewer)
- PP** SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB** University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
- PY** 2014
- TI** COMPARISON OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF MODEL ANTIOXIDANTS AND BEVERAGES DETERMINED BY DPPH, ABTS AND FOLIN-CIOCALTEU METHOD
- DT** Graduation thesis (University studies)
- NO** XI, 62 p., 22 fig., 16 tab., 59 ref.
- LA** sl
- AL** sl/en
- AB** Some studies have shown that antioxidants found in foods have positive impact on lower incidence of chronic cardiovascular diseases and cancer. Accordingly there is a large interest to apply various *in vitro* methods for measuring antioxidant activity (AOA) in order to evaluate antioxidant potential (AOP) of foods. Methods that are most often applied are ABTS, DPPH and Folin-Ciocalteau (FC) assays. Within the diploma thesis we have analysed the influence of solvent composition, applied for measurement of AOA, on determined AOP of model antioxidants (MAO), some beverages and propolis. With ABTS radical AOP was determined in methanol, mQ water and in phosphate buffer pH 7,4. After sixty minute incubation the highest AOP for all MAO and beverages was determined in phosphate buffer pH 7,4, whereas values determined in mQ water and methanol were lower, but did not differ substantially. DPPH radical is not soluble in aqueous buffers therefore AOA was measured in methanol, mixture of methanol and buffer pH 5, and in mixture of methanol and buffer pH 7,4. The lowest AOP for all samples analyzed was determined in methanol, whereas for the majority of MAO and beverages differences in determined AOP at pH 5 and pH 7,4 were small. Values of AOP were expressed as Trolox equivalents and compared to the results of FC assay. With the exception of ascorbic acid and chlorogenic acid, where highest AOP was determined with FC assay, experiments in phosphate buffer pH 7,4 with ABTS resulted in highest determined AOP.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 CILJ DELA	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ANTIOKSIDANTI.....	3
2.2 PROSTI RADIKALI	3
2.3 FENOLNE SPOJINE KOT ANTIOKSIDANTI.....	5
2.3.1 Flavonoidi.....	7
2.4 ANTIOKSIDANTI V ANALIZIRANIH VZORCIH	9
2.4.1 Zeleni in črni čaj	9
2.4.2 Propolis	10
2.4.3 Jabolčni sok.....	12
2.4.3.1 Kvercetin	13
2.4.4 Rdeče in belo vino	13
2.4.4.1 Flavonoidi.....	15
2.4.4.1.1 Flavan-3-oli in proantocianidini	15
2.4.4.1.2 Antocianidini	15
2.4.4.1.3 Flavonoli	15
2.4.4.2 Neflavonoidi	16
2.4.4.2.1 Hidroksicimetne kisline.....	16
2.4.4.2.2 Hidroksibenzojske kisline	16
2.4.4.2.3 Stilbeni (skupina resveratrola).....	17
2.4.4.3 SO ₂ (žveplov dioksid).....	17
2.4.5 Določanje antioksidantov v vzorcih pijač.....	18
2.4.5.1 Določanje antioksidativnega potenciala z DPPH [•] radikalom	18

2.4.5.2 Določanje antioksidativnega potenciala z ABTS [•] radikalom	19
2.4.5.3 Določanje skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu reagentom	20
3 MATERIALI IN METODE	22
3.1 MATERIALI	22
3.1.1 Vzorci	22
3.1.2 Laboratorijska oprema	23
3.1.3 Reagenti	23
3.2 METODE DELA	25
3.2.1 Umeritvene krivulje.....	25
3.2.1.1 Umeritvena krivulja za Troloks s Folin-Ciocalteu metodo	25
3.2.1.2 Umeritvena krivulja za Troloks z ABTS metodo	25
3.2.1.3 Umeritvena krivulja za Troloks z DPPH metodo	26
3.2.2 Izvedba eksperimenta pri različnih časih inkubacije s Folin-Ciocalteu metodo	27
3.2.3 Vpliv topil na določen AOP z DPPH in ABTS.....	28
3.2.3.1 Določanje vpliva topila na AOP vzorcev in modelnih antioksidantov z ABTS pri 734 nm	28
3.2.3.2 Določanje vpliva topila na AOP vzorcev in modelnih antioksidantov z DPPH pri 520 nm	28
3.2.3.3 Določanje skupnih fenolnih spojin v vzorcih in modelnih antioksidantih s Folin-Ciocalteu reagentom	29
3.2.4 Kinetika reakcije vzorcev in modelnih antioksidantov v testih za določanje AOP	30
4 REZULTATI.....	32
4.1 UMERITVENE KRIVULJE	32
4.1.1 Umeritvena krivulja za Troloks z metodo Folin-Ciocalteu	32
4.1.2 Umeritvene krivulje za Troloks z ABTS metodo.....	33
4.1.3 Umeritvene krivulje za Troloks z DPPH metodo	34
4.2 VPLIV ČASA INKUBACIJE ANTIOKSIDANTOV IN FOLIN-CIOCALTEU REAGENTA PRED DODATKOM BAZE NA IZMERJEN AOP	35
4.3. KINETIKA REAKCIJ ANTIOKSIDANTOV V RAZLIČNIH TOPILIH Z RADIKALOM ABTS IN DPPH	37
4.3.1 Stabilnost ABTS in DPPH v različnih topilih	37
4.3.2 Potek reakcije modelnih antioksidantov in antioksidantov v vzorcih pijač z ABTS in DPPH v različnih topilih	38

4.3.2.1 Jabolčni sok	38
4.3.2.2 Zeleni čaj	39
4.3.2.3 Propolis	40
4.3.2.4 CAPE	41
4.3.2.5 Katehin	42
4.3.2.6 Galna kislina	43
4.3.2.7 Kvercetin	44
4.4. DOLOČITEV AOP MODELNIH ANTIOKSIDANTOV IN VZORCEV PIJAČ Z DPPH, ABTS IN FC REAGENTOM	45
4.4.1 Vrednosti AOP za modelne antioksidante	46
4.4.2 Vrednosti AOP za vzorce pijač in propolisa	49
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	52
5.1 RAZPRAVA.....	52
5.2 SKLEPI.....	55
6 POVZETEK	56
7 VIRI	57

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vrsta in vsebnost fenolnih spojin v nekaterih živilih (Abram in sod., 2010).....	5
Preglednica 2: Razvrstitev fenolnih spojin (Goodwin in Mercer, 1983).....	6
Preglednica 3: Glavne skupine flavonoidov, ki se pojavljajo v prehrani ljudi in živila, ki jih vsebujejo (Vrhovšek, 2001).....	8
Preglednica 4: Prisotnost nekaterih mikrokomponent v propolisu (Babnik in sod., 1998).....	12
Preglednica 5: Priprava raztopin za umeritveno krivuljo Troloksa s FC reagentom.....	25
Preglednica 6: Priprava umeritvenih krivulj za Troloks v različnih topilih za ABTS test.....	26
Preglednica 7: Priprava umeritvenih krivulj za Troloks v različnih topilih za DPPH test.....	27
Preglednica 8: Modelni antioksidanti (MAO) za prikaz odvisnosti antioksidativne aktivnosti od različnih časov inkubacije pri metodi Folin-Ciocalteu.....	28
Preglednica 9: Priprava razredčitev posameznih pijač za prikaz odvisnosti antioksidativne aktivnosti od časa inkubacije pri metodi Folin-Ciocalteu.....	28
Preglednica 10: Končni razredčitveni faktorji pri določanju vpliva topila in pH na antioksidativno aktivnost.....	29
Preglednica 11: Končne koncentracije modelnih antioksidantov pri določanju vpliva topila in pH na antioksidativno aktivnost.....	30
Preglednica 12: Končni razredčitveni faktorji pri spremljanju kinetike vzorcev pijač.....	31
Preglednica 13: Končne koncentracije modelnih antioksidantov pri spremljanju kinetike modelnih antioksidantov.....	31
Preglednica 14: Vpliv časa inkubacije pred dodatkom natrijevega karbonata na izmerjeno absorbanco pri 765 nm pri FC metodi.....	35
Preglednica 15: Numerični prikaz vrednosti AOP za modelne antioksidante (MAO)....	47
Preglednica 16: Numerični prikaz vrednosti AOP za vzorce pijač.....	50

KAZALO SLIK

Slika 1: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Abram, 2000:24).....	7
Slika 2: Strukturne formule glavnih polifenolov v čaju (Lambert in Elias, 2010:65).....	10
Slika 3: Osnovna tehnološka shema pridelave vina.....	14
Slika 4: Strukturni formuli difenilpikrilhidrazila (DPPH [•]) in difenilpikrilhidrazina (DPPH ₂ , reducirana oblika) (Molyneux, 2004).....	18
Slika 5: Sprememba barve raztopine iz vijolične (DPPH [•]) v bledo svetlo rumeno (DPPH ₂).....	19
Slika 6: Sprememba barve ABTS [•] iz zeleno-modre oksidirane v brezbarvno reducirano obliko.....	20
Slika 7: Vpliv dodanih antioksidantov na nastanek modroobarvanih produktov s FC reagentom.....	21
Slika 8: Grafični prikaz umeritvene krivulje za Troloks po metodi za določanje koncentracije skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu reagentom.....	32
Slika 9: Grafični prikaz umeritvenih krivulj za Troloks po ABTS metodi.....	33
Slika 10: Grafični prikaz umeritvenih krivulj za Troloks po DPPH metodi.....	34
Slika 11: Odvisnost različnih časov inkubacije na AOP pri metodi Folin-Ciocalteu.....	35
Slika 12: Prikaz kinetike po metodi Folin-Ciocalteu za vzorce pijač in MAO v prvih 20 minutah reakcije in celoten potek reakcije v 130 minutah.....	36
Slika 13: Stabilnost ABTS in DPPH v izbranih topilih.....	37
Slika 14: Hitrost reakcije med antioksidanti v jabolčnem soku in ABTS ter DPPH v različnih topilih	38
Slika 15: Hitrost reakcije med antioksidanti v zelenem čaju in ABTS ter DPPH v različnih topilih	39
Slika 16: Hitrost reakcije med antioksidanti v propolisu in ABTS ter DPPH v različnih topilih	40
Slika 17: Hitrost reakcije med modelnim antioksidantom CAPE in ABTS ter DPPH v različnih topilih.....	41
Slika 18: Hitrost reakcije med modelnim antioksidantom katehinom in ABTS ter DPPH v različnih topilih.....	42
Slika 19: Hitrost reakcije med modelnim antioksidantom galno kislino in ABTS ter DPPH v različnih topilih.....	43
Slika 20: Hitrost reakcije med modelnim antioksidantom kvercetinom in DPPH v različnih topilih.....	44
Slika 21: Antioksidativni potencial klorogenske, galne, askorbinske in kaftarne kisline ter epigalokatehin galata in katehina določen z ABTS, DPPH in Folin-Ciocalteu	

metodami in antioksidativni potencial dehidroaskorbinske kisline in žveplovega
dioksida določen z ABTS, DPPH in Folin-Ciocalteu
metodami.....46

Slika 22: Antioksidativni potencial zelenega in črnega čaja ter refoška, laškega rizlinga in
jabolčnega soka in propolisa določen z ABTS, DPPH in Folin-Ciocalteu
metodami49

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca
ABTS	2,2'-azobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina
AK	askorbinska kislina
AO	antioksidant
AOA	antioksidativna aktivnost
AOP	antioksidativni potencial
dA ₅₂₀	sprememba absorbance pri valovni dolžini 520 nm
dA ₇₃₄	sprememba absorbance pri valovni dolžini 734 nm
dA ₇₆₅	sprememba absorbance pri valovni dolžini 765 nm
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal
DPPH ₂	2,2-difenil-1-pikrilhidrazin
EGCG	epigalokatehin galat
FC	Folin-Ciocalteu reagent
MAO	modelni antioksidant
R	razredčitveni faktor
TE	troloksni ekvivalent (ang. Trolox equivalent)
TEAC	antioksidativna kapaciteta izražena kot troloksni ekvivalent (Trolox equivalent antioxidant capacity)

1 UVOD

Nekatera odkritja kažejo, da imajo antioksidanti, ki stabilizirajo oziroma zmanjšajo koncentracijo prostih radikalov, pozitiven vpliv na zmanjšano pojavnost nekaterih kroničnih bolezni. Porušeno ravnotežje med prostimi radikali in antioksidanti imenujemo oksidativni stres. Antioksidanti ga preprečujejo z lovljenjem prostih radikalov, s keliranjem kovinskih ionov, z odstranjevanjem in/ali popravilom oksidativno poškodovanih biomolekul. Nekatere antioksidante sintetizira telo samo, druge pa dobimo s hrano (Korošec, 2000). Številna živila, kot so sadje, zelenjava in žitarice, vsebujejo sestavine, ki delujejo antioksidativno. Take so npr. tokoferoli in tokotrienoli v oljih in semenih, askorbinska kislina in hidroksikarboksilne kisline, flavonoidi in karotenoidi v sadju in zelenjavi ter fenolne spojine v čajih, zeliščih in kakavu (Abram in Simčič, 1997). Za določanje antioksidantov in fenolnih snovi v vzorcih živil se uporablja vrsta različnih *in vitro* metod. Nobena metoda ne da celovitega odgovora o antioksidativni učinkovitosti fenolnih spojin. Na njihovo antioksidativno učinkovitost vpliva tudi vrsta reaktanta, na katerega antioksidant deluje, in izbira matriksa, v katerem antioksidant učinkuje. Posamezen antioksidant reagira različno z različnimi radikali (Abram in sod., 2010). Najpogostejše metode, katere smo uporabili tudi mi za določanje antioksidativne aktivnosti, so spektrofotometrične metode DPPH in ABTS. Metodi temeljita na merjenju spremembe absorbance, ki nastane pri redukciji radikala z antioksidantom. ABTS test temelji na redukciji modro/zelene raztopine ABTS⁺ s pomočjo antioksidantov; DPPH test pa temelji na redukciji vijolične raztopine DPPH v 1,1-difenil-2-pikril hidrazin (Floegel in sod., 2011). Na metodi vplivajo predvsem topilo, inkubacijski čas, pH in koncentracija vzorca. Uporabili smo tudi metodo Folin-Ciocalteu. Vsebnost skupnih fenolnih spojin v izvlečku določamo s Folin-Ciocalteujevo metodo, ki temelji na tvorbi modroobarvanega kompleksa fenolnih spojin s Folin-Ciocaltejevim reagentom (Abram in sod., 2010). V zadnjem času vedno več študij posveča pozornost uporabi ustreznega topila, pH raztopine in inkubacijskega časa, da bi morda pospešili hitrost reakcij in pripomogli k ustreznjejši določitvi antioksidativnega potenciala.

1.1 CILJ DELA

Namen diplomske naloge je bil analizirati potek reakcije med prostima radikaloma DPPH ter ABTS in modelnimi antioksidanti (askorbinska kislina, dehidroaskorbinska kislina, katehin, klorogenska kislina, galna kislina, epigalokatehin galat, kaftarna kislina, kvercetin, Troloks in SO₂) ter z antioksidanti, prisotnimi v rdečem vinu (refošk), belem vinu (laški rizling), zelenem in črnem čaju, jabolčnem soku in propolisu. Poteke reakcije smo spremljali v metanolu, mQ vodi in pri različnih vrednostih pH. Analizirali smo kinetiko reakcij modelnih antioksidantov in vzorcev pijač ter tako določili optimalen čas poteka reakcije. Pri tem času smo nato ovrednotili vpliv topila na izmerjeno vrednost antioksidativnega potenciala. Skupne fenolne spojine smo določili tudi s Folin-Ciocalteu metodo.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevali smo, da bosta prisotnost vode in metanola v reakcijskem mediju kakor tudi pH medija vplivala na hitrost reakcije ter s tem na določeno vsebnost antioksidantov v vzorcih pijač in modelnih antioksidantov. Predvidevali smo tudi višje vsebnosti fenolnih spojin v čajih, rdečem vinu in propolisu kot v jabolčnem soku in belem vinu.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ANTIOKSIDANTI

Oksidativni stres se pojavi v vseh organizmih v aerobnem okolju. Zato so biološki sistemi razvili vrsto antioksidantov, ki jih varujejo pred oksidacijo. Univerzalna definicija antioksidanta ne obstaja, ker poznamo vrsto kemijskih mehanizmov s katerimi je oksidacija inhibirana (McClements in Decker, 2008). Antioksidant je izraz, ki je široko uporabljen, a ga je presenetljivo težko jasno definirati. Živilski tehničarji uporabljajo antioksidante za inhibicijo lipidne oksidacije, preprečitev oksidacije sveže rezanega sadja in sveže stisnjene sokov. Nesmiselno bi bilo govoriti o smiselnosti in pravilnosti definicij antioksidanta, zato je najbolje uporabiti širšo razlago pojma kot jo navajata Halliwell in Gutteridge (2000) ki pravi da je antioksidant snov, ki prepreči oksidacijo neke druge snovi tudi takrat, ko je koncentracija le-te precej večja od koncentracije antioksidanta.

Antioksidante razvrščamo v tri skupine. V prvi so pravi antioksidanti, ki vežejo proste radikale, v drugi so reducenti, v tretji skupini pa so antioksidantni sinergisti, ki povečujejo učinkovanje antioksidantov prve skupine. Slednji lahko vplivajo na regulacijo biosinteze in regeneracijo encimskih antioksidantov, nizkomolekularnih antioksidantov in proteinov, ki vežejo prooksidativne ione; takšne spojine lahko uvrstimo med pro-antioksidante (Vertuani in sod., 2004). V prvi skupini so antioksidanti, ki predstavljajo glavno znotrajcelično antioksidantno obrambo (SOD, katalaza, glutation peroksidaza), v drugi so neencimski proteinski antioksidanti v plazmi (transferin, hemoglobin, albumin), v tretji pa so neencimski antioksidanti, ki so v plazmi, v celicah in v celičnih membranah (vitamin C, GSH, sečna kislina, vitamin E, beta-karoten). Antioksidanti so po kemijski zgradbi lahko vodotopni ali topni v maščobah (Korošec, 2000).

Podobno kot pri sami definiciji pojma, tudi pri razvrstitvi antioksidantov ne obstaja najboljša možna razdelitev, saj imajo strukturno različni antioksidanti lahko enak mehanizem delovanja in obratno. Velja pa tudi, da imajo nekateri antioksidanti več možnih mehanizmov delovanja. Pogostokrat se antioksidanti delijo po naslednjih kriterijih: izvor (naraven, sintetičen, endogen, eksogen), način delovanja (encimski, neencimski), kemijsko fizikalne lastnosti (polaren, nepolaren), struktura (polifenoli, tioli,...), mehanizem delovanja (lovilec prostih radikalov, preprečevanje tvorbe prostih radikalov,...). Med antioksidante največkrat uvrščajo tudi kelatorje redoks aktivnih ionov (Cigic in Tasic, 2006).

2.2 PROSTI RADIKALI

Prosti radikali so atomi, molekule ali ioni z vsaj enim elektronom brez para. So visoko reaktivne molekule, ki poškodujejo celične strukture, vključno z nukleinskimi kislinami in geni (Korošec, 2000). So intermediati pri redoks, fotokemičnih in radikalnih reakcijah, ki se pojavljajo pri vrsti biokemijskih procesov. Nastajajo predvsem pri redoks in encimskih reakcijah, kjer prihaja do prenosa elektrona (Halliwell in Gutteridge, 2000). Nastanek

radikalov povzročajo tudi različna sevanja, npr. termično dovajanje energije, fotoliza ali radioliza, ki privedejo do homolitske cepitve kovalentne vezi.

Primeri nastanka radikala (Kreft in Pečar, 1998):

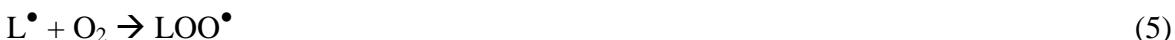


(pri ionizaciji snovi; h je Planckova konstanta, v je frekvenca elektromagnetnega sevanja)

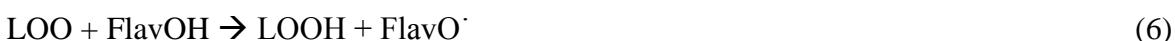
Prosti radikali so zelo reaktivni, kar pomeni da imajo majhno kemijsko specifičnost, tj. da lahko reagirajo z večino molekul v svoji bližini, kar vključuje proteine, lipide, ogljikove hidrate in DNA. Kadar radikal reagira z neradikalom, nastane nov prosti radikal, ki reagira naprej v verižni reakciji, medtem ko prvotni izgubi radikalske lastnosti (Cigić in Tasič, 2006). Oksidativni stres se v bioloških sistemih pokaže, če je bil sistem dalj časa izpostavljen oksidantom ali če je prišlo do zmanjšanja antioksidativne sposobnosti organizma ali obeh. Oksidativni stres je večkrat povezan ali pa vodi v nastanek reaktivnih vrst kisika, med katerimi so posebno zanimivi prosti radikali. Tako lahko nastanejo HO[·] (hidroksilni), HOO[·] (hidroperoksilni), O₂[·] (hiperoksidni), RO[·] (alkoksilni), ROO[·] (alkilperoksilni), ArO[·] (fenoksilni) ali še drugi radikali (Abram, 2000). Vse te oblike kisika oz. njegove spojine so reaktivni kisikovi intermediati, kateri so odgovorni za celične poškodbe, ki so lahko vzrok vnetni reakciji, maligni transformaciji in smrti celice (Cigić in Tasič, 2006).

Dostikrat srečamo pojem avtooksidacije. Gre za oksidacijo organske snovi, ki je izpostavljena zračnemu kisiku. Raziskave so pokazale da so reakcije avtooksidacije katalizirane reakcije, kjer so katalizatorji ioni prehodnih elementov- predvsem tistih, ki se lahko nahajajo v različnih oksidacijskih stanjih (železo in baker) in lahko v stiku s kisikom izmenjujejo elektrone. Kisik pretvarjajo v superoksid oziroma v vodikov peroksid, ki lahko vršita nadaljnjo oksidacijo organske snovi. Zato je izredno pomembno, da celica kar se da skrbno nadzoruje koncentracije prostih ionov prehodnih elementov in s tem kontrolira nenadzorovane oksidacije (Kreft in Pečar, 1998).

Pojem antioksidativne aktivnosti ni jasno definiran in obstaja vrsta definicij, ki temeljijo na naravi oksidacije in reaktivnih intermediatov, ki sodelujejo v procesu. Pri lipidni oksidaciji se za aktivnost antioksidanta smatra sposobnost zaustavitve nadaljevanja kinetične verige v formaciji hidroperoksidov (Musialik in sod., 2008):



s kompetitivno reakcijo s fenolnim/flavonoidnim antioksidantom, FlavOH:



2.3 FENOLNE SPOJINE KOT ANTIOKSIDANTI

Fenolne spojine so sekundarni metaboliti, torej spojine, ki niso naravnost vključene v osnovni metabolizem (fotosintezo, celično dihanje, prenos snovi,...). Pri rastlinah so fenolne spojine pomembne za obrambo rastlin pred zunanjimi vplivi (UV svetloba, mikrobi, insekti itd.), so barvila (cvetovi in sadeži), vplivajo pa tudi na senzorične lastnosti živil (Abram in sod., 2010). Kot odgovor na stres naj bi celice rabile v celici že prisotne fenolne spojine ali pa zaradi stresa nastale fenolne spojine zaradi hidrolize ali oksidacije ali *de novo* sinteze (fitoaleksini). Običajno je povečanje skupnih fenolnih spojin, posebno klorogenske kisline (Abram in Simčič, 1997). V celici so fenolne spojine v vakuoli ali pa so vezane v celični steni.

Preglednica 1: Vrsta in vsebnost fenolnih spojin v nekaterih živilih (Abram in sod., 2010)

Živilo	Spojina	Vsebnost (%)
proso	kondenzirani tanini	0,05-3,5
pšenična moka	fenolne kisline (proste in vezane)	0,01
koruza	tanini	do 0,01
soja, zrna	fenolne kisline	do 0,004
sojina moka	fenolne kisline	0,02
fižol-različne vrste	tanini	0,5-1,6
sadje (jabolka, hruške)		
- lupina	flavonoidi	0,02
- sadna kaša	flavonoidi	do 0,001
zelenjava	flavonoidi	do 0,4
paprika	flavonoli	do 0,02
dišavnice	flavonoidi	do 0,2
čaj, zelen, listi	flavonoidi/katehini	20
čaj, fermentiran, listi	flavonoidi/katehini	3
kakav, zrna	flavonoidi/katehini	3
	levkoantocianidini	2,5
kava, zrna	klorogenska kislina	6-8

- pražena	klorogenska kislina	4-5
-----------	---------------------	-----

Fenolne spojine so številčna in raznolika skupina spojin. Vsebujejo vsaj en aromatski obroč, na katerem je ena ali več hidroksilnih skupin. Najbolj enostavna razvrstitev je po številu C-atomov (Abramovič in sod., 2008; Abram, 2000). Med fenolnimi spojinami so najbolj pogosti glikozidi flavonolov, konjugati hidroksicimetne kisline in kondenzirani tanini ter antociani (Abram in Baričevič, 2006). Pri poimenovanju fenolnih spojin je v literaturi dokajšnja zmeda in se zato priporoča uporaba razdelitve po številu C-atomov v molekuli.

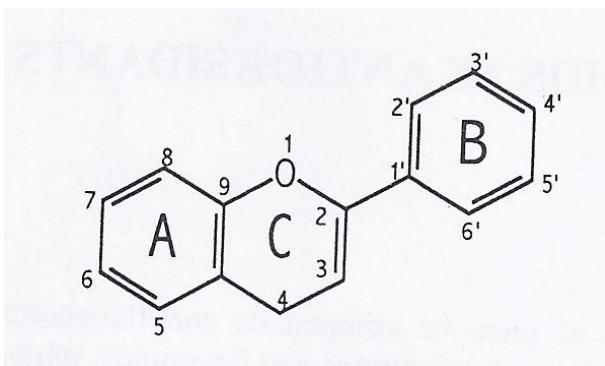
Preglednica 2: Razvrstitev fenolnih spojin (Goodwin in Mercer, 1983)

Št. C atomov	Osnovni skelet	Skupina
6	C ₆	Fenoli
7	C ₆ C ₁	Fenolne kisline
8	C ₆ C ₂	Fenilocetne kisline
9	C ₆ C ₃	Hidroksicimetne kisline Fenilpropeni Kumarini Izokumarini Kromoni
10	C ₆ C ₄	Naftokinoni
13	C ₆ C ₁ C ₆	Ksantoni
14	C ₆ C ₂ C ₆	Stilbeni Antrakinoni
15	C ₆ C ₃ C ₆	Flavonoidi
18	(C ₆ C ₃) ₂	Lignani Neolignani
30	(C ₆ C ₃ C ₆) ₂	Biflavonoidi
n	(C ₆ C ₃) _n	Lignini
	(C ₆) _n	Melanini
	(C ₆ C ₃ C ₆) _n	Kondenzirani tanini

2.3.1 Flavonoidi

Polifenoli so najbolj razširjeni antioksidanti v naši prehrani. Delimo jih na dve veliki skupini in sicer na flavonoide in neflavonoide. Slednji po grobi oceni prispevajo 1/3 dnevnega vnosa polifenolov, flavonoidi pa 2/3. Številne študije kažejo povezavo med uživanjem hrane in pičač, ki vsebujejo visoke vsebnosti flavonoidov, in zmanjšanjem nastanka mnogih bolezni modernega življenja, ki jih povzroča oksidativni stres (Vrhovšek, 2001). Dokazano je, da uživanje sadja in zelenjave preprečuje nastanek rakavih obolenj (Steinmetz in Potter, 1996) in infarkta (Ness in Powles, 1997). Zmerno uživanje vina naj bi zmanjševalo pojavnost bolezni srca in ožilja (Renauld in De Lorgeril, 1992). Čaj naj bi varoval pred rakom (Yang in Wang, 1993) in boleznimi srca in ožilja (Tijburg in sod., 1997). Flavonoidi naj bi delovali preventivno tudi pred procesi staranja.

Flavonoidi so fenolne spojine, zgrajene iz 15 C-atomov in so spojine, ki se razlikujejo po oksidacijski stopnji heterocikličnega C₃ obroča, kot tudi po različnih substituentah na obročih A, B in C. Zato ni presenetljiv podatek, da je dosedaj poznanih več kot 5000 različnih flavonoidov (Abram, 2000).



Slika 1: Osnovna struktura formula flavonoidov (Abram, 2000: 24)

Glede na razlike v heterocikličnem obroču C jih delimo na flavone, flavonole, izoflavone, antociane, flavanole (catehini) in flavanone. Osnovne strukture so nadalje substituirane v A in B obroču s hidroksičnimi skupinami, različnimi sladkorji, metoksi skupinami oz. se pojavljajo kot sulfati in glukoronidi (Vrhovšek, 2001). V naravi so flavonoidi običajno glikozilirani, kar pomeni, da imajo vezane različne monosaharide (glukoza, galaktoza, arabinosa, ramnoza), ali pa tudi daljše verige na obroč. Največkrat je sladkor vezan na C₃, lahko pa tudi na C₅ ali C₇ atom. Le redki imajo sladkor vezan na B obroču (Abram in Simčič, 1997). Glede na stopnjo polimerizacije delimo flavonoide na monomere, oligomere in polimere. Oligomeri in polimeri se imenujejo proantocianidini (Vrhovšek, 2001).

Flavonoidi se tako kot vsi drugi polifenoli nahajajo samo v živilih rastlinskega izvora. Ponavadi jih sadje vsebuje več kot zelenjava, največ pa k vnosu pripomorejo pičač, kot so rdeče vino, sokovi in čaji.

Preglednica 3: Glavne skupine flavonoidov, ki se pojavljajo v prehrani ljudi in živila, ki jih vsebujejo (Vrhovšek, 2001)

SKUPINA	GLAVNI PREDSTAVNIKI	ŽIVILA, KI VSEBUJEJO ZNATNE KOLIČINE
flavanoli monomeri	katehin, epikatehin, epigalokatehin galat	zeleni čaj, črni čaj, rdeče vino, čokolada, robide, rdeče grozdje, češnje, marelice, slive, jagode
flavanoli oligomeri	procianidini oligomeri, tudi galoilati	rdeče grozdje, jabolka, hruške, grozdje, čaj, jedilna čokolada, kakav, robide, rdeči ribez, češnje, ameriške borovnice, jagode, maline
antociani	pelargonidin, cianidin, peonidin, malvidin, petunidin in delfnidin (kot glukozidi)	predvsem v rdečem sadju, v manjših koncentracijah se nahajajo v zelenjavi, rdečem radiču, rdeči pesi
kompleksni pigmenti	produkti kondenzacije med flavanoli oziroma med flavanoli in antociani	rdeče vino, črni čaj
flavonoli	kvercetin, kamferol, miricetin (kot glikozidi)	rumena čebula, jabolka, rdeče vino, jagode, maline, itd.
flavanoni	hesperetin, naringenin (kot glikozidi)	agrumi (pomaranče, grenivke, limone itd.)
izoflavoni	genistein, daidzein	soja
flavoni	luteonin, apigenin	rdeča paprika, zelena

Glede na to, da se flavonoidi nahajajo v skoraj vseh živilih rastlinskega izvora je praktično nemogoče poznati natančen dnevni vnos vseh flavonoidov v človeški organizem. Dnevni vnos v dieti zahodnoevropskih dežel je bil ocenjen na nekaj 100 mg/dan. Razlogi za to, da ne moremo določiti točnega dnevnega vnosa je predvsem v pomanjkanju standardiziranih analitičnih metod, raznolikosti flavonoidov in širokega območja koncentracij flavonoidov v posamezni vrsti živil.

2.4 ANTIOKSIDANTI V ANALIZIRANIH VZORCIH

2.4.1 Zeleni in črni čaj

Čajevec raste ponekod kot grm, drugod kot drevo, ki je najtesnejši sorodnik okrasnih kamelij in njihovih samoniklih sorodnic. Rod teh rastlin obsega več kot 80 vrst, ki so skoraj vse doma v hribovijih jugovzhodne Azije. Čajevec je v vseh pogledih in v različnih časih najpomembnejši med kamelijami. Vse kaže, da zato ker (Cortese, 2004):

- edini med njimi vsebuje kofein,
- vsebuje veliko antioksidantov, posebno zelo močnega in učinkovitega (-)-epigalokatehin-3-galata (EGCG),
- svetovni letni pridelek čaja tehta več kot tri milijone ton, kar pomeni 12 milijonov ton svežih lističev.

Lističe za zeleni čaj po obiranju hitro segrejejo, da prekinejo delovanje encima polifenol oksidaze. Zato ostanejo katehini v zelenem čaju nespremenjeni in ohranijo antioksidativni potencial. Kcatehini torej niso delno oksidirani kot v črnem čaju. Pri proizvodnji črnega čaja obrane lističe zmečkajo ali zmeljejo ter izpostavijo zraku, tako v prisotnosti kisika encim polifenol oksidaza katalizira pretvorbo brezbarvnih katehinov vobarvane teaflavine in tearubidine. Zaradi tega se barva lističev spremeni v bakreno rjavilo, obenem pa se razvije specifična aroma črnega čaja. Postopka predelave čajnih listov se je prijelo ime fermentacija, a temu ni tako, ker je postopek v bistvu oksidacija. Spremembe med predelavo so izključno biokemijske narave in pri njih ne sodelujejo mikroorganizmi (Cortese, 2004). Na količino polifenolov in antioksidativne aktivnosti pa vplivata tudi čas infuzije čaja z vodo in temperatura vode. Campanella in sod. (2003) so ugotovili, da je najboljša antioksidativna učinkovitost in vsebnost polifenolov po 5-minutni infuziji čaja v destilirani vodi s temperaturo 70 °C. Do časa petih minut oba parametra naraščata, nato pa začneta padati.

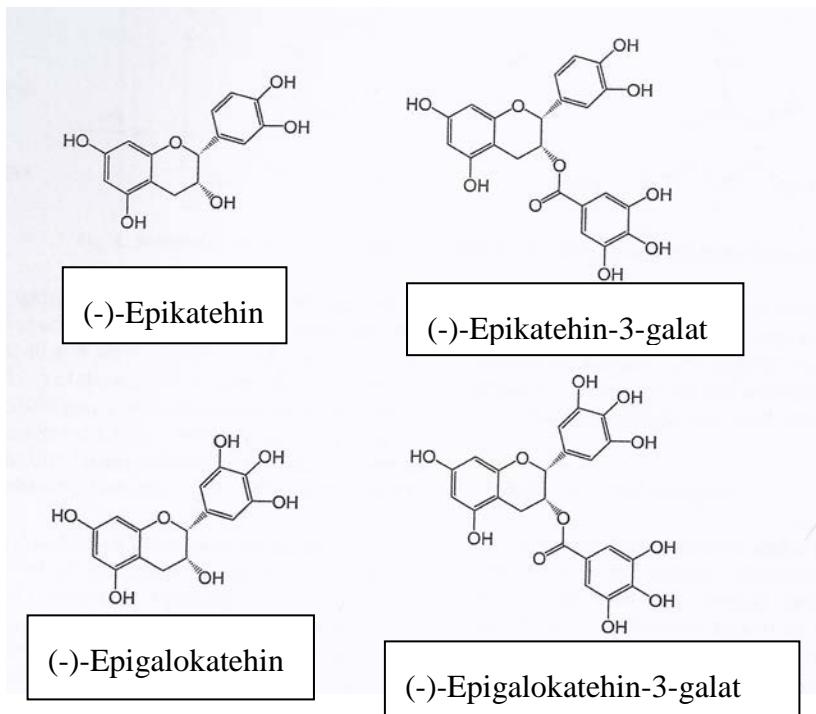
Epidemiološke raziskave so pokazale, da je redno uživanje dovolj velikih količin zelenega čaja povezano z zmanjšanim tveganjem za nastanek različnih vrst raka (Filipič, 2001), potekajo pa tudi preiskave na temo vpliva antioksidantov na srčne bolezni, diabetes in nevrodegenerativne bolezni (Lambert in Elias, 2010). Vinson in Dabbagh (1998) sta ugotovila, da so katehini v čaju veliko boljši antioksidanti kot vitamina C in E ter provitamin β karoten glede na vrednost IC₅₀. IC₅₀ ali koncentracija učinkovitosti je definirana kot koncentracija antioksidanta, ki je potrebna za 50 % zmanjšanje koncentracije prostega radikala in se zazna kot sprememba barve.

Po učinku v našem telesu so najpomembnejše sestavine čaja kofein (2-4 % suhe snovi) in polifenoli (do 35 %, v povprečju okoli 20 ali 25 %). Ključne razlike med zelenim in črnim čajem so v polifenolih in aromatičnih spojinah. Zeleni čaj vsebuje predvsem katechine, ki predstavljajo pretežni delež polifenolov. Skupna količina in vrste katehinov so ključne naravne lastnosti zelenega čaja, iz katerih izvirajo njegov okus in antioksidativne lastnosti. Omembe vredni katehini, razvrščeni po padajoči vsebnosti v čaju, so:

- (-)-epigalokatehin-3-galat
- (-)-epigalokatechin

- (-)-epikatehin-3-galat
- (-)-epikatehin
- (+)-galokatehin
- (+)-catehin

Minus ali plus označuje konfiguracijo na kiralnem centru (Cortese, 2004).



Slika 2: Strukturne formule glavnih polifenolov v čaju (Lambert in Elias, 2010:65)

Prva dva katehina, ki ju najdemo v čaju, sta najmočnejša antioksidanta. Splošno velja, da imajo največ EGCG in drugih katehinov najbolj trpki zeleni čaji, kajti prav katehini so tisti, ki dajejo čaju trpkost (nekaj ga prispeva tudi kofein). Črni čaj kot vir EGCG ni pomemben. Za razliko od zelenega, ki ga vsebuje v povprečju 10 %, je v črnem čaju od 1-5 % EGCG. Razlika je tudi v zgradbi molekul, ki je v črnem čaju kompleksnejša. Razmerje polifenolov črnega čaja je drugačno kot v zelenem čaju. Črni čaj vsebuje le okoli 3 % katehinov, ker so se ostali med oksidacijo pretvorili v teaflavine in predvsem v tearubigine. Slednji so bolj topni kot katehini, v črnem čaju pa zavzemajo od 10 do 20 % suhe snovi. V primerjavi s katehini učinkujejo manj antioksidativno (Cortese, 2004).

2.4.2 Propolis

Propolis ali zadelavino sestavljajo smolnate substance s katero čebele prevlečejo vso notranjost panja. S tem preprečujejo razvoj različnih bakterij in obvarujejo panj pred kvarom. S propolisom zadelajo tudi vhod panja in skušajo zapreti špranje manjše od 5 mm (Meglič, 2004). Navadno je propolis rijavkaste ali rijavozelene barve, ima prijetno aromo po

topolovih popkih, medu, vosku in vaniliji. Najpreprostejša razvrstitev propolisa pozna le štiri vrste: brezovega (65 %), topolovega (15 %), brezovo-topolovega in druge. Najboljši in najčistejši propolis pridobivajo čebele poleti. Letno ga naberejo od 100 do 150 g na panj, včasih tudi do 400 g (Babnik in sod., 1998). Propolis je edini čebelji pridelek, ki deluje proti plesnim, bakterijam, kvasovkam in virusom. Zavira rast več kot tridesetih bakterij in drugih mikroorganizmov (Božnar, 2002). Na Mikrobiološkem inštitutu Medicinske fakultete v Ljubljani so ugotovili da je zelo aktiven proti bakterijam vrst *Proteus vulgaris* in *Bacillus alvei*, ne učinkuje pa na *Escherichia coli* ali *Pseudomonas pyocyanea* (Babnik in sod., 1998). Ljudje uporabljamo propolis za izboljšanje odpornosti in kot dodatek raznim kozmetičnim izdelkom. Oviri pri uporabi propolisa in tudi drugih čebeljih pridelkov v medicinske namene sta nestandardna surovina in velika možnost alergije. Propolis lahko uporabljamo v naravni obliki, kot vodni ali alkoholni ekstrakt ali kot sestavni del zdravilnih, dietetičnih in kozmetičnih pripravkov. Biološki pomen je predvsem pospešitev obnavljanja tkiva, protivnetno in antibiotično delovanje alkoholne in vodne raztopine ter njegov antioksidativni učinek (Božnar, 2002).

Propolis je postal zanimiv tudi kot eden boljših čebeljih produktov, ki preprečujejo bolezni povezane z oksidacijskim stresom (Cigut in sod., 2011). Natančno sestavo propolisa je težko določiti, saj je odvisna od časa in kraja nabiranja čebel. V preglednici 4 so navedene kemijske oznake ugotovljenih snovi v propolisu in njihovo skupno število.

Večino od 180 do sedaj znanih spojin propolisa sestavljajo polifenoli. Večinski delež imajo flavonoidi, poleg njih pa tudi fenolne kisline in estri, fenolni aldehidi, ketoni, itd. Preostale spojine so aromatske kisline (5-10 %), voski (30-40 %), smole in cvetni prah (Castaldo in sod., 2002). Med fenolnimi spojinami prevladujejo hidrokinoni (0,1 %, Greenaway in sod., 1987), kavna kislina in njeni estri (2-20 %, Bankova in sod., 1995) in kvercetin (<0,1-0,7 %, Greenaway in sod., 1990). Mnoge analize so v vseh vrstah propolisa pokazale prisotnost flavonskih derivatov, cimetove kisline, kofeinske kisline, benzojske kisline in ferulne kisline, ki deluje predvsem baktericidno na gram pozitivne in negativne bakterije (Babnik in sod., 1998). Tako kot vsi flavonoidi, ki lovijo proste radikale, ima tudi propolis protivnetne učinke. Pri teh učinkih je v propolisu najbolj pomemben fenilni ester kavne kisline (CAPE), ki je učinkovit že v manjših količinah (Frenkel in sod., 1993).

Preglednica 4: Prisotnost nekaterih mikrokompontent v propolisu (Babnik in sod., 1998)

Kemijska oznaka ugotovljene snovi	Štev. ugotovljenih snovi
flavonoidi	38
hidroksiflavoni	27
hidroksiflavanoni	11
halkoni	2
benzojska kislina in derivati	12
derivati benzaldehida	2
cimetov alkohol, cimetova kislina in njeni derivati	14
alkoholi, ketoni, fenoli in heteroaromatične spojine	12
terpeni, seskviterpenski alkoholi in ustrezni derivati	7
alifatski ogljikovodiki	6
rudninske snovi	22
steroli in steroidni ogljikovodiki	6
sladkorji	7
aminokisline	24

2.4.3 Jabolčni sok

Jabolčni sok je eden najpopularnejših sokov na svetu. Letna proizvodnja jabolk, ki znaša približno 40 milijonov ton, je na drugem mestu takoj za grozdjem. Za sok se porabi približno osmina vseh pridelanih jabolk. Sveže stisnjeni sok ima kratek rok uporabe, je rjave barve in pride do sedimenta. Rok uporabe podaljšamo s pasterizacijo soka ali z uporabo konzervansov. Za preprečitev oksidacije soka se dodaja askorbinska kislina (Varnam in Sutherland, 1994). Sveže sadje vsebuje veliko število sekundarnih metabolitov, predvsem flavonoidov. Flavonoide in glikozide flavonoidov uvrščamo med pomembnejše predstavnike polifenolov, ki so v sadju močno razširjeni. Mnogi so obarvani, običajno v

vakuolah, nekatere najdemo tudi v kromo- ali kloroplastih. Vpliv posameznih tehnoloških operacij, kot so lupljenje, rezanje in drobljenje, zmanjšuje vsebnost flavonoidov. Do 50 % izgube nastanejo predvsem pri procesih, kot so pasterizacija, sterilizacija, zamrzovanje itd. Tudi postopki bistrenja, ki vključujejo uporabo ultrafiltracije in čistilnih sredstev, npr. bentonit, želatino, PVPP, zmanjšujejo koncentracijo polifenolov v primerjavi z minimalno obdelanimi sokovi. Pri predelavi bistrega jabolčnega soka se izgubi do 40 % polifenolov (Aherne in O'Brien, 2002; Hribar in Zlatić, 2006). Z upoštevanjem novejših dognanj in s primernimi tehnološkimi postopki lahko bistveno zmanjšamo negativne posledice predelave, v nekaterih primerih pa lahko prehransko vrednost živila bistveno povečamo. Možni učinki predelave živil na celokupen antioksidativni potencial živila so (Nicolli in sod., 1999):

- Predelava ima minimalni učinek na antioksidativni potencial živila
- Izguba naravno prisotnih antioksidantov
- Povečanje antioksidativnih lastnosti pristotnih antioksidantov
- Nastanek novih spojin z antioksidativnimi lastnostmi
- Nastanek novih spojin z prooksidativnimi lastnostmi
- Interakcije med različnimi sestavinami živila

Od fenolnih spojin v jabolkih in soku prevladujejo kvercetin in rutin, ki sta flavonola, epikatehin in katehin, ki sta flavanola ter klorogenska in kavna kislina, ki sta hidroksicimetni kislini (Karaman in sod., 2010). Vsebnost fenolnih spojin v soku je močno odvisna tudi od tega, iz katerih sort jabolk je sok narejen. Odvisno je tudi od zrelosti jabolk (Shahidi in Naczk, 1995).

2.4.3.1 Kvercetin

Kvercetinu pripisujejo številne biološke učinke, ki ugodno vplivajo na zdravje človeka; najbolj poznano je antivirusno, protivnetno in protimikrobeno delovanje. Razpoložljivi znanstveni dokazi, ki govorijo v prid blagodejnem učinkom, temeljijo na *in vitro* raziskavah, saj vemo, da je kvercetin močan antioksidant (Rice-Evans in sod., 1996; Cao in sod., 1997). Kot tak je sposoben znižati raven oksidativnega stresa, znanega po vpletenuosti v določene vrste raka (Storz, 2005).

2.4.4 Rdeče in belo vino

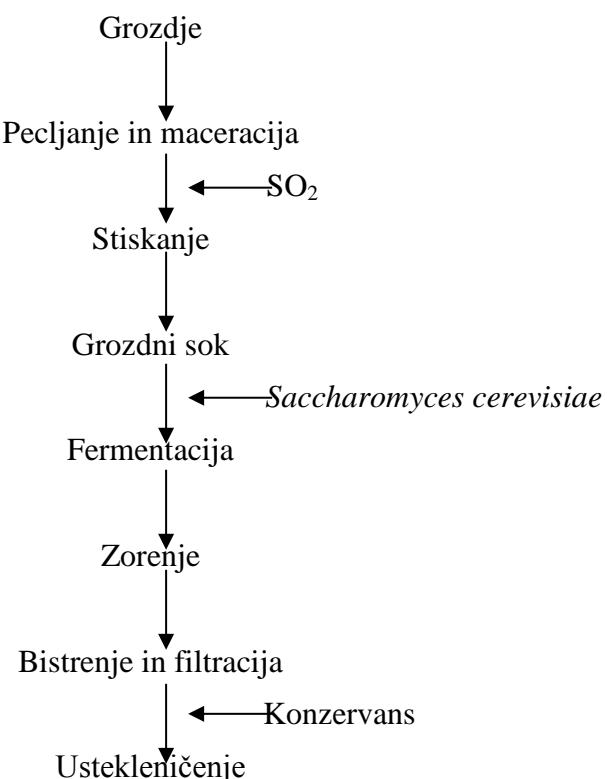
V vseh fazah predelave grozdja je v večji ali manjši meri prisoten kisik, katerega škodljiv vpliv se kaže v oksidaciji kemijskih snovi ob nastanku produktov, ki vplivajo na senzorično kakovost, zmanjšanje antioksidativnih lastnosti, zdravstvenih učinkov in prehranske vrednosti končnega pridelka. Fizikalno-kemijska sestava vin (belih ali rdečih) je odvisna od številnih dejavnikov:

- sorte grozdja, letnika, vinogradniškega območja, vinogradniške tehnologije, zdravstvenega stanja in stopnje zrelosti grozdja ob trgovini,
- tehnologije predelave (pecljanje, drozganje, čas in temperatura maceracije, stiskanje, bistrenje) in pogojev alkoholnega vrenja,

- postfermentativnih postopkov (postopki stabilizacije, zorenje vina v posodah iz nerjavnega jekla ali v hrastovih sodih),... (Košmerl, 2000).

Pri analizi antioksidativnega potenciala smo za vzorec vzeli rdeče vino refošk in belo vino laški rizling. Refošk je zelo stara sorta. Po videzu je vino intenzivno vijoličasto obarvano in ima vonj po malinah, tudi ribezu. Mlado vino je živahnog, zaradi višje kisline prijetno rezko, posebno nekaj dni, preden popolnoma povre. Laški rizling je v južni Evropi zelo zastopana sorta, v Sloveniji pa sploh. Po videzu so mlada kakovostna vina rumenkasto zelenkaste do zlato rumene barve, pri vinih posebne kakovosti celo zlate. V uspelih vinih najdemo vonj po limoni in po dozorevajočih jabolkih. V zrelih vinih pa na vonje po suhem listju, čajih, marelici itd. Vino se uvršča med prijetna, pitna, lažja vina. Govorimo o nevtralnem, toda uravnoteženem okusu, ki daje vtis lahketnosti, živahnosti, vendar po požirku kmalu izgine (Nemanič, 1999).

Grozdje in vino predstavlja zelo pomemben vir polifenolnih antioksidantov. Vsebuje različne polifenole, ki v odvisnosti od stopnje polimerizacije predstavljajo enostavne fenolne kisline (npr. tartratni ester kavne kisline) do zelo kompleksnih visoko molekularnih taninov ali proantocianidinov (Rasmussen in sod., 2005). Predvsem slednje spojine imajo velik pomen pri senzorični kakovosti, saj vplivajo na trpkost, grenkobo, vonj in okus. Zaradi dokazanih antioksidativnih lastnosti fenolnih spojin vina v *in vitro* in *in vivo* raziskavah proti prostim radikalom in pozitivnega učinka na naše zdravje, je naša osnovna želja, da jih z ustreznim znanjem in tehnološkimi postopki kar najbolj pridobimo, ohranimo in preprečimo njihovo oksidacijo (Košmerl in sod., 2006). Na sliki 3 je prikazana osnovna tehnologija pridelave vina.



Slika 3: Osnovna tehnološka shema pridelave vina (Varnam in Sutherland, 1994)

Fenole v vinu lahko razdelimo v dve veliki skupini: flavonoide in neflavanoide. Antioksidativne lastnosti posameznega fenola so predvsem močno odvisne od njegove kemijske strukture. Zaradi ene ali več hidroksilnih skupin na benzenovem obroču ima večina fenolov v vinu antioksidativne lastnosti (Vrhovšek, 1996).

2.4.4.1 Flavonoidi

V skupino flavonoidov uvrščamo podskupine flavan-3-ole, proantocianidine, antocianidine in flavonole.

2.4.4.1.1 Flavan-3-oli in proantocianidini

Najbolj znani predstavniki te podskupine so katehin, epikatehin ter proantocianidini B1, B2, B3 in B4. Monomerne in oligomerne oblike flavan-3-olov so najvažnejši fenoli v rdečih vinih. Flavan-3-oli in proantocianidini se nahajajo predvsem v trdih delih grozdne jagode (kožici, pečkah), medtem ko so njihove koncentracije majhne v grozdnem soku. Zaradi tega je njihova količina veliko večja v rdečih kot v belih vinih. S podaljševanjem časa maceracije se povečuje tudi njihova koncentracija. Koncentracije katehina v rdečih vinih variirajo med 130 in 400 mg/L, medtem ko so vsebnosti epikatehina približno polovico manjše. V belih vinih količina katehina niha med 20-50 mg/L in vrednosti epikatehina polovico manjše. Vsebnosti flavan-3-olov in proantocianidinov skupaj se v rdečih vinih gibljejo od 120 do 3500 mg/L (Vrhovšek, 1996).

2.4.4.1.2 Antocianidini

Antocianidini so rdeči pigmenti v grozdu, ki se večinoma nahajajo v jagodni kožici. Njihova struktura vsebuje dva benzenova obroča, povezana s kationsko vezjo. V vinu je bilo prepoznanih pet molekul z dvemi ali tremi prostimi hidroksilnimi skupinami (Ribéreau-Gayon in sod., 2006) na B-obroču (delfinidin, cianidin, petunidin, malvidin in peonidin). Malvidin in peonidin imata samo eno prosto -OH-skupino v B-obroču, vendar je pomembno dejstvo, da sta prav malvidin in peonidin najverjetneje metabolizirana. Količina skupnih antocianidinov se giblje, v odvisnosti od sorte, med 40 in 1300 mg/L (Vrhovšek, 1996).

2.4.4.1.3 Flavonoli

V kožici rdečih vinskih sort *Vitis vinifera* je bilo odkritih pet glikonskih oblik flavonolov: kvercetin-3-glukoronid, kvercetin-3-glukozid, miricetin-3-glukozid, izoramnetin-3-glukozid in kamferol-3-glukozid. V kožicah belih sort so do sedaj odkrili kvercetin-3-

glukoromid, kvercetin-3-glukozid in kamferol-3-glukozid. Količinsko najpomembnejša flavonola, kvercetin-3-glukoromid in kvercetin-3-glukozid, najdemo predvsem v pecljevini in jagodni kožici. V študijah so bile določene vsebnosti flavonolov v rdečih vinih med 2 in 17 mg/L za kvercetin in 0,0-18,3 mg/L za miricetin. Vsebnosti teh spojin v belih vinih so pod mejo zaznave (Vrhovšek, 1996).

2.4.4.2 Neflavonoidi

V to skupino uvrščamo hidroksicimetne kisline, hidroksibenzojske kisline in stilbene.

2.4.4.2.1 Hidroksicimetne kisline

V to skupino uvrščamo kaftarno, kutarno, kavno, *p*-kumarno, ferulno in fertarno kislino. Hidroksicimetne kisline so najpomembnejša skupina neflavonoidov tako v rdečih kot tudi belih vinih. Medtem ko so v rdečih vinih najpomembnejši fenoli flavonoidi, so hidroksicimetne kisline najpomembnejši fenoli belih vin. Vsebnosti hidroksicimetnih kislin se v povprečju gibljejo med 20 in 120 mg/L za rdeča vina, medtem ko so vsebnosti za bela vina polovico manjše. V večini vin je trans-kaftarna kislina zastopana v največjih koncentracijah, sledi ji trans-*p*-kutarna, medtem ko so druge spojine v manjših koncentracijah.

Prostih kislin (kavne, *p*-kumarne in ferulne) v grozdju ni, vendar se tvorijo zaradi esterazne aktivnosti med vinifikacijo. Vsebnosti prostih kislin so ponavadi majhne in sicer do 2 mg/L za posamezno prosto kislino. Na njihovo koncentracijo močno vplivata tehnologija in skladiščenje vina.

Količinsko si v vinu hidroksicimetne kisline sledijo takole: trans-kaftarna > trans-*p*-kutarna > trans-kavna > trans-*p*-kumarna > cis-*p*-kutarna > fertarna > ferulna kislina (Vrhovšek, 1996).

2.4.4.2.2 Hidroksibenzojske kisline

Glavne proste hidroksibenzojske kisline v rdečem vinu so galna, vanilinska in siringinska kislina. Galna kislina je močan antioksidant, ker galna kislina in njeni estri vsebujejo tri proste hidroksilne skupine. Ekstrahir se iz grozdnih pečk in je ponavadi glavna hidroksibenzojska kislina v rdečih vinih. Njena ekstrakcija je relativno počasna, zato večje koncentracije dobimo z daljšim maceracijskim časom. V rdečih vinih se vsebnosti gibljejo okoli 80 mg/L, medtem ko so v belih vinih manjše (do 10 mg/L, Vrhovšek, 1996).

2.4.4.2.3 Stilbeni (skupina resveratrola)

Resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben) je v enologiji predmet številnih študij zadnjih let, saj naj bi imel zaradi svojih antioksidacijskih lastnosti varovalni učinek proti boleznim srca in ožilja. V vinu se nahaja v štirih oblikah: cis- in trans-resveratrol ter cis- in trans-glukozid resveratrola (Vrhovšek in sod., 1996). Na koncentracijo resveratrola v vinu vplivajo številni dejavniki- od stopnje dozorelosti grozdja in načina vinifikacije grozdja do načinov donegovanja vina. V grozdju se nahaja v jagodni kožici. Zaradi tega je koncentracija resveratrola dosti večja v rdečih vinih kot v belih. Največje vsebnosti vsote vseh štirih oblik resveratrola, dokazane do sedaj, dosegajo v rdečih vinih do 30 mg/L, medtem ko se povprečne vsebnosti za rdeča vina gibljejo med 5 in 7 mg/L. V belih in rose vinih do 1 mg/L. Podatek o priporočljivem dnevnom vnosu od 3 mg do 1 g, priporočeno s strani ameriške agencije za hrano in zdravila, pomeni 1000 kozarcev vina. Na vsebnost resveratrola v vinu vplivajo okolje rasti grozdja (temperatura, vlažnost), sorta vina in način skladiščenja.

2.4.4.3 SO₂ (žveplov dioksid)

V najrazličnejših področjih živilske industrije se uporablja žveplov dioksid (pogovorno žveplo) kot antioksidant in inhibitor (preprečevalec, zaviralec) mikrobiološke aktivnosti. Delovanje žvepla v kletarstvu se odraža v vrsti fizikalnih in kemijskih reakcij, ki vključujejo predvsem:

- preprečevanje rasti in/ali ubijanje neželenih mikroorganizmov: bakterij rodu *Lactobacillus* in *Pediococcus* ter ne-*Saccharomyces* kvasovk;
- preprečevanje delovanja oksidacijskih encimov (polifenoloksidaz-tirozinaz ali lakaz v inficiranem grozdju);
- vezavo porabnikov žvepla (acetaldehyda, piruvata, keto-glutarata in antocianov);
- preprečevanje reakcij porjavenja, t.j. tvorbo rjavih pigmentov.

Žveplov dioksid je pod normalnimi pogoji plin. Je dobro topen v vodi, njegova topnost pa je funkcija temperature. Pri nižjih temperaturah je topnost boljša. Žveplov dioksid, raztopljen v moštu ali vinu, se obnaša kot kislina, kar se posledično kaže v treh različnih disociacijskih oblikah, katerih delež je odvisen od pH. Pri pH pod 1,86 prevladuje molekularna oblika (SO₂). Pri pH od 1,86-7,18 je glavna bisulfitna oblika (monohidrogen sulfitni ion; HSO₃⁻), pri pH nad 7,18 pa je glavna sulfitna oblika (sulfitni ion; SO₃²⁻). Iz te delitve je razvidno, da je pri vrednostih pH mošta in vina prevladujoča oblika bisulfitnega iona, delež ostalih oblik pa je odvisen od pH konkretnega vzorca.

Molekularna oblika žveplovega dioksida je pomembna zaradi protimikrobnega delovanja, torej procesov kvara zaradi neželenih bakterij in kvasovk; hkrati pa je tudi senzorično zaznavna z vonjanjem. Delež molekularne oblike s naraščajočo vrednostjo pH pada.

Bisulfitna oblika žveplovega dioksida je s stališča kletarstva najmanj pomembna zaradi reakcij vezave žvepla s porabniki, ki nastanejo med alkoholno fermentacijo: acetaldehidom, keto-kislinami, oksidiranimi fenolnimi spojinami, antociani in glukozo.

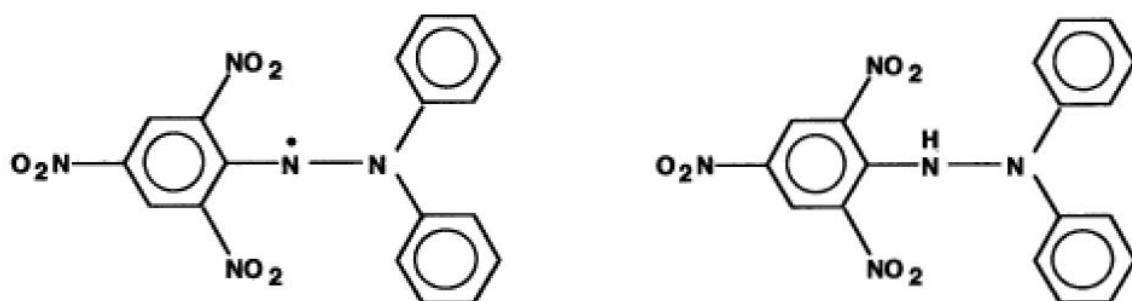
Pozitiven vidik vezave bisulfitne oblike zlasti z acetaldehidom kot glavnim porabnikom, ki je produkt reakcij oksidacije mladega vina ali staranja, je senzoričen (predvsem bela vina pogosto opišemo kot oksidirana, aldehydna). Druga prednost vezave žvepla je pri porjavenju, kjer pride do tvorbe rjavih pigmentov iz oksidiranih fenolnih spojin zaradi encimskih oksidacij v moštu oziroma kemijskih oksidacij v vinu; v obeh primerih pride do izgube prostega žveplovega dioksida.

Sulfitna oblika deluje kot antioksidant, čeprav je prisotna v izredno majhnih koncentracijah (od 0,006 % pri pH 3,0 do 0,06 % pri pH 4,0). Reakcija sulfitnega iona s kisikom je relativno hitra, kajti etanol v vinu nekoliko upočasni hitrost reakcije. Nesporočeno je dejstvo, da ta reakcija s kisikom upočasni oksidacijo fenolnih spojin ob tvorbi kinonov, tvorbo acetaldehida in rjavih pigmentov (Košmerl, 2000).

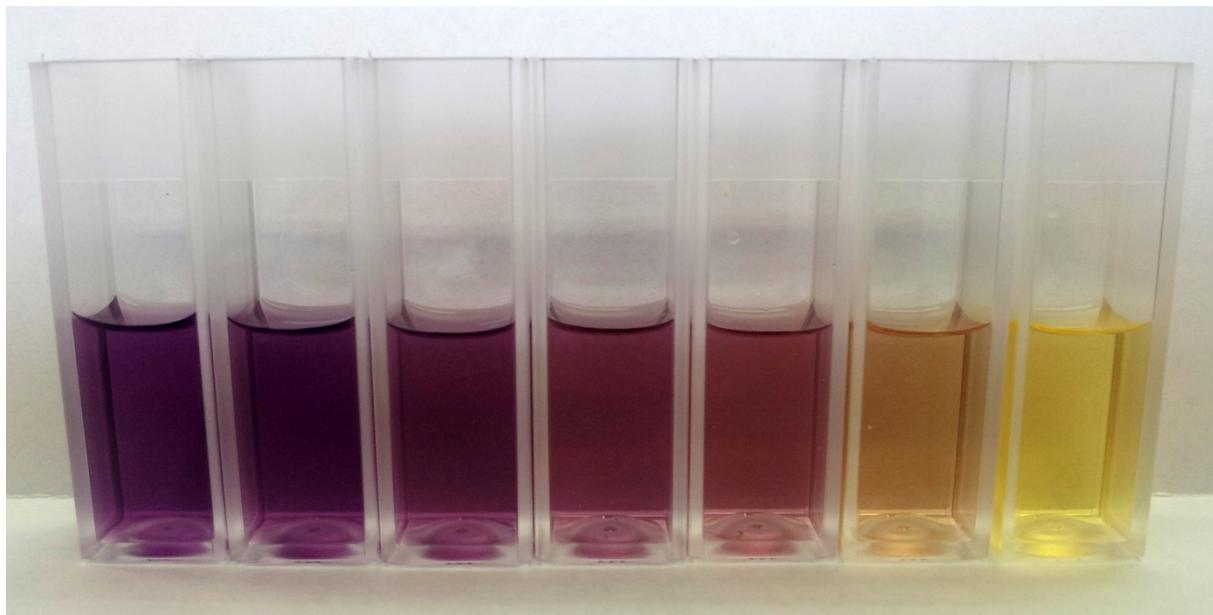
2.4.5 Določanje antioksidantov v vzorcih pijač

2.4.5.1 Določanje antioksidativnega potenciala z DPPH^\bullet radikalom

Metodo s prostim radikalom DPPH^\bullet je predstavil Marsden Blois na Univerzi Stanford, ki je kot modelni antioksidant uporabil cistein in je ena izmed najstarejših indirektnih metod za določanje antioksidativnega potenciala (Molyneux, 2004; Kedare in Singh, 2011). DPPH^\bullet (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) je stabilen prosti radikal, ki zaradi delokalizacije prostega elektrona okoli molekule, le-ta ne tvori dimer, kot bi se zgodilo z mnogimi drugimi radikali. Delokalizacija na molekuli povzroči tudi močno vijolično barvo raztopine DPPH . Absorpcijski maksimum je pri valovnih dolžinah okoli 520 nm. Ko zmešamo raztopino s snovjo, ki lahko odda vodikov atom, se tvori reducirana oblika molekule difenilpikrilhidrazina (DPPH_2) in vijolična barva raztopine se pretvori v bledo svetlo rumeno barvo, ki nastane zaradi prisotnosti pikrilne skupine. V sledeči enačbi je prikazan primer reakcije antioksidanta z DPPH (Molyneux, 2004; Kedare in Singh, 2011).



Slika 4: Strukturni formuli difenilpikrilhidrazila (DPPH^\bullet) (levo) in difenilpikrilhidrazina (DPPH_2 , reducirana oblika) (desno) (Molyneux, 2004)



Slika 5: Sprememba barve raztopine iz vijolične ($DPPH^{\bullet}$) v bledo svetlo rumeno ($DPPH_2$)
(foto: Hodnik M.)

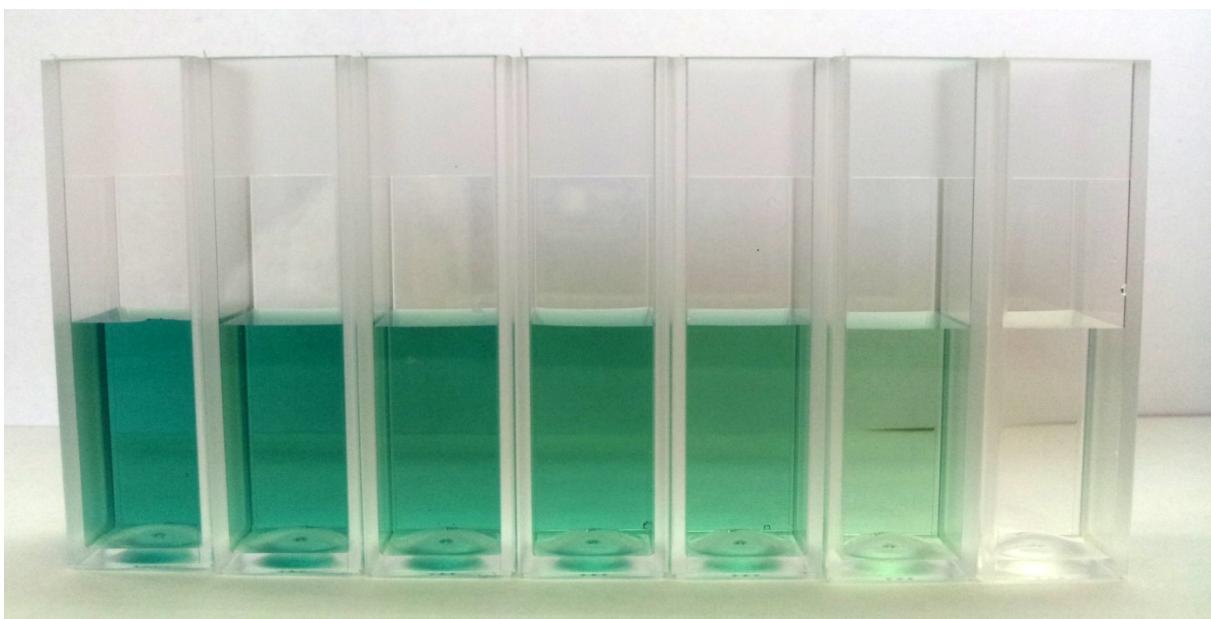
Ta metoda je hitra, enostavna, poceni in pogosto uporabljena za določanje antioksidativnega potenciala posameznih spojin in njihovih zmesi. Gre za spektrofotometrično merjenje spremembe koncentracije $DPPH^{\bullet}$. Zmanjšanje koncentracije $DPPH^{\bullet}$ je posledica reakcije med radikalom $DPPH^{\bullet}$ in antioksidantom. Količina preostalega $DPPH^{\bullet}$ v proučevanem sistemu je merilo za antioksidativni potencial določene spojine (Kedare in Singh, 2011).

2.4.5.2 Določanje antioksidativnega potenciala z ABTS $^{\bullet}$ radikalom

Ena izmed najpogosteje uporabljenih metod je indirektna metoda določanja antioksidativnega potenciala z ABTS $^{\bullet}$ radikalom (Roginsky in Lissi, 2005).

Prednost ABTS metode je njena preprosta uporaba in možnost za rutinske analize v vsakem laboratoriju. Slabost metode je, da podaja sposobnost spojin za reakcijo z ABTS, saj reagira z -OH skupinami v aromatski spojini, ne glede na to, ali te prispevajo k antioksidativni aktivnosti ali ne (Roginsky in Lissi, 2005).

V odsotnosti fenolnih snovi je ABTS $^{\bullet}$ radikal precej stabilen, v prisotnosti donorja vodikovega atoma (fenoli) pa hitro reagira in postane brezbarven (Roginsky in Lissi, 2005). Zmanjšanje absorbance radikala je proporcionalno koncentraciji in aktivnosti antioksidanta v analiziranem vzorcu (Fernández-Pachón in sod., 2006).

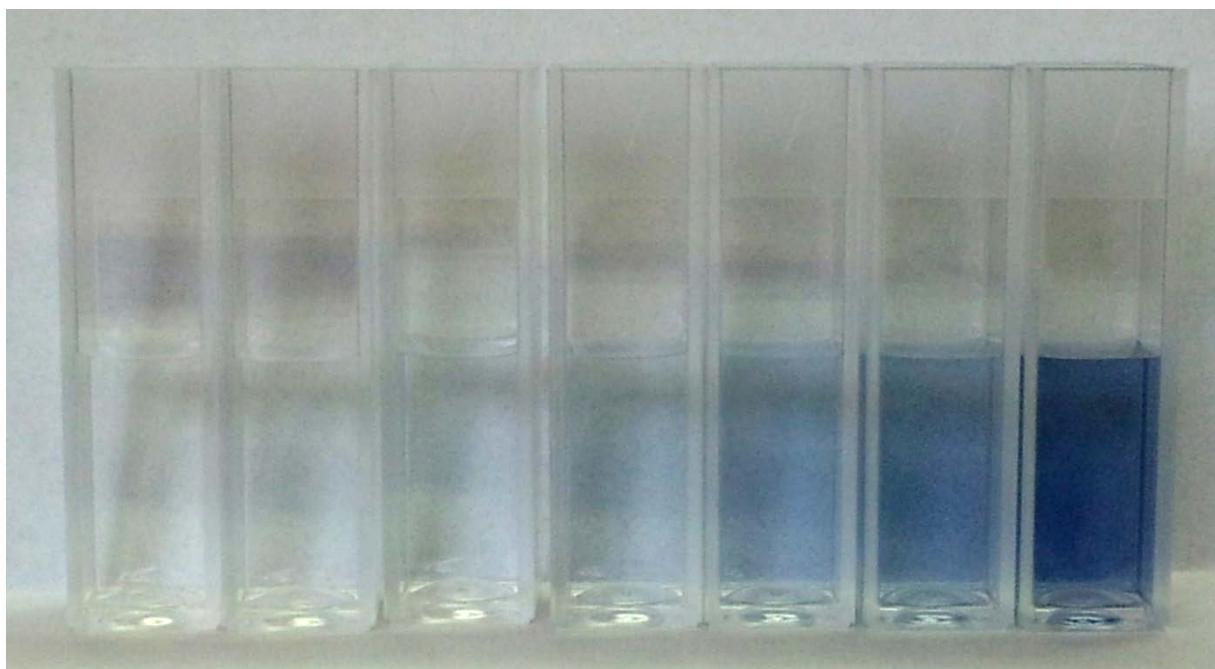


Slika 6: Sprememba barve ABTS[•] iz zeleno-modre oksidirane v brezbarvno reducirano obliko (foto: Hodnik M.)

Radikal ABTS[•] je topen v vodnih in organskih topilih in se lahko uporablja za določanje antioksidativnega potenciala tako hidrofilnih kot lipofilnih antioksidantov (Arnao, 2000). Rice-Evans in Miller (1997) sta metodo preizkusila, ko sta želela povezati antioksidativno sposobnost nekega flavonoida z njegovo strukturo. S to metodo sta definirala sposobnost antioksidantov, da polovijo radikale, v primerjavi s tisto, ki jo ima Troloks (vodotopni analog vitamina E). Vsebnost antioksidantov v nekem vzorcu tako izrazimo kot Troloks ekvivalente TEAC (Troloks Equivalent Antioxidant Capacity). Če je v vzorcu koncentracija antioksidantov, ki ima enak učinek kot 1 mM Troloks, ima vzorec 1 TEAC. Za večji oziroma manjši antioksidativni učinek, je določena TEAC vrednost ustrezno večja ali manjša (Abram, 2000).

2.4.5.3 Določanje skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu reagentom

Vsebnost skupnih fenolnih spojin v snovi (npr. vinu) določamo s Folin-Ciocalteujevo metodo, ki temelji na tvorbi modro obarvanega kompleksa fenolnih spojin s Folin-Ciocalteujevim (FC) reagentom (Abram in sod., 2010).



Slika 7: Vpliv dodanih antioksidantov na nastanek modro obarvanih produktov s FC reagentom (foto: Hodnik M.)

Pri reakciji med fenolnimi spojinami in FC reagentom pride do oksidacije fenolatov, pri čemer zaradi redukcije heteropolnih kislin nastane moder kompleks oz. kromogen, ki ima absorpcijski maksimum pri 765 nm. Ker so fenolati prisotni le v bazičnem mediju, FC reagent in nastali produkti pa so v takih pogojih nestabilni, izvajamo reakcijo pri šibko bazičnih pogojih in z veliko koncentracijo reagenta (Roginsky in Lissi, 2005; Prior in sod., 2005; Karadag in sod., 2009). Vsebnost omenjenega kompleksa določimo spektrofotometrično: izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 765 nm (A_{765}). Večja absorbanca pomeni večjo koncentracijo fenolnih spojin. Umeritveno krivuljo pripravimo z reakcijo FC reagenta z izbrano čisto fenolno spojino. Graf odvisnosti A_{765} od koncentracije fenolne spojine omogoči, da iz izmerjene vrednosti A_{765} odčitamo vrednost koncentracije skupnih fenolnih spojin v določeni snovi (Abram in sod., 2010).

Slabost te metode je, da lahko določimo več fenolnih spojin, kot jih dejansko je, saj FC reagent ni specifičen in lahko poleg fenolnih spojin reagira tudi z ogljikovimi hidrati, karotenoidi, aminokislinami, vitaminom C itd. (Prior in sod., 2005).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorci

Za poskus smo izbrali naslednje vzorce pijač:

- refošk (suho vino, št. serije L002/1000000, reg. št. GO-2065/2010, alk. 11,5 % vol., letnik 2010, pridelal in polnil: Vinakoper d.o.o., Šmarska cesta 1, Koper),
- laški rizling (suho vino, št. serije 02, št. steklenic v seriji 42000, št. odločbe: MB-609/10/5, alk. 12,0 % vol., letnik 2009, pridelal in polnil: Jeruzalem Ormož d.o.o. (Puklavec & friends), vinorodni okoliš Štajerska Slovenija),
- jabolčni sok (datum proizvodnje 19.9.2011, rok uporabe 18.3.2013, sadni delež 100 %, proizvajalec: Fructal d.d., Ajdovščina),
- propolis (serija 56479, rok uporabe najmanj do 9/2013, sestavine: alkohol, propolis (14 %), med, rastlinski glicerin, proizvajalec: Božnar čebelarstvo d.o.o., Polhov Gradec),
- zeleni čaj (kitajski, št. serije L468, rok uporabe 13.4.2013, v obliki filter vrečk 1,8 g, proizvajalec: Žito d.d., Šmartinska 154, Ljubljana),
Priprava čaja: v 250 mL čašo smo dali 150 mL mQ vode, ki smo jo segreli v mikrovalovni pečici segreli do vrenja (90 s). Nato smo počakali, da se je temperatura vode znižala na 80 °C in dodali filter vrečko čaja. V vodi smo jo pustili 3 minute in nato odstranili,
- črni čaj (indijski, št. serije L351, rok uporabe 19.8.2013, v obliki filter vrečk 1,5 g, proizvajalec: Žito d.d., Šmartinska 154, Ljubljana)
Priprava čaja: v 250 mL čašo smo dali 150 mL mQ vode in jo v mikrovalovni pečici segreli do vrenja (90 s). Nato smo dali v vodo filter vrečko čaja in jo pustili 3 minute. Po tem smo jo odstranili.

in sledeče modelne antioksidante:

- dehidroaskorbinska kislina (Aldrich)
- katehin (Sigma)
- klorogenska kislina (Fluka)
- galna kislina (Merck)
- epigalokatehin galat (Extra Synthesis)
- žveplov dioksid (v obliki žveplove(IV) kisline, Merck)
- askorbinska kislina (Sigma)
- kaftarna kislina
- Troloks (Aldrich)
- kvercetin (Sigma).

3.1.2 Laboratorijska oprema

Za poskus smo potrebovali:

- UV-VIS spektrofotometer (HP),
- UV-VIS spektrofotometer (Varian Cary 100 Bio),
- kivete (2,5 mL makro PS, Brand),
- avtomatske pipete,
- analitska tehnica
- tehnicka (Exacta 2200 EB),
- štoparica,
- centrifugirke (15 mL, TPP),
- centrifugirke (50 mL, TPP),
- mikrocentrifugirke (2 mL, Brand),
- pH meter,
- kapalke
- stojala za epruvete in mikrocentrifugirke,
- stresalnik,
- centrifuga (Tehnica Centric 322B),
- magnetno mešalo,
- filtrni papir,
- injekcijske igle.

3.1.3 Reagenti

- ocetna kislina (CH_3COOH , M=60,05 g/mol, Merck),
- metanol (CH_3OH , M=32,04 g/mol, Merck),
- etanol (96 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, M=46,07 g/mol, Merck),
- 2-propanol ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, M=60,10 g/mol, Merck),
- 10 M raztopina NaOH; zatehtali smo 20 g NaOH v čašo in raztopili z mQ vodo v skupnem volumnu 50 mL,
- acetatni pufer; v čašo smo zatehtali ustrezno količino ocetne kisline in dolili mQ vodo do skupnega volumna 200 mL. Z 10 M NaOH smo nato uravnavali na vrednost pH 5. Tako smo pripravili 250 mM raztopino acetatnega pufra, ki smo ga uporabili v poskusu,
- TRIS pufer; v čašo smo zatehtali ustrezno količino TRIS-a. Nato smo izračunali potreben dodatek mQ vode. Tako dobljeno raztopino smo razdelili na dva dela in pH uravnavali z ocetno kislino na vrednosti pH 7,4 in 5. Končna koncentracija Tris-a je bila 250 mM.
- fosfatni pufer; v čašo smo natehtali 1,44 g 10 mM Na_2HPO_4 in 0,27g 1,8 mM KH_2PO_4 . Dodali smo 1000 mL mQ vode in s HCl uravnali pH vrednost na 7,4. Fosfatni pufer ima končno koncentracijo 5 mM.
- 20 % raztopina natrijevega karbonata (Na_2CO_3),

- Folin-Ciocalteu reagent (SIGMA); tik pred uporabo smo ga razdredili z mQ vodo v razmerju 1:2 (1 mL FC reagenta + 2 mL mQ vode),
- ABTS (2,2-azino-bis(3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid), $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$, $M=514,62$ g/mol, SIGMA); v čašo smo na 10 mL mQ vode dodali 25 mg ABTS reagenta (ALDRICH). Nato smo v čašo dodali prebitek manganovega dioksida. Čašo smo prekrili z aluminijasto folijo ter na magnetnem mešalu mešali eno uro. Po koncu mešanja smo raztopino centrifugirali 10 minut ter nato prefiltrirali skozi filtrni papir. Tako smo dobili koncentriran ABTS, ki smo ga v poskus dodali toliko, da smo dobili vrednost začetne absorbance okrog 1,
- DPPH[•] (2,2-diphenyl-1-pikryl-hydrazil, $C_{18}H_{12}N_5O_6$, $M=394,32$ g/mol, ALDRICH); v 15 mL centrifugirko smo zatehtali 2 mg DPPH[•] in dodali 5 mL metanola. Tako smo pripravili ≈ 1 mM raztopino, ki smo jo ob ustreznom razredčenju uporabili v poskusih.

3.2 METODE DELA

3.2.1 Umeritvene krivulje

3.2.1.1 Umeritvena krivulja za Troloks s Folin-Ciocalteu metodo

V vsako 2 mL centrifugirko smo odpipetirali različne volumne 1 mM Troloksa, raztopljenega v metanolu, in dopolnili z metanolom do 120 µL.

Preglednica 5: Priprava raztopin za umeritveno krivuljo Troloksa z FC reagentom

Končna konc. Troloksa (µM)	Volumen Troloksa s konc. 1mM (µL)	Volumen metanola (µL)	Volumen mQ H ₂ O (µL)	Volumen FC reagenta (µL)	Volumen 20% Na ₂ CO ₃ (µL)
0	0	120	1380	250	250
5	10	110	1380	250	250
10	20	100	1380	250	250
15	30	90	1380	250	250
20	40	80	1380	250	250
30	60	60	1380	250	250
40	80	40	1380	250	250
60	120	0	1380	250	250

Razliko do 1500 µL smo dopolnili z mQ vodo. Nato smo v centrifugirke dodali 250 µL Folin-Ciocalteu reagenta in premešali. Po 5 minutah smo dodali 250 µL 20 % raztopine Na₂CO₃ in ponovno premešali. Po 60 minutah inkubacije na sobni temperaturi, smo vsebino centrifugirk prenesli v 2,5 mL PS kivete in izmerili absorbancijo proti slepemu vzorcu pri valovni dolžini 765 nm. S pomočjo enačbe premice umeritvene krivulje s Troloksom smo izračunali koncentracijo skupnih fenolnih spojin v vzorcih pijač in jo izrazili kot ekvivalent Troloksa (mmol/L).

3.2.1.2 Umeritvena krivulja za Troloks z ABTS metodo

Umeritvene krivulje z ABTS metodo smo naredili v treh različnih topilih. V vseh primerih smo v test dodajali 1 mM Troloks, raztopljen v metanolu. Uporabili smo naslednja topila:

- a.) 5 mM fosfat pH 7,4
- b.) mQ voda
- c.) metanol

V stojalu smo si pripravili 2 mL centrifugirke in sicer tri paralelke za slepe vzorce in dve paralelki za standardne raztopine Troloksa.

Preglednica 6: Priprava umeritvenih krivulj za Troloks v različnih topilih za ABTS test

	V topilu a		V topilu b		V topilu c	
ABTS	60 µL		60 µL		60 µL	
Topilo	1860 µL		1860 µL		1860 µL	
	Troloks v MeOH	MeOH	Troloks v MeOH	MeOH	Troloks v MeOH	mQ voda
	0 µL	80 µL	0 µL	80 µL	0 µL	80 µL
	10 µL	70 µL	10 µL	70 µL	10 µL	70 µL
	20 µL	60 µL	20 µL	60 µL	20 µL	60 µL
	30 µL	50 µL	30 µL	50 µL	30 µL	50 µL
	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL
	60 µL	20 µL	60 µL	20 µL	60 µL	20 µL

Po 60-minutni inkubaciji pri sobni temperaturi smo izmerili absorbance pri valovni dolžini 734 nm.

3.2.1.3 Umeritvena krivulja za Troloks z DPPH metodo

Kot pri umeritvenih krivuljah z metodo ABTS, smo tudi tu naredili tri umeritvene krivulje. V vseh primerih smo v test dodajali 1 mM Troloks, raztopljen v metanolu. Uporabili smo naslednja topila:

- a.) metanol
- b.) 50 % metanol in 50 % 50 mM TRIS pH 7,4
- c.) 50 % metanol in 50 % 50 mM acetatni pufer pH 5

V stojalo smo si pripravili 2 mL centrifugirke in sicer tri paralelke za slepe vzorce in dve paralelki za standardne raztopine Troloksa.

Preglednica 7: Priprava umeritvenih krivulj za Troloks v različnih topilih za DPPH test

	V topilu a		V topilu b		V topilu c	
1mM DPPH	200 µL		200 µL		200 µL	
TRIS pH 7,4	-		1000 µL		-	
acetatni pufer pH 5	-		-		1000 µL	
	MeOH	Troloks v MeOH	MeOH	Troloks v MeOH	MeOH	Troloks v MeOH
	1800 µL	0 µL	800 µL	0 µL	800 µL	0 µL
	1790 µL	10 µL	790 µL	10 µL	790 µL	10 µL
	1780 µL	20 µL	780 µL	20 µL	780 µL	20 µL
	1770 µL	30 µL	770 µL	30 µL	770 µL	30 µL
	1760 µL	40 µL	760 µL	40 µL	760 µL	40 µL
	1740 µL	60 µL	740 µL	60 µL	740 µL	60 µL
	1720 µL	80 µL	720 µL	80 µL	720 µL	80 µL

Po 60-minutni inkubaciji pri sobni temperaturi smo izmerili absorbance pri valovni dolžini 520 nm.

3.2.2 Izvedba eksperimenta pri različnih časih inkubacije s Folin-Ciocalteu metodo

Za vsak vzorec pijač ali modelnega antioksidanta (MAO) smo v 15 mL centrifugirki pripravili mešanico, ki je vsebovala 9360 µL mQ vode, 390 µL določene koncentracije modelnih antioksidantov (preglednica 8) ali 390 µL razredčenega vzorca pijač (preglednica 9) ter 1625 µL Folin-Ciocalteu reagent.

Razredčitve vzorcev pijač v testu so bile za zeleni čaj 1:1000, za jabolčni sok 1:60 in za propolis 1:6000. Koncentracije MAO v testu so bile za katehin 15 µM in 18 µM za galno kislino in CAPE. Te koncentracije se nanašajo na stanje po dodatku natrijevega karbonata v reakcijsko mešanico.

V stojalu smo imeli pripravljene 2 mL centrifugirke s 125 µL 20 % raztopine Na₂CO₃. Ob različnih časih inkubacije vzorca v kislem smo dodali 875 µL pripravljene mešanice v centrifugirke in premešali. Časi inkubacije so bili 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 480 in 1200 sekund. Po 60-minutni inkubaciji pri sobni temperaturi smo vsebino centrifugirk prenesli v 1,5 mL PS kivete in izmerili absorbanco proti slepemu vzorcu pri valovni dolžini 765 nm.

Preglednica 8: Modelni antioksidanti (MAO) za prikaz odvisnosti antioksidativne aktivnosti od različnih časov inkubacije pri metodi Folin-Ciocalteu

MAO	PRIPRAVA
KATEHIN	V 50 mL centrifugirko smo zatehtali 5 mg katehina in dodali 38 mL mQ vode. Tako smo dobili 0,45 mM raztopino.
GALNA KISLINA	V 50 mL centrifugirko smo zatehtali 3 mg galne kisline in dodali 32,7 mL mQ vode. Tako smo dobili 0,54 mM raztopino.
CAPE	V 50 mL centrifugirko smo zatehtali 6,96 mg CAPE in dodali 45 mL metanola. Tako smo dobili 0,54 mM raztopino.

Preglednica 9: Priprava razredčitev posameznih pijač za prikaz odvisnosti antioksidativne aktivnosti od časa inkubacije pri metodi Folin-Ciocalteu

PIJAČA	PRIPRAVA RAZREDČITVE
ZELENI ČAJ	V 15 mL centrifugirko smo odpipetirali 0,30 mL zelenega čaja in dodali 9,70 mL mQ vode.
JABOLČNI SOK	V 15 mL centrifugirko smo odpipetirali 5 mL jabolčnega soka in dodali 5 mL mQ vode.
PROPOLIS	V 2 mL centrifugirko smo odpipetirali 0,2 mL propolisa in dodali 1,8 mL metanola. Nato smo 0,5 mL razredčenega propolisa prenesli v 15 mL centrifugirko in dodali 9,5 mL metanola.

3.2.3 Vpliv topil na določen AOP z DPPH in ABTS

3.2.3.1 Določanje vpliva topila na AOP vzorcev in modelnih antioksidantov z ABTS pri 734 nm

Za test smo uporabili različna topila, in sicer 5 mM PBS pufer s pH 7,4, mQ vodo in metanol. Slepe probe smo delali v treh paralelkah, eksperimente z vzorci pa v dveh paralelkah, in sicer tako, da smo v vse 2 mL centrifugirke dodali 1900 µL topila in 40 µL razredčenega vzorca ali modelnega antioksidanta z določeno koncentracijo. Nato smo v razmaku 30 sekund v centrifugirke dodajali 60 µL ABTS reagenta. Po 60 minutah inkubacije pri sobni temperaturi smo izmerili absorbanco v 2,5 mL PS kivetah pri valovni dolžini 734 nm.

3.2.3.2 Določanje vpliva topila na AOP vzorcev in modelnih antioksidantov z DPPH pri 520 nm

Za test smo uporabili tri različna topila, in sicer metanol, 50 % acetatni pufer s pH 5 in 50 % TRIS acetatni pufer s pH 7,4 (pri obeh je preostalih 50 % metanola). Slepe probe smo

delali v treh paralelkah, eksperimente z vzorci pa v dveh, in sicer tako, kot je prikazano v preglednici 7 za dodatek 40 µL Troloks-a. V 2 mL centrifugirke smo dali ustrezno topilo (ozioroma mešanico) ter 40 µL razredčenega vzorca ali modelnega antioksidanta z določeno koncentracijo. Nato smo v razmaku 30 sekund v vsako centrifugirko dodali 200 µL DPPH v metanolu. Po 60 minutah inkubacije pri sobni temperaturi smo izmerili absorbanco v 2,5 mL PS kivetah pri valovni dolžini 520 nm.

3.2.3.3 Določanje skupnih fenolnih spojin v vzorcih in modelnih antioksidantih s Folin-Ciocalteu reagentom

V 2 mL centrifugirke smo dodali 1440 µL mQ vode, 60 µL vzorca in 250 µL Folin-Ciocalteu reagenta. Po 5 minutah smo dodali še 250 µL 20% raztopine Na₂CO₃ in premešali. Po 60-minutni inkubaciji pri sobni temperaturi smo izmerili absorbanco v 2,5 mL PS kivetah pri 765 nm.

Preglednica 10: Končni razredčitveni faktorji pri določanju vpliva topila in pH na antioksidativno aktivnost

Preglednica 11: Končne koncentracije (μM) modelnih antioksidantov pri določanju vpliva topila in pH na antioksidativno aktivnost

	ABTS 7,4	ABTS mQ	ABTS MeOH	DPPH MeOH	DPPH 5	DPPH 7,4	FC
klorogenska kislina	15	15	15	15	15	13	20
galna kislina	3	7	7	7	7	7	15
askorbinska kislina	20	20	20	20	20	20	30
kaftarna kislina	10	15	15	15	15	10	20
dehidroaskorbinska kislina	300	300	300	300	300	100	100
epigalokatehin galat	2	4	4	4	2	2	5
katehin	5	5	5	15	10	7,5	15
žveplov dioksid (SO_2)	40	40	400	120	40	40	1000
Troloks	20	20	20	20	20	20	30

3.2.4 Kinetika reakcije vzorcev in modelnih antioksidantov v testih za določanje AOP

Kinetiko vzorcev in modelnih antioksidantov smo analizirali na enak način kot v točki 3.2.3, le da so tudi vzorci pijač imeli enako razredčitev in modelni AO enake koncentracije v vseh topilih. Delali smo na spektrofotometru Varian Cary 100 bio, ki omogoča spremeljanje sprememb absorbance za šest kivet hkrati. Najprej smo s spektrofotometrom spremljali stabilnost slepih vzorcev. Nato smo za vsak vzorec pijač in modelnih antioksidantov posebej v 2 mL centrifugirkah pripravili mešanico topil in reagenta. Po dodatku vzorca smo 120 minut spremljali spremenjanje absorbance.

Preglednica 12: Končni razredčitveni faktorji pri spremljanju kinetike vzorcev pijač

VZOREC PIJAČ	FAKTOR R (končna razredčitev v testu)
zeleni čaj	ABTS: 2500 DPPH: 1400
propolis	ABTS: 22000 DPPH: 9000
jabolčni sok	ABTS: 130 DPPH: 50

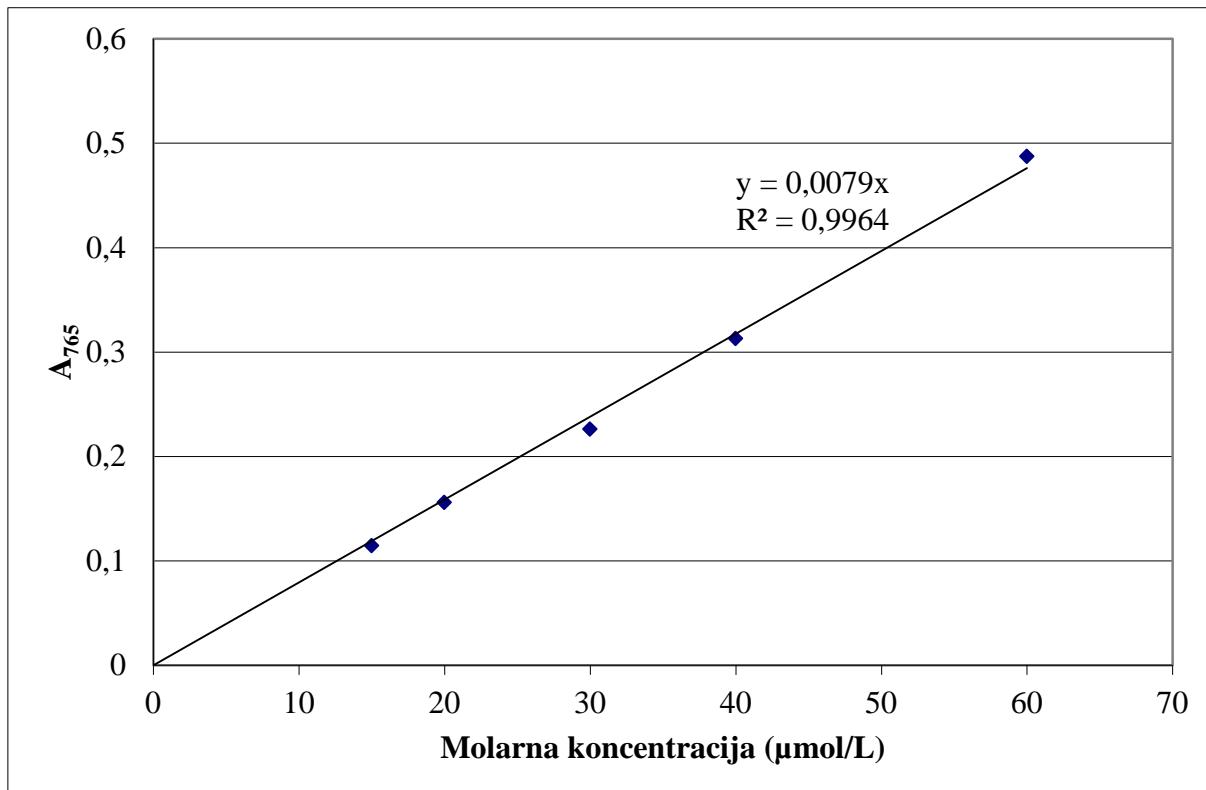
Preglednica 13: Končne koncentracije modelnih antioksidantov pri spremljanju kinetike modelnih antioksidantov

MODELNI ANTOOKSIDANT	KONCENTRACIJA (končna koncentracija v testu v μM)
CAPE	ABTS: 11 DPPH: 10
galna kislina	ABTS: 4 DPPH: 9
katehin	ABTS: 5 DPPH: 10

4 REZULTATI

4.1 UMERITVENE KРИVULJE

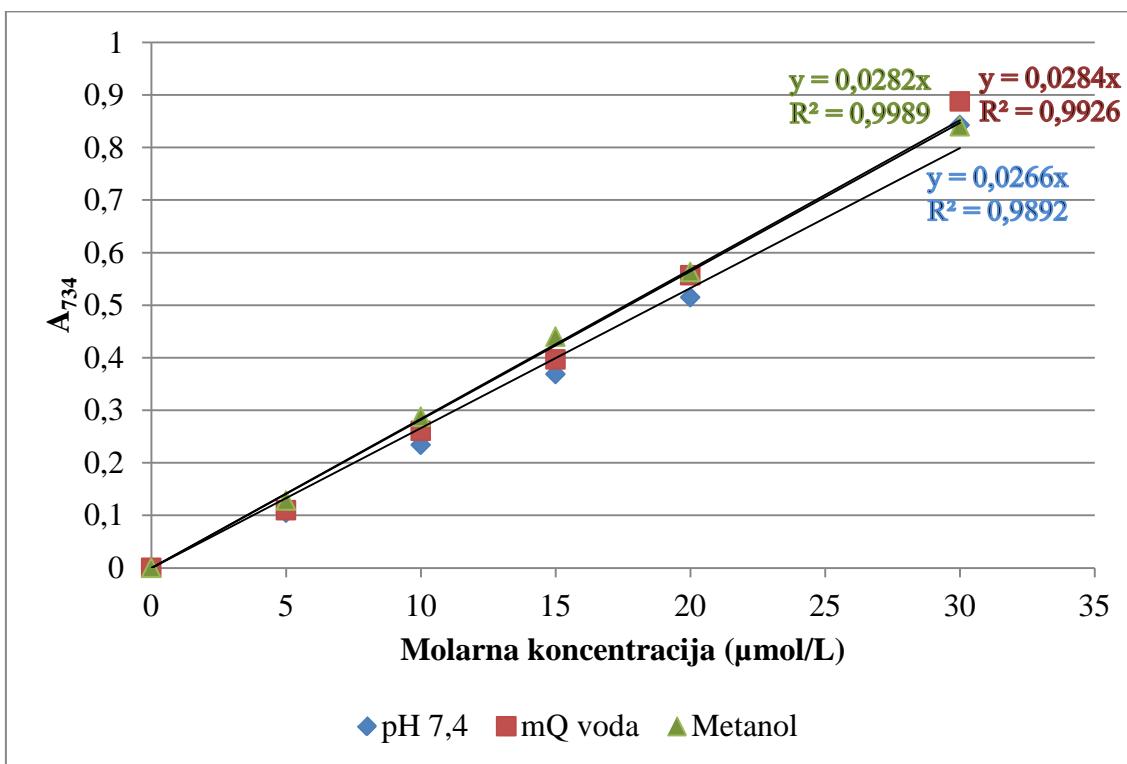
4.1.1 Umeritvena krivulja za Troloks z metodo Folin-Ciocalteu



Slika 8: Grafični prikaz umeritvene krivulje za Troloks po metodi za določanje koncentracije skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu reagentom.

Na sliki 8 je prikazana umeritvena krivulja za Troloks po Folin-Ciocalteu metodi. V testiranem koncentracijskem območju smo določili linearno odvisnost A_{765} od koncentracije. Umeritvene krivulje, ki smo jih pripravili s Troloksom, smo uporabili za vrednotenje vsebnosti polifenolov v vzorcih pijač, ki smo jih izražali kot ekvivalent Troloksa.

4.1.2 Umeritvene krivulje za Troloks z ABTS metodo

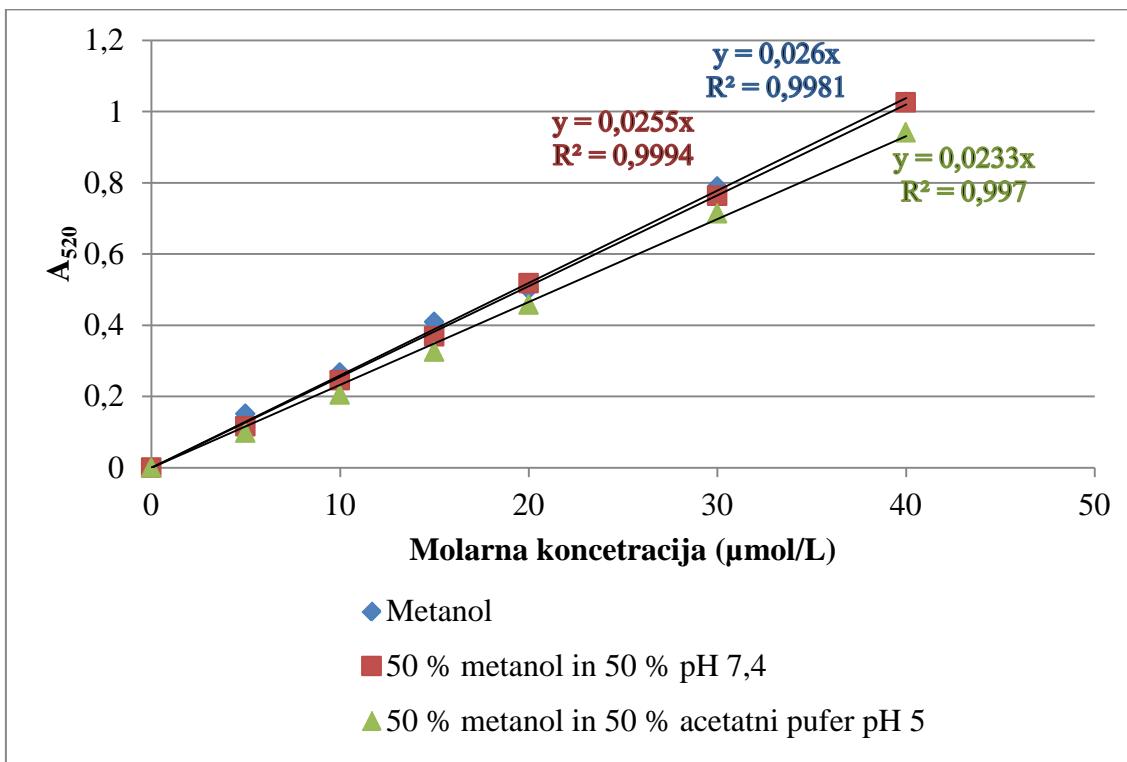


Slika 9: Grafični prikaz umeritvenih krivulj za Troloks po ABTS metodi

Na sliki 9 so prikazane umeritvene krivulje za Troloks po ABTS metodi. V testiranem koncentracijskem območju smo določili linearno odvisnost A_{734} od koncentracije. Največji signal (A_{734}) pri enaki koncentraciji Trolokса smo določili pri preizkušu, ki je potekal v mQ vodi. Najmanjšega smo določili pri testu, ki je potekal pri pH 7,4.

Naklone pridobljene iz umeritvenih krivulj smo uporabili pri določevanju AOP vzorcev pijač in modelnih antioksidantov.

4.1.3 Umeritvene krivulje za Troloks z DPPH metodo

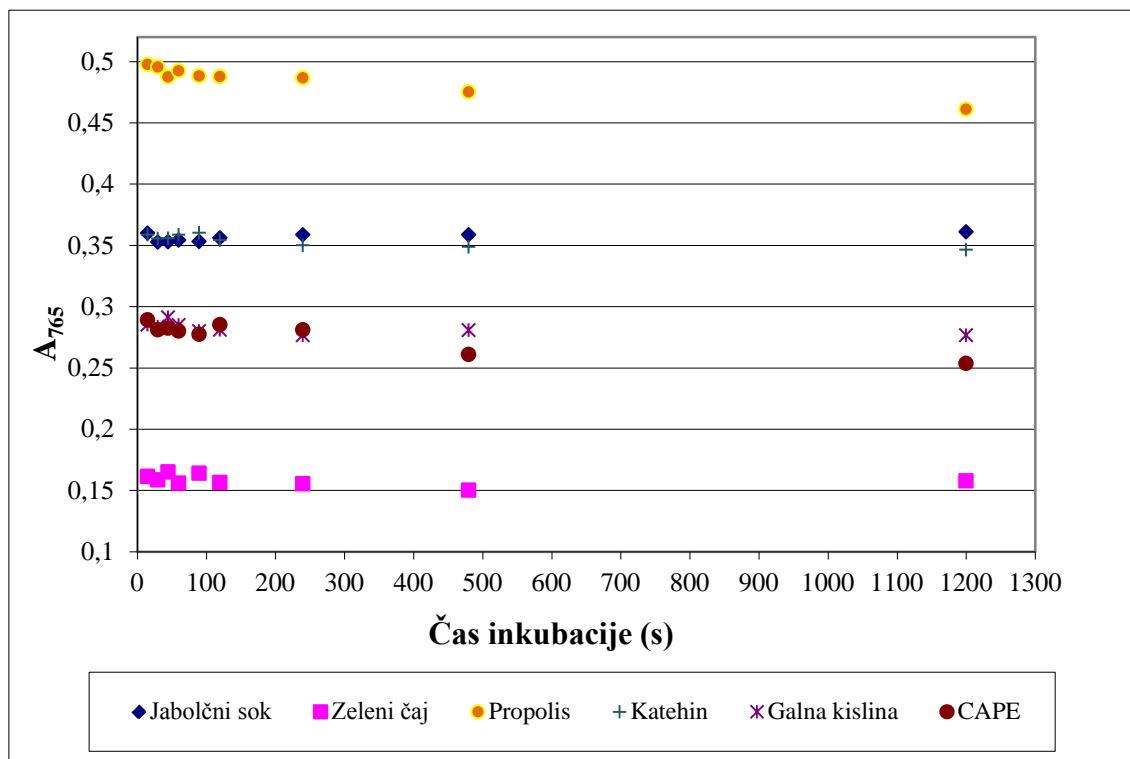


Slika 10: Grafični prikaz umeritvenih krivulj za Troloks po DPPH metodi

Na sliki 10 so prikazane umeritvene krivulje za Troloks po DPPH metodi. V testiranem koncentracijskem območju smo določili linearno odvisnost A_{520} od koncentracije. Največji signal (dA_{520}) pri enaki koncentraciji Trolokса smo določili pri preizkusu, ki je potekal v metanolu. Najmanjšega smo določili pri testu, ki je potekal v pogojih z 50 % metanola in 50 % acetatnega pufra pH 5.

Naklone pridobljene iz umeritvenih krivulj smo uporabili pri določevanju AOP vzorcev pijač in modelnih antioksidantov.

4.2 VPLIV ČASA INKUBACIJE ANTOOKSIDANTOV IN FOLIN-CIOCALTEU REAGENTA PRED DODATKOM BAZE NA IZMERJEN AOP



Slika 11: Odvisnost različnih časov inkubacije antioksidantov in FC reagenta pred dodatkom baze pri metodi Folin-Ciocalteu

Na sliki 11 so za tri vzorce pijač in tri vzorce modelnih antioksidantov prikazane odvisnosti absorbance od časa inkubacije. Čas inkubacije je čas, ki mine med dodatkom Folin-Ciocalteu reagenta in 20 % Na₂CO₃. Najkrajša inkubacija pred dodatkom karbonata je bila 15 sekund, najdaljša pa 20 minut.

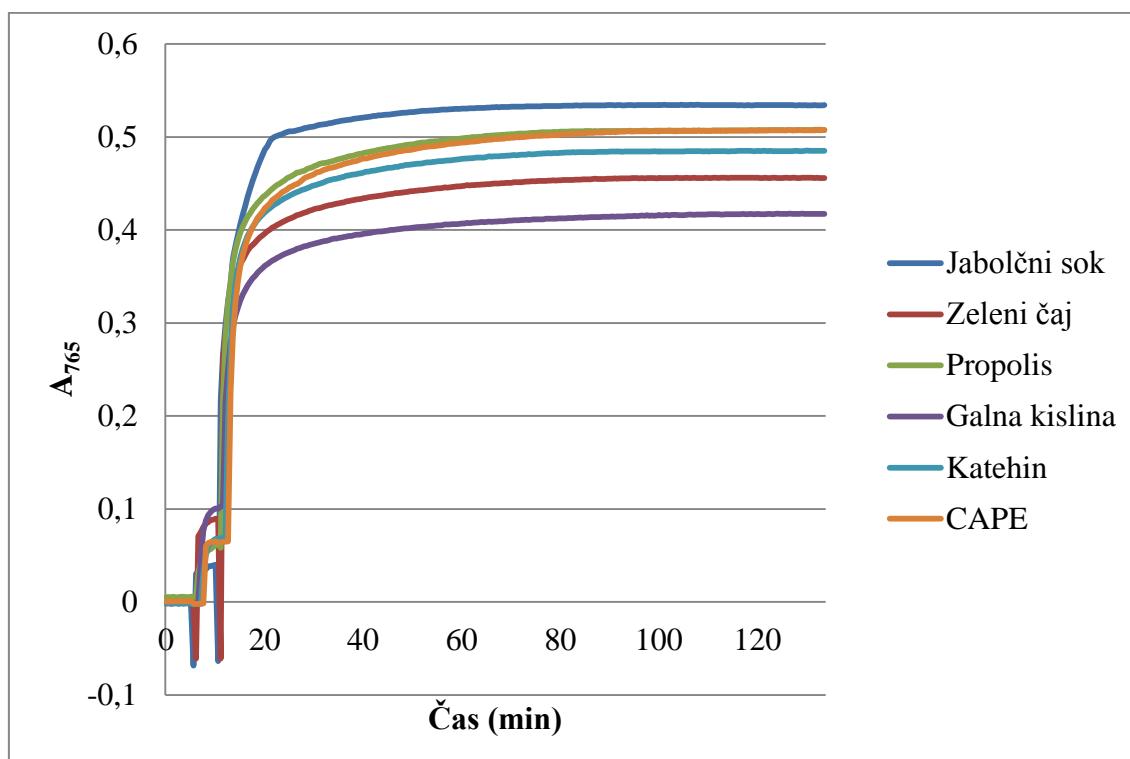
Preglednica 14: Vpliv časa inkubacije pred dodatkom natrijevega karbonata na izmerjeno absorbanco pri 765 nm pri FC metodi

	Jabolčni sok	Zeleni čaj	Propolis	Katehin	Galna kislina	CAPE
Dodatek Na ₂ CO ₃ po 15 sekundah (A ₇₆₅)	0,36011	0,16144	0,49763	0,35866	0,2852	0,28907
Dodatek Na ₂ CO ₃ po 20 minutah (A ₇₆₅)	0,36094	0,1579	0,46116	0,3465	0,27654	0,25379
Razlika (%)	+ 0,2	- 2,2	- 7,9	- 3,5	- 3,1	- 14

Pri jabolčnem soku smo opazili začetno padanje absorbance pri kratkih časih inkubacije. Pri daljših časih inkubacije se vrednost absorbance rahlo zviša na prvotno vrednost. V primeru jabolčnega soka je čas inkubacije tudi najmanj vplival na AOP. V vseh ostalih primerih pa je bila absorbanca po 20-minutni inkubaciji manjša od najkrajšega časa, to je 15 sekund. V vzorcih pijač pa smo največjo odvisnost časa inkubacije na AOP zasledili v vzorcu propolisa. Modelna antioksidanta katehin in galna kislina imata podobno spremembo med prvo in zadnjo točko. Največja razlika med prvo in zadnjo točko je bila pri modelnem antioksidantu CAPE, kjer je bila v primeru 20-minutne inkubacije absorbanca manjša za 14 %.

Videli smo, da pri krajših časih inkubacije ne pride do velikih razlik v absorbanci, zato smo se odločili, da bomo uporabljali čas inkubacije 5 minut, ki se tudi največkrat uporablja.

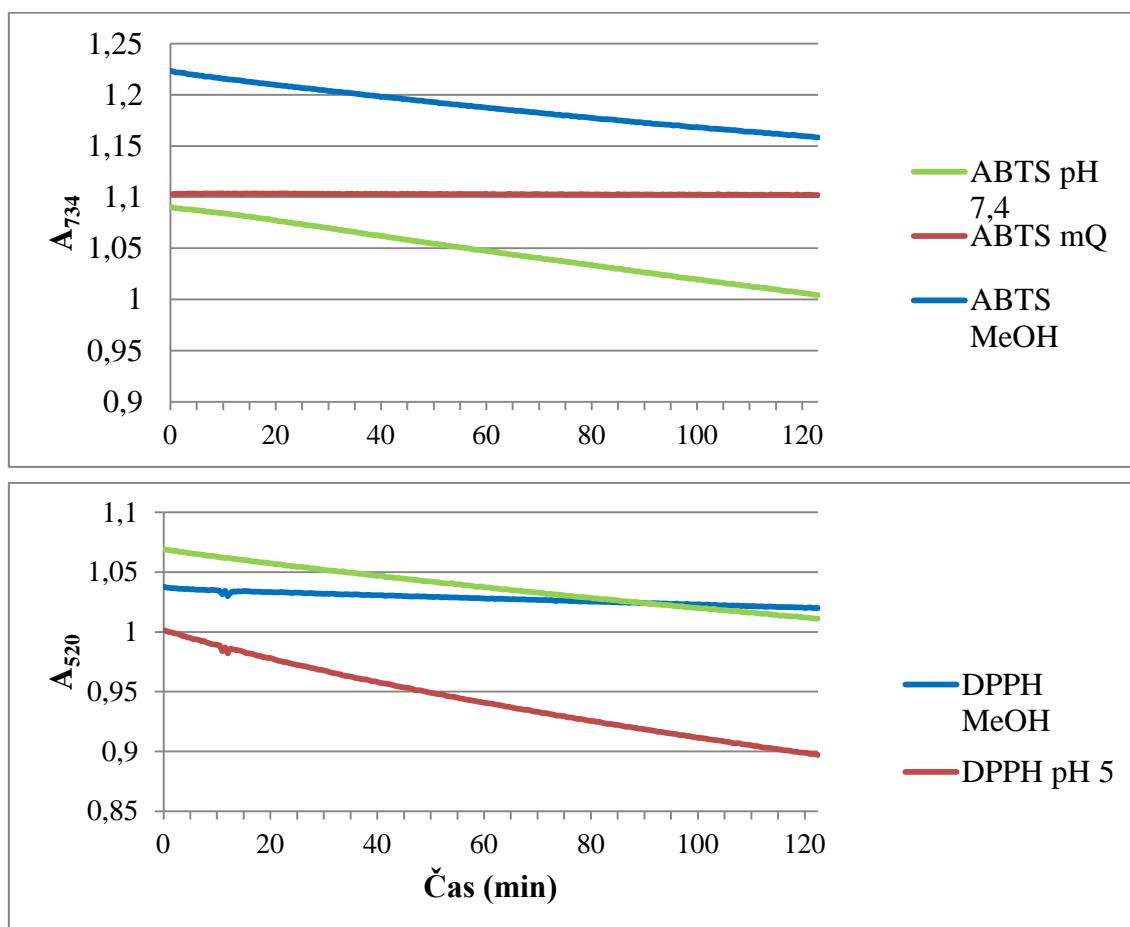
Na izmerjeno absorbanco in s tem določen AOP pa vpliva tudi čas od dodatka natrijevega karbonata do meritve absorbance. Da bi analizirali vpliv časa inkubacije po dodatku karbonata, smo izvajali kontinuirne meritve, kjer smo najprej dodali FC reagent in vzorec, nato po 5 minutah še natrijev karbonat ter kontinuirno spremljali absorbanco do 120 minut. Rezultati so prikazani na sliki 12. Razvidno je, da po dodatku karbonata pride do hitrega naraščanja absorbance. Po približno 20 minutah se hitrost zelo zmanjša in je po 60 minutah že skoraj zanemarljiva. Zato smo se odločili, da bomo meritve absorbance pri metodi FC merili po 60 minutah inkubacije.



Slika 12: Prikaz kinetike po metodi Folin-Ciocalteu za vzorce pijač in modelnih antioksidantov (MAO)

4.3. KINETIKA REAKCIJ ANTIOKSIDANTOV V RAZLIČNIH TOPILIH Z RADIKALOMA ABTS IN DPPH

4.3.1 Stabilnost ABTS in DPPH v različnih topilih



Slika 13: Stabilnost ABTS (zgoraj) in DPPH (spodaj) v izbranih topilih

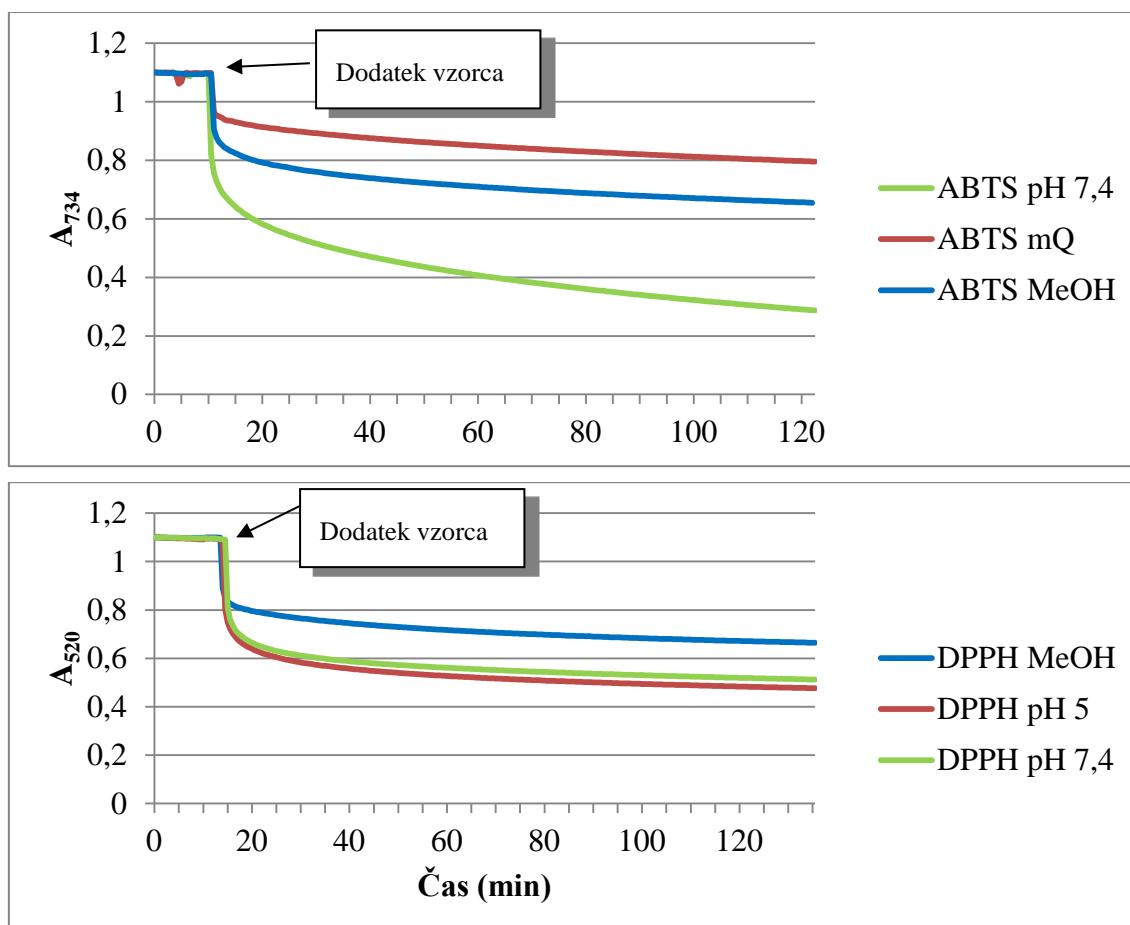
Na sliki 13 je prikazan vpliv inkubacije ABTS in DPPH v različnih topilih na spremembo absorbance v odsotnosti reducentov. S pomočjo tega prikaza lahko tudi ocenimo stabilnost ABTS in DPPH v času 120 min. Opazili smo, da je v mQ vodi radikal ABTS zelo stabilen, česar pa ne moremo trditi za ostala dva pogoja. V pH 7,4 je bila dA na uro enaka 0,043 v prvi uri in 0,041 v drugi uri. Absorbanca se je v 120 minutah zmanjšala za 7,9%. Ko smo za topilo uporabili metanol, je bila dA na uro v prvi uri enaka 0,036 in 0,028 v drugi uri. Zmanjšanje absorbance je znašalo 5,3 %.

Pri vseh treh topilih za DPPH lahko opazimo zmanjšanje absorbance. V metanolu pride v prvi uri spremjanja stabilnosti do 0,0099 dA na uro in v drugi uri 0,008 dA na uro. V celotnem času inkubacije se absorbanca zmanjša za 1,7 %. Pri pH 5 pride do dA na uro v prvi uri za 0,06 in v drugi uri za 0,04. Absorbanca se je torej v 120 minutah zmanjšala za 10,2 %. V slepem vzorcu s pH 7,4 pa opazimo zmanjšanje absorbance v prvi uri za 0,03 in

v drugi uri za 0,025. V celotnem času se je absorbanca zmanjšala za 5,3 %. Iz teh podatkov ugotovimo, da je DPPH najbolj stabilen v metanolu.

4.3.2 Potek reakcije modelnih antioksidantov in antioksidantov v vzorcih pijač z ABTS in DPPH v različnih topilih

4.3.2.1 Jabolčni sok



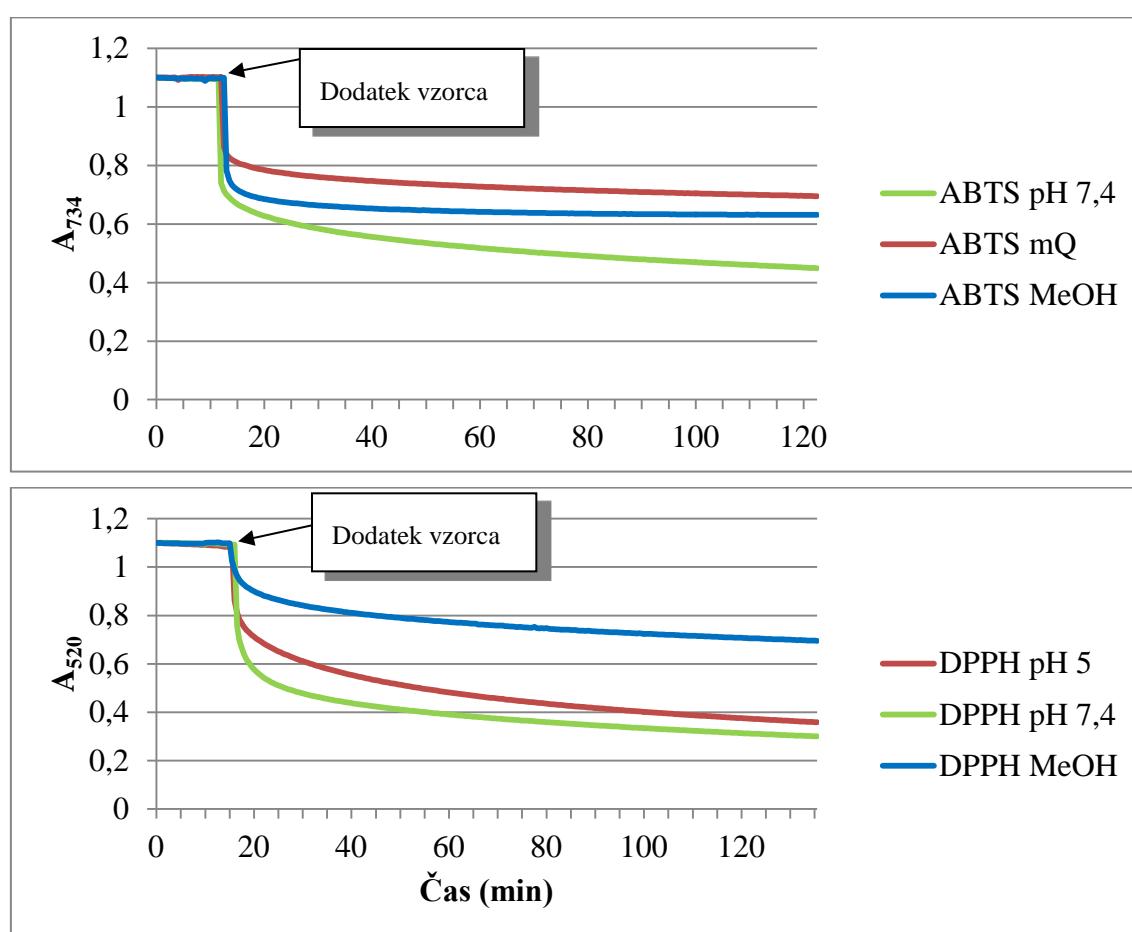
Slika 14: Hitrost reakcije med antioksidanti v jabolčnem soku in ABTS (zgoraj) ter DPPH (spodaj) v različnih topilih. Razredčitev jabolčnega soka v testu je pri ABTS 1:130 in pri DPPH 1:50.

Na sliki 14 je prikazana hitrost reakcije za vzorec jabolčnega soka. Pri uporabi ABTS reagenta opazimo, da kljub enaki razredčitvi pride pri pH 7,4 do večjega zmanjšanja absorbance. V metanolu je začetna amplituda večja kot v mQ vodi. Po 1 minuti od dodatka vzorca pride pri pH 7,4 do začetnega upada absorbance za 0,34, pri mQ vodi je dA 0,15 in pri metanolu 0,22. Pri daljših časih inkubacije pa ne opazimo večjih razlik. Glede na to, da smo pri testih stabilnosti reagentov opazili veliko stabilnost reagenta v mQ vodi, predvidevamo, da je padanje v mQ vodi realno, medtem ko je v metanolu lahko posledica nestabilnosti ABTS. ABTS je manj stabilen tudi pri pH 7,4, vendar je hitrost zmanjševanja

absorbance precej večja kot v odsotnosti antioksidantov, zato lahko velik del amplitude pri daljših časih pripisemo antioksidantom v jabolčnem soku.

Ko smo uporabili reagent DPPH opazimo, da je začetna amplituda pri metanolu najmanjša in sicer se absorbanca po 1 minuti od dodatka vzorca zmanjša za 0,25, medtem ko pri pH 5 za 0,34 in pH 7,4 za 0,33. Med slednjima torej ni velike razlike. Glede na to, da je DPPH stabilen v metanolu, predvidevamo, da je zmanjševanje absorbance pri daljših časih inkubacije povezano z antioksidanti, medtem ko v prisotnosti pufrov določen delež zmanjšane absorbance lahko pripisemo nestabilnosti DPPH.

4.3.2.2 Zeleni čaj



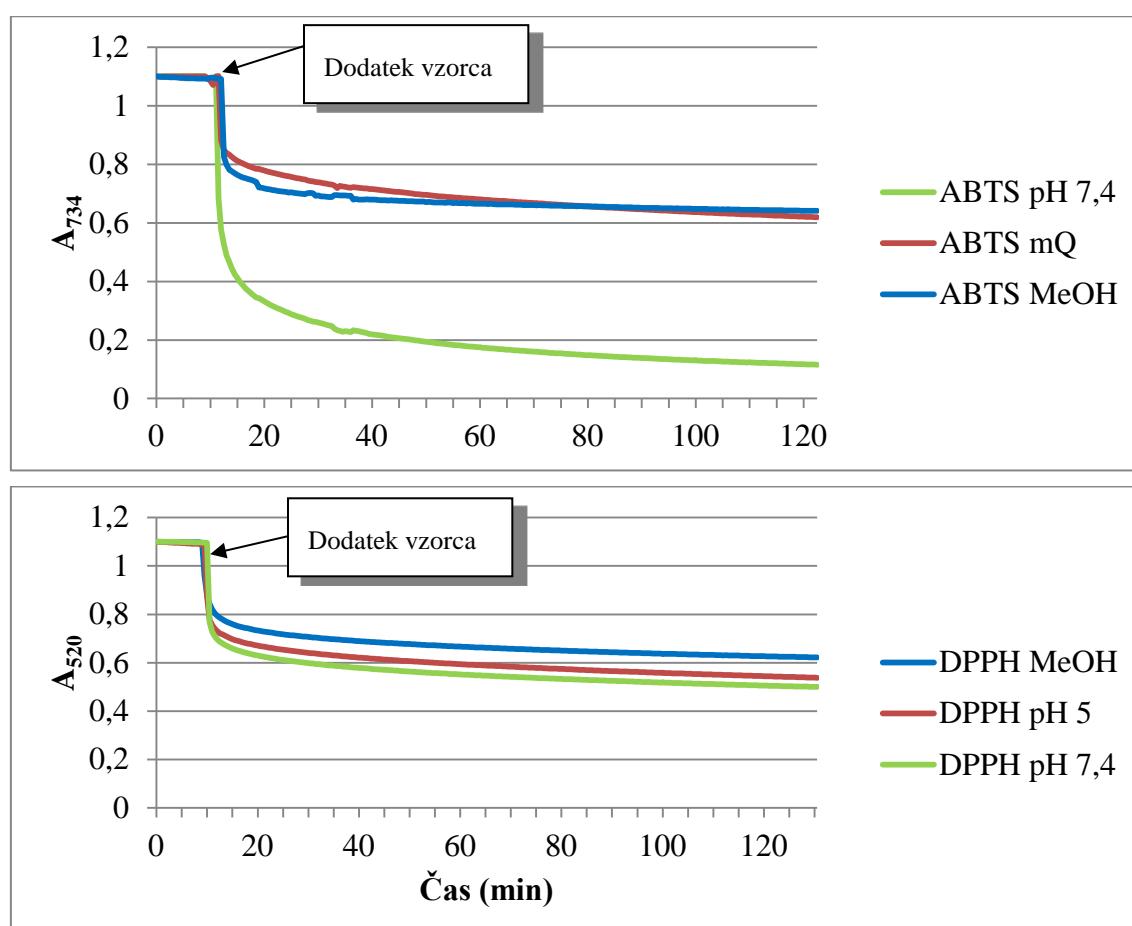
Slika 15: Hitrost reakcije med antioksidanti v zelenem čaju in ABTS (zgoraj) ter DPPH (spodaj) v različnih topilih. Razredčitev zelenega čaja v testu je pri ABTS 1:2500 in pri DPPH 1:1400.

Na sliki 15 je prikazana hitrost reakcije za vzorec zelenega čaja. Zgornji graf predstavlja hitrost reakcije ob uporabi reagenta ABTS. Pri pH 7,4 opazimo hiter začetni upad absorbance in sicer je dA po 1 minuti od dodatka vzorca enak 0,39 ter nadaljnje padanje

absorbance skozi celoten čas opazovanja. Zmanjševanje absorbance je lahko posledica nestabilnosti reagenta ABTS v pH 7,4, kakor tudi antioksidantov v zelenem čaju. Pri ostalih dveh topilih ravno tako pride do velike začetne amplitude padanja absorbance in sicer je dA po 1 minuti inkubacije pri mQ vodi enak 0,26 ter v metanolu 0,35. Glede na to, da je reagent stabilen v mQ vodi, je lahko padanje realno in ga pripisujemo antioksidantom v zelenem čaju, medtem ko je v metanolu lahko posledica slabše stabilnosti reagenta.

Na spodnjem grafu je prikazana hitrost reakcije za reagent DPPH. V metanolu opazimo začetno amplitudo padanja absorbance, ki pa je v primerjavi z ostalima dvema topiloma, nižja. V prvi minuti po dodatku vzorca je dA v metanolu enak 0,11, sledi mu pH 5 z 0,27 in pH 7,4 z zelo visoko spremembo dA in sicer za 0,4. Glede na to, da je reagent DPPH v metanolu stabilen, predvidevamo, da pri daljših časih inkubacije reakcija poteka med radikalom DPPH^\bullet in antioksidanti v vzorcu. Pri topilih s pH 5 in 7,4 opazimo pri daljših časih inkubacije nadaljnje zmanjševanje absorbance, kar lahko kljub slabši stabilnosti v teh topilih v veliki meri pripisemo antioksidantom v zelenem čaju.

4.3.2.3 Propolis

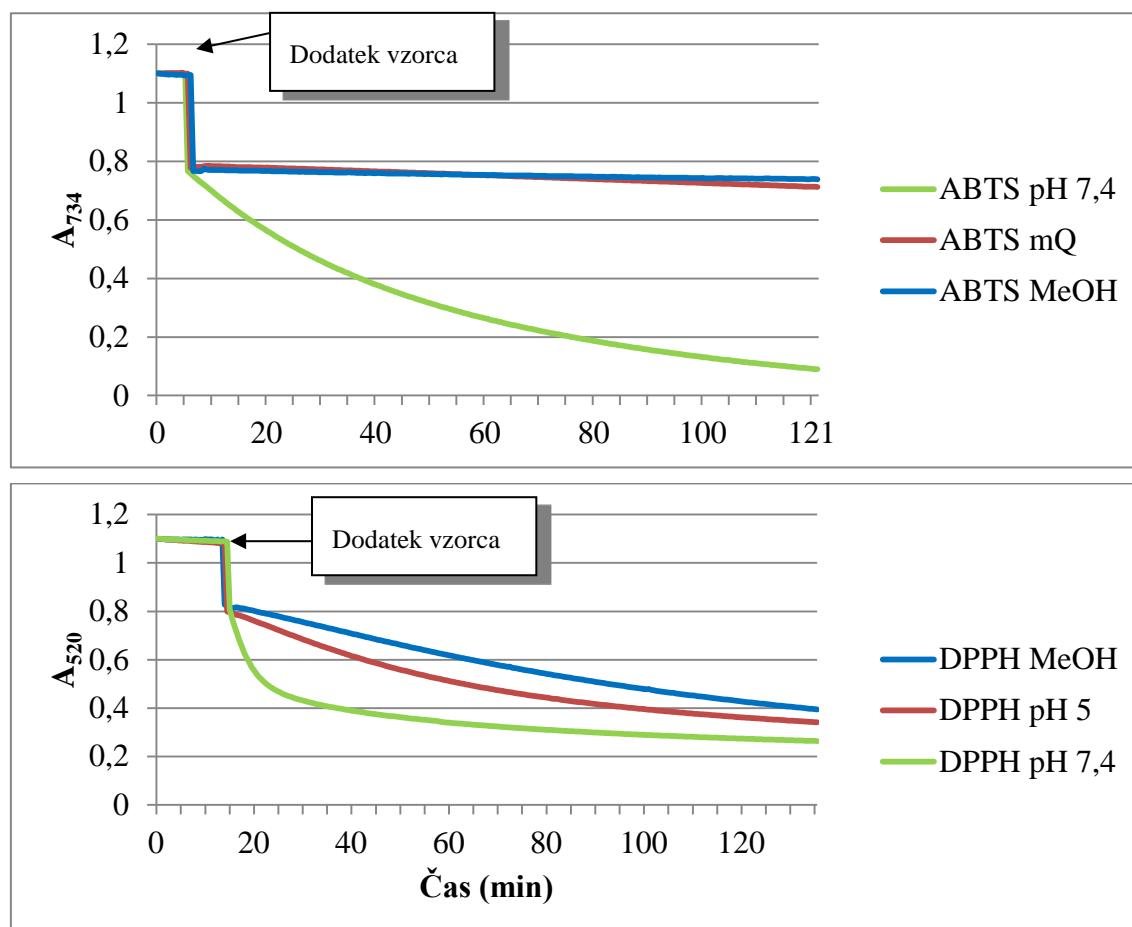


Slika 16: Hitrost reakcije med antioksidanti v propolisu in ABTS (zgoraj) ter DPPH (spodaj) v različnih topilih. Razredčitev propolisa v testu je pri ABTS 1:22000 in pri DPPH 1:9000.

Na sliki 16 je prikazana hitrost reakcije za vzorec propolisa. Zgornji graf predstavlja rezultate dela z ABTS reagentom. Največja začetna amplituda zmanjšanja absorbance je pri pH 7,4 in sicer v prvi minuti po dodatku vzorca za 0,52. Padec absorbance znaša v mQ vodi 0,25 po eni minuti inkubacije. Pri daljših časih inkubacije se absorbanca zmanjšuje v obeh topilih. Glede na dobro stabilnost reagenta v mQ vodi, sklepamo, da je pri tem topilu reakcija potekala med AO vzorca propolisa in reagentom, medtem ko pri pH 7,4 vsaj del zmanjšanja absorbance lahko pripisemo nestabilnosti reagenta v topilu. V metanolu se absorbanca po 1 minuti zmanjša za 0,29. Nadaljnje zmanjševanje absorbance je lahko tudi posledica slabše stabilnosti ABTS.

Na spodnjem grafu je prikazana hitrost reakcije za reagent DPPH. V prvi minuti po dodatku vzorca se je pri metanolu absorbanca zmanjšala za 0,21, pri pH 5 za 0,31 in največ v pH 7,4 in sicer za 0,37. V vseh treh topilih smo priča podobnemu zmanjševanju absorbance pri daljših časih inkubacije. Zaradi večje stabilnosti DPPH v metanolu je zmanjševanje absorbance v tem topilu skoraj zagotovo posledica reakcij z antioksidanti v propolisu.

4.3.2.4 CAPE

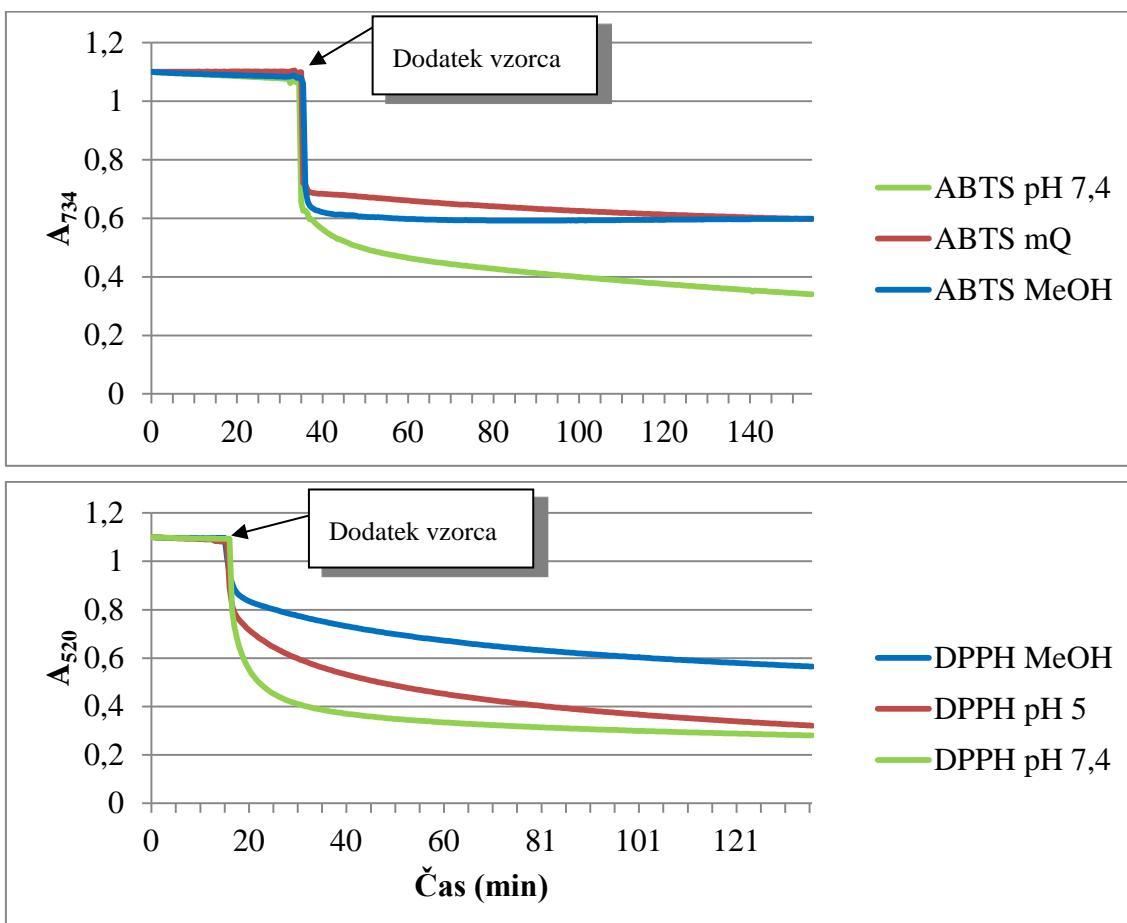


Slika 17: Hitrost reakcije med modelnim antioksidantom CAPE in ABTS (zgoraj) ter DPPH (spodaj) v različnih topilih. Koncentracija CAPE v testu je pri ABTS 11 µM in pri DPPH 10 µM.

Na sliki 17 je prikazana hitrost reakcije za modelni AO CAPE. Zgornji graf predstavlja pridobljene rezultate pri uporabi ABTS reagenta. Pri vseh treh topilih opazimo začetno amplitudo padanja absorbance, ki pa je pri vseh treh topilih enaka $dA=0,33$. Vendar pa se pri mQ vodi in metanolu zmanjševanje absorbance pri daljših časih inkubacije zelo upočasni, medtem ko pri pH 7,4 reakcija poteka naprej. Pri pH 7,4 je kljub manjši stabilnosti ABTS v tem topilu zmanjševanje absorbance povezano z reaktivnostjo CAPE. To lahko trdimo zato, ker tudi pri preizkusu stabilnosti reagentov nismo dobili tako hitrega padanja absorbance kot v primeri modelnega AO CAPE.

Pri uporabi DPPH reagenta je dA v prvi minuti inkubacije v metanolu enaka 0,25, v pufru pH 5 0,29 in v pufru pH 7,4 je dA v prvi minuti 0,32. V vseh treh topilih se absorbanca zmanjšuje bolj kot pa zaradi slabše stabilnosti DPPH v samih topilih, kar lahko pripisemo antioksidativni aktivnosti delno oksidiranih produktov CAPE.

4.3.2.5 Katehin

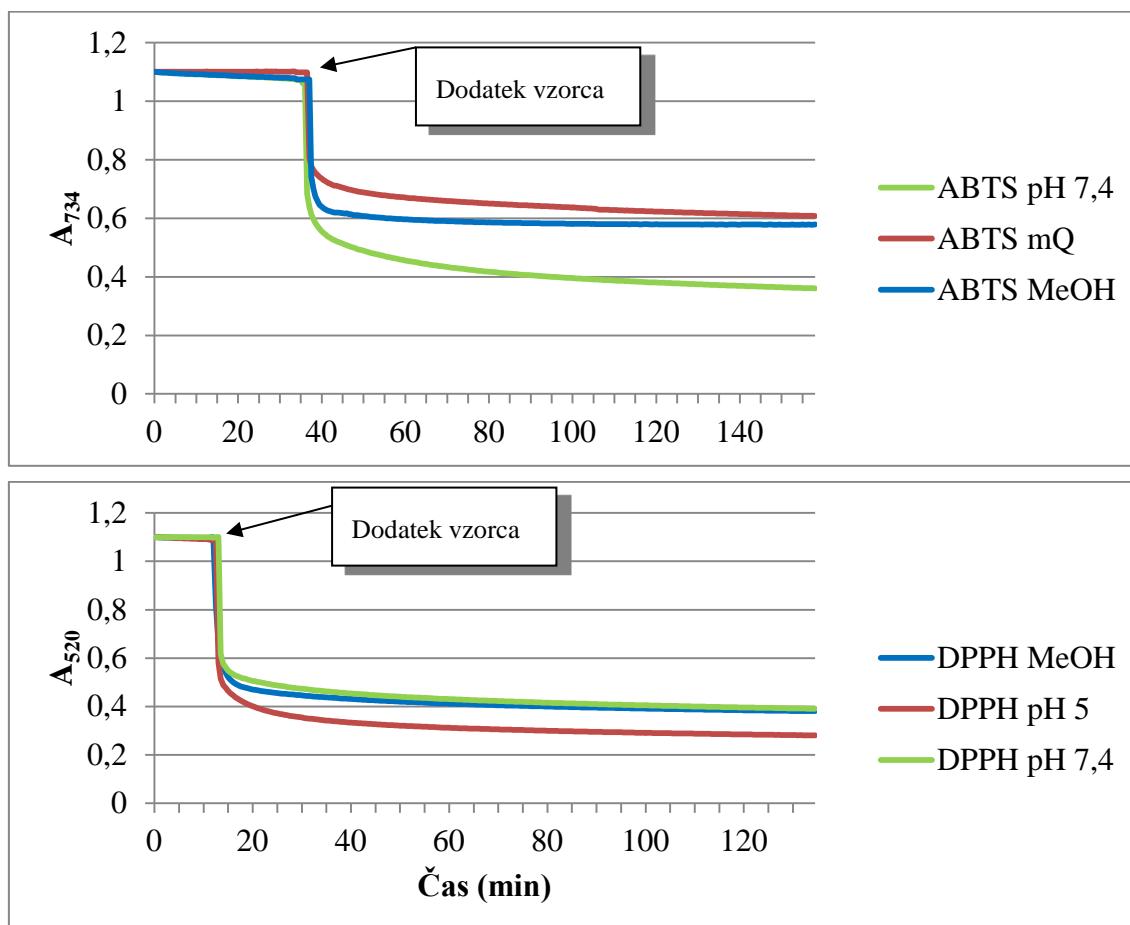


Slika 18: Hitrost reakcije med modelnim antioksidantom katehinom in ABTS (zgoraj) ter DPPH (spodaj) v različnih topilih. Koncentracija katehina v testu je pri ABTS 5 μM in pri DPPH 10 μM .

Na sliki 18 je prikazana hitrost reakcije za modelni AO katehin. Na zgornjem grafu so prikazani rezultati dela z ABTS reagentom in v treh različnih topilih. V prvi minuti po dodatku vzorca se je absorbanca pri pH 7,4 znižala za 0,45, pri mQ vodi za 0,38 in pri metanolu za 0,4. Pri daljših časih inkubacije opazimo najhitrejše padanje absorbance pri pH 7,4, medtem ko se v metanolu reakcija skoraj zaustavi.

Na spodnjem grafu so prikazani rezultati dela z DPPH reagentom v treh različnih topilih. Ravno tako kot pri ostalih vzorcih je začetna amplituda zelo visoka. Pri metanolu se je absorbanca v prvi minuti inkubacije znižala za 0,15, pri pH 5 za 0,26 in v pH 7,4 za 0,36. Po hitrem začetnem delu reakcije sledi počasni del. Glede na to, da je reagent DPPH dobro stabilen v metanolu, sklepamo, da je padanje absorbance rezultat dejanske reakcije z delno oksidiranim katechinom. Pri ostalih dveh topilih pa je padanje absorbance v manjši meri lahko posledica tudi slabše stabilnosti reagenta v teh topilih.

4.3.2.6 Galna kislina

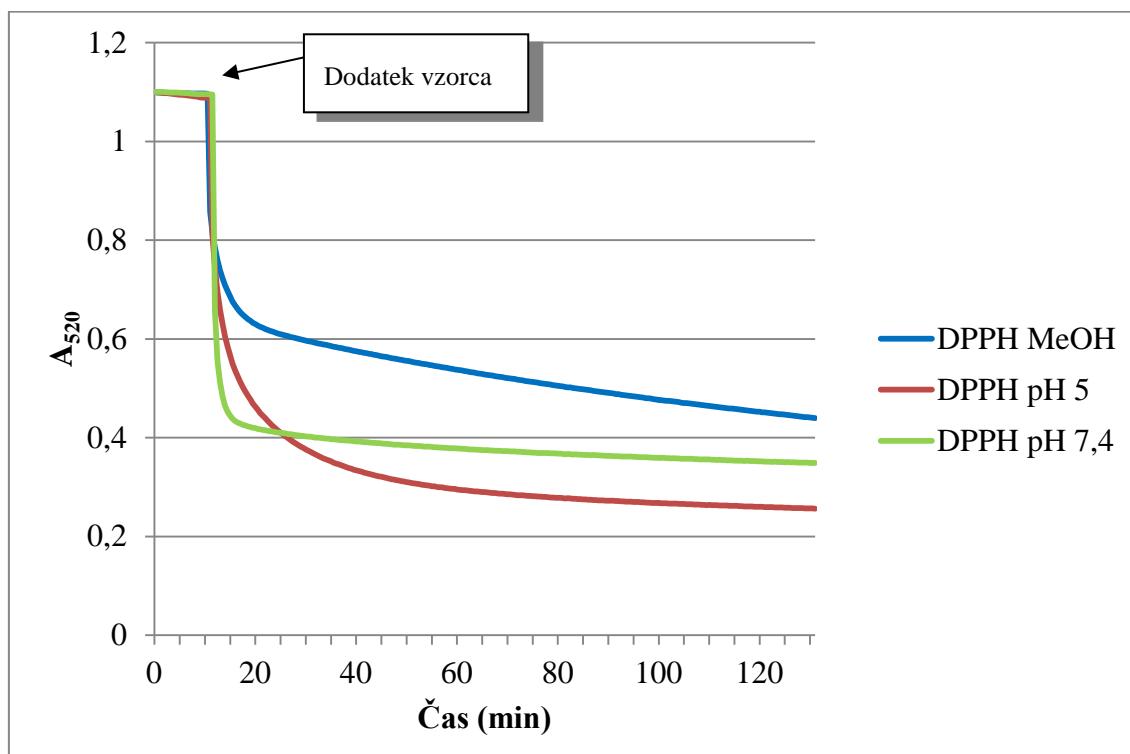


Slika 19: Hitrost reakcije med modelnim antioksidantom galno kislino in ABTS (zgoraj) ter DPPH (spodaj) v različnih topilih. Koncentracija galne kisline v testu je pri ABTS 4 μM in pri DPPH 9 μM .

Na sliki 19 je prikazana hitrost reakcije za modelni AO galno kislino. V prvi minuti inkubacije pri pH 7,4 se absorbanca zmanjša za 0,43, v mQ vodi za 0,32 in v metanolu za 0,38. Po hitri začetni spremembi sledi faza počasnega padanja in sicer pri mQ vodi kot rezultat dejanske reakcije (zaradi dobre stabilnosti reagenta v topilu), medtem ko pri metanolu predvsem posledica slabše stabilnosti ABTS.

Tudi pri reagentu DPPH opazimo hiter začetni upad vrednosti absorbance in sicer v prvi minuti po dodatku vzorca v metanolu za 0,43, v pH 5 za 0,57 in v pH 7,4 za 0,52. V primerjavi z dosedanjimi vzorci je zanimivo, da je edino pri tem začetna amplituda najvišja v pH 5. Po hitrem začetnem padcu absorbance sledi faza počasnega padanja, ki je pri vseh treh z na videz enako hitrostjo. Reagent DPPH je najbolj stabilen v metanolu, iz česar lahko sklepamo, da je tu nižanje absorbance zagotovo rezultat dejanske reakcije vzorca z reagentom.

4.3.2.7 Kvercetin



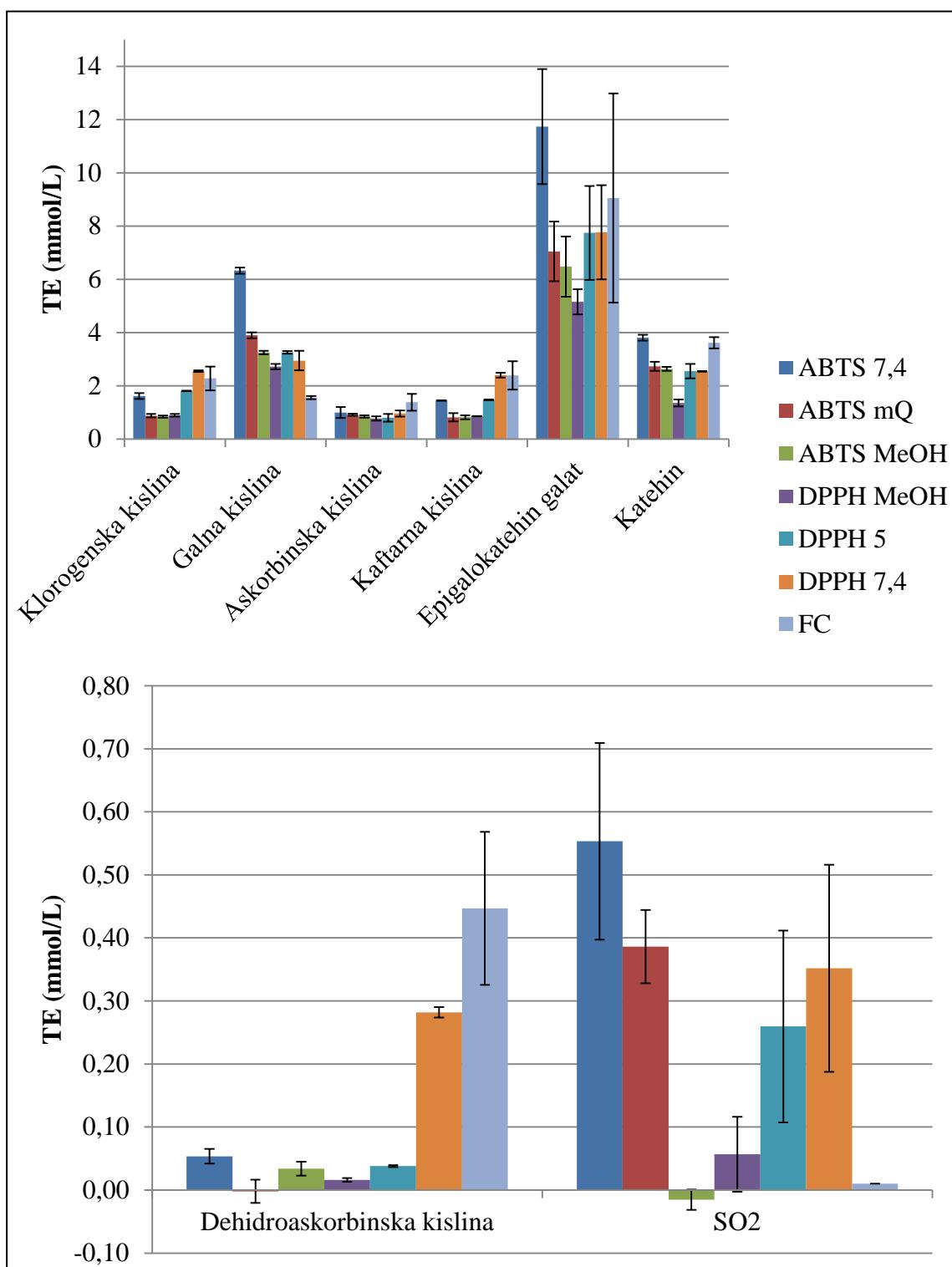
Slika 20: Hitrost reakcije med modelnim antioksidantom kvercetinom in DPPH v različnih topilih. Koncentracija kvercetina v testu je $10 \mu\text{M}$.

Na sliki 20 je prikazana hitrost reakcije za modelni AO kvercetin s koncentracijo $10 \mu\text{M}$. Po dodatku vzorca se absorbanca v prvi minuti zmanjša v metanolu za 0,28, v pH 5 za 0,34 in pri pH 7,4 za 0,54, kar je več kot polovično zmanjšanje začetne vrednosti absorbance. V počasni fazni se absorbanca najhitreje zmanjšuje v metanolu.

4.4. DOLOČITEV AOP MODELNIH ANTIOKSIDANTOV IN VZORCEV PIJAČ Z DPPH, ABTS IN FC REAGENTOM

Analiza rezultatov vpliva reakcijskih pogojev na hitrost reakcije antioksidantov z DPPH in ABTS je pokazala, da so razlike med različnimi topili v poteku reakcije za nekatere antioksidante relativno velike. Ker sta DPPH in ABTS v določenih topilih nestabilna, smo se odločili, da bomo antioksidante inkubirali 60 minut, saj bi daljši časi inkubacije lahko rezultirali v eksperimentalnih artefaktih. Pri FC metodi nismo ugotovili večjih vplivov časa inkubacije na določen AOP, zato smo pred dodatkom natrijevega karbonata vzorec in reagent inkubirali 5 minut in nato še 60 minut do merjenja absorbance.

4.4.1 Vrednosti AOP za modelne antioksidante



Slika 21: Antioksidativni potencial klorogenske, galne, askorbinske in kaftarne kisline ter epigalokatehin galata in katehina (zgoraj) in antioksidativni potencial dehidroaskorbinske kisline in žveplovega dioksida (spodaj) določen z ABTS, DPPH in Folin-Ciocalteu metodo

Preglednica 15: Numerični prikaz vrednosti AOP za modelne antioksidante

	ABTS pH 7,4	ABTS mQ	ABTS MeOH	DPPH MeOH	DPPH pH 5	DPPH pH 7,4	FC
klorogenska kislina	1,6 ± 0,11	0,9 ± 0,07	0,8 ± 0,04	0,9 ± 0,05	1,8 ± 0,01	2,5 ± 0,03	2,3 ± 0,45
galna kislina	6,3 ± 0,12	3,9 ± 0,11	3,3 ± 0,07	2,7 ± 0,1	3,3 ± 0,05	2,9 ± 0,37	1,6 ± 0,06
askorbinska kislina	1 ± 0,2	0,9 ± 0,04	0,9 ± 0,05	0,8 ± 0,08	0,8 ± 0,15	1 ± 0,11	1,4 ± 0,32
kaftarna kislina	1,4 ± 0,01	0,8 ± 0,16	0,8 ± 0,08	0,9 ± 0,01	1,5 ± 0,01	2,4 ± 0,09	2,4 ± 0,53
epigalokatehin galat	11,7 ± 2,16	7 ± 1,12	6,5 ± 1,13	5,2 ± 0,47	7,7 ± 1,76	7,8 ± 1,77	9,1 ± 3,93
katehin	3,8 ± 0,11	2,7 ± 0,17	2,6 ± 0,08	1,4 ± 0,13	2,5 ± 0,27	2,5 ± 0,01	3,6 ± 0,21
dehidroaskorbinska kislina	0,05 ± 0,01	0 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0	0,04 ± 0	0,28 ± 0,01	0,45 ± 0,12
SO₂	0,55 ± 0,16	0,39 ± 0,06	-0,02 ± 0,02	0,06 ± 0,06	0,26 ± 0,15	0,35 ± 0,16	0,01 ± 0

Na sliki 21 so prikazane vrednosti AOP za modelne antioksidante. Napaka meritev je izražena kot standardni odklon dveh neodvisnih eksperimentov, vključujoč ponovno tehtanje in razredčevanje antioksidantov.

Pri klorogenski kislini smo dobili najvišjo AOP vrednost pri DPPH 7,4. Z metodo DPPH klorogenska kislina najslabše reagira v topilu metanol. Rezultati, pridobljeni z metodo ABTS, nam povedo, da najbolj reagira v topilu s pH 7,4. Med topili metanolom in mQ vodo ni večje razlike, čeprav slabše reagira v metanolu. Vrednost AOP, določena s FC reagentom, je manjša je od AOP, določene z DPPH v pH 7,4. Z DPPH v pufru pH 7,4 določimo več kot trikratnik AOP-ja, določenega z ABTS v metanolu.

Modelni AO galna kislina najbolje reagira pri metodi ABTS in pri pH 7,4. Najslabše pa reagira pri uporabi FC reagenta in sicer smo dobili kar 4x manjšo vrednost AOP. Če se osredotočimo na razlike med topili pri ABTS metodi ugotovimo, da smo največjo vrednost AOP dobili pri pH 7,4 in najnižjega v metanolu. Pri metodi DPPH razlike med topili niso tako velike, a vzorec najbolje reagira v topilu s pH 5. Najslabše reagira v metanolu. V topilu s pH 7,4 je vrednost AOP nekje vmes med ostalima dvema.

Pri askorbinski kislini so se vrednosti AOP pri skoraj vseh metodah in topilih približale vrednosti 1. Nekoliko višjo vrednost smo izmerili le pri uporabi FC metode. Pri ABTS metodi vzorec najbolje reagira v pH 7,4 medtem ko je v ostalih dveh topilih enak. Pri

DPPH metodi najbolje reagira ravno tako pri pH topila 7,4. Vrednosti AOP v ostalih dveh topilih sta enaki.

Dehidroaskorbinska kislina praktično ne reagira v DPPH in ABTS testu, z izjemo DPPH pri pH 7,4. Skoraj 50 % reaktivnosti Troloksa pa doseže v FC testu. Reaktivnost lahko pripisemo tvorbi redoks aktivnih zvrsti pri višjem pH-ju, ki nastanejo pri razpadu dehidroaskorbinske kisline.

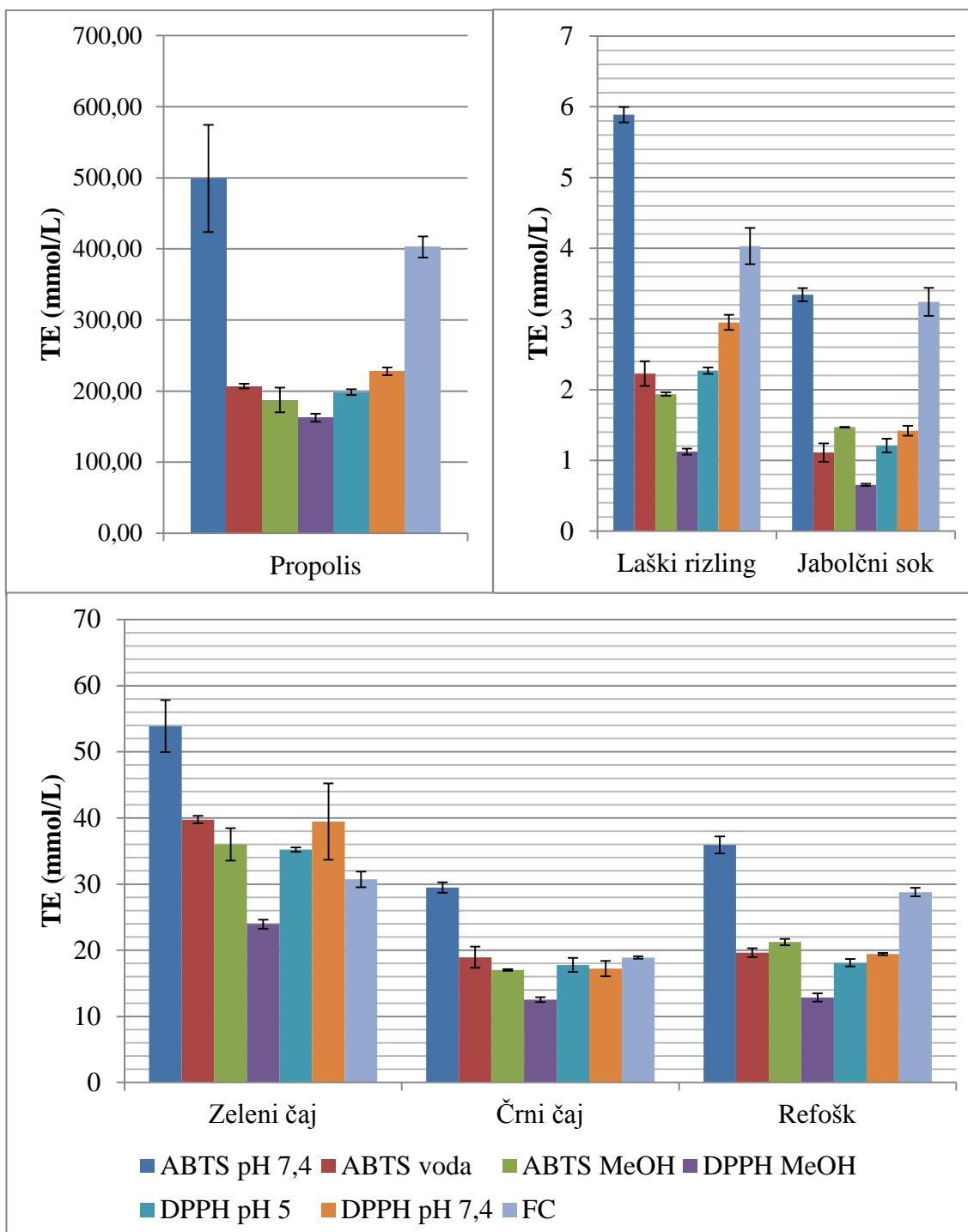
Kaftarna kislina najbolje reagira z DPPH metodo pri uporabi topila s pH 7,4. Pri tej isti metodi najslabše reagira v metanolu, kjer smo določili za 60 % manjši AOP. Tudi z ABTS metodo smo dobili najvišje vrednosti AOP pri uporabi topila s pH 7,4. Ko smo za topilo uporabili metanol in mQ vodo pa sta vrednosti za 40 % manjši kot pri pH 7,4. Z FC metodo določimo enako vrednost kot z ABTS pri pH 7,4.

Epigalokatehin galat najbolje reagira v topilu s pH 7,4 v ABTS testu. Pri uporabi te metode smo najnižjo vrednost AOP določili v metanolu, kjer smo določili za 45 % manjši AOP. Z DPPH v topilih s pH 5 in 7,4 reagira približno enako, slabše pa v metanolu, kjer smo določili za tretjino manjši AOP. Z FC reagentom določimo drugi najvišji AOP.

Katehin najbolje reagira z ABTS v topilu s pH 7,4, metanolu in vodi pa določimo za 30 % manjši AOP. Še večje so razlike v DPPH testu, kjer v metanolu določimo nekaj več kot 50 % AOP-ja v alkoholih s pufrom. Z FC reagentom določimo vrednost, ki se le malo razlikuje od AOP, določenega v ABTS pri pH 7,4.

Žveplov dioksid pri ABTS metodi najbolje reagira pri pH 7,4. Reaktivnost v metanolu je praktično zanemarljiva. Podobne rezultate, torej zanemarljivo reaktivnost v metanolu in največjo reaktivnost v pufru pH 7,4, smo ugotovili tudi za DPPH test. Za razliko od ostalih antioksidantov, kjer FC metoda daje vrednosti AOP, SO₂ v FC testu zelo slabo reagira.

4.4.2 Vrednosti AOP za vzorce pijač in propolisa



Slika 22: Antioksidativni potencial zelenega in črnega čaja ter refoška (spodaj), laškega rizlinga in jabolčnega soka (zgoraj desno) in propolisa (zgoraj levo) določen z ABTS, DPPH in Folin-Ciocalteu metodami.

Preglednica 16: Numerični prikaz vrednosti AOP za vzorce pijač

	ABTS pH 7,4	ABTS mQ	ABTS MeOH	DPPH MeOH	DPPH pH 5	DPPH pH 7,4	FC
zeleni čaj	53,9 ± 3,93	39,8 ± 0,56	36 ± 2,44	24 ± 0,68	35,2 ± 0,33	39,5 ± 5,77	30,7 ± 1,19
črni čaj	29,5 ± 0,79	18,9 ± 1,6	17 ± 0,11	12,5 ± 0,37	17,8 ± 1,06	17,2 ± 1,16	18,9 ± 0,19
refošk	35,9 ± 1,28	19,6 ± 0,65	21,2 ± 0,47	12,9 ± 0,62	18,1 ± 0,57	19,4 ± 0,17	28,8 ± 0,66
laški rizling	5,9 ± 0,11	2,2 ± 0,18	1,9 ± 0,03	1,1 ± 0,04	2,3 ± 0,04	3 ± 0,11	4 ± 0,26
jabolčni sok	3,3 ± 0,09	1,1 ± 0,13	1,5 ± 0,01	0,7 ± 0,02	1,2 ± 0,1	1,4 ± 0,07	3,2 ± 0,2
propolis	499,1 ± 75,55	206,8 ± 3,29	187,4 ± 17,31	162,5 ± 5,52	198,3 ± 4,05	227,7 ± 5,35	402,8 ± 14,9

Na sliki 22 in v preglednici 16 so predstavljeni rezultati AOP za vzorce pijač in sicer z metodami ABTS, DDPH in FC v različnih topilih. Pri večini smo opazili podobno razporeditev antioksidativnega potenciala glede na metode in topila. V splošnem smo opazili večji AOP pri ABTS 7,4 in pri metodi FC. Najnižje vrednosti pa smo pri vseh vzorcih opazili pri DPPH MeOH.

Za vzorce pijač smo pri skoraj vseh opazili podobno obliko grafikona, razen pri vzorcu zelenega čaja. Pri vzorcu zelenega čaja smo določili najvišji AOP z ABTS pri pH 7,4. Za razliko od ostalih vzorcev smo pri zelenem čaju opazili višjo vrednost AOP v DPPH 5 in 7,4 kot pri metodi FC. Največja razlika v določenem AOP je tako med ABTS pri pH 7,4 in DPPH v metanolu, kjer določimo le 44 % maksimalnega AOP.

V vzorcu črnega čaja smo najvišjo vrednost AOP določili pri ABTS 7,4 in najnižjo pri uporabi metanola kot topila. Z DPPH dobimo najnižjo vrednost v metanolu. Vrednosti v pH 5 in 7,4 so podobne določenem AOP s FC reagentom. Največja razlika v določenem AOP je tako med ABTS pri pH 7,4 in DPPH v metanolu, kjer določimo le 36 % maksimalnega AOP.

V refošku smo najvišjo vrednost AOP izmerili s FC reagentom in ABTS 7,4. Najnižji rezultat smo ponovno pridobili pri DPPH MeOH, kjer določimo le 42 % maksimalnega AOP. Pri ostalih pogojih smo z ABTS in DPPH določili primerljive AOP. Enako velja za ostali dve topili pri metodi DPPH.

V vzorcu propolisa smo dobili izjemno visoke vrednosti AOP. V povprečju so vrednosti skoraj 10x večje kot na primer v vzorcu zelenega čaja. Lahko bi rekli, da so tudi v tem vzorcu rezultati dokaj podobni ostalim. Najvišja vrednost AOP z ABTS pri 7,4 ter najnižja vrednost AOP pri DPPH v metanolu, kjer določimo le 33 % maksimalnega AOP.

Rezultati za vzorca laškega rizlinga in jabolčnega soka nam pokažejo nizke vrednosti AOP v primerjavi z ostalimi vzorci. V obeh vzorcih smo pri metodi DPPH dobili najvišjo

vrednost v pH 7,4. Razlika je pri ABTS metodi, kjer smo v vzorcu laškega rizlinga dobili najnižjo vrednost AOP v metanolu, medtem ko je v jabolčnem soku ta vrednost najnižja pri mQ vodi. Tako za laški rizling kot jabolčni sok je največja razlika v določenem AOP med ABTS pri pH 7,4 in DPPH v metanolu, kjer za laški rizling določimo le 19 % maksimalnega AOP in za jabolčni sok 21 %.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo proučevali predvsem vpliv različnih topil in vrednosti pH v reakcijski mešanici z metanolno raztopino radikala DPPH[•] in vodno raztopino reagenta ABTS na določanje antioksidativnega potenciala (AOP). Z metodo Folin-Ciocalteu smo proučevali vsebnost skupnih fenolnih spojin v vzorcu. Za proučevanje smo vzeli različne vzorce pijač (zeleni in črni čaj, belo in rdeče vino, jabolčni sok ter propolis) in modelne AO (klorogenska, galna, askorbinska, kaftarna in dehidroaskorbinska kislina, epigalokatehin galat, catehin in SO₂). Rezultate smo nato predstavili kot Troloks ekvivalente.

Že pred pričetkom laboratorijskega dela smo pričakovali razlike med posameznimi vzorci in sicer med čajema in rdečim ter belim vinom. Do razlik med zelenim in črnim čajem pride predvsem zaradi razlike v postopkih, ki sledijo obiranju lističev čajevca. Lističe za zeleni čaj po obiranju segrejejo, s tem inaktivirajo encim polifenol oksidazo. Zato catehini v zelenem čaju ostanejo nespremenjeni, medtem ko so v črnem čaju delno oksidirani. Ta razlika se pri naših rezultatih predvsem kot velika razlika v AOP čajev. V povprečju smo pri zelenem čaju dobili 2x večje vrednosti AOP kot v črnem čaju. Če na sliki 22 pogledamo obliko grafov, sta si zelo podobna. Z metodo FC smo v zelenem čaju dobili nizko vrednost AOP, medtem ko je v črnem čaju izmerjena vrednost AOP druga po velikosti. V zelenem čaju smo pri DPPH metodi dobili v pH 7,4 najvišjo vrednost, v črnem čaju pa smo višjo vrednost dobili v pH 5. Iz teh ugotovitev lahko sklepamo, da pride zaradi različnega načina proizvodnje čaja do skoraj polovico manjše vsebnosti AO v črnem čaju.

Splošno je znano, da rdeča vina vsebujejo veliko več AO kot bela. Rdeče grozdje je zakladnica flavonoidov, antocianskih barvil in taninov. Za določitev AOP vrednosti smo izbrali refošk in laški rizling. Razlika v vrednosti AOP je očitna. Vrednosti AOP pri rdečem vinu so od 7-12x večje kot pri belem vinu. Pri obeh vinih smo najvišje vrednosti izmerili z metodo ABTS v pH 7,4. Sledijo FC metoda in DPPH v pH 7,4. Najnižje vrednosti smo pri obeh izmerili v metanolu z DPPH metodo.

V diplomski nalogi smo želeli poiskati metodo in topila za to metodo, s katero bi izmerili najvišje vrednoti AOP. Pri posamezni metodi se, rezultati med uporabljenimi topili močno razlikujejo. V vzorcu zelenega čaja smo pri ABTS metodi dobili najvišje vrednosti AOP v pH 7,4. V mQ vodi dobimo nižjo vrednost AOP za 26 %, v metanolu pa za tretjino manjšo vrednost AOP. Pri DPPH metodi smo delali s topili metanol, pH 5 in 7,4. Najvišjo vrednost smo dobili pri slednjem, v pH 5 je bil AOP manjši za 10 % in v metanolu za 39 % nižji od najvišje izmerjene vrednosti AOP. Z metodo FC smo dobili nizko vrednost AOP, ki je bila višja le od DPPH v metanolu.

V vzorcu črnega čaja smo pri ABTS metodi dobili najvišjo vrednost v pH 7,4. V mQ vodi in metanolu sta vrednosti podobni in od pH 7,4 nižji za približno 40 %. Pri DPPH metodi pa je tu prišlo do posebnosti. Pri vseh vzorcih pijač je AOP v pH 7,4 višji kot v pH 5. V primeru črnega čaja pa je ravno obratno. Vrednost AOP je tud rahlo višja in sicer za 3 %. Najnižjo vrednost smo dobili v metanolu, ki je od najvišje izmerjene vrednosti nižja za 30 %. Najvišjo vrednost smo torej izmerili z ABTS metodo v pH 7,4 in najnižjo z DPPH v

metanolu. Vrednost AOP, izmerjena s FC metodo, je podobna vrednostim, ki smo jih dobili pri drugih dveh metodah z ostalimi topili.

Najvišjo vrednost AOP smo, tako kot pri ostalih vzorcih, tudi pri refošku izmerili z ABTS metodo v pH 7,4. Drugo najvišjo vrednost pri tej metodi smo, kot v primeru jabolčnega soka, izmerili v metanolu in sicer je ta vrednost nižja za 41 %. Vrednost AOP v mQ vodi je nižja za 45 % in je rahlo nižja od tiste v metanolu. Pri DPPH metodi so vrednosti podobne kot pri ostalih vzorcih. Najvišja vrednost AOP je bila pridobljena v pH 7,4 in le za 7 % nižja v pufru pH 5. Najnižjo vrednost AOP smo izmerili v metanolu, ki je od najvišje nižja za tretjino. Visoko vrednost AOP smo izmerili z metodo FC. Ta je nižja le od ABTS v pH 7,4 in sicer za 20 %.

Propolis se je izkazal za vzorec, ki ima veliko fenolnih spojin. Najvišjo vrednost AOP smo dobili pri metodi ABTS v pH 7,4. Naslednja vrednost po velikosti je bila izmerjena z FC metodo, ki je od najvišje nižja za 20 %. Na prvi pogled izgledajo vrednosti AOP pri ostalih metodah in topilih dokaj podobne, ampak temu ni tako. Pri ABTS metodi smo drugo najvišjo vrednost izmerili v mQ vodi, ki je od najvišje nižja za 59 %. V metanolu je vrednost AOP podobna tisti v vodi. Manjša od najvišje je za 62 %. Pri DPPH metodi smo najvišjo vrednost izmerili v pH 7,4. Nižja vrednost je bila izmerjena v pH 5 in najnižja v metanolu.

Laški rizling je belo vino in že zaradi tega smo pričakovali nižje vrednosti AOP od refoška. Pri ABTS metodi smo najvišji AOP izmerili v pH 7,4. Vrednosti v mQ vodi in metanolu sta podobni, čeprav je slednja manjša. Od najvišje izmerjene sta manjši kar za dve tretjini. Z DPPH metodo smo najvišji AOP dobili v topilu s pH 7,4. Sledi pH 5, ki je bil manjši za tretjino in metanol, ki je od pH 7,4 manjši za dve tretjini. Pri laškem rizlingu se je za dobro metodo izkazal tudi FC. Z njim smo namreč dobili drugo najvišjo vrednost AOP. Ta je od ABTS v pH 7,4 manjša za tretjino, a še vseeno višja od ostalih. Zelo pomembna spojina v belih vinih je tudi SO₂. Žveplov dioksid je pomemben zaradi vrste fizikalnih in kemijskih reakcij, ki vključujejo predvsem preprečevanje rasti neželenih mikroorganizmov, preprečevanje delovanja oksidacijskih encimov (predvsem polifenoloksidaz) in preprečevanje reakcij porjavenja oz. tvorbe rjavih pigmentov. S kletarskega stališča je pomemben podatek o prostem žveplovem dioksidu, zlasti njegov delež, ki je potreben za vzdrževanje želene koncentracije molekularne oblike 0,825 mg SO₂/L, ki zagotavlja kemijsko in mikrobiološko stabilnost vina (Košmerl, 2000).

V jabolčnem soku je oblika grafa podobna refošku. Z ABTS smo pri obeh izmerili najvišji AOP, s tem da je druga najvišja vrednost izmerjena v metanolu in ne mQ vodi, kot pri ostalih vzorcih pijač. Vrednost v metanolu je od najvišje pri tej metodi manjša za 55 % in v mQ vodi za dve tretjini. Pri DPPH metodi je najmanjša vrednost izmerjena v metanolu, najvišja pa zopet v pH 7,4. AOP, izmerjen v pH 5, je malenkost nižji od tistega v 7,4 in sicer za 14 %. AOP, izmerjen v metanolu, pa je za polovici manjši. V jabolčnem soku odstopa rezultat, pridobljen z FC metodo. Ta je enak tistem, ki smo ga izmerili pri ABTS metodi v pH 7,4. Od vseh vzorcev pijač je tako samo pri jabolčnem soku.

Glede na podatke, pridobljene s poskusni, lahko trdimo, da je najboljša metoda za določanje AOP ABTS metoda in sicer ob uporabi fosfatnega pufra s pH 7,4. Za zelo dobro in enostavno metodo se je pokazala tudi FC metoda. Pri vseh vzorcih pijač, razen zelenemu čaju, smo s to metodo dobili visoke rezultate. Če za določanje AOP uporabljamo DPPH metodo, je ravno tako najbolje delo v pH 7,4.

V jabolčnem soku med antioksidanti prevladuje AO katehin. Če pogledamo naša dva grafa (slika 21 in 22) za ta dva vzorca opazimo, da sta si zelo podobna. V jabolčnem soku kot tudi pri katehinu opazimo, da smo najviše vrednosti AOP pridobili z ABTS metodo v pH 7,4. Oba sta nam dala dobre rezultate tudi s FC metodo. Pri ABTS metodi je podobno tudi to, da smo višji rezultat dobili v metanolu kot mQ voda, čeprav je ta razlika pri modelnemu AO katehinu zelo majhna. Tudi pri DPPH metodi smo v primeru katehina dobili najvišjo vrednost AOP v pH 7,4 in najnižjo v metanolu. Kot za jabolčni sok, lahko vzporednice potegnemo tudi za zeleni čaj in epigalokatehin galat. Z ABTS metodo smo pri teh dveh vzorcih opazili podobnost pri vrednostih AOP. Najviše smo pridobili v pH 7,4, kateremu sledi mQ voda in metanol. Z DPPH metodo smo v obeh primerih najmanjši AOP dobili v metanolu, medtem ko v pH 5 in 7,4 pride do razlik. Pri EGCG sta slednji vrednosti enaki, medtem ko v vzorcu čaja večji AOP izmerimo v nevtralnem pH-ju. Z FC metodo je vrednost AOP pri EGCG ena izmed višjih, v zelenem čaju pa je ta vrednost ena manjših.

V diplomski nalogi Laure Bertalanič (2011) z naslovom Vpliv topila na določeno antioksidativno aktivnost vin in modelnih antioksidantov, so se osredotočili predvsem na DPPH metodo in topila, z različnimi vrednostmi pH. Med vzorci, ki so jih uporabljali, je bil tudi refošk in laški rizling. Skupno obema je acetatni pufer s pH 5 in metanol pri DPPH metodi. V njeni diplomi so laški rizling razredčili 120x, medtem ko v mojem raziskovalnem delu 140x. Vrednost AOP v njeni diplomi pri laškem rizlingu je bila 1,6 mmol/L, medtem ko pri meni 2,27 mmol/L. Razlike so lahko posledica različne razredčitve in tudi različnih vzorcev vin (drugačne surovine, razlike v predelavi, letnik in serija, drug proizvajalec itd.). V metanolu so oni določili vrednost AOP 0,7 mmol/L, v moji diplomski nalogi pa 1,12 mmol/L. Za vzorec refoška so uporabili končno razredčitev 1250x, v naši nalogi pa 1000x. Za refošk so določili TE v acetatnem pufru pH 5,25 20,0 mmol/L in v metanolu 13 mmol/L. Mi smo določili v acetatnem pufru pH 5 18,1 mmol/L in v metanolu 12,9 mmol/L. Rezultati so si pri tem vzorcu zelo podobni, sploh v metanolu. Po pregledu vzorcev, ki smo jih uporabili, sem ugotovil, da je bil vzorec refoška od istega proizvajalca. Razlike so bile v letniku in alkoholni stopnji v vinu. Predvidevamo tudi, da je proizvodnji postopek obeh vin enak, torej so razlike v surovini. Z metodo FC so v diplomski nalogi L. Bertalanič določili za laški rizling TE 4,5 mmol/L in za refošk 39,4 mmol/L. Naši rezultati so bili za laški rizling 4 mmol/L in za refošk 28,8 mmol/L. Pri tej metodi so rezultati pri refošku zelo različni, a so podobni pri vzorcu laškega rizlinga.

5.2 SKLEPI

- Vpliv časa inkubacije na izmerjeno absorbanco pri metodi FC je bil največji pri CAPE (zmanjšanje absorbance za 14 % med najkrajšo 15-sekundno in najdaljšo 20-minutno inkubacijo) in najmanjši pri jabolčnem soku (povečanje za 0,2 % med najkrajšo in najdaljšo inkubacijo).
- Radikal ABTS je najbolj stabilen v mQ vodi, slabše v čistem metanolu in najslabše v pufru pH 7,4.
- Radikal DPPH je najbolj stabilen v čistem metanolu, slabše v mešanici metanola in pufra pH 7,4 ter najslabše v mešanici metanola in acetatnega pufra pH 5.
- Po dodatku vzorca raztopini radikalov DPPH in ABTS, smo pri vseh zaznali hitro začetno fazo, ki se je končala v nekaj minutah. Nato je sledila počasnejša faza: Amplitude hitre in počasne faze so bile močno odvisne od sestave topila in radikala, s katerim smo določali AOP.
- Kot optimalen čas za določanje AOP smo izbrali 60 minut, saj ta predstavlja kompromis med stabilnostjo radikalov DPPH in ABTS ter hkrati predstavlja čas, ko se je absorbanca zaradi antioksidanta le malo spreminja.
- V vseh vzorcih pijač smo najvišji AOP določili v pH 7,4 z ABTS metodo. Pri isti metodi manjši AOP v mQ vodi in najmanjši AOP v metanolu (razen vzorca refoška in jabolčnega soka).
- Pri DPPH metodi smo najvišji AOP dobili v mešanici metanola in TRIS pufra pH 7,4. Nižji AOP smo določili v mešanici acetatnega pufra pH 5 in metanola ter najnižjega v čistem metanolu (izjema je vzorec črnega čaja).
- Z metodo FC smo, z izjemo zelenega čaja, določili drugi najvišji AOP analiziranih vzorcev.
- Največjo koncentracijo skupnih fenolnih spojin z FC metodo smo določili v vzorcu propolisa in najmanjšo v vzorcu jabolčnega soka.

6 POVZETEK

V diplomski nalogi smo kot vzorce pijač uporabili zeleni čaj, črni čaj, refošk, laški rizling, propolis in jabolčni sok. Uporabili smo prav tako modelne antioksidante, in sicer askorbinsko kislino, troloks, katehin, kaftarno kislino, galno kislino, žveplov dioksid, CAPE, klorogensko kislino, epigalokatehin galat in dehidroaskorbinsko kislino.

Da bi delo izvedli čim bolj uspešno, smo najprej analizirali kinetični potek reakcije modelnih AO in vzorcev, da bi ugotovili najbolj primeren čas inkubacije pri delu z metodama ABTS in DPPH. Ugotovili smo, da je 60-minutna inkubacija najustreznejša, tako z vidika hitrosti rekcije kot tudi stabilnosti radikala ABTS in DPPH v topilu. Radikal ABTS se je za najstabilnejšega pokazal v mQ vodi in za najmanj stabilnega v pH 7,4. Radikal DPPH[•] je najbolj stabilen v metanolu, najslabša stabilnost pa je v acetatnem pufru pH 5. Za metodo FC smo preverili vpliv časa inkubacije, t.-j. čas med dodatkom FC reagenta in 20 % Na₂CO₃. Ugotovili smo, da pri modelnem AO CAPE ta čas najbolj vpliva na končno izmerjeno absorbanco, najmanj pa pri jabolčnem soku. Odločili smo se, da bo čas inkubacije 5 minut, ker so razlike pri tem času zanemarljive. Za primerjavo metode DPPH in ABTS, smo določili vzorcem pijač tudi koncentracijo skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu metodo. Pri tej metodi smo glede na troloks določili propolis največjo koncentracijo skupnih fenolnih spojin in v vzorcu jabolčnega soka najmanjšo. Večje vrednosti AOP vzorcev pijač določimo s Folin-Ciocalteu metodo kot z DPPH metodo. Izjema temu sklepu je le vzorec zelenega čaja, kjer je bil AOP, določen z FC metodo, manjši od DPPH metode.

Namen diplomske naloge je bil predvsem proučiti vpliv vrste in pH vrednosti topila na določen antioksidativni potencial vzorcev in modelnih antioksidantov. Najprej smo ugotovili, da tako za ABTS metodo kot za DPPH lahko trdimo, da je določen antioksidativen potencial večji v pufrih z višjim pH. Pri ABTS metodi smo vedno najvišje vrednosti antioksidativnega potenciala določili v fosfatnem pufru pH 7,4. Temu sledi mQ voda in najslabše v metanolu. Le v vzorcih refoška in jabolčnega soka smo dobili višje vrednosti v metanolu kot v mQ vodi, čeprav je razlika med njimi zelo majhna. Pri metodi DPPH smo najvišje vrednosti antioksidativnega potenciala določili v mešanici metanola in TRIS pufra pH 7,4. Nižje rezultate smo dobili v acetatnem pufru pH 5 in najnižje v metanolu. V vzorcu črnega čaja pa smo višjo vrednost določili v metanolu.

Zaključimo lahko s trditvijo, da je za določanje antioksidativne aktivnosti tako pijač kot modelnih antioksidantov v vseh pogledih najprimernejša uporaba višjih pH vrednosti v mešanici z metanolom. Smotrna je tudi uporaba polarnih topil ali mešanice metanola s pufrji, saj so antioksidanti v pijačah nahajajo v vodnem okolju in tako določimo realnejše rezultate.

7 VIRI

- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26.-27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32
- Abram V., Abramovič H., Skrt M., Kač M., Poklar Ulrich N. 2010. Antioksidacijska učinkovitost fenolnih spojin. Kemija v šoli in družbi, 22, 2: 14-19
- Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. Farmacevtski dnevnik, 48: 573-589
- Abramovič H., Smole Možina S., Abram V. 2008. Fenolne spojine iz stranskih proizvodov rastlinske predelave - funkcionalni dodatki živilom. V: Stranski proizvodi in odpadki v živilstvu - uporabnost in ekologija. 25. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 17.-18. april 2008. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 177-188
- Aherne S.A., O'Brien N.M. 2002. Dietary flavonols: Chemistry, food content and metabolism. Nutrition, 18: 75-81
- Arnao M. B. 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. Trends in Food Science & Technology, 11: 419-421
- Babnik J., Božič J., Božnar A., Debelak M., Gregorc A., Jenko-Rogelj M., Jelenc J., Kresal D., Meglič M., Poklukar J., Rihar J., Senegačnik J., Stark J., Strmole B., Šivic F., Vidmar U., Zdešar P. 1998. Od čebele do medu. Ljubljana, Kmečki glas: 420-425
- Bankova V., Christov R., Kujumgiev A., Marcucci M.C., Popov S. 1995. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. Zeitschrift für Naturforschung Section C. Biosciences, 50: 167-172
- Bertalanič L., Košmerl T., Poklar Ulrich N., Cigić B. 2012. Influence of solvent composition on antioxidant potential of model polyphenols and red wines determined with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60: 12282-12288
- Bertalanič L. 2011. Vpliv topila na določeno antioksidativno aktivnost vin in modelnih antioksidantov. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 81 str.

Božnar M. 2002. Zaklad iz čebeljega panja. Ljubljana, Kmečki glas: 39 str.

Campanella L., Bonanni A., Tomassetti M. 2003. Determination of the antioxidant capacity of samples of different types of tea, or of beverages based on tea or other herbal products, using a superoxide dismutase biosensor. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 32: 725-736

Cao G., Sofic E., Prior R. 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. Free Radical Biology and Medicine, 22: 749-760

Castaldo S., Capasso F. 2002. Propolis, an old remedy used in modern medicine. Fitoterapia, 73: 1-6

Cigić B., Rudan Tasič D. 2006. Antioksidanti in prooksidanti. V: Karcinogene in antikarcinogene komponente v živilih. 24. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 9.-10. november 2006. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 103-116

Cigut T., Polak T., Gašperlin L., Raspor P., Jamnik P. 2011. Antioxidative activity of propolis extract in yeast cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59: 11449-11455

Cortese D. 2004. Čaj, čas za zdaj. Ljubljana, Kmečki glas: 190 str.

Fernández-Pachón M.S., Villano D., Troncoso A.M., García-Parrilla M.C. 2006. Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity. Analytica Chimica Acta, 563: 101-108

Filipič M. 2001. Antimutagene in antikancerogene snovi v hrani. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 8. in 9. nov. 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 137-144

Floegel A., Dae-Ok K., Sang-Jin C., Sung I.K., Ock K.C. 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. Journal of Food Composition and Analysis, 24: 1043-1048

Frenkel K., Wei H., Bhimani R., Ye J., Zadunaisky J.A., Huang M.-T., Ferraro T., Conney A.H., Grunberger D. 1993. Inhibition of tumor promoter-mediated processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl ester. Cancer Research, 53: 1255-1261

Goodwin T.W., Mercer E.I. 1983. Plant phenolics. Oxford, Oxford Academic Press: 528-566

Greenaway W., Scaysbrook T., Whatley F.R. 1987. The analysis of bud exudate of *Populus x euramericana*, and of propolis, by gas chromatography-mass spectrometry. Proceedings of the Royal Society, Biological Sciences, 232: 249-272

Greenaway W., Scaysbrook T., Whatley F.R. 1990. The composition and plant origins of propolis: a report of work at Oxford. Bee World, 71: 107-118

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 2000. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford, Clarendon Press: 936 str.

Hribar J., Zlatić E. 2006. Flavonoidi sadja in zelenjave kot antikancerogene komponente. V: Karcinogene in antikarcinogene komponente v živilih. 24. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 9. in 10. nov. 2006. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 157-163

Karadag A., Ozcelik B., Saner S. 2009. Review of methods to determine antioxidant capacities. Food Analytical Methods, 2: 41-60

Karaman S., Tütem E., Baskan Sözgen K., Apak R. 2010. Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC-CUPRAC assay. Food Chemistry, 120: 1201-1209

Kedare S. B., Singh R.P. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. Journal of Food Science and Technology, 48: 412-422

Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26.-27. okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-21

Košmerl T. 2000. Preprečevanje oksidacije vin in ohranjanje njihovih antioksidacijskih lastnosti. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 167-178

Košmerl T., Vrhovšek U., Wondra M. 2006. Alkohol in rakava obolenja: se vino razlikuje od ostalih alkoholnih piča? V: Karcinogene in antikarcinogene komponente v živilih. 24. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 9. in 10. nov. 2006. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 149-156

Kreft S., Pečar S. 1998. Vloga radikalov pri obolenjih. Farmacevtski vestnik, 49: 469-481

Lambert J.D., Elias R.J. 2010. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. Archives of Biochemistry and Biophysics, 501: 65-72

McClements D.J., Decker E.A. 2008. Lipids. V: Fennema's food chemistry. 4th ed. Damodaran S., Parkin K., Fennema O.R. (eds.). Boca Raton, CRC press: 155-216

Meglič M. 2004. Čebelji pridelki: pridobivanje in trženje. Brdo pri Lukovici, Čebelarska zveza Slovenije: 96 str.

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

Musialik M., Kuzmicz R., Pawłowski T. S., Litwinienko G. 2008. Acidity of hydroxyl groups: an overlooked influence on antiradical properties of flavonoids. Journal of Organic Chemistry, 74: 2699-2709

Nemanič J. 1999. Spoznajmo vino. Ljubljana, Kmečki glas: 200 str.

Ness A.R., Powles J.W. 1997. Fruit and vegetables and cardiovascular disease: a review. International journal of Epidemiology. 26: 1-13

Nicoli M.C., Anese M., Parpinel M. 1999. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. Trends in Food Science and Technology, 10: 94-100

Prior R. L., Wu X., Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 4290-4302

Rasmussen S.E., Frederiksen H., Struntze Krogholm K., Poulsen L. 2005. Dietary proanthocyanidins: Occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. Molecular Nutrition & Food Research, 49: 159-174

Renauld S., De Lorgeril M. 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. Lancet, 339: 1523-1526

Ribereau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. 2006. Handbook of enology, Vol. 2. The chemistry of wine stabilization and treatments. 2nd ed. Chichester, J. Wiley & Sons: 129-182

Rice-Evans C. A., Miller N. J. 1997. Structure: antioxidant activity relationship of flavonoids and isoflavonoids. V: Natural antioxidants in human health and disease. Rice-Evans C. A., Packer L. (eds.). New York, Marcel Dekker: 199-219

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine, 20: 933-956

Roginsky V., Lissi E. A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. Food Chemistry, 92: 235-254

Shahidi F., Naczk M. 1995. Food phenolics: sources, chemistry, effects, applications. Lanchester, Technomic Publishing Company: 331 str.

Steinmetz K.A., Potter J.D. 1996. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. Journal of American Dietetic Association, 96: 1027-1039

Storz P. 2005. Reactive oxygen species in tumor progression. Frontiers in Bioscience, 10: 1881-1896

Tijburg L.B.M., Mattern T., Folts J.D., Weisgerber U.M., Katan M.B. 1997. Tea flavonoids and cardiovascular diseases: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 37: 771-785

Varnam H.A., Sutherland P.J. 1994. Beverages: technology, chemistry and microbiology. London, Chapman & Hall: 464 str.

Vertuani S., Angusti A., Manfredini S. 2004. The antioxidants and pro-antioxidants network: An overview. Current Pharmaceutical Design, 10: 1677-1694

Vinson A.J., Dabbagh A.Y. 1998. Tea phenols: Antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. Nutrition Research, 18: 1067-1075

Vrhovšek U. 1996. Fenoli kot antioksidanti v vinu. V: Zbornik referatov 1. slovenskega vinogradniško-vinarskega kongresa, Portorož od 4. do 6. decembra 1996. Ptuj, Slovenska vinska akademija Veritas: 124-134

Vrhovšek U., Eder R., Wendelin S. 1996. Resveratrol- Antioksidant v vinu. V: Tehnologija, hrana, zdravje: knjiga del. 1. slovenski kongres o hrani in prehrani, Vol. II. Bled, 21. do 25. april 1996. Raspot P., Pitako D., Hočevar I. (ur.). Ljubljana, Društvo živilskih in prehranskih strokovnih delavcev: 635-641

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

Yang C.S., Wang Z.Y. 1993. Tea and cancer. Journal of the National Cancer Institution, 85: 1038-1049