

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Iris SKUBIN

**DOLOČANJE SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN
V URINU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Iris SKUBIN

DOLOČANJE SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN V URINU

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DETERMINATION OF TOTAL PHENOLIC COMPOUNDS
IN THE URINE**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilstva. Analize so bile opravljene na Katedri za tehnologijo, prehrano in vino ter na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisije za študij 1. in 2. stopnje Oddelka za živilstvo je za nadomestno mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Tatjano Košmerl, za somentorja prof. ddr. Marjana Simčiča in za recenzentko izr. prof. dr. Helena Abramovič.

Mentorica: prof. dr. Tatjana Košmerl

Somentor: prof. ddr. Marjan Simčič

Recenzentka: izr. prof. dr. Helena Abramovič

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Iris Skubin

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 613.2:612.46:547.56:543.42(043)=163.6
KG	prehrana / antioksidanti / fenolne spojine / urin / biomarkerji / kreatinin / analizne metode/ Folin-Ciocalteu metoda
AV	SKUBIN, Iris
KA	KOŠMERL, Tatjana (mentorica)/ SIMČIČ, Marjan (somentor)/ ABRAMOVIČ, Helena (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2016
IN	DOLOČANJE SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN V URINU
TD	diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 48 str., 4 pregl, 21 sl., 8 pril., 49 vir.
IJ	Sl
JI	sl/en
AI	Polifenoli so pomembni za naše zdravje, saj ugodno vplivajo nanj in nas ščitijo pred boleznimi. So eden od temeljev zdrave prehrane, ker varujejo naše telo pred oksidativnim stresom in prostimi radikali. Težko je ovrednotiti količino zaužitih fenolnih spojin preko analiz zaužite hrane, zato je smotrna uporaba metod za analizo skupnih fenolnih spojin (SFS) v telesnih tekočinah kot pokazateljev zaužitih SFS. Zbiranje urina je neinvazivna metoda pridobivanja telesnih tekočin. Idealna kemijska metoda za analizo SFS v urinu je tista, s katero lahko kompleksne vzorce kvantitativno in kvalitativno čim bolj natančno analiziramo. Za določanje in primerjavo vsebnosti SFS v urinu lahko uporabljamo več različnih metod. Namen diplomske naloge je določitev SFS v urinu na skupini 10 posameznikov in narediti primerjavo ter ovrednotiti korelacijo med določenimi SFS v urinu brez predhodne ekstrakcije na trdni fazi in z ekstrakcijo. Za določanje SFS smo izbrali metodo Folin-Ciocalteu s spektrofotometričnimi meritvami na mikrotitrskih ploščah. Določili smo korelacijo med količino izločenih SFS v 24-urnem urinu in SFS v jutranjem urinu, normalizirano na kreatinin. Ugotovili smo, da se količina SFS, izločenih v 24-h urinu med posamezniki statistično razlikuje, čeprav so zaužile isti obrok.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 613.2:612.46:547.56:543.42(043)=163.6
CX nutrition / antioxidants / phenolic compounds / urine / biomarkers / creatinine / analytical methods/ Folin-Ciocalteu method
AU SKUBIN, Iris
SA KOŠMERL, Tatjana (supervisor)/SIMČIČ, Marjan (co-advisor)/ABRAMOVIČ, Helena (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2016
TI DETERMINATION OF TOTAL PHENOLIC COMPOUNDS IN THE URINE
DT Graduation Thesis (Universtiy studies)
NO XI, 48 p., 4 tab., 21 fig., 8 ann., 49 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Polyphenols are important for our health as a positive influence and they protect us from diseases. They are one of the cornerstones of a healthy diet because they protect our body against oxidative stress and free radicals. It is difficult to evaluate the intake of phenolic compounds through the analysis of food intake, so it is suitable to use the methods for analysis of total phenolic compounds (SFS) in body fluids as biomarkers of consumed phenolic compounds. Collecting urine is a non-invasive method of obtaining bodily fluids. The ideal chemical method for the analysis of SFS in the urine is one with which complex patterns can be quantitatively and qualitatively analyzed as closely as possible. Several different methods can be used for the determination and comparison of the SFS in urine. The aim of this thesis is to determine the total amount SFS measured in the urine in a group of 10 individuals and to compare and evaluate the correlation between SFS in urine exposed to solid phase and SFS in urine without extraction. For SFS determination the Folin-Ciocalteu method with spectrophotometric measurements in microtiter plates was used. We studied the correlation between the SFS in a 24-hour urine and SFS in morning urine, normalized to creatinine. We found out that the amount of SPS excreted in 24-hour urine is statistically different between subjects, even though they ate the same meal.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA.....	2
1.2 DELOVNI HIPOTEZI	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 FENOLNE SPOJINE	3
2.1.1 Biosinteza fenolnih spojin.....	3
2.1.2 Delitev fenolnih spojin	4
2.1.3 Flavonoidi.....	5
2.2 ANTIOKSIDANTI.....	6
2.2.1 Vloga antioksidantov	6
2.3 VLOGA FENOLNIH SPOJIN.....	6
2.3.1 Antioksidativno delovanje fenolnih spojin.....	8
2.4 VPLIVI FENOLNIH SPOJIN NA ZDRAVJE	9
2.4.1 Protimikrobno delovanje.....	9
2.4.2 Vpliv na ožilje	10
2.4.3 Kancerogenost	10
2.5 URIN	12
2.5.1 Kreatinin	13
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 IZVEDBA POSKUSA IN ZBIRANJE VZORCEV	14
3.2 MATERIAL	15
3.2.1 Pribor.....	15
3.2.2 Reagenti.....	15
3.3 ANALIZNE METODE	16
3.3.1 Priprava vzorcev	16
3.3.2 Določanje SFS v urinu s Folin-Ciocalteu metodo.....	16
3.3.3 Modificirana F-C metoda (Medina-Remón in sod., 2009).....	18
3.3.4 Priprava sintetičnega urina	20
3.3.5 Priprava umeritvene krivulje.....	20
3.3.6 Določanje kreatinina	21
3.4 OBDELAVA IN UREJANJE PODATKOV	21
4 REZULTATI	22
4.1 KOLIČINA IZLOČENIH SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN PRI DESETIH PREISKOVANKAH NORMALIZIRANA NA KREATININ	22

4.2	PRIMERJAVA DOLOČENIH VREDNOSTI SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN V URINU Z IN BREZ EKSTRAKCIJE NA TRDNI FAZI.....	33
4.3	IZRAČUNANA KOLIČINA IZLOČENIH SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN PRI DESETIH PREISKOVANKAH V 24-URNEM URINU	34
4.4	PRIMERJAVA KOLIČINE IZLOČENIH SKUPNIH FENOLNIH SNOVI IZRAČUNANIH V 24-URNEM URINU IN JUTRANJEM URINU NORMALIZIRANEM NA KREATININ	38
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	42
5.1	RAZPRAVA	42
5.2	SKLEPI	43
6	POVZETEK.....	44
7	VIRI.....	45
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Razvrstitev fenolnih spojin (Abram in Simčič, 1997; Robards, 1999)	4
Preglednica 2: Delitev fitokemičnih snovi in njihovo delovanje (Milič in sod., 2008)	7
Preglednica 3: Število vzorcev glede na preiskovanko po dnevih	14
Preglednica 4: Pearsonovi koeficienti korelacije pri korelaciji med dnevno izločeno količino skupnih fenolnih spojin (mg) in količino SFS jutranjega urina, normaliziranega na kreatinin (mg/mmol) v vzorcih z ekstrakcijo na trdni fazi (za vse posameznice)	39

KAZALO SLIK

Slika 1: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Abram, 2000).....	5
Slika 2: Strukturna formula kvercetina (Song in sod., 2009)	11
Slika 3: Sekundarne rastlinske snovi, ki preprečujejo spremembe celic (povzeto po Gavez, 2010).....	12
Slika 4: Prikaz kolektorja za ekstrakcijo na trdni fazi, kartuš za ekstrakcijo in vakuumske črpalke	18
Slika 5: Shematski prikaz določanja skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu metodo (Medina-Remón in sod., 2009).....	19
Slika 6: Prikaz mikrotitrskega čitalnika za merjenje absorbance	20
Slika 7: Količina izločenih skupnih fenolnih spojin normalizirana na kreatinin v ekvivalentih galne kisline (mg GAE/mmol kreatinina) pri preiskovanki A z ekstrakcijo in brez ekstrakcije.	23
Slika 8: Količina izločenih skupnih fenolnih spojin normalizirana na kreatinin v ekvivalentih galne kisline (mg GAE/mmol kreatinina) pri preiskovanki B z ekstrakcijo in brez ekstrakcije.	24
Slika 9: Količina izločenih skupnih fenolnih spojin normalizirana na kreatinin v ekvivalentih galne kisline (mg GAE/mmol kreatinina) pri preiskovanki C z ekstrakcijo in brez ekstrakcije.	25
Slika 10: Količina izločenih skupnih fenolnih spojin normalizirana na kreatinin v ekvivalentih galne kisline (mg GAE/mmol kreatinina) pri preiskovanki D z ekstrakcijo in brez ekstrakcije.	26
Slika 11: Količina izločenih skupnih fenolnih spojin normalizirana na kreatinin v ekvivalentih galne kisline (mg GAE/mmol kreatinina) pri preiskovanki E z ekstrakcijo in brez ekstrakcije.	27
Slika 12: Količina izločenih skupnih fenolnih spojin normalizirana na kreatinin v ekvivalentih galne kisline (mg GAE/mmol kreatinina) pri preiskovanki F z ekstrakcijo in brez ekstrakcije.	28
Slika 13: Količina izločenih skupnih fenolnih spojin normalizirana na kreatinin v ekvivalentih galne kisline (mg GAE/mmol kreatinina) pri preiskovanki I z ekstrakcijo in brez ekstrakcije.	29

Slika 14: Količina izločenih skupnih fenolnih spojin normalizirana na kreatinin v ekvivalentih galne kisline (mg GAE/mmol kreatinina) pri preiskovanki J z ekstrakcijo in brez ekstrakcije.	30
Slika 15: Količina izločenih skupnih fenolnih spojin normalizirana na kreatinin v ekvivalentih galne kisline (mg GAE/mmol kreatinina) pri preiskovanki K z ekstrakcijo in brez ekstrakcije.	31
Slika 16: Količina izločenih skupnih fenolnih spojin normalizirana na kreatinin v ekvivalentih galne kisline (mg GAE/mmol kreatinina) pri preiskovanki L z ekstrakcijo in brez ekstrakcije.	32
Slika 17: Koncentracija skupnih fenolnih spojin v urinu v mg galne kisline/L določenih z ekstrakcijo na trdni fazi (SPE) in brez SPE.....	33
Slika 18: Količina dnevno izločenih skupnih fenolnih spojin v mg GA pri desetih preiskovankah določenih brez ekstrakcije na trdni fazi (brez SPE).	35
Slika 19: Količina dnevno izločenih skupnih fenolnih spojin v mg GA pri desetih preiskovankah določenih z ekstrakcijo na trdni fazi (s SPE).	36
Slika 20: Korelacija med dnevno izločeno količino skupnih fenolnih spojin (mg) in količino SFS jutranjega urina, normalizirano na kreatinin (mg/mmol) v vzorcih z ekstrakcijo na trdni fazi za vse posameznice.....	38
Slika 21: Korelacija med dnevno izločeno količino skupnih fenolnih spojin (mg) in količino SFS jutranjega urina, normaliziranega na kreatinin (mg/mmol) določena brez ekstrakcije na trdni fazi (za vse posameznice)	39

KAZALO PRILOG

- Priloga A:** Umeritvena krivulja za izračun količine izločenih SFS s predhodno ekstrakcijo na trdni fazi
- Priloga B:** Umeritvena krivulja za izračun količine izločenih SFS brez ekstrakcije na trdni fazi
- Priloga C:** Izračunana vrednost Pearsonovega koeficienta korelacije (r) med koncentracijo dnevno izločenih SFS, normaliziranih na kreatinin z ekstrakcijo (s SPE) in koncentracijo dnevno izločenih SFS, normaliziranih na kreatinin brez SPE za vsako preiskovanko
- Priloga D:** Izračunana vrednost Pearsonovega koeficienta korelacije (r) med koncentracijo dnevno izločenih SFS, normaliziranih na kreatinin z ekstrakcijo (s SPE) in koncentracijo dnevno izločenih SFS, normaliziranih na kreatinin brez SPE (za vsak posamezen dan)
- Priloga E:** Izračunana vrednost Pearsonovega koeficienta korelacije (r) med količino dnevno izločenih SFS in koncentracijo SFS jutranjega urina, normaliziranega na kreatinin pri določanju brez ekstrakcije na trdni fazi (za vsako posameznico)
- Priloga F:** Izračunana vrednost Pearsonovega koeficienta korelacije (r) med količino dnevno izločenih SFS in koncentracijo SFS jutranjega urina, normaliziranega na kreatinin pri določanju brez ekstrakcije na trdni fazi (za vsak posamezni dan)
- Priloga G:** Podatki preiskovank, ki so sodelovale v raziskavi
- Priloga H:** Jedilnik preiskovank, razdeljen na posamične obroke v raziskavi

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca
ARE	antioksidativni odzivni elementi (angl. antioxidant responsive elements)
F-C	Folin-Ciocalteu
GA	galna kislina (angl. gallic acid)
GAE	ekvivalent galne kisline (angl. gallic acid equivalent)
ITM	indeks telesne mase
LDL	lipoproteini majhne gostote (angl. low-density lipoproteins)
PPO	polifenilen oksid (angl. polyphenylene oxide)
SD	standardna deviacija
SFS	skupne fenolne spojine
SPE	ekstrakcija na trdni fazi (angl. solid phase extraction)
UV	ultravijolično sevanje

1 UVOD

Število bolezni iz dneva v dan narašča, saj se premalo zavedamo vpliva zdrave prehrane na naše telo, nanje pa vplivata tudi oksidativni stres in življenjski slog posameznika. Menim, da je naša pozornost do hrane bistveno drugačna kot nekdanja in da sta ozaveščenost in odnos do hrane in njene povezave z zdravjem boljša kot nekoč. Z ustrezno izbrano prehrano in njeno količino lahko marsikdaj izzovemo ali preprečimo nekatere bolezni današnjega časa.

V današnjem času poteka mnogo znanstvenih raziskav, ki se nanašajo na zdravljenje s pomočjo prehrane. Vsako hranilo in njegova vloga v telesu ima velik pomen na preprečevanje in obvladovanje nekaterih bolezni. V prehrani imajo lahko preproste spremembe močan zdravilen učinek. Vsako hranilo izzove biokemične učinke v telesu zaradi povezanosti hranil z biokemičnimi potmi in s presnovnimi funkcijami v telesu. Prehrana danes je več kot le njena hranilna vrednost, ampak obsega kompleksno in široko področje. Miselnost, da nas hrana samo nahrani, je premalo. Uporaba prehranskih dodatkov, ki je v današnjem času zelo aktualna, je bistveno manj učinkovita in zdravilna kot sama sveža hrana. Namesto poseganja po prehranskih nadomestkih lahko z uporabo fitokemikalij iz sveže hrane vnesemo v telo mnogo dobrih učinkov rastlinskega izvora. Biokemija rastlin, kot predmet mnogih področij zdravljenja z zelišči, součinkuje s fiziologijo človeka in pripomore k pravilnemu delovanju organizma in zdravju človeka. Z uživanjem sveže rastlinske hrane posegamo po domači lekarni s snovi iz narave, ki delujejo zdravilno. Ta niso zgolj le hranila, ampak farmakološko učinkovita zdravila. Funkcije fitokemikalij so različne. Lahko so neposreden uporaben prehranski vir kot del rastlinske zgradbe. Nekatere uravnavajo razvojne stopnje in opravljajo vlogo hormonov. Spet druge delujejo kot barvila (npr. temno vijoličasti betacianin v rdeči pesi) (Pinnock, 2013).

V skupino naravnih polifenolov uvrščamo torej tudi rastlinska barvila, med drugim tudi čreslovine (tanine, grenčine in fenolne kisline) in flavonoide. Te snovi najdemo pogosto tik pod lupino sadja, zelenjave in ovoja žitnih zrn. Te snovi kot grenka obrambna snov varujejo rastlino pred škodljivci in opravljajo vlogo antioksidantov, da plodove varujejo pred škodljivim ultravijoličnim sevanjem. Ravno to je razlog, da sadje in zelenjavo čim manj lupimo in polnozrnat izdelke uživamo skupaj z ovojem zrnja. Zanimiv je primer izgube polifenolov pri lupljenju korenja, saj kar 85 odstotkov le-teh zavržemo z odpadki (Bohlmann in Ullmann, 2014).

Fenolne spojine imajo pomembno vlogo tako v rastlinskem svetu, kot tudi v prehrani ljudi. S sintezo antioksidativnih zaščitnih snovi se rastline ščitijo pred napadi virusov, bakterij in tudi rastlinojedih organizmov ter pred navadnimi sončnimi žarki, ki sprožajo nastanek prostih radikalov. Številne epidemiološke študije kažejo povezavo med uživanjem hrane in pijač, ki vsebujejo veliko flavonoidov in zmanjšanjem nastanka mnogih bolezni modernega življenja, ki jih povzroča oksidativni stres. Flavonoidi naj bi delovali preventivno tudi pred procesi staranja (Vrhovšek, 2001).

S prehranjevanjem z živili, bogatimi s hranili rastlinskega snovmi izvora, si lahko pomagamo pri preprečevanju nekaterih kroničnih bolezni, kot so srčno-žilne bolezni, rak in sladkorne bolezni tipa 2, katere so v zahodnem svetu pogost vzrok smrti. Rastlinska hrana s svojimi naravnimi snovmi opravlja v telesu biološko aktivnost. Biološka aktivnost sestoji iz razstrupljanja kancerogenih snovi, popravlja okvar DNK, antioksidativnega učinka, spremembe metabolizma estrogena in okrepitve imunskega sistema (Reinhard, 2014).

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je določiti skupno količino fenolnih spojin izmerjenih v urinu na skupini 10 posameznikov in narediti primerjavo med njimi ter ovrednotiti korelacije med skupnimi fenolnimi spojinami (SFS) v urinu pred in po ekstrakciji na trdni fazi. Za določanje SFS smo izbrali metodo Folin-Ciocalteu s spektrofotometričnimi meritvami na mikrotitrskih ploščah. Določili bomo korelacijo med količino izločenih fenolnih spojin v 24-urnem urinu in jutranjim urinom, normaliziranim na kreatinin.

1.2 DELOVNI HIPOTEZI

- Količina skupnih fenolnih spojin izločenih v 24-h urinu se med posameznicami statistično značilno razlikuje, čeprav so zaužile isti obrok.
- Količina skupnih fenolnih spojin v 24-h urinu je v močni povezanosti s količino SFS v jutranjem urinu, normaliziranim na kreatinin.

2 PREGLED OBJAV

2.1 FENOLNE SPOJINE

Fenolne spojine imenujemo tudi fenolne snovi, rastlinski fenoli, polifenoli ali polifenolne spojine. Med njih prištevamo vse tiste spojine, ki imajo vsaj en aromatski obroč in eno ali več hidroksilnih (-OH) skupin, direktno vezanih na aromatski obroč. V naravi običajno najdemo spojine z več hidroksilnimi skupinami, zato jih poimenujemo tudi polifenoli. Splošna delitev fenolnih spojin se nanaša na razdelitev po številu C-atomov v molekuli, kot je razvidno iz preglednice 1 (Abram in Simčič, 1997).

Študije kažejo, da imajo polifenolne snovi v mnogih rastlinah vpliv na biološke procese in pozitiven antioksidativen učinek. V skoraj vseh rastlinah je prisotna velika skupina polifenolov, ki se delijo na flavonoide, lignine in tanine. Mnogi so koristni za zdravje zaradi antioksidativnega učinka (Reinhard, 2014).

Polifenoli imajo antioksidativne lastnosti, ki lahko zavirajo peroksidacijo lipidov, zmanjšujejo kapilarno krhkost povezano s hemoragičnimi spremembami, znižujejo visok krvni tlak in tveganje za arteriosklerozo. Prav tako igrajo pomembno vlogo pri zaščiti rastlin pred ultravijoličnim sevanjem (Vogrinčič in sod., 2010).

Eksperimentalni in epidemiološki podatki kažejo, da polifenoli prispevajo k preprečevanju nekaterih kroničnih bolezni, kot so kardiovaskularne bolezni, sladkorne bolezni, rakava obolenja, nevrodegenerativne bolezni in osteoporoze (Pérez-Jiménez in sod., 2010).

Polifenolne spojine se razlikujejo tudi po polarosti. Manj polarne polifenolne spojine (npr. flavanoni, flavonoli) so dobro topne v kloroformu, diklorometanu, dietiletru ali etil acetatu. Bolj polarne polifenolne spojine pa so dobro topne v vodnih mešanicah z etanolom ali metanolom (npr. katehini) (Marston in Hostettmann, 2006).

2.1.1 Biosinteza fenolnih spojin

Biosinteza fenolnih spojin v rastlinah je kompleksno medsebojno sodelovanje različnih poti (Abram in Simčič, 1997). Fenolne spojine vsebujejo aromatski obroč s stransko verigo treh ogljikov, ker številni izhajajo iz aminokislin fenilalanina in tirozina. Večina rastlinskih fenolov se sintetizira iz dveh osnovnih poti: šikiminske kislinske poti in malonske poti.

Šikiminska kislinska pot temelji na nastanku fenolnih spojin iz fenilalanina ali njegovega prekursorja. Fenolne spojine se kemijsko zelo razlikujejo med seboj po ne/topnosti v vodi in nekaterih organskih topilih ravno zaradi njihove sinteze po različnih poteh (Saltveit, 2010).

Vsebnost in vrsta fenolnih spojin se razlikujeta glede na vrsto, sorto, stopnjo zrelosti in klimatske razmere. Fenolne skupine pripomorejo k barvi, okusu in aromi sadja (Cheynier in Moutounet, 1992; Joseph in Lloyd, 2004).

Flavonoidi se sintetizirajo v rastlinskih tkivih in sodelujejo pri svetlobni fazi fotosinteze kot prenašalci elektronov (Middleton in sod., 2000).

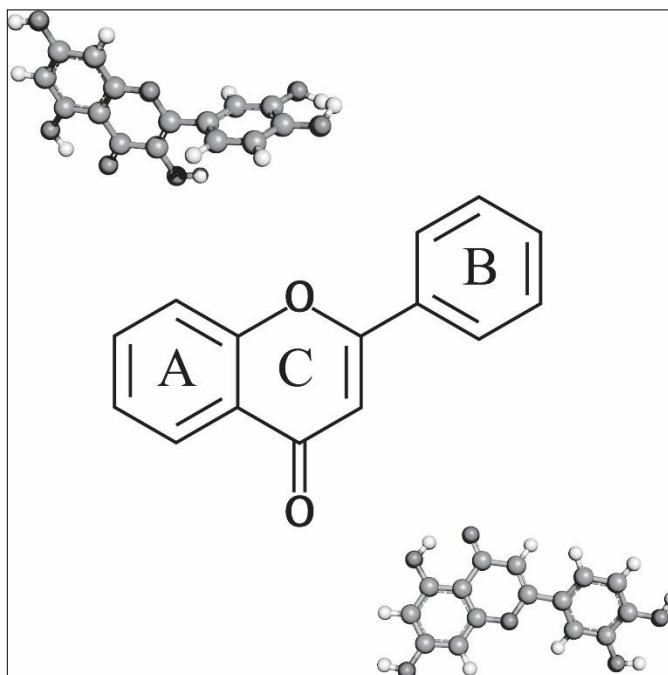
2.1.2 Delitev fenolnih spojin

Preglednica 1: Razvrstitev fenolnih spojin (Abram in Simčič, 1997; Robards, 1999)

Število C - atomov	Osnovni skelet	Skupina
6	C_6	enostavni fenoli
7	C_6C_1	hidroksibenzojske kisline
8	C_6C_2	fenilacetne kisline
9	C_6C_3	hidroksicimetne kisline fenilpropeni kumarini izokumarini kromoni
10	C_6C_4	naftokinoni
13	$C_6C_1C_6$	ksantoni
14	$C_6C_2C_6$	stilbeni antrakinoni
15	$C_6C_3C_6$	flavonoidi
18	$(C_6C_3)_2$	lignani neolignani
30	$(C_6C_3C_6)_2$	biflavonoidi
n	$(C_6C_3)_n$ $(C_6)_n$ $(C_6C_3C_6)_n$	lignini melanini kondenzirani tanini (flavolani)

2.1.3 Flavonoidi

Flavonoidi so fenolne spojine zgrajene iz 15 C-atomov, osnovno spojino flavon sestavljajo strukture, ki jih označujemo s $C_6C_3C_6$. Osnovno strukturno formulo flavonoidov oziroma 2-fenilbenzopirana prikazuje slika 1 (Abram, 2000).



Slika 1: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Abram, 2000)

Flavonoidi so kompleksna skupina polifenolnih spojin z osnovnim $C_6-C_3-C_6$ obročem, v katerem je most s tremi ogljiki med fenilnima skupinama. Razdelimo jih v naslednje skupine: flavonoli, flavanoli, flavanoni, antociani in izoflavoni. Točno število flavonoidov je težko določiti, vendar pa lahko govorimo o številu okrog 2000 do 6500. Flavonoidi so vključeni v mnoge biološke interakcije in imajo pomembno vlogo in učinek na zdravje ljudi (Robles-Sardin in sod., 2010).

Polifenoli, vključno s flavonoidi, so bioaktivne fitokemikalije, ki jih najdemo v sadju in zelenjavi. Ker jih človeško telo ne more proizvajati, jih lahko zaužijemo le s hrano, bogato z njimi. Ker imajo visoko antioksidativno vrednost, so pogosto povod za raziskave v zvezi z njihovimi zaščitnimi lastnostmi do zdravja.

Raziskovalci z univerze v Oregonu zatrjujejo, da naj bi se flavonoidi tekom presnove strukturno močno spremenili, kar pa zmanjšuje tudi njihovo antioksidativno učinkovitost *in vivo*. Po vstopu v telo se flavonoidi spremenjeni izločijo z urinom ali v žolč. Čeprav *in vitro* študije kažejo na 3- do 5-kratno večjo antioksidativno moč flavonoidov od vitaminov C in E, se vitamini boljše absorbirajo v telesu (Robles-Sardin in sod., 2010).

2.2 ANTIOKSIDANTI

Antioksidanti so naravne ali sintetične snovi, ki že v majhnih koncentracijah preprečujejo ali zavirajo nezaželene oksidativne spremembe v bioloških sistemih (Salobir, 2000). Fenoli, galna kislina in njeni derivati, flavonoidi in druge naravne spojine so antioksidanti, ki nevtralizirajo proste radikale in s tem preprečujejo udar škodljivih snovi v celico (Korošec, 2000).

Kisik, ki je nujno potreben za življenje, hkrati tudi ubija. Zadnjih nekaj let skrbno proučujejo mehanizme staranja. Ugotovili so, da so glavni vzrok za staranje reaktivne oblike kisika. Vse te oblike kisika so rezultat normalne celične presnove in posledica dejavnikov okolja: UV- in gama žarkov, toplote, kajenja, onesnaženega okolja, itd. Obramba proti prostim radikalom so antioksidanti. Kač je razvrstila antioksidante v tri skupine: pravi antioksidanti (encimi), reducenti (hemoglobin, albumin) in antioksidanti sinergisti (vitamin C in E, flavonoidi, karotenoidi, sečna kislina, itd.) (Kač, 2000).

2.2.1 Vloga antioksidantov

Antioksidanti so znanstveno zelo obširno obravnavani, saj imajo ključno vlogo pri preprečevanju različnih obolenj. Z znanstvenega vidika reaktivne kisikove spojine povzročajo oksidativne poškodbe telesnih celic. Te spojine nastanejo v telesu kot posledica oksidirane snovi v hrani, onesnaževalcev iz okolja, sončne svetlobe, cigaretne dima in tudi ob nekaterih normalnih procesih presnove. V boju z antioksidativnimi okvarami, ki lahko privedejo do kroničnih bolezni, kot so rak, sladkorna bolezen in srčno-žilne bolezni, lahko antioksidanti bistveno pripomorejo. Med raziskovalci postaja veliko zanimanje vloga spojin rastlinskega izvora, ki učinkujejo kot antioksidanti. Odkrili naj bi jih že preko 4000 in med njimi so tudi: polifenoli s podskupinami flavonoidi, fenolne kisline, lignani in stilbeni. Med flavonoide spadajo flavanoli (katehin), flavoni, flavonoli, flavanoni, izoflavoni in antociani (Reinhard, 2014).

2.3 VLOGA FENOLNIH SPOJIN

Fitokemične snovi imajo poleg antioksidativnega, protibakterijskega in protivirusnega delovanja še naslednje učinke, in sicer spodbujanje jetrnih encimov, ki delujejo na strupe in jih odstranjujejo, spodbujanje imunskega sistema, zmanjševanje nevarnosti za pojav krvnih strdkov, uravnavanje koncentracije holesterola in hormonskega metabolizma, ter zniževanje krvnega tlaka. Antioksidativna učinkovitost fenolov naj bi zmanjševala tveganja za srčna obolenja in omejevala razvoj vnetja v tkivih, ki so jih prizadeli prosti radikali, kar je razvidno iz preglednice 2 (Milič in sod., 2008).

Preglednica 2: Delitev fitokemičnih snovi in njihovo delovanje (Milič in sod., 2008)

Fitokemične snovi	Zgledi spojin	Poglavitni prehranski viri	Delovanje
Flavonoidi	kempferol, kvercetin hesperitin, naringenin, rutin, tangeritin	artičoke, jabolka, zelena solata, čebula, paprika, čaj, paradižnik, vino, agrumi	antioksidativno uravnavanje encimov lahko preprečuje raka in bolezni srca in ožilja, lahko uravnava imunski sistem
Glukozinolati Izotiocinati	alilizotiocinati, glukobrasicin, indoli	kapusnice (brokoli, brstični ohrovt, cvetača), gorčica, vodna kreša	spodbujajo jetrne encime, lahko preprečujejo raka
Hidroksicimetne kisline	kavna, klorogenska in ferulna kislina, kurkumin	jabolka, kava, kari, gorčica, hruške	antioksidativno; lahko preprečujejo raka
Izoflavoni	daidzein, genistein	izdelki iz soje (moka, sojine beljakovine)	nižajo koncentracijo serumskih lipidov, antiestrogensko, lahko preprečujejo raka na prsih in prostatu
Lignani	metaresinol, sekoizolariciresinol	jagode, laneno seme, oreščki, rženi otrobi	antioksidativno in antiestrogensko, lahko preprečujejo raka na debelem črevesu in prostatu
Monoterpeni	D-karvan, D-limonen, perilil alkohol	češnje, agrumi, zelišča (koper, meta, kumina)	spodbujajo jetrne encime, delujejo proti tumorjem, antimikrobno
Organosulfidi	alil metil sulfid, dialil sulfid	zelje, česen, por, čebula itd.	upočasnjujejo strjevanje krvi, zmanjšujejo količino lipidov v krvi, spodbujajo jetrne encime, lahko preprečujejo raka
Fenoli	elagična kislina, galna kislina, hidrokinon, p-krezol	zelo razširjeni v črnem čaju, kakavovih zrnih, zelenemčaju, malinah, jagodah	antioksidativno, delujejo protivnetno
Fitosteroli	B-sistosterol, kampesterol, stigmasterol	rastlinska olja, v nekaterih margarinah jih je desetkrat več	znižujejo skupni holesterol in »slabi« holesterol LDL
Tanini	teaflavini, tearubigeni	črni čaj, rdeče vino, pražena kava	antioksidativno, antimikrobno in protivnetno

2.3.1 Antioksidativno delovanje fenolnih spojin

Fenolni antioksidanti (AH) naj bi zaustavljali oksidacijo lipidov. Sposobnost antioksidantov je odvisna od jakosti vezi A-H. Čim šibkejša je ta vez, tem boljši je antioksidant. Zato so dobri antioksidanti predvsem tiste fenolne spojine, ki imajo dve -OH skupini na orto položaju. Za antioksidante je ravno tako pomembno, da so njihovi radikali slabo reaktivni. To za fenole velja, saj se elektron lahko delokalizira po obroču, kar zagotavlja stabilnost. Najbolj razširjeni fenolni antioksidanti so flavonoidi. Zanje velja, da lahko preprečujejo peroksidacijo lipidov na več načinov: z lovljenjem radikalov (O_2 , $HO^\cdot$, $Fe(OH)_3^\cdot$), z vezavo kovinskih ionov (Fe^{2+} , Cu^{2+}) in z inhibicijo encimov (lipooksigenaze, ciklooksigenaze), ki katalizirajo reakcije, pri katerih nastajajo prosti radikali. Divalentne kovinske ione dobro vežejo flavonoidi, ki imajo na obroču B dve -OH skupini v orto položaju, oz. tisti ki imajo -OH skupino na mestu 3 ali 5 (Abram in Simčič, 1997; Gutteridge in Halliwell, 2010).

Antioksidanti nevtralizirajo delovanje prostih radikalov, ki s svojo visoko reaktivnostjo reagirajo s celicami našega telesa in jih poškodujejo. Prosti radikali so del produkta pri celični presnovi in se v veliki količini tvorijo pri pomanjkljivi prehrani, pomanjkljivem spancu, onesnaženem okolju, čustvenem stresu in pretirani telesni aktivnosti. Tako se pojavi oksidativni stres, ki je posledica prevelike količine prostih radikalov, ki lahko privede do razvoja sladkorne bolezni, srčno-žilnih in rakavih obolenj, ter celo avtoimunih in živčnih bolezni. Zato je uživanje hrane, bogate z antioksidanti, kamor uvrščamo tudi vitamine (C, E), fitohranila (betakaroten) in minerale (selen), potrebno za preprečevanje celičnih poškodb in vnetij, kot posledica delovanja prostih radikalov (Boone, 2014).

Polifenoli so naravne spojine, ki se nahajajo v sadju, zelenjavi, žitih in pijači. Polifenoli so sekundarni metaboliti rastlin ter obramba pred patogenimi organizmi in UV sevanjem. Konec 20. stoletja je bilo preko epidemioloških študij dokazano, da uživanje hrane, ki je bogata s polifenoli, vpliva na številne bolezni, kot je razvidno iz preglednice 2 (Milič in sod., 2008).

Polifenoli v vinu, zelenjavi, sadju, čokoladi, kakavovih izdelkih, čaju, oljčnem olju, pridobljenim s hladnim stiskanjem imajo različne učinke. Dokazano je, da mnogi polifenoli *in vitro* delujejo kot antioksidanti, saj imajo polifenoli močno redukcijsko sposobnost. Predvidevajo, da polifenoli posredno delujejo proti raku, preko aktivacije endogenih obrambnih sistemov in neposredno učinkujejo na lovljenje prostih radikalov. Podatki novejših raziskav nakazujejo, da se geni, ki jih inducira oksidativni stres in ki kodirajo endogene antioksidante, nahajajo v promotorskem delu t.i. antioxidant responsive elements (ARE), na katerega se lahko vežejo polifenoli.

Polifenoli naj bi po tej poti spodbujali prepisovanje genov za endogene antioksidante in razstrupljevalne obrambne mehanizme (Rozman in sod., 2006).

Fenolne spojine se kot sekundarni metaboliti pojavljajo v sadju. Odkriti so bili mehanizmi delovanja fenolnih spojin, kot so vezava kovinskih ionov, donacija vodika in lovljenje prostih radikalov (Robards in sod., 1999).

2.4 VPLIVI FENOLNIH SPOJIN NA ZDRAVJE

V raziskavi, ki je bila opravljena v letu 2008 in je zajemala šest tedensko spremljanje uživanja sadja in zelenjave ter na drugi strani populacijo, ki je uživala manj sadja in zelenjave, je bilo ugotovljeno, da so pri posameznikih, ki so uživali veliko sadja in zelenjave vsebnosti fenolnih spojin, izločenih v urinu višje, kot pri posameznikih, ki so uživali minimalne količine sadja in zelenjave. Urinski kvercetin in flavononi ter skupni flavonoidi so bili po dieti z veliko količino zaužitega sadja in zelenjave dokazano povišani, kar nakazuje, da prehrana, bogata s fenolnimi spojinami, ugodno vpliva na zdravje. Na individualni ravni je bila predmet opazovanja pozitivna korelacija med spremembami vnosa sadja in zelenjave in izločenih flavonoidov v urinu. Poleg tega so ugotovili pozitivno korelacijo med skupnimi fenolnimi metaboliti v vzorcih 24-urnega urina, pri katerih je bil vnos sadja in zelenjave povečan (300-600 g). Prav tako je bila povečana vsebnost skupnih fenolnih spojin v jutranjem urinu, vendar v manjši meri. Ta raziskava potrjuje, da so skupne fenolne spojine izločene v 24-urnem urinu boljši pokazatelj učinkovitosti kot biomarker pri vnosu sadja in zelenjave (Spencer in sod., 2008).

2.4.1 Protimikrobno delovanje

Dokazano je, da naravne fenolne spojine zavirajo rast posameznih bakterij, gliv in virusov (Mukhtar in Ahmad, 2000). Fenolne spojine zavirajo rast bakterij, kot npr. vrst/rodu *Escherichia coli*, *Salmonella* in *Staphylococcus aureus*. Najmanj občutljive na fenolne spojine so kvasovke vrste *Candida albicans*. Rastline ta učinek polifenolnih spojin s pridom uporabljajo. Ugotovili so, da se v okolici poškodbe rastline (opekline, piki žuželk, itd.) poveča koncentracija teh spojin. Močan protiglivični učinek imajo visoke koncentracije flavonoidov, fenolnih kislin in stilbenov. Najmočnejše zavirajo rast bakterij vrste *Helicobacter pylori* polifenoli iz grozdne kože (Karapinar in Sengun, 2007).

Delovanje polifenolov je lahko direktno zaviralno na določene mikroorganizme ali pa delujejo le kot sinergisti in povečajo učinek ostalih konzervansov. Fenolne spojine so zelo reaktivne in hitro tvorijo vezi z drugimi molekulami. Na protimikrobno aktivnost polifenolov vplivajo še prisotnost lipidov, soli, pH in temperatura.

Soli delujejo sinergistično s polifenoli ter tako povečajo njihovo protimikrobno učinkovitost (Davison, 1993).

Polifenoli delujejo neposredno proti virusom in bakterijam, saj pomagajo nevtralizirati proste radikale, kateri uničujejo celice (Bohlmann, 2014).

2.4.2 Vpliv na ožilje

Flavonoidi, kot je kvercetin, lahko ovirajo nastajanje arterioskleroze in pomagajo krepiti žile, ter s tem varujejo pred obolenji srca in ožilja. Razlike v količini zaužitih flavonoidov so morda odgovorne za okoli 25 % razlik pri pojavljanju srčnih obolenj v različnih državah. Tveganje za arteriosklerozo zmanjšajo lahko tudi izoflavoni. Fenolne spojine preprečujejo oksidacijo LDL (low-density lipoproteins), ki je glavni vzrok za poapnenje žil (Milič in sod., 2008).

Polifenoli preprečujejo škodo na ožilju, saj delujejo protivnetno. Ugodno vplivajo na srce in ožilje, saj nekateri pomembni polifenoli izboljšajo pretok krvi. Pomembni viri flavonoidov so vijoličasto obarvane vrste sadja in zelenjave, kot so rdeče zelje, robide, črni ribez, češnje. V orehih, malinah, nekaterih kapusnicah, borovnicah in celih pšeničnih zrnih najdemo fenolne kisline. Med polifenoli je pomemben tudi resveratrol, ki ima pomembne zdravstvene učinke. Najdemo ga v rdečem vinu, saj med proizvodnjo preide iz kožice grozdnih jagod v vino (Bohlmann, 2014).

Flavonoidi so pomembne spojine za zdravje krvnih žil, saj uravnavajo prepustnost in odpornost kapilar, ter omogočajo pretok kisika, ogljikovega dioksida in drugih hranil. Delujejo kot antioksidanti pri preprečevanju oksidacije lipidov z nizko gostoto (LDL) in tvorbi aterosklerotičnih oblog. Preprečujejo tudi prekomerno kopičenje trombocitov v krvi, in s tem preprečujejo strjevanje krvi in poškodbe krvnih žil. Znanstveniki so ugotovili, da dnevno uživanje 4 do 5 skodelic črnega čaja 4 tedne občutno izboljša vazodilatacijo pri posameznikih s koronarno boleznijo (Robles-Sardin in sod., 2010).

Polifenoli ali flavonoidi zmanjšujejo možnosti za nastanek krvnih strdkov in njihovo nalaganje na arterijske stene, ter blažijo razna vnetja. V raziskavi, ki je zajemala 805 moških starejše populacije, je bilo kar 68 % manjše tveganje za srčno-žilne bolezni pri moških, ki so uživali največ polifenolov, kot pri tistih, ki so jih manj. Največ teh polifenolov najdemo v jagodičevju, granatnem jabolku, grozdju, jabolkih, stročnicah, zelju, brokoliu, zeleni, sladkem krompirju, zelenem čaju, oljčnem olju, čokoladi in rdečem vinu (Meredith, 2011).

2.4.3 Kancerogenost

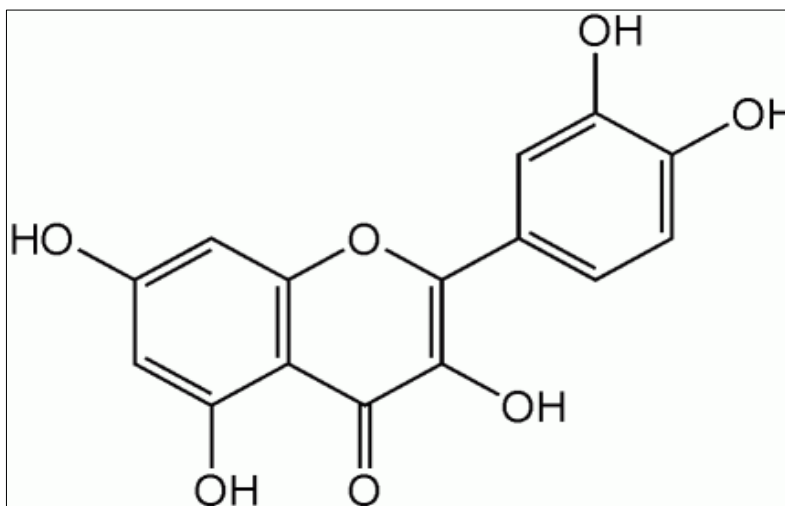
Premajhno uživanje sadja in zelenjave pomembno prispeva k tveganju za pojav raka. Zmanjšanje tega tveganja je, kot nakazujejo raziskave, močneje povezano z uživanjem sadja

in zelenjave kot z jemanjem vlaknin ter antioksidativnih vitaminov. To nakazuje, da tveganje zmanjšujejo druge snovi, npr. fenolne spojine (Milič in sod., 2008).

Človeške celice zaznajo flavonoide kot snovi, ki navadno niso prisotne v telesu. Njihova prisotnost aktivira mehanizem za razstrupljanje, kateri odpravlja tudi mutagene in rakotvorne snovi. Flavonoidi torej posredno lahko pomagajo odpraviti rakotvorne celice in tako zmanjšati tveganje za razvoj rakavih obolenj (Robles-Sardin in sod., 2010). Epidemiološke ugotovitve in laboratorijske študije so pokazale, da v čaju prisotne polifenolne spojine lahko zmanjšajo tveganje za različne bolezni, vključno z rakom (Mukhtar in Ahmad, 2000).

Dokazano je, da kvercetin povzroča v prisotnosti Cu(II) ionov oksidativne poškodbe DNA. Z raziskavami so ugotovili, da je mesto poškodb zelo specifično in enako mestom poškodb, ki jih povzroča H_2O_2 (Dufresne in Farnworth, 2001).

Kvercetin je eden najmočnejših biološko aktivnih članov družine flavonoidov v sadju in zelenjavi. Kvercetin je verjetno najbolj zaslužen za terapevtsko učinkovitost čebule. Le-ta učinkuje na več načinov in je ena najmočnejših protirakavih snovi, ki jih poznamo. Kvercetin preprečuje poškodbe celične DNA in zavira encime, ki pospešujejo rast tumorjev. Kvercetin je tudi protivnetna, antibakterijska, protiglivična in protivirusna učinkovina (Carper, 2008).



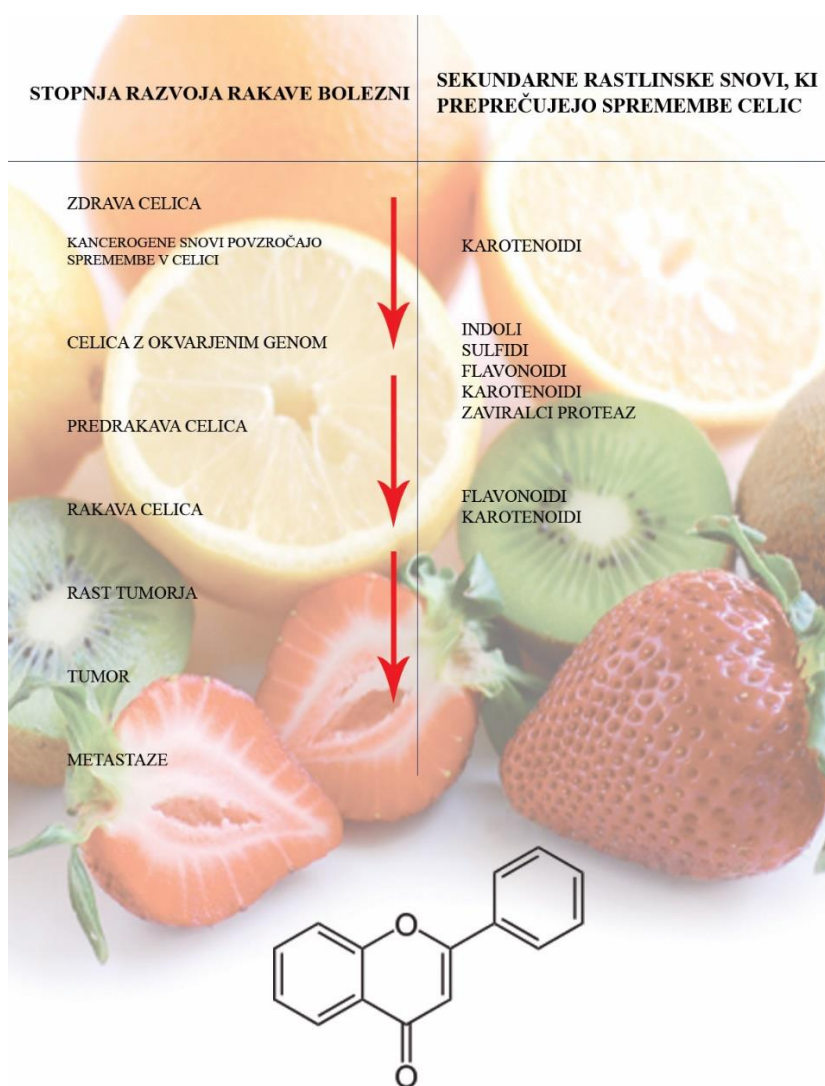
Slika 2: Strukturna formula kvercetina (Song in sod., 2009)

Katehini inducirajo apoptozo v različnih celičnih linijah in tako preprečijo izražanje določenih s tumorjem povezanih genov, kar kaže na to, da so katehini dobri kandidati za preventivna sredstva proti raku (Torres in sod., 2002).

Številni dokazi potrjujejo, da imajo ljudje, ki uživajo več sadja in zelenjave, ki so dober vir fenolov, polovico manjšo možnost za razvoj mnogih vrst raka. V tem primeru največkrat

izpostavljajo rak debelega črevesa, maternice, jajčnikov, dojke, pljučnega raka, požiralnika in ustne votline, želodca, mehurja ter trebušne slinavke (Carper, 2008).

Resveratrol preprečuje vse faze razvoja raka in številne raziskave potrjujejo, da je učinkovit pri večini vrst raka, vključno s pljučnim in kožnim rakom, rakom dojke, prostate in rakom želodca. Prav tako je bilo dokazano, da polifenolne spojine zavirajo metastaze (Pandrey in Rizvi, 2009).



Slika 3: Sekundarne rastlinske snovi, ki preprečujejo spremembe celic (povzeto po Gavez, 2010)

2.5 URIN

Urin je sestavljen iz 96 % vode in 4 % raztopljenih snovi, ki so posledica zaužite hrane ali odpadni produkt organizma. Sečnina ali urea, kot organska spojina predstavlja končne

metabolite dušikovih spojin in s tem polovico vseh snovi v urinu. Sečna kislina in kreatinin, ki sta najpomembnejši sestavini urina, sta iz telesa odstranjena zaradi toksičnosti. Urin nastane s filtracijo, ki poteka skozi glomerulne kapilare. Končni urin pri zdravem človeku vsebuje snovi raztopljene v vodi, ki jih telo ne potrebuje. V urinu prisotni topljenci so ioni (K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , H^+ , Cl^- , HCO_3^- , ...), presnovni produkti, kot so sečna kislina in kreatinin, sečnina, snovi, vnesene s hrano in s pesticidi, ter snovi, ki so lahko posledica jemanja zdravil. Pri zdravem človeku urin vsebuje tudi manjšo količino proteinov, predvsem globulinov (Rupnik, 2005).

Z urinom, ki je bil zbran v določenem času, določimo časovni vzorec urina. Vzorce urina zbiramo v določenem časovnem obdobju zaradi vpliva različnega telesnega napora, biološkega ritma ter vpliva presnove in hidratacije na samo hitrost izločanja (Skitek in Trampuš Bakija, 2001).

Fenolne spojine pri ljudeh se lahko presnavljajo s konjugacijo. Te konjugirane vrste se lahko hitro izločijo z urinom. Splošno konjugirane fenolne spojine obsegajo skupno koncentracijo bio označevalcev v urinu (Guidry in sod., 2015).

V nekaterih študijah so ocenjevali ali skupne fenolne spojine zagotavljajo veljaven biomarker za skupni fenolni vnos. Po podatkih ni bilo skoraj nič literature, ki bi opisovala metodo za določanje SFS (skupnih fenolnih spojin), za ugotavljanje le-teh v kompleksnih matrikah kot je urin, ki ima mnogo motečih substanc (Medina-Remón in sod., 2009).

2.5.1 Kreatinin

Koncentracijo kreatinina določamo zaradi časovne kontrole vzorcev urina pri določeni preiskovanki. S kreatininom izvemo, koliko je urin koncentriran. Njegovo dnevno izločanje pri določeni osebi je konstantno in je odvisno od mišične mase posameznice.

Pri razgradnji proteina kreatina v mišičnem metabolizmu nastane stranski produkt kreatinin. Zato velja, da večji kot je vnos beljakovin, večja je mišična masa in večja je količina kreatinina. Pri športnikih je povečana količina kreatinina normalen pojav. Kreatinin se preko krvi prenaša v ledvice, katere ga večinoma izločijo v urin. Delovanje ledvic torej lahko ocenjujemo z nivojem kreatinina. Njegova količina je sorazmerna celotni mišični masi, katera določa pri posamezniku različne vrednosti plazemske koncentracije kreatinina. Te vrednosti se razlikujejo, saj so odvisne od vsebnosti zaužitih beljakovin v hrani, od starosti in spola posameznika, pa tudi od rase. Vrednosti kreatinina so tako pri starejših osebah nižje, višje pa pri moških za razliko od žensk (Wright in sod., 2001).

Literatura navaja, da je pri določanju SFS v urinu, normaliziranem na kreatinin, pomembna spremenljivka različno delovanje ledvic posameznikov in posledično tudi različno izločanje kreatinina (Zamora-Ros in sod., 2011).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 IZVEDBA POSKUSA IN ZBIRANJE VZORCEV

V raziskavi je sodelovala skupina 10 posameznic (starosti od 24 do 33 let, oz. povprečna starost 28 let), katere so zaužile enake posebej pripravljene obroke tekom petih dni. V prilogi G so prikazani natančnejši podatki njihove starosti, teže in višine. Tekom izvajanja poskusa so posameznice zbirale vzorce urina, katerega smo uporabili za našo analizo. Tekom poskusa je bilo pridobljenih 424 vzorcev urina, odpipetiranega v eppendorfove centrifugirke. Vzorci so bili do časa naše analize shranjeni v hladilni napravi pri -80°C zaradi boljše ohranjenosti.

Posameznice so tekom poskusa morale zbrati celodnevni urin, vendar vsak vzorec posamično. Preglednica 3 prikazuje število vzorcev glede na preiskovanko po posamičnih dnevih. Prvi jutranji urin vsakega dne je vzorec odvzet takoj zjutraj po spanju. 24-urni urin je izračunan na podlagi vseh zaporedno pridobljenih vzorcev preiskovanke v posameznem dnevu. Prostovoljke so transportirale svoje vzorce urina do laboratorija v posebnih zbiralnikih za urin.

Preglednica 3: Število vzorcev glede na preiskovanko po dnevih

Preiskovanka/Dan	Dan 1	Dan 2	Dan 3	Dan 4	Dan 5	vsota
A	9	7	7	7	7	37
B	10	7	8	8	6	39
C	6	6	8	7	9	36
D	5	5	9	5	6	30
E	8	10	10	8	7	43
F	6	8	10	9	12	45
I	7	11	4	3	6	31
J	16	14	11	11	11	63
K	8	9	6	8	8	39
L	8	8	9	10	11	46
vsota	83	85	82	76	83	Skupna vsota=409

Z raziskavo smo želeli določiti skupno količino fenolnih spojin, izmerjenih v urinu, na skupini 10 posameznikov in narediti primerjavo, ter ovrednotiti korelacije med določenimi SFS brez in z ekstrakcijo. Za določanje SFS smo izbrali metodo Folin-Ciocalteu s spektrofotometričnimi meritvami na mikrotitrskih ploščah.

Določili smo korelacijo med količino izločenih fenolnih spojin v 24-urnem urinu in jutranjim urinom, normaliziranim na kreatinin.

3.2 MATERIAL

Raziskava je obsegala analizo skupnih fenolnih spojin v urinu.

3.2.1 Pribor

- Avtomatske in elektronske pipete (Eppendorf, Nemčija)
- Vakuumska črpalka (Büchi, Švica)
- Tehnica (Mettler Toledo, Švica)
- Kolektor za ekstrakcijo na tekoči fazi (Milford, Nemčija)
- Kartuše za ekstrakcijo na tekoči fazi (Water Oasis 3 mL, Milford, U.S.A)
- Kolektor za ekstrakcijo na trdni fazi (Milford, Nemčija)
- Kartuše za ekstrakcijo na trdni fazi (Water Oasis 3 mL, Milford, U.S.A)
- Ultrazvočna kopel
- Mikrotitrne plošče
- MilliQ sistem za čiščenje vode
- Mikrotitrski čitalnik Tecan safire

3.2.2 Reagenti

- Amonijev klorid (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Folin-Ciocalteu reagent (Sigma, Nemčija)
- Galna kislina (Merck, Nemčija)
- Kalcijev klorid (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Kalijev dihidrogenfosfat (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Kalijev klorid (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Kreatinin (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Magnezijev klorid (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Metanol (Merck, Nemčija)
- Mravljinčna kislina (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Natrijev citrat (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Natrijev karbonat (Sigma-Aldrich,)
- Natrijev klorid (Carlo Erba reagents, Italija)
- Natrijev oksalat (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Natrijev sulfat (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Urea (Sigma-Aldrich, Nemčija)

3.3 ANALIZNE METODE

Kemijske analize smo opravili v času od decembra 2011 do marca 2012 na Katedri za tehnologije, prehrano in vino Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

3.3.1 Priprava vzorcev

Najprej smo primerno odtalili vzorce urina (zaradi možne degradacije polifenolov), ki so bili zmrznjeni pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, nato pa še dobro premešali, zaradi prisotne usedline v nekaterih vzorcih.

Ker vzorci urina predstavljajo različna časovna obdobja, so lahko bolj ali manj koncentrirani. Zato smo jih za samo analizo razredčili, da smo lahko izmerili absorbanco v linearnem območju. S pomočjo podatkov o koncentraciji kreatinina, smo vzorce primerno razredčili in sicer z 2-kratno, 5-kratno ali 10-kratno razredčitvijo.

3.3.2 Določanje SFS v urinu s Folin-Ciocalteu metodo

Za določanje skupnih fenolnih spojin (SFS) v urinu sem uporabila modificirano Folin-Ciocalteu (F-C) metodo, opisano v članku Medina-Remón in sod. (2009). F-C kolorimetrija temelji na kemični redukciji F-C reagenta, ki je mešanica volframovih in molibdenovih oksidov. Produkt redukcije kovinskega oksida je modro obarvan kompleks, ki absorbira svetlobo pri 765 nm. Izmerjena absorbanca je premosorazmerna s koncentracijo fenolnih spojin v reakcijski zmesi (Waterhouse, 2002). Ker so v urinu raztopljene snovi, ki motijo detekcijo fenolnih spojin, je v analizo vključena še predhodna ekstrakcija na trdni fazi (SPE). Ta pristop je okolju prijaznejši in enostavnejši, kot pa metoda določanja SFS s tekočinsko kromatografijo ali z masno spektrometrijo (Medina-Remón in sod., 2009). Metoda je enostavna, hitra in omogoča analizo velikega števila vzorcev.

V poskusu smo analizirali urin s predhodno ekstrakcijo na trdni fazi in brez nje po metodi določanja SFS z reagentom Folin-Ciocalteu s spektrofotometričnimi meritvami na mikrotitrskih ploščah z metodo iz članka (Medina-Remón in sod., 2009). Uporabili smo priporočljivo in hitro metodo z uporabo kartuš Water Oasis® HLB in mikrotitrskih plošč s 96 celicami. Prednost teh plošč je, da omogočajo analizo velikega števila vzorcev (v našem primeru 424) v istem času, saj omogočajo spektrofotometrične meritve več vzorcev hkrati.

Ekstrakcija je izraz v kemiji za prenos snovi iz neke trdne ali tekoče zmesi v drugo tekočino. Glede na agregatno stanje začetne zmesi tako razlikujemo ekstrakcijo trdno-tekoče in tekoče-tekoče. Ekstrakcijo pogosto uporabljamo pri izolaciji in čiščenju produktov reakcij (Dolenc, 2013).

Ekstrakcija je sestavljena in dveh zaporednih faz. V prvi združimo zmes s topilom, v drugi pa obe fazi ločimo. Celotni proces razdelimo v tri stopnje, in sicer fazna sprememba pri raztapljanju topljenca, naslednja faza je difuzija topljenca v topilu, ki se nahaja v porah trdnega materiala na površino delca ter zadnja faza, ki je prenos topljenca skozi tekočinski film na površini delca v glavni tok topila (Knez in Škerget, 2009).

Ekstrakcija je zelo pomemben korak za izolacijo, identifikacijo in uporabo fenolnih spojin. Solventna ekstrakcija in ekstrakcija s super kritičnimi tekočinami so najpogostejše uporabljene tehnike za izolacijo fenolov. Predmet številnih raziskovanj na temo pridobivanja in analize polifenolov je najpogostejše osredotočena na rastlinske polifenole, ki jih najdemo v zelenjavi, sadju, vinu, kavi, čaju, zeliščih in v žitih (Ignat in sod., 2011). Metoda, kot je SPE z uporabo trdnega absorbenta, je dobra za pridobivanje flavonoidov (Tsao in McCallum, 2010).

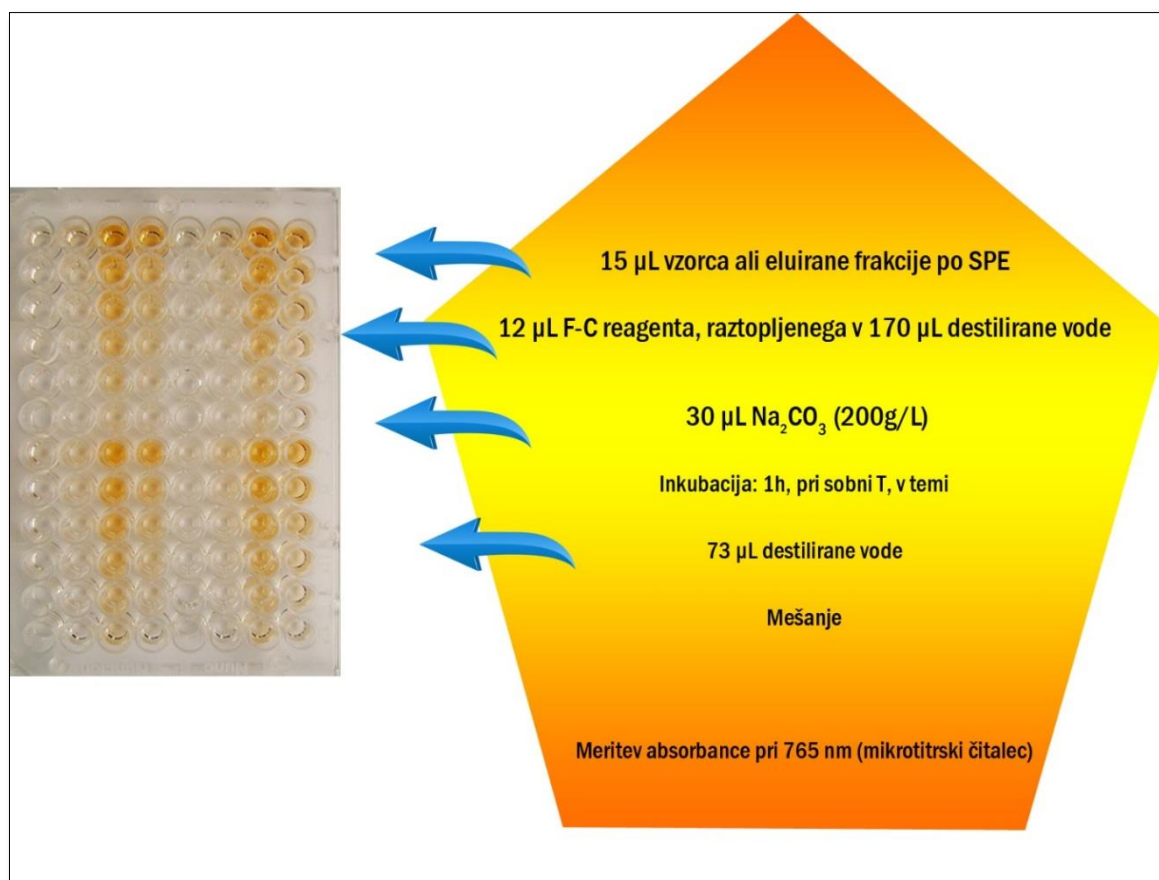
Ekstrakcijo na trdni fazi smo izvedli z uporabo kolektorja za ekstrakcijo, kot je razvidno iz slike 4. Za čiščenje motečih snovi smo uporabili kartuše Water Oasis® HLB 3-mL, ki smo jih namestili na stekleni pokrov kolektorja. Skozi kartuše smo za aktivacijo trdne faze spustili 2 mL 1,5 mol/L mravljinčne kisline in 2 mL vodne metanolne raztopine (95:5 volumskih deležev). Nato smo skozi spustili še 1 mL vzorca, SFS pa smo eluirali z 1 mL metanola, ki je vseboval 1 mL/L mravljinčne kisline. Za ekstrahiranje standardnih raztopin umeritvene krivulje smo uporabili isti postopek.



Slika 4: Prikaz kolektorja za ekstrakcijo na trdni fazi, kartuš za ekstrakcijo in vakuumске črpalke

3.3.3 Modificirana F-C metoda (Medina-Remón in sod., 2009)

Na mikrotitrsko ploščo smo odmerili 15 μL vzorca ali eluirane frakcije pri SPE z 170 μL destilirane vode, dodali 12 μL F-C reagenta in 30 μL natrijevega karbonata. Nato smo to mešanico inkubirali 1 h pri sobni temperaturi ter v temnem prostoru, da je reakcija med F-C reagentom in SFS v vzorcu potekala nemoteno.



Slika 5: Shematski prikaz določanja skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu metodo (Medina-Remón in sod., 2009)

Merjenje absorbance smo izvajali v laboratoriju Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Našim vzorcem na mikrotitrskih ploščah smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 745 nm s pomočjo instrumenta, ki ga imenujemo mikrotitrski čitalnik Tecan safire, kateri je razviden iz slike 6. Mikrotitrške plošče s 96 celicami smo vstavili v aparaturo, katera je z Magellanovim programom numerično podala izmerjene rezultate.



Slika 6: Prikaz mikrotitrskega čitalnika za merjenje absorbance

3.3.4 Priprava sintetičnega urina

Sintetični urin smo uporabili za pripravo slepega vzorca in standardnih raztopin. Po Griffith in sod. (1976) smo uporabili navodila, kjer so pripravili sintetični urin tako, da je vseboval 11 topljencev v koncentracijah, ki se jih običajno najde v 24-urnem urinu povprečnega zdravega človeka. Natehtali smo kemikalije in pripravili raztopino z vsebnostjo določenih kemikalij: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,65 g/L), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,651 g/L), NaCl (4,6 g/L), Na_2SO_4 (0,651 g/L), Na_2 citrat $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,65 g/L), Na_2 oksalat (0,020 g/L), KH_2PO_4 (2,8 g/L), KCl (1,6 g/L), NH_4Cl (1,0 g/L), urea (25 g/L) in kreatinin (1,1 g/L).

3.3.5 Priprava umeritvene krivulje

Z Folin-Ciocalteu metodo za določanje vsebnosti fenolov uporabimo galno kislino kot standard (Ramirez-Sanchez in sod., 2010). Galno kislino smo uporabili za pripravo umeritvene krivulje. Najprej smo pripravili izhodno raztopino tako, da smo natehtali 3 mg galne kisline (300 mg/L) v 10 mL merilno bučko in jo napolnili do oznake s sintetičnim urinom. Iz osnovne raztopine galne kisline smo pripravili z ustreznim razredčevanjem različne koncentracije standardnih raztopin (3, 30, 60, 90, 120, 150 mg/L). Pripraviti je potrebno dve različni umeritveni krivulji.

Za prvo umeritveno krivuljo smo pripravili standardne raztopine, kot je opisano, nato je sledil postopek določanja SFS enak kot za vzorce (slika 5). Standardne raztopine druge umeritvene krivulje smo pa najprej dali na SPE in šele nato določili SFS. Vse vzorce smo preračunali glede na umeritveni krivulji iz prilog A in B.

3.3.6 Določanje kreatinina

Vsak vzorec je bil definiran z volumnom urina (mL) in določeno vsebnostjo kreatinina (mmol/L). Vsak vzorec smo nato normalizirali s koncentracijo kreatinina (mmol/L). Koncentracijo kreatinina so določili po spektrofotometrični metodi z analizo na Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana, Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v Ljubljani. Analizo na kreatinin so določili v vzorcih urina brez ekstrakcije. Koncentracija SFS je odvisna od stopnje razredčitve urina, zato smo uporabili koncentracijo kreatinina za normalizacijo rezultatov.

3.4 OBDELAVA IN UREJANJE PODATKOV

Za obdelavo in urejanje podatkov smo uporabili računalniški program Excel. Uporaba računalniškega programa SPSS pa nam je omogočila statistično urejanje in obdelavo naših podatkov.

Statistična obdelava podatkov je zajemala določanje:

- Aritmetične sredine, ki je seštevek vseh spremenljivk, deljena s številom podatkov. Aritmetična sredina velja za najpogostejše uporabljeno srednjo vrednost.

- Pearsonovega koeficienta korelacije, s katerim smo določili jakost povezave oz. korelacijo. Ta obsega vrednosti na intervalu od -1 do +1. O linearni funkcijski zvezi med spremenljivkami lahko govorimo, ko je Pearsonov koeficient -1 ali 1. Če povezava ni linearna ga ne moremo uporabiti kot mero povezanosti dveh številskih spremenljivk. V literaturi najdemo navedene intervale za določitev povezanosti: 0: ni povezanosti, 0-0,2: neznatna (pozitivna/negativna) povezanost; 0,2-0,4: nizka (šibka) povezanost, 0,4-0,7: srednja (zmerna) povezanost; 0,7-0,9: visoka povezanost; 0,9-1: zelo visoka (močna) povezanost; 1: popolna (funkcijska) povezanost. Pearsonov koeficient se uporablja za natančno mero povezanosti, kjer regresijska premica grafično predstavlja korelacijo (Košmelj, 2007).

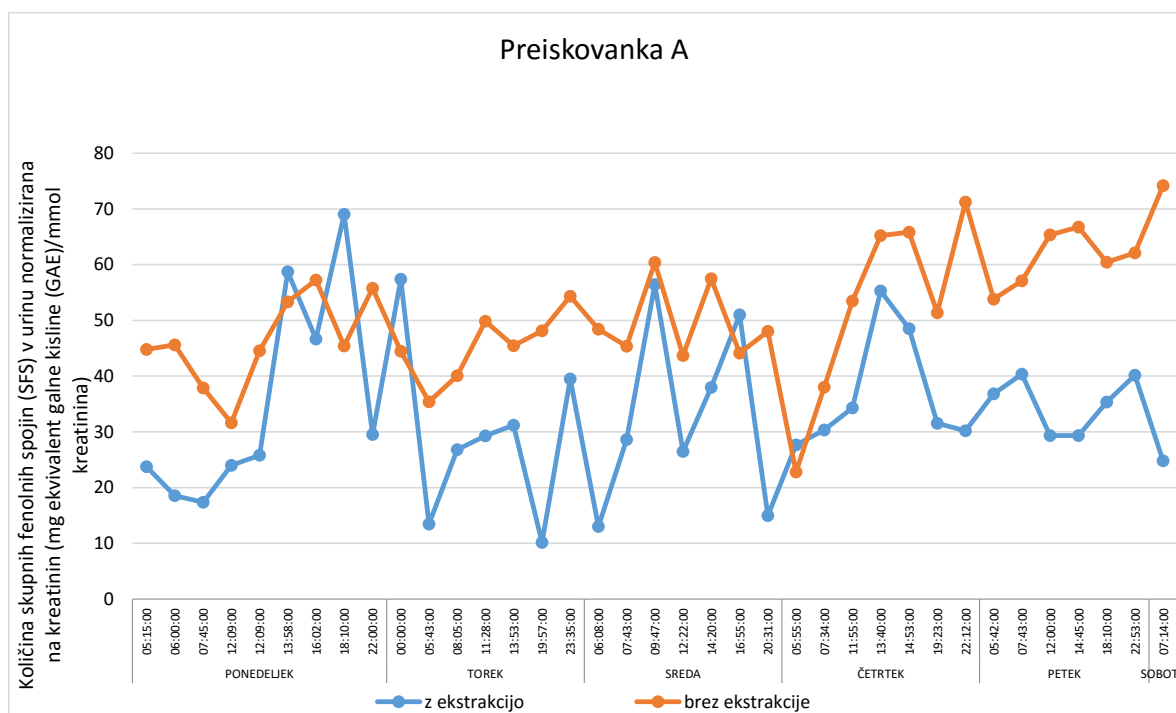
4 REZULTATI

4.1 KOLIČINA IZLOČENIH SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN PRI DESETIH PREISKOVANKAH NORMALIZIRANA NA KREATININ

Količino izločenih SFS, normalizirane na kreatinin, bomo predstavili grafično na slikah od 7 do 16 glede na vsako posameznico. Časovna skala je pri vsaki posameznici individualna, saj njihovega življenjskega stila nismo omejevali in zato se je začel poskus za vsako posameznico ob različni uri prvega dne. Vsi grafi prikazujejo količino izločenih SFS, normaliziranih na kreatinin, določenih v vzorcih po ekstrakciji in brez ekstrakcije na trdni fazi.

Določanje SFS desetih preiskovank smo določili s Folin-Ciocalteu metodo. Vzorce urina smo zbirali 5 zaporednih dni, ter tako pridobili 424 vzorcev. Ker sta posameznici G in H odstopili od poskusa, smo 15 vzorcev izločili pri rezultatih (pri G: N=6, H: N=9), tako da smo v naših rezultatih konkretno uporabili 409 vzorcev, kar je razvidno iz preglednice 3. Določanje SFS desetih preiskovank smo izvedli v vzorcih urina po SPE in brez predhodne SPE. SFS smo določali v štirih paralelkah, en rezultat pa smo izločili in preračunali povprečje ostalih treh. SFS brez in s SPE smo določili s pomočjo umeritvenih krivulj iz priloge, na podlagi katerih je bila izračunana količina SFS v posamičnem vzorcu (N=409), kar je razvidno iz preglednice 3, ki prikazuje število vzorcev glede na preiskovanko po dnevih. Količino izločenih skupnih fenolnih spojin normalizirano na kreatinin smo izrazili v ekvivalentih galne kisline (mg GA/mmol kreatinina).

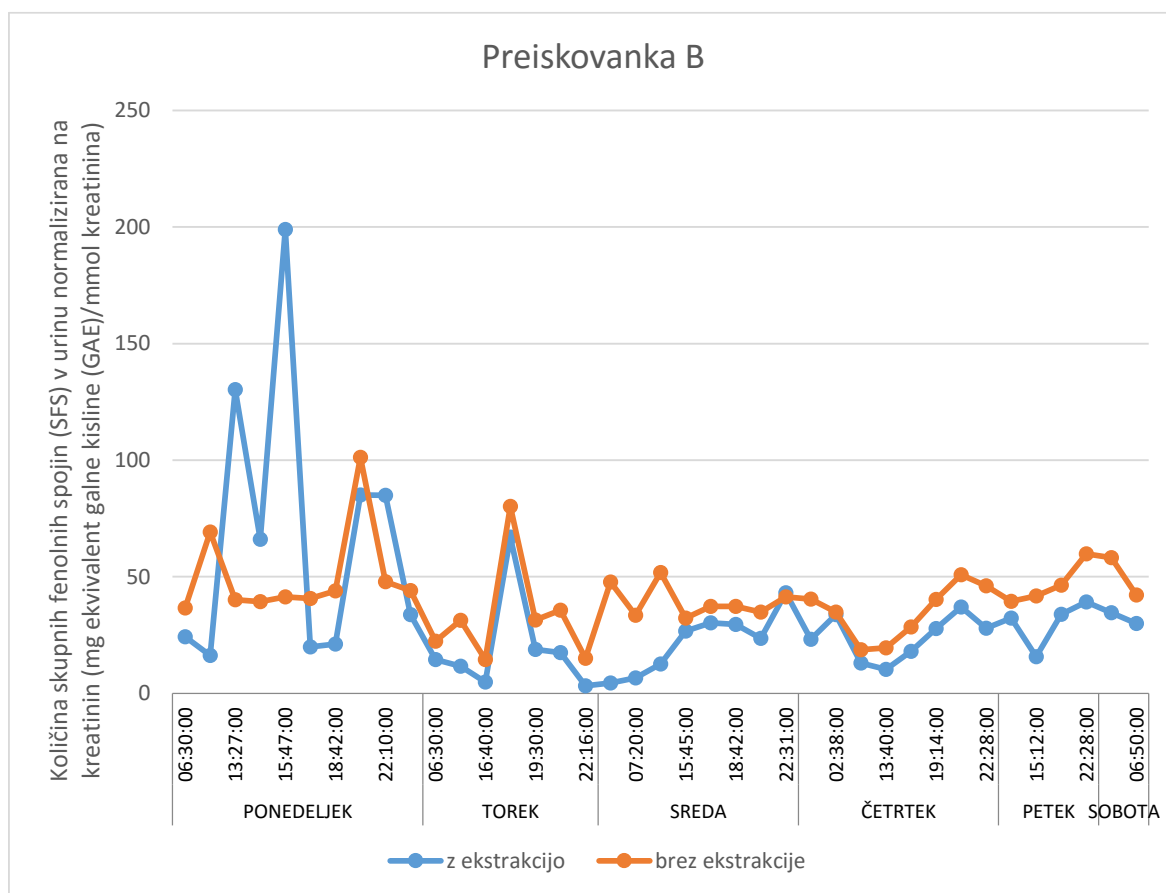
Slika 7 prikazuje količino izločenih SFS pri preiskovanki A, z ekstrakcijo in brez nje. Vrednosti nihajo pri metodi z ekstrakcijo (s SPE) od 10,17 do 69,05 mg GA/mmol kreatinina, povprečna vrednost pri SPE pa znaša 33,60 mg GA/mmol kreatinina. Pri metodi brez ekstrakcije pa pri preiskovanki A znašajo vrednosti koncentracije skupnih fenolnih spojin od 22,81 do 74,18 mg GA/mmol kreatinina; povprečna vrednost pa je 51,05 mg GA/mmol kreatinina.



Slika 7: Količina izločenih skupnih fenolnih spojin normalizirana na kreatinin v ekvivalentih galne kisline (mg GAE/mmol kreatinina) pri preiskovanki A z ekstrakcijo in brez ekstrakcije.

Predstavljeni rezultati kažejo, da je v vseh dneh imela največjo določeno količino izločenih SFS, določenih s SPE, v ponedeljek zvečer okrog 18 ure, najmanjšo pa v torek okrog 20 ure. Pri določanju brez SPE je preiskovanka A dosegla najmanjšo vrednost v četrtek zjutraj, največjo pa v soboto zjutraj. V ponedeljek opazimo nekoliko višjo količino izločenih SFS v vzorcih s SPE kot v vzorcih brez predhodne ekstrakcije.

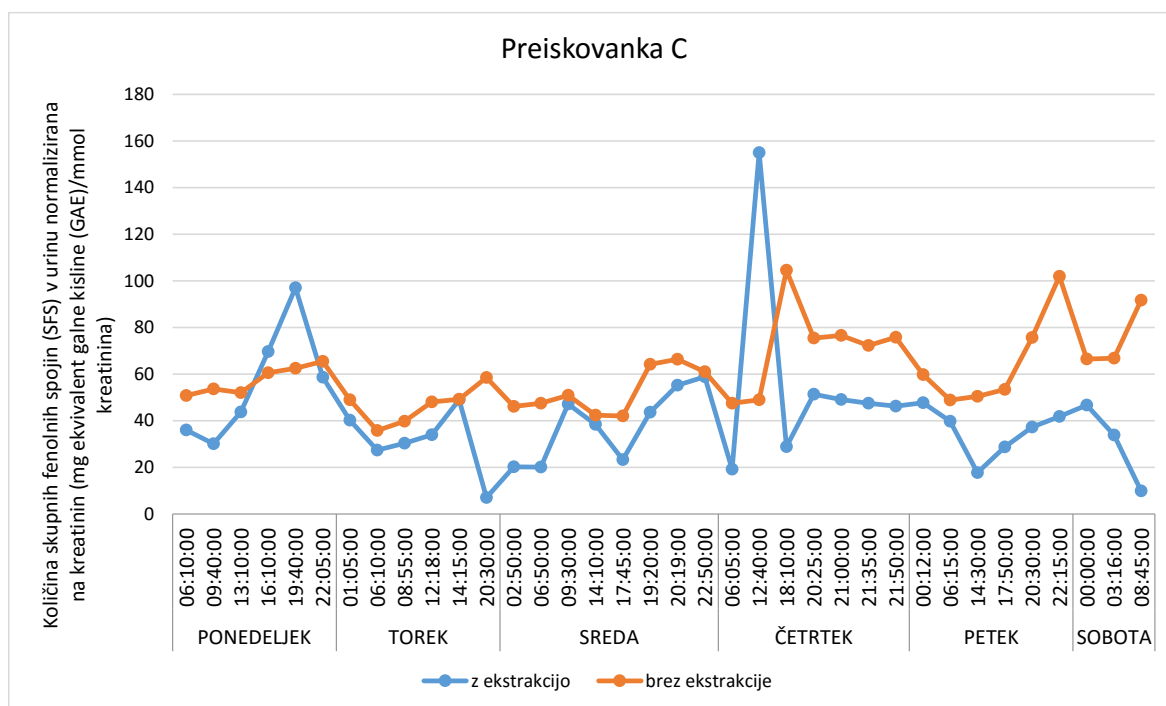
Slika 8 prikazuje količino izločenih SFS v vzorcih z ekstrakcijo in brez pri preiskovanki B. Vrednosti nihajo pri metodi z ekstrakcijo (s SPE) od 3,17 do 198,91 mg GA/mmol kreatinina, povprečna vrednost pri SPE pa znaša 35,18 mg GA/mmol kreatinina. Pri metodi brez ekstrakcije pa pri preiskovanki B znašajo vrednosti koncentracije skupnih fenolnih spojin od 14,43 do 101,27 mg GA/mmol kreatinina; povprečna vrednost pa 41,50 mg GA/mmol kreatinina.



Slika 8: Količina izločenih skupnih fenolnih spojin normalizirana na kreatinin v ekvivalentih galne kisline (mg GAE/mmol kreatinina) pri preiskovanki B z ekstrakcijo in brez ekstrakcije.

Rezultati preiskovanke B kažejo, da je v vseh dneh imela najmanjšo določeno količino izločenih SFS, določenih s SPE, v torek zvečer okrog 22 ure, največjo pa v ponedeljek popoldne. Pri določanju brez SPE je preiskovanka B dosegla najvišjo vrednost v ponedeljek nekaj po 20 uri, najmanjšo pa v torek popoldne. V ponedeljek tekom dneva opazimo nekoliko višjo količino izločenih SFS v vzorcih s SPE kot v vzorcih brez predhodne ekstrakcije.

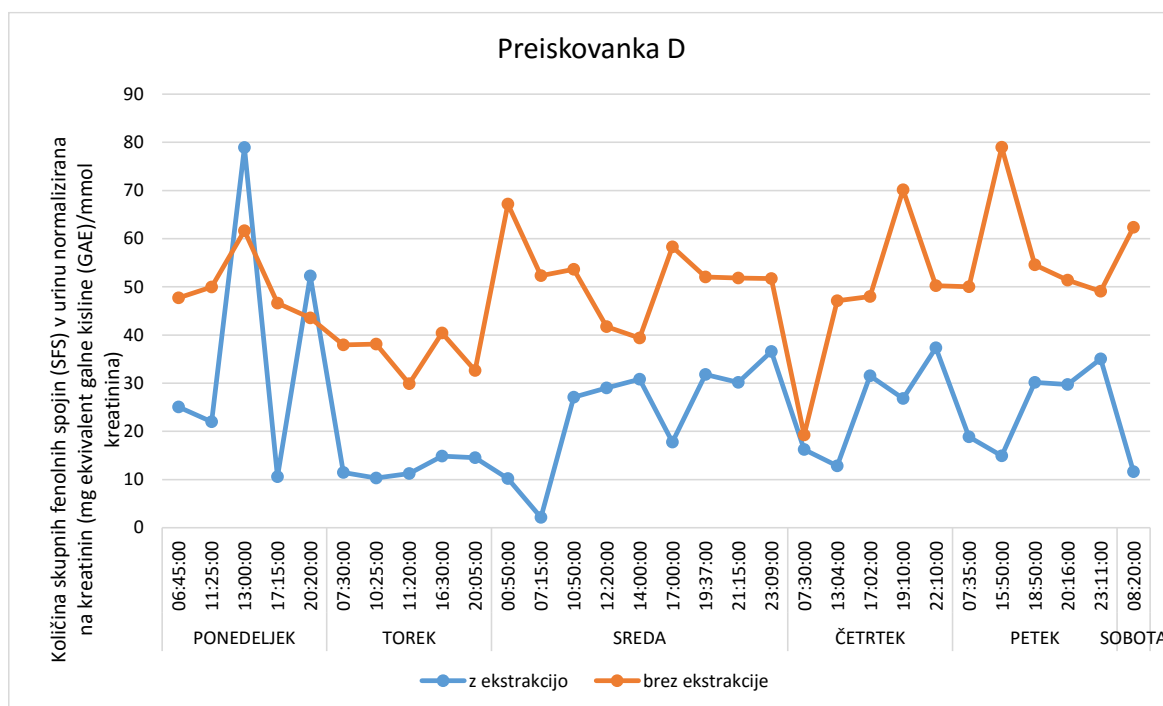
Slika 9 prikazuje količino izločenih SFS pri preiskovanki C z ekstrakcijo in brez nje. Vrednosti nihajo pri metodi z ekstrakcijo (s SPE) od 7,04 do 154,93 mg GA/mmol kreatinina, povprečna vrednost pri SPE pa znaša 42,50 mg GA/mmol kreatinina. Pri metodi brez ekstrakcije pa pri preiskovanki C znašajo vrednosti koncentracije skupnih fenolnih spojin od 35,74 do 104,55 mg GA/mmol kreatinina; povprečna vrednost pa 60,04 mg GA/mmol kreatinina.



Slika 9: Količina izločenih skupnih fenolnih spojin normalizirana na kreatinin v ekvivalentih galne kisline (mg GAE/mmol kreatinina) pri preiskovanki C z ekstrakcijo in brez ekstrakcije.

Najvišjo količino izločenih SFS po določanju s SPE preiskovanka C doseže v četrtek, najmanjšo pa v torek zvečer. Z določanjem brez SPE pa opazimo najmanjšo vrednost v torek zjutraj, največjo pa v četrtek okrog 18 ure. Rezultati preiskovanke C kažejo, da je v ponedeljek popoldne in v četrtek imela nekoliko povišano vrednost SFS v vzorcih s SPE kot v vzorcih brez predhodne ekstrakcije.

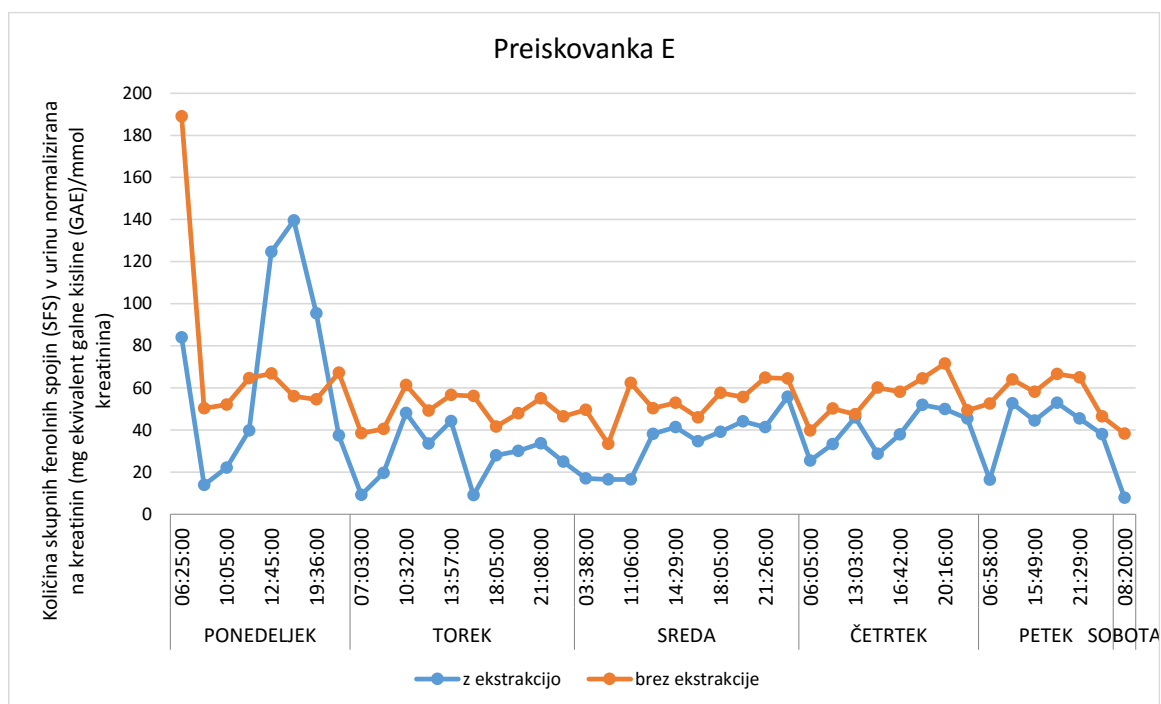
Slika 10 prikazuje količino izločenih SFS pri preiskovanki D v vzorcih z ekstrakcijo in brez nje. Vrednosti nihajo pri metodi z ekstrakcijo (s SPE) od 2,14 do 78,94 mg GA/mmol kreatinina, povprečna vrednost pri SPE pa znaša 24,40 mg GA/mmol kreatinina. Pri metodi brez ekstrakcije pa pri preiskovanki D znašajo vrednosti koncentracije skupnih fenolnih spojin od 19,25 do 78,97 mg GA/mmol kreatinina; povprečna vrednost pa 49,26 mg GA/mmol kreatinina.



Slika 10: Količina izločenih skupnih fenolnih spojin normalizirana na kreatinin v ekvivalentih galne kisline (mg GAE/mmol kreatinina) pri preiskovanki D z ekstrakcijo in brez ekstrakcije.

Predstavljeni rezultati nam sporočajo, da je v vseh dneh imela največjo določeno količino izločenih SFS v vzorcih s SPE v ponedeljek po 13 uri, najmanjšo pa v sredo zjutraj. Pri določanju brez SPE je preiskovanka D dosegla najmanjšo vrednost v četrtek zjutraj, največjo pa v petek popoldne. V ponedeljek opazimo nekoliko višjo količino izločenih SFS v vzorcih s SPE v primerjavi z vzorci brez predhodne ekstrakcije.

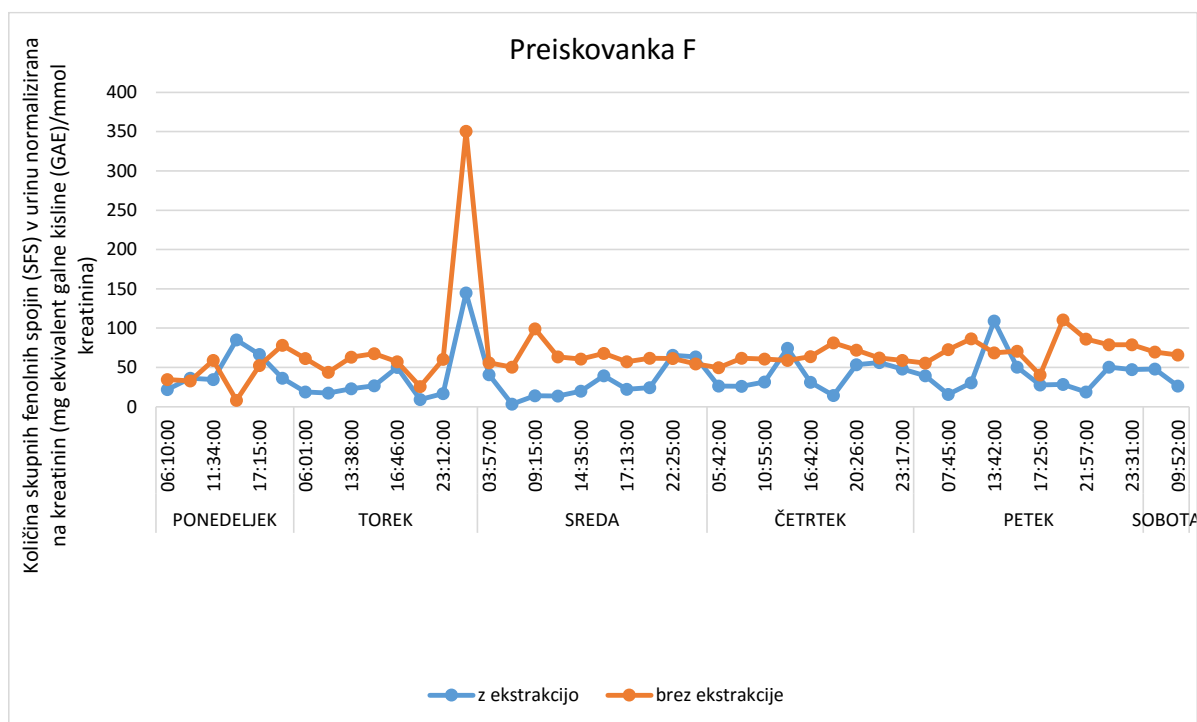
Slika 11 prikazuje količino izločenih SFS pri preiskovanki E v vzorcih z ekstrakcijo in brez nje. Vrednosti nihajo pri metodi z ekstrakcijo (s SPE) od 7,75 do 139,59 mg GA/mmol kreatinina, povprečna vrednost pri SPE pa znaša 40,89 mg GA/mmol kreatinina. Pri metodi brez ekstrakcije pa pri preiskovanki E znašajo vrednosti koncentracije skupnih fenolnih spojin od 33,47 do 189,05 mg GA/mmol kreatinina; povprečna vrednost pa 57,29 mg GA/mmol kreatinina.



Slika 11: Količina izločenih skupnih fenolnih spojin normalizirana na kreatinin v ekvivalentih galne kisline (mg GAE/mmol kreatinina) pri preiskovanki E z ekstrakcijo in brez ekstrakcije.

Rezultati preiskovanke E kažejo, da je v vseh dneh imela najmanjšo določeno količino izločenih SFS, določenih s SPE, v soboto zjutraj, največjo pa v ponedeljek proti večeru. Pri določanju brez SPE je preiskovanka E dosegla najvišjo vrednost v ponedeljek zjutraj, najmanjšo pa v sredo zjutraj. V ponedeljek popoldne opazimo nekoliko višjo količino izločenih SFS v vzorcih s SPE v primerjavi z vzorci brez predhodne ekstrakcije.

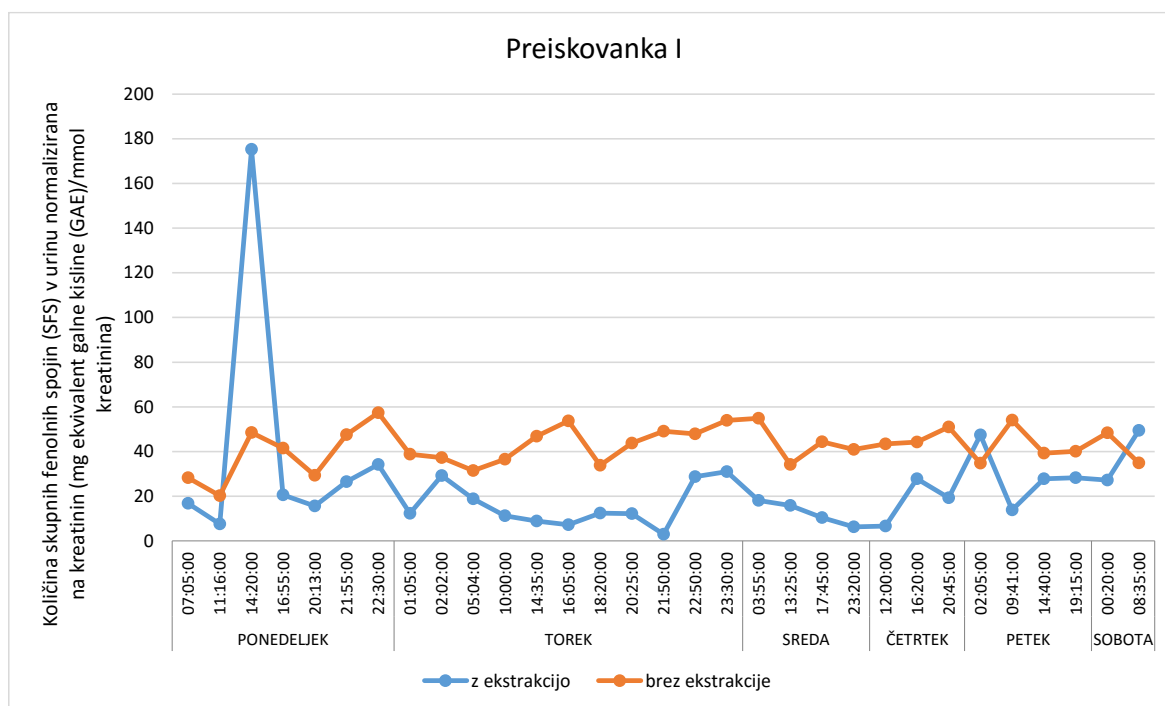
Slika 12 prikazuje količino izločenih SFS pri preiskovanki F v vzorcih z ekstrakcijo in brez nje. Vrednosti nihajo pri metodi z ekstrakcijo (s SPE) od 3,37 do 144,67 mg GA/mmol kreatinina, povprečna vrednost pri SPE pa znaša 38,78 mg GA/mmol kreatinina. Pri metodi brez ekstrakcije pa pri preiskovanki F znašajo vrednosti koncentracije skupnih fenolnih spojin od 7,95 do 350,36 mg GA/mmol kreatinina; povprečna vrednost pa 68,43 mg GA/mmol kreatinina.



Slika 12: Količina izločenih skupnih fenolnih spojin normalizirana na kreatinin v ekvivalentih galne kisline (mg GAE/mmol kreatinina) pri preiskovanki F z ekstrakcijo in brez ekstrakcije.

Iz rezultatov najvišjo količino izločenih SFS po določanju s SPE preiskovanka F doseže v torek pozno zvečer, najmanjšo pa v sredo zgodaj zjutraj. Z določanjem brez SPE pa opazimo najmanjšo vrednost v ponedeljek po 13 uri, največjo pa v torek pozno zvečer. Rezultati preiskovanke E kažejo, da je v ponedeljek in petek popoldne imela malce povišano vrednost SFS v vzorcih s SPE v primerjavi z vzorci brez predhodne ekstrakcije.

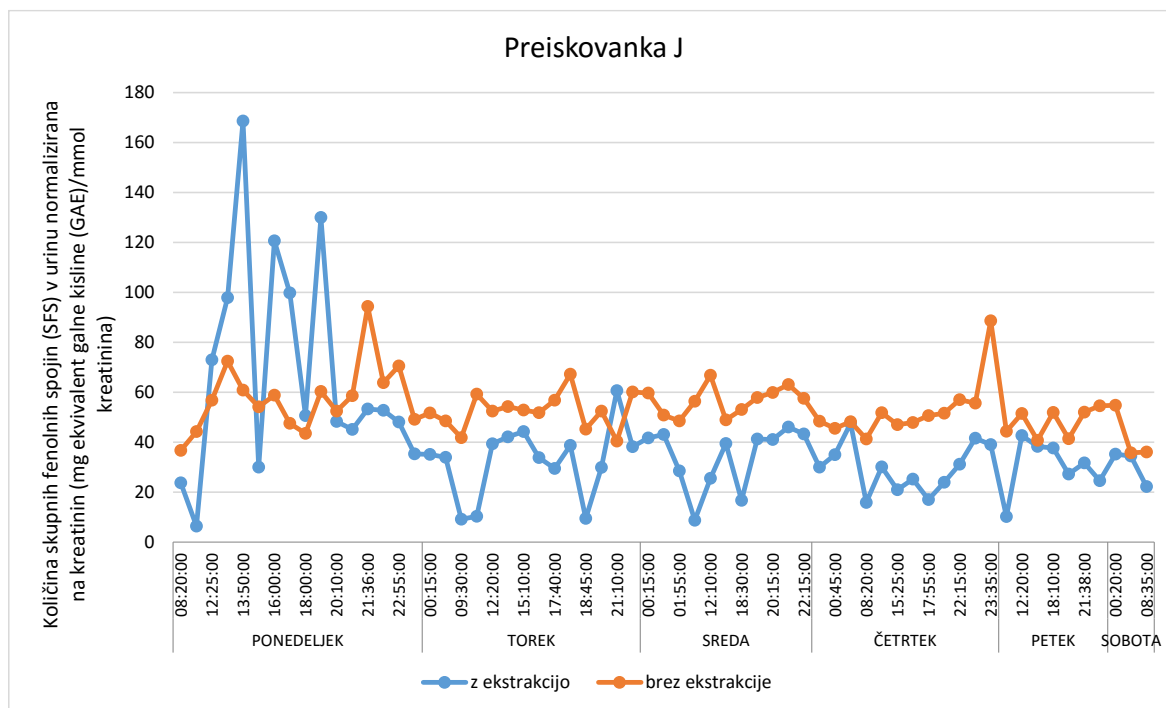
Slika 13 prikazuje količino izločenih SFS pri preiskovanki I v vzorcih z ekstrakcijo in brez nje. Vrednosti nihajo pri metodi z ekstrakcijo (s SPE) od 2,94 do 175,28 mg GA/mmol kreatinina, povprečna vrednost pri SPE pa znaša 24,85 mg GA/mmol kreatinina. Pri metodi brez ekstrakcije pa pri preiskovanki I znašajo vrednosti koncentracije skupnih fenolnih spojin od 20,26 do 57,33 mg GA/mmol kreatinina; povprečna vrednost pa 42,28 mg GA/mmol kreatinina.



Slika 13: Količina izločenih skupnih fenolnih spojin normalizirana na kreatinin v ekvivalentih galne kisline (mg GAE/mmol kreatinina) pri preiskovanki I z ekstrakcijo in brez ekstrakcije.

Predstavljeni rezultati nam sporočajo, da je v vseh dneh imela najmanjšo določeno količino izločenih SFS, določenih s SPE v torek okrog 22 ure, najvišjo pa v ponedeljek po 14 uri. Pri določanju brez SPE je preiskovanka I dosegla najmanjšo vrednost v ponedeljek dopoldne, največjo pa zvečer istega dne. V ponedeljek opazimo bistveno višjo količino izločenih SFS v vzorcih s SPE kot v vzorcih brez predhodne ekstrakcije.

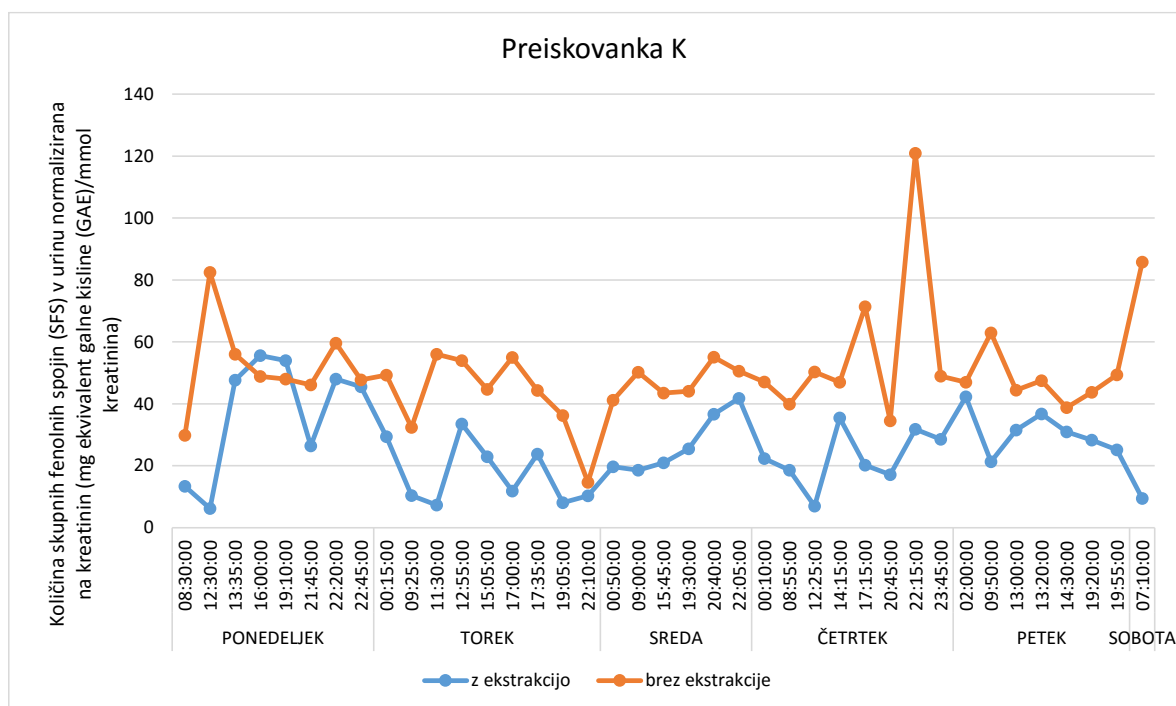
Slika 14 prikazuje količino izločenih SFS pri preiskovanki J v vzorcih z ekstrakcijo in brez nje. Vrednosti nihajo pri metodi z ekstrakcijo (s SPE) od 6,36 do 168,62 mg GA/mmol kreatinina, povprečna vrednost pri SPE pa znaša 40,84 mg GA/mmol kreatinina. Pri metodi brez ekstrakcije pa pri preiskovanki J znašajo vrednosti koncentracije skupnih fenolnih spojin od 35,73 do 94,29 mg GA/mmol kreatinina; povprečna vrednost pa 53,59 mg GA/mmol kreatinina.



Slika 14: Količina izločenih skupnih fenolnih spojin normalizirana na kreatinin v ekvivalentih galne kisline (mg GAE/mmol kreatinina) pri preiskovanki J z ekstrakcijo in brez ekstrakcije.

Rezultati preiskovanke J kažejo, da je v vseh dneh imela najmanjšo določeno količino izločenih SFS, določenih s SPE, v ponedeljek po 11 uri, največjo pa v ponedeljek po 14 uri. Pri določanju brez SPE je preiskovanka J dosegla najvišjo vrednost v ponedeljek zvečer, najmanjšo pa v soboto zjutraj. V ponedeljek tekom dneva opazimo nekoliko višjo količino izločenih SFS v vzorcih s SPE kot v vzorcih brez predhodne ekstrakcije.

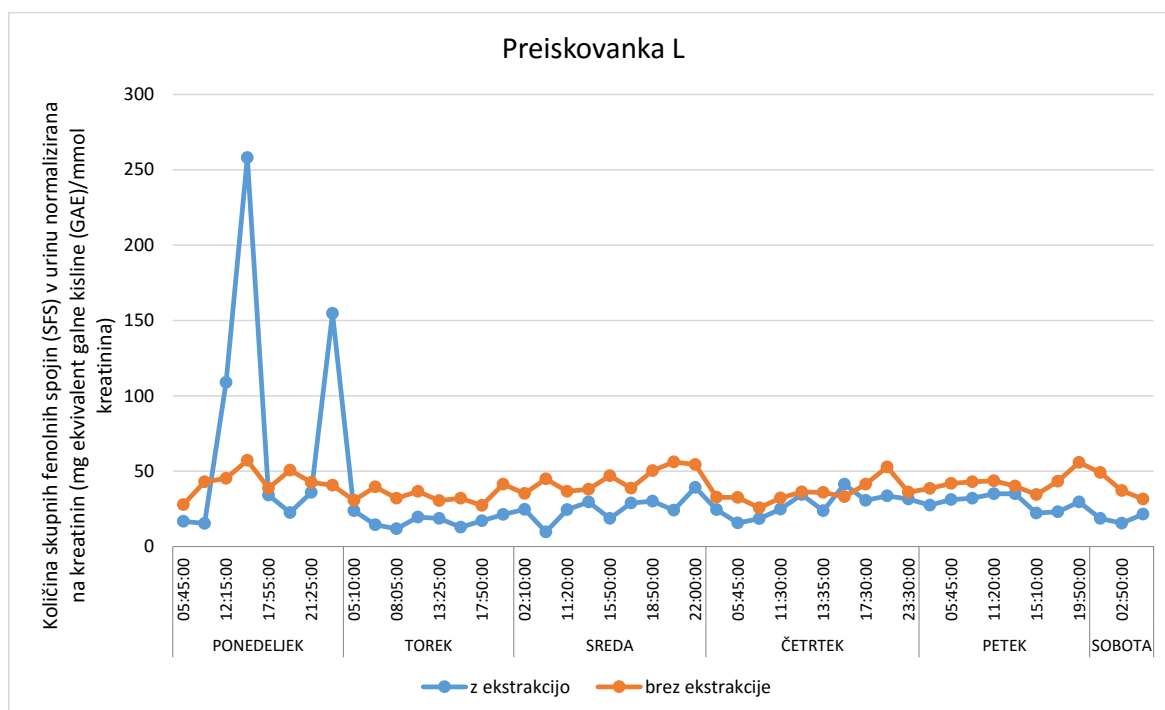
Slika 15 prikazuje količino izločenih SFS pri preiskovanki K v vzorcih z ekstrakcijo in brez nje. Vrednosti nihajo pri metodi z ekstrakcijo (s SPE) od 6,23 do 55,62 mg GA/mmol kreatinina, povprečna vrednost pri SPE pa znaša 26,25 mg GA/mmol kreatinina. Pri metodi brez ekstrakcije pa pri preiskovanki K znašajo vrednosti koncentracije skupnih fenolnih spojin od 14,65 do 120,88 mg GA/mmol kreatinina; povprečna vrednost pa 50,48 mg GA/mmol kreatinina.



Slika 15: Količina izločenih skupnih fenolnih spojin normalizirana na kreatinin v ekvivalentih galne kisline (mg GAE/mmol kreatinina) pri preiskovanki K z ekstrakcijo in brez ekstrakcije.

Iz rezultatov najvišjo količino izločenih SFS po določanju s SPE preiskovanka K doseže v ponedeljek popoldne, najmanjšo pa v ponedeljek po 12 uri. Z določanjem brez SPE pa opazimo najmanjšo vrednost v torek zvečer, največjo pa v četrtek zvečer. Rezultati preiskovanke K v ponedeljek kažejo na rahlo povišanost vrednosti SFS v vzorcih s SPE kot v vzorcih brez predhodne ekstrakcije.

Slika 16 prikazuje količino izločenih SFS pri preiskovanki L v vzorcih z ekstrakcijo in brez nje. Vrednosti nihajo pri metodi z ekstrakcijo (s SPE) od 9,59 do 258,08 mg GA/mmol kreatinina, povprečna vrednost pri SPE pa znaša 34,44 mg GA/mmol kreatinina. Pri metodi brez ekstrakcije pa pri preiskovanki L znašajo vrednosti koncentracije skupnih fenolnih spojin od 25,58 do 57,20 mg GA/mmol kreatinina; povprečna vrednost pa 39,84 mg GA/mmol kreatinina.



Slika 16: Količina izločenih skupnih fenolnih spojin normalizirana na kreatinin v ekvivalentih galne kisline (mg GAE/mmol kreatinina) pri preiskovanki L z ekstrakcijo in brez ekstrakcije.

Predstavljeni rezultati nam sporočajo, da je v vseh dneh imela preiskovanka L najmanjšo določeno količino izločenih SFS, določenih s SPE, v sredo okrog 10 ure, najvišjo pa v ponedeljek po 13 uri. Pri določanju brez SPE je preiskovanka L dosegla najmanjšo vrednost v ponedeljek dopoldne, največjo pa zvečer istega dne. V ponedeljek opazimo bistveno višjo količino izločenih SFS v vzorcih s SPE kot v vzorcih brez predhodne ekstrakcije.

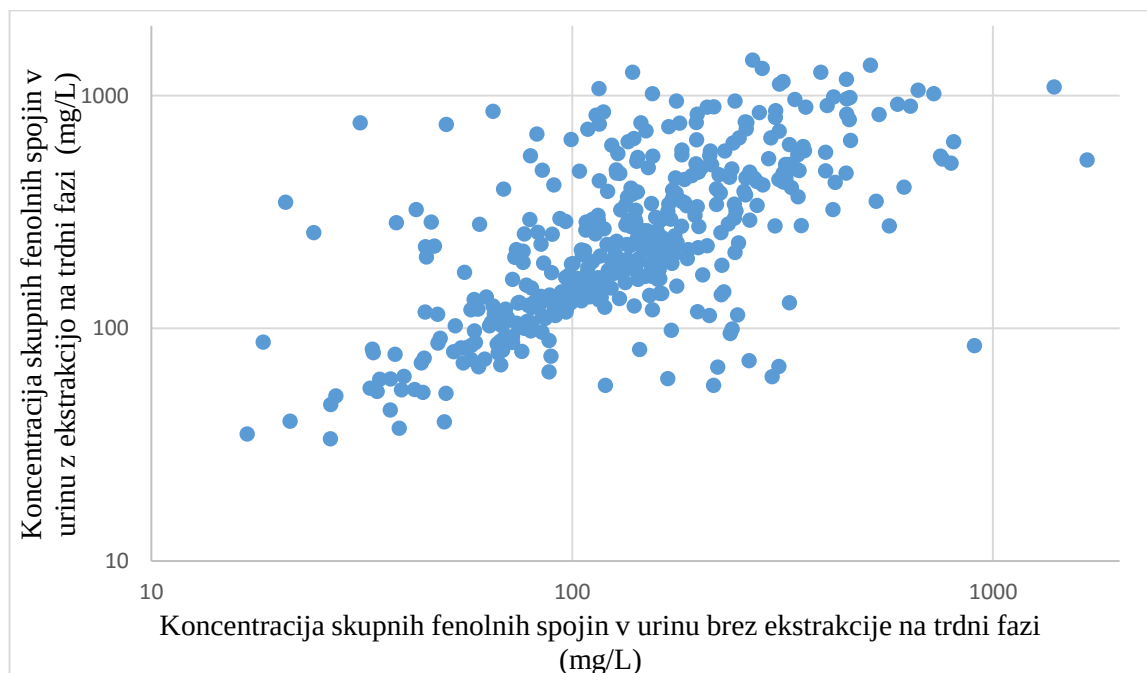
Iz priloge C so razvidni izračunani vsi Pearsonovi koeficienti korelacije za vsako posameznico posebej tekom vseh preiskovanih dni. Ti nam povedo, kakšna je povezanost izločenih SFS, normalizirano na kreatinin med vzorci s SPE in vzorci brez SPE. Pri osebah C, D, I, K znašajo vrednosti koeficienta od 0,010 pri preiskovanki C, 0,064 pri preiskovanki K, 0,130 pri preiskovanki I in 0,164 pri preiskovanki D, kar nam pove, da je povezanost neznatna, vendar pozitivna. Med 0,2 in 0,4 znašajo vrednosti pri osebah A, B, J in L, kar nakazuje na šibko povezanost. Zmerni povezanosti glede na izbrani metodi določanja SFS z ekstrakcijo in brez nje sta se najbolj približali posameznici E in F. V prilogi D pa so prikazani izračunani Pearsonovi koeficienti korelacije za vsak dan posebej. V ponedeljek ($r = 0,169$) in petek ($r = 0,176$) je bila povezanost pozitivna, vendar neznatna. Šibka povezanost se je pojavila v sredo ($r = 0,239$) in četrtek ($r = 0,274$). V torek pa je bila povezanost visoka, kjer je Pearsonov koeficient korelacije znašal $r = 0,771$.

Rezultati količine izločenih skupnih fenolnih spojin, normaliziranih na kreatinin se med posamezniki nekoliko razlikujejo, saj literatura navaja, da se absorpcija in metabolizem polifenolov iz hrane med posamezniki razlikuje (Zamora-Ros in sod., 2011).

Folin-Ciocalteu metoda za določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin je nespecifična, vendar pogosto uporabljena metoda, saj na rezultate vplivajo tudi druge reducirajoče substance. To so substance, kot so npr. nekatere aminokisline, organske kisline, reducirajoči sladkorji in drugi reducenti (Prior in sod., 2005). To je gotovo eden izmed razlogov za različne koncentracije SFS, ki jih določimo s F-C metodo.

4.2 PRIMERJAVA DOLOČENIH VREDNOSTI SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN V URINU Z IN BREZ EKSTRAKCIJE NA TRDNI FAZI

Izbrali smo primerjavo glede na izbrano metodo priprave vzorca, da bi ugotovili, katera metoda je boljša in ali je potrebna predhodna ekstrakcije na trdni fazi pri pripravi vzorca. Za primerjavo med metodama smo obravnavali celotno število izbranih vzorcev, vključno z dvema preiskovankama (preiskovanka G in H), ki sta od poskusa izstopili predčasno (N=424).



Slika 17: Koncentracija skupnih fenolnih spojin v urinu v mg galne kisline/L določenih z ekstrakcijo na trdni fazi (SPE) in brez SPE.

Graf, ki je razviden iz slike 17, je prikazan z logaritemsko skalo, zaradi gostote podatkov ($N=424$). Vrednosti koncentracij skupnih fenolnih spojin v urinu, določenih v vzorcih z ekstrakcijo na trdi fazi, se gibljejo od 16,87 mg GA/L do 1673,26 mg GA/L, povprečna vrednost pa znaša 176,36 mg GA/L. Vrednosti koncentracij SFS brez ekstrakcije pa se gibljejo med 33,60 mg GA/L in 1421,39 mg GA/L, vrednost povprečja pa znaša 320,82 mg GA/L.

Ugotovili smo, da nam določen Pearsonov koeficient korelacije, ki znaša 0,505, pove zmerno (srednjo) povezanost med izbranimi metodama priprave vzorca (Košmelj, 2007). Določen Pearsonov koeficient korelacije nam v naši raziskavi poda zelo dobro povezanost glede na ogromno število podatkov, ki v našem poskusu obsega 424 vzorcev.

Zamora-Ros in sodelavci trdijo, da je F-C metoda z ekstrakcijo na trdni fazi hitro in dobro merilo za določanje celotne vsebnosti polifenolov (Zamora-Ros in sod., 2011).

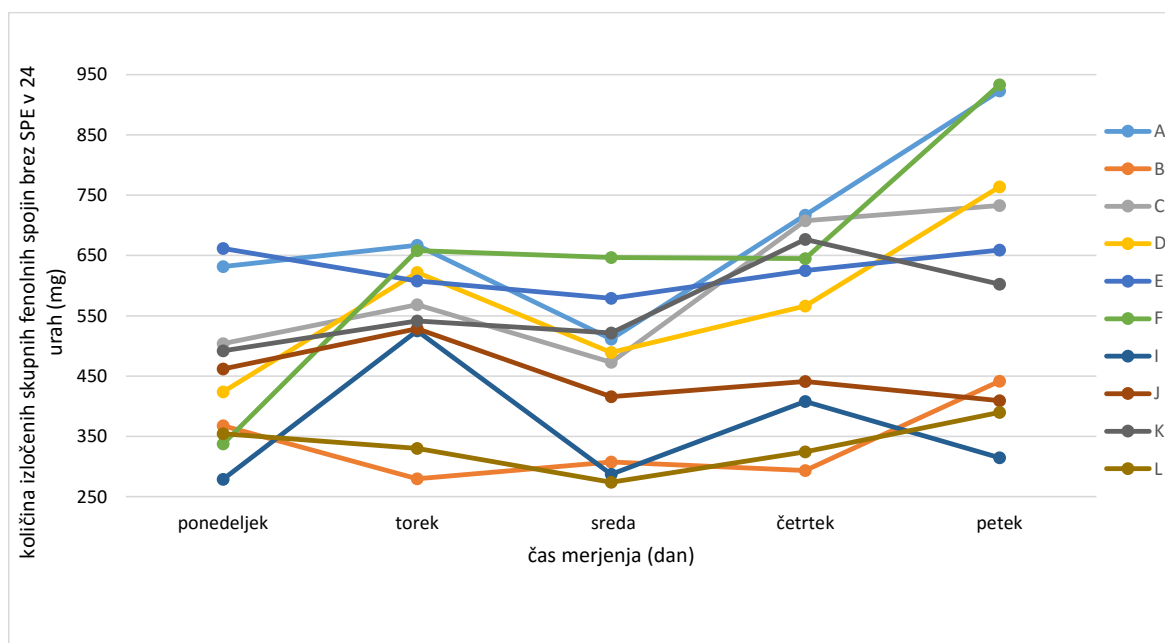
Koncentracije SFS s SPE so, kot smo predvidevali, nižje od koncentracij določenih brez SPE.

Vrednosti določenih SFS, normalizirane na kreatinin, katere smo določili z ekstrakcijo na trdni fazi, so načeloma manjše, kot tiste brez ekstrakcije. Razlike v vrednosti med določenimi SFS z in brez ekstrakcije vsak dan se pojavijo zaradi določenih motečih spojin (aminokisline, organske kisline, reducirajoči sladkorji in drugi reducenti), ki se poleg polifenolov pojavijo v urinu. Pri metodi določanja SFS brez ekstrakcije na trdni fazi so te spojine prisotne in reagirajo z F-C reagentom, kar daje "lažno" previsok rezultat.

4.3 IZRAČUNANA KOLIČINA IZLOČENIH SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN PRI DESETIH PREISKOVANKAH V 24-URNEM URINU

V naši raziskavi nas je zanimala količina izločenih SFS v 24 urah (v enem dnevu), pri čemer so preiskovanke uživale iste obroke tekom preiskovalnih dni. Ker imamo deset preiskovank in pet dni je $N=50$.

Maso izločenih SFS (mg) v 24 urah smo izračunali tako, da smo koncentracije z upoštevanom razredčitvijo vzorca (mg/L) pomnožili z volumnom posamičnega vzorca (mL) in maso izločenih SFS posameznih vzorcev sešteli. Vsote smo narisali po dnevih glede na posameznico ter glede na metodo brez SPE (slika 18) in s SPE (slika 19).



Slika 18: Količina dnevno izločenih skupnih fenolnih spojin v mg GA pri desetih preiskovankah določenih brez ekstrakcije na trdni fazi (brez SPE).

Vrednosti količin izločenih skupnih fenolnih spojin v 24-urnem urinu (mg) brez ekstrakcije pri preiskovankah glede na dan se zelo razlikujejo med seboj. Najnižje vrednosti znašajo 273,85 mg pri preiskovanki L, najvišje vrednosti pa 933,07 mg pri preiskovanki F za vse dni.

V ponedeljek znašajo izločene vrednosti preiskovank od 278,65 mg do 661,68 mg. Izračunali smo še povprečno vrednost izločenih SFS za ponedeljek, ki znaša 451,26 mg z standardno deviacijo (SD) 125,29 mg. V tem območju povprečja so vse preiskovanke, razen preiskovanke I, ki odstopa z 278,64 mg, preiskovanke A (631,66 mg) in preiskovanke E (661,69 mg).

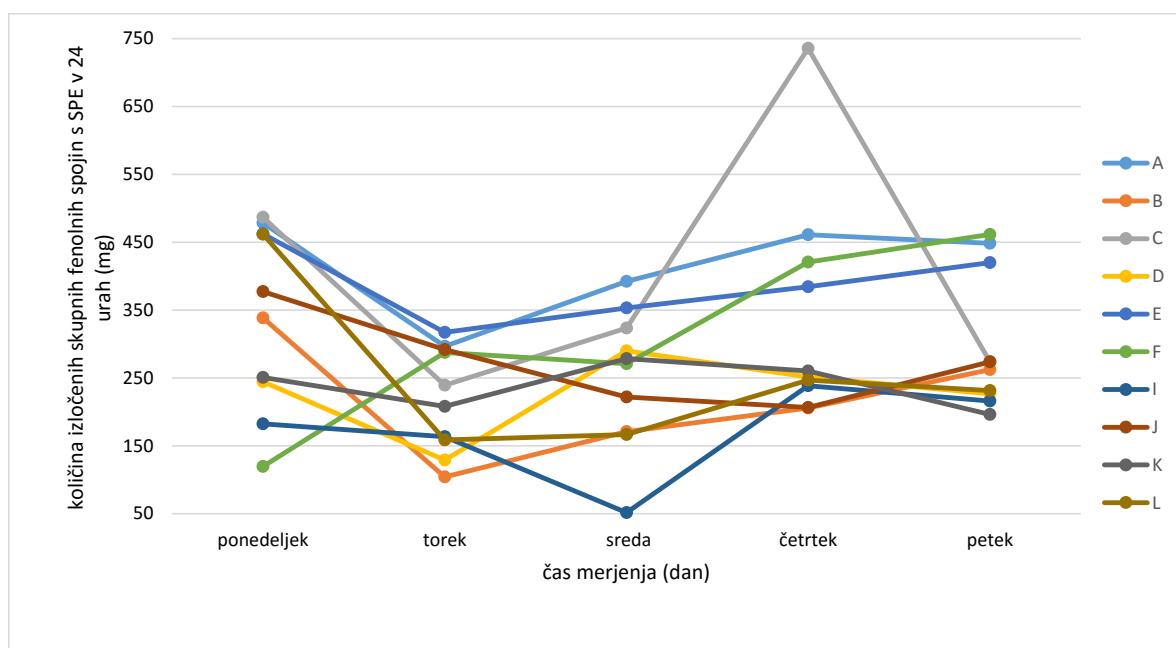
V torek je povprečje izločenih SFS 532,81 mg s SD 130,71 mg, vrednosti izločenih SFS so v območju od 279,86 mg do 666,97 mg. V torek najbolj odstopata od povprečja preiskovanki B (279,86 mg) in L (329,99 mg) ter preiskovanka A (666,97 mg).

Količina izločenih SFS v sredo je od 273,85 mg do 646,71 mg s povprečno vrednostjo 450,56 mg in SD 127,08 mg. Najbolj odstopajo preiskovanke B (307,51 mg), I (287,17 mg), L (273,85 mg) ter E (579,17 mg) in F (646,71 mg).

V četrtek se vrednosti izločenih SFS gibljejo od 293,33 mg do 717,11 mg. Povprečje za ta dan znaša 540,42 mg s SD 160,43 mg. Najbolj odstopata preiskovanki A (717,11 mg) in C (707,83 mg), ter preiskovanki B (293,33 mg) in L (324,47 mg).

V petek pa je najvišja količina izločenih SFS 933,07 mg, najnižja pa 314,38 mg. Povprečje izločenih SFS vseh preiskovank pa znaša 616,92 mg s SD 223,08 mg. Vse preiskovanke se gibljejo v omenjenem območju, razen preiskovanke I, kjer znaša količina izločenih SFS 314,38 mg, ter preiskovank A (922,89 mg) in F (933,07 mg), katerih količina je nekoliko višja.

Prvi dan je v urinu brez SPE najmanjša količina izločenih SFS pri preiskovanki I, največja pa pri preiskovanki E. V torek znaša največja vrednost izločenih SFS pri preiskovanki A, najmanjša pa pri preiskovanki B. Tretji dan dosega najmanjšo izločeno vrednost SFS preiskovanka L, največjo pa preiskovanka F. V četrtek pa je preiskovanka A izločila največ SFS, najmanj pa preiskovanka B. Zadnji dan pa dosega najmanjšo vrednost izločenih SFS preiskovanka I, največjo pa preiskovanka F. Iz rezultatov lahko razberemo, da je preiskovanka A dosegla največjo količino izločenih SFS v 24-urnem urinu v torek in četrtek, za razliko od preiskovanke B, ki je ta dva dneva izločila najmanjšo količino. Tudi preiskovanka F je dosegla največje količine v dveh dnevih, v sredo in petek, medtem ko je preiskovanka I v petek in ponedeljek dosegla najnižjo vrednost.



Slika 19: Količina dnevno izločenih skupnih fenolnih spojin v mg GA pri desetih preiskovankah določenih z ekstrakcijo na trdni fazi (s SPE).

Vrednosti količin izločenih skupnih fenolnih spojin v 24-urnem urinu (mg) z ekstrakcijo na trdi fazi (s SPE) pri preiskovankah glede na dan se zelo razlikujejo med seboj.

Najnižje vrednosti znašajo 51,41 mg pri preiskovanki I, najvišje vrednosti pa 735,92 mg pri preiskovanki C za vse dni. V ponedeljek znašajo izločene vrednosti preiskovank od 119,54 mg do 486,73 mg. Izračunali smo še povprečno vrednost izločenih SFS za ponedeljek, ki znaša 340,16 mg s SD 134,32 mg. V tem območju povprečja so vse preiskovanke, razen preiskovank A (478,57 mg), C (486,73 mg), ki odstopata, ter F (119,54 mg) in I (182,39 mg).

V torek je povprečje izločenih SFS 532,81 mg s SD 130,71 mg, vrednosti izločenih SFS pa so v območju od 279,86 mg do 666,97 mg. V torek odstopata preiskovanki B (104,16 mg) in D (129,05 mg), ter preiskovanka E (317,07 mg). Povprečje pa znaša 219,54 mg s SD 77,60 mg.

Količina izločenih SFS v sredo je od 51,41 mg do 392,22 mg. Najbolj odstopa preiskovanka I (51,41 mg) in preiskovanka A (392,22 mg). Povprečna vrednost znaša 251,81 mg s SD 101,40 mg.

V četrtek se vrednosti izločenih SFS gibljejo od 205,55 mg do 735,92 mg. Povprečje za ta dan znaša 341,14 mg s SD 166,33 mg. Odstopa samo preiskovanka C z 735,92 mg izločenih SFS.

V petek pa je najvišja količina izločenih SFS 461,26 mg, najnižja pa 196,03 mg. Povprečje izločenih SFS vseh preiskovank pa znaša 300,91 mg 101,71 mg. Odstopajo preiskovanke A (448,25 mg), E (419,83 mg), F (461,26 mg), ter preiskovanka K z najnižjo izločeno količino SFS, ki znaša 196,03 mg.

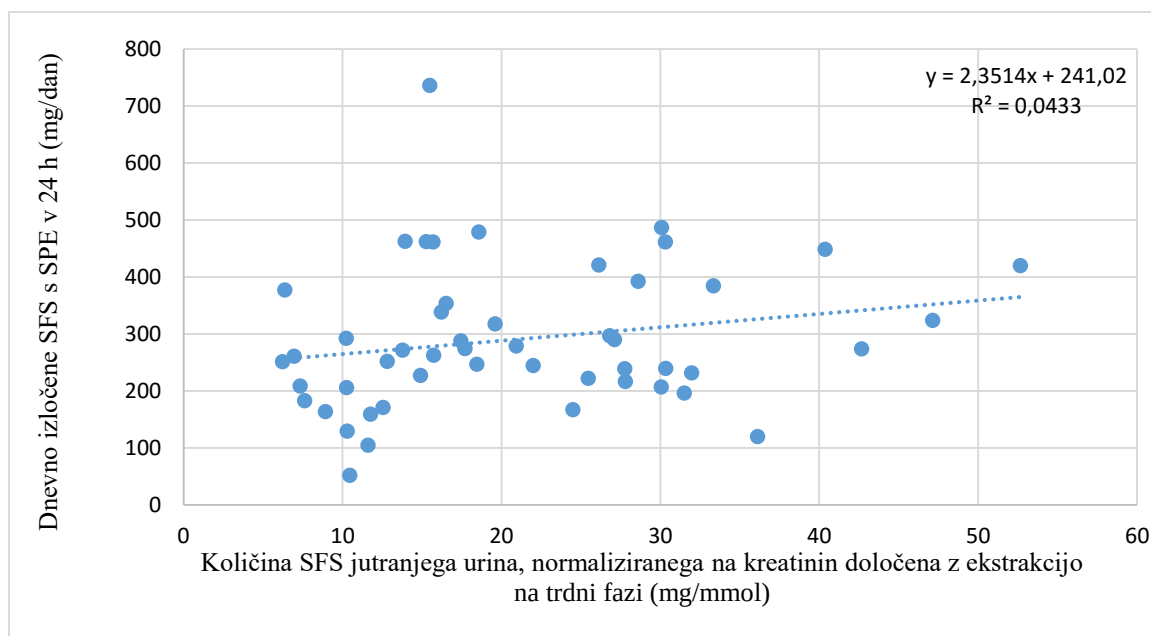
Pri uporabi ekstrakcije na trdni fazi za določanje SFS smo v ponedeljek opazili največjo količino izločenih SFS pri preiskovanki C, najmanjšo pa pri preiskovanki F. Naslednji dan je najmanjša vrednost znašala pri preiskovanki B, največja pa pri E. V sredo je preiskovanka A izločila največ SFS za razliko od preiskovanke I, ki je ta dan izločila najmanj SFS. Preiskovanka B je v četrtek dosegla najmanjšo vrednost, preiskovanka C pa najvišjo. Zadnji dan pa je največ izločenih SFS bilo določenih pri preiskovanki F, najmanj pa pri preiskovanki K. Iz rezultatov je razvidno, da je preiskovanka F dosegla največ izločenih SFS v petek, najmanj pa v ponedeljek.

Študije navajajo, da je 24-urni urin najbolj zanesljiv in neinvaziven biološki material za določanje SFS. Kot navajajo mnoge epidemiološke študije je zbiranje 24-urnega urina za preiskovanje oteženo in nepraktično (Zamora-Ros in sod., 2011).

Da bo prišlo do razlik v vrednosti količin dnevno izločenih SFS smo predvidevali, zaradi različnega izločanja in resorpcije SFS, kar je posledica različnega metabolizma in fiziološkega stanja posameznic, čeprav so zaužile enake obroke.

4.4 PRIMERJAVA KOLIČINE IZLOČENIH SKUPNIH FENOLNIH SNOVI IZRAČUNANIH V 24-URNEM URINU IN JUTRANJEM URINU NORMALIZIRANEM NA KREATININ

Primerjali smo izračunane posamezne dnevne količine izločenih skupnih fenolnih spojin v mg s koncentracijo skupnih fenolnih spojin jutranjega urina, normaliziranega na kreatinin v mg/mmol, v vzorcih s SPE in brez SPE za vse naše preiskovanke. Določili smo korelacijo med njima z določitvijo Pearsonovega koeficienta korelacije. Na sliki 20 je prikazana zveza med koncentracijo SFS v jutranjem urinu, normalizirano na kreatinin (mg/mmol) s količino dnevno izločenih skupnih fenolnih spojin (mg) za vseh pet dni v vzorcih s SPE za vseh deset posameznic. Slika 21 prikazuje isto primerjavo, vendar v vzorcih brez ekstrakcije na trdni fazi.



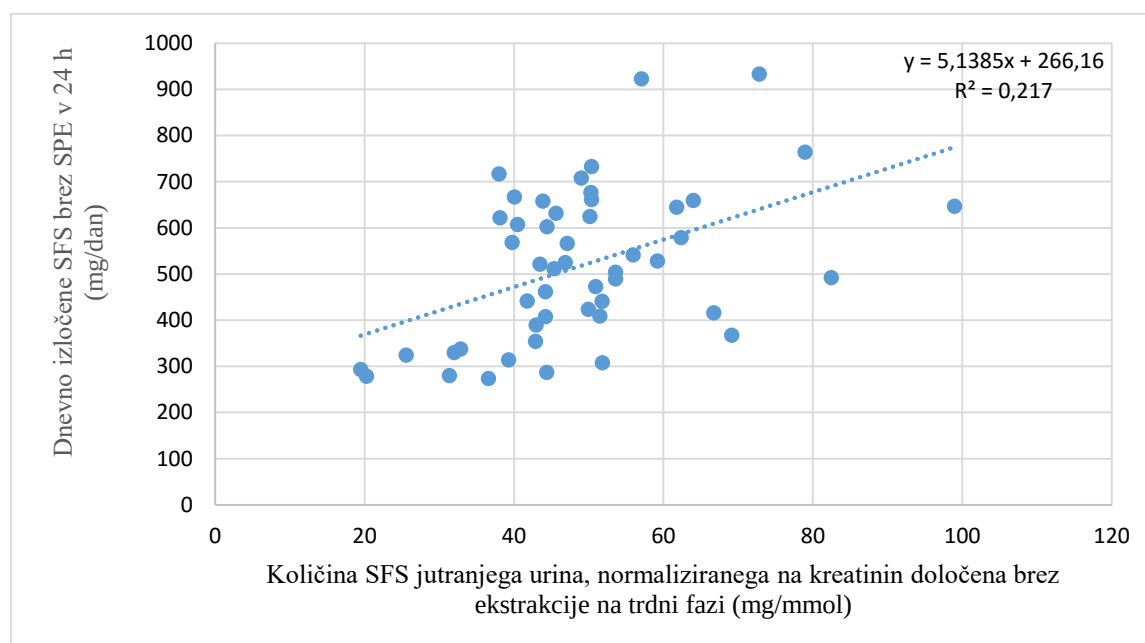
Slika 20: Korelacija med dnevno izločeno količino skupnih fenolnih spojin (mg) in količino SFS jutranjega urina, normalizirano na kreatinin (mg/mmol) v vzorcih z ekstrakcijo na trdni fazi za vse posameznice.

Preglednica 4: Pearsonovi koeficienti korelacije pri korelaciji med dnevno izločeno količino skupnih fenolnih spojin (mg) in količino SFS jutranjega urina, normaliziranega na kreatinin (mg/mmol) v vzorcih z ekstrakcijo na trdni fazi (za vse posameznice)

	Količina izločenih SFS z ekstrakcijo na trdni fazi	Količina izločenih SFS brez ekstrakcije na trdni fazi
Korelacija med dnevno izločeno količino skupnih fenolnih spojin (mg) in količino SFS jutranjega urina, normaliziranega na kreatinin (mg/mmol)	$r = 0,21$	$r = 0,47^{**}$

** statistično značilno ($P < 0,01$)

Ugotovili smo, da med koncentracijo SFS jutranjega urina, normaliziranega na kreatinin in količino SFS, izločenih v 24-ih urah v vzorcih s SPE, obstoja neznačilna povezanost (preglednica 4). Za to zvezo podatkov smo določili Pearsonov koeficient korelacije, ki je znašal 0,21. Ta podatek nam pove, da je povezanost nizka (Košmelj, 2007).



Slika 21: Korelacija med dnevno izločeno količino skupnih fenolnih spojin (mg) in količino SFS jutranjega urina, normaliziranega na kreatinin (mg/mmol) določena brez ekstrakcije na trdni fazi (za vse posameznice)

Slika 21 prikazuje statistično značilno visoko povezanost ($p < 0,01$) med koncentracijo SFS jutranjega urina normaliziranega na kreatinin in količino SFS izločenih v 24-ih urah pri določanju brez SPE. Za to zvezo smo določili Pearsonov koeficient korelacije, ki je znašal 0,47 (preglednica 4). Ta podatek nam pove, da je povezanost zmerna (Košmelj, 2007).

Na podlagi izračunanih Pearsonovih koeficientov korelacije (priloga E) za vsako posameznico pri določanju SFS brez ekstrakcije, smo pri osebah C, J in K določili negativen koeficient, kar pomeni, da povezanosti ni. Pri preiskovanki E opazimo pozitivno povezanost, vendar neznatno (koeficient korelacije znaša 0,046). Med 0,4 in 0,7 se gibljejo vrednosti koeficienta pri osebah A, B, D, F, I in L, kar pomeni, da imajo te preiskovanke srednjo povezanost. Visoki in popolni povezanosti se ni približala nobena posameznica. V prilogi F smo določili tudi Pearsonove koeficiente korelacije za vsak dan posebej. V nobenem dnevu nismo določili neznatne povezanosti. V ponedeljek in torek je bila povezanost nizka, saj znašata $r = 0,35$ za ponedeljek in $r = 0,38$ za torek. Zmerni povezanosti smo določili v sredo ($r = 0,64$) in četrtek ($r = 0,67$). V petek pa je bil Pearsonov koeficient korelacije $r = 0,74$, kateri nam pove, da je bila ta dan visoka povezanost.

Literatura navaja, da je najboljši način za ocenjevanje 24-h urin. Ker pa je postopek zbiranja 24-urnega urina težko izvedljiv, časovno zamuden in drag, največkrat v raziskavah uporabljamo urin, ki je normaliziran na kreatinin. Zamora-Ros in sodelavci so ocenjevali korelacijo med zaužitimi polifenoli in skupnimi polifenoli v urinu, ki je zajemal 24-urni urin in urin, normaliziran na kreatinin. Študija je zajemala 928 udeležencev. V obeh primerih so ugotovili statistično povezanost ($r = 0,580$) in korelacijski koeficient ($r = 0,722$) med izločenimi skupnimi fenolnimi spojinami tako v 24-urnem kot v urinu, normaliziranem na kreatinin. Iz študije sklepamo, da je 24-urni urin bolj sprejemljiv za določanje SFS, kot urin, normaliziran na kreatinin (Zamora-Ros in sod., 2011).

Zamora-Ros in sod. so ugotovili, da je količina SFS v 24-urnem urinu in urinu, normaliziranem na kreatinin, v tesni povezanosti ($r = 0,580$, $p < 0,001$). Ker je delni koeficient korelacije znašal ($r = 0,722$), potrjujejo, da tudi spol, starost, telesna aktivnost, vnos energije in delovanje ledvic vplivajo na rezultate.

V tej študiji so opazili pomembno povezanost med SFS v 24-urnem urinu in urinu, normaliziranem na kreatinin v populaciji starejših ljudi. Prav tako so ugotovili statistično povezavo obeh načinov merjenja SFS s dejanskim vnosom polifenolov. Najboljša korelacija je po pričakovanjih bila med SFS v 24-urnem urinu in vnosom zaužitih polifenolov (Zamora-Ros in sod., 2011).

Mennen in sod. (2008) so v študiji hoteli oceniti, če lahko zaznamo polifenole in njihove metabolite v urinu populacije in če je ta povezana s tistimi, ki so jih opazili v 24-h urinu, ki velja za potencialno uporaben biomarker za polifenolni vnos. Relativno izločanje polifenolov je odvisno od vnosa in njihove biorazpoložljivosti in koncentracijskih vrednosti v 24-urnem urinu. Rezultati te študije kažejo na dobro korelacijo med izmerjenimi polifenoli v vzorcu in v celodnevem zbranem urinu.

S tem navajajo možnost uporabe vzorca urina na samem mestu, kot pokazatelja vnosa polifenolov. Edini polifenol, za katerega niso našli povezave med koncentracijo, merjeno v vzorcih na samem mestu in 24-urnem urinu, je kavna kislina, kar pomeni, da ni primeren biomarker. Ugotovili so, da so izmerjeni polifenoli, kot so klorogenska kislina, kumarna

kislina, galna kislina, kvercetin, izoramnetin, kamferol, hesperetin, narigenin, enterolakton in enterodiol dober in potencialno uporaben biomarker za določanje polifenolnega vnosa (Mennen in sod., 2008).

Pri določanju 24-urnega urina je oteženo samo zbiranje urina, tako časovno kot volumsko. S tem pride do večjih napak pri preiskavah. Samo zbiranje je neprijazno do preiskovanca, saj mora skladiščenje potekati v hladilniku in transport volumsko dokaj obsežnega vzorca ni prijeten. Hoteli smo ugotoviti, če bi lahko samo jutranji urin, ki je lažje pridobljen, bil dober biomarker za določanje SFS. Za preiskave bi bil lažje dostopen, kot na primer urin, ki ga oddamo pri zdravniških preiskavah. Jutranji urin predstavlja največji del dneva, saj preiskovanec ponoči počiva. Vendar iz naše raziskave jutranji urin ne predstavlja najboljšega vzorčnega primera (t.i. »spot« urin) za določanje SFS. Ker imamo malo preiskovank (samo 10) in samo $N=50$ podatkov lahko trdimo, da bi bil pri raziskavi z večjim številom preiskovancev Pearsonov koeficient v obeh primerih večji in povezanost višja. V raziskavi lahko samo komentiramo opažanja, ne moremo pa posploševati rezultatov poskusa zaradi omejenega trajanja in majhnega števila posameznic. Če bi hoteli dobiti bolj natančne rezultate analize, bi ta morala obsegati širši krog preiskovancev s poskusom, ki bi bil sistematično boljše sestavljen.

Energijski vnos hrane, telesna dejavnost in indeks telesne mase (ITM) so statistično povezani s kreatininom v urinu. Ker je kreatinin stranski produkt mišičnega katabolizma smatramo, da je njegova proizvodnja odvisna od vzorca živil, telesne sestave in gibanja. Vse spremenljivke, razen indeksa telesne mase (ITM) so izboljšale korelacijo od 0,580 do 0,722 med obema urinskima določitvama skupnih fenolnih spojin. Namen študije je bil oceniti, ali sta obe metodi merjenja (tako 24-h urina, kot urina, normaliziranega na kreatinin) dobra biomarkerja za določanje celotnega vnosa polifenolov. Ugotovili so, da obstoja korelacija $r=0,211$; $p < 0,001$ med določenimi SFS v volumnu 24-h urina, izraženimi kot mg GAE/g kreatinina in celotnim vnosom polifenolov. Vendar zveza med SFS v mg GAE/g kreatinina in skupnim vnosom polifenolov ni bila statistično značilna. Te razlike se pojavijo zaradi variabilnosti pri izločanju kreatinina, spola, telesne aktivnosti, starosti, prehrane in ledvične funkcije (Zamora-Ros in sod., 2011).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Namen raziskave je bil določitev skupnih fenolnih spojin izmerjenih v urinu na skupini 10 posameznikov. Ugotavljali smo primerjavo in določili korelacijo med določenimi SFS v vzorcih urina z SPE in brez ekstrakcije. Za določanje SFS smo uporabili metodo Folin-Ciocalteu s spektrofotometričnimi meritvami na mikrotitrskih ploščah s pomočjo mikrotitrskega čitalnika. Določili smo tudi korelacijo med količino izločenih fenolnih spojin v 24-urnem urinu in jutranjem urinu, normaliziranim na kreatinin. Preiskovanke ženskega spola so uživale iste obroke in zbirale urin pet dni.

Literatura navaja, da so podatki o izločenih SFS z uporabo F-C metode med posamezniki lahko precej različni, zaradi vpliva motečih snovi (kot so žveplov dioksid, sladkor, aromatični amini, askorbinska kislina, organske kisline, Fe(II)), katere lahko reagirajo z F-C reagentom (Zamora-Ros in sod., 2011).

Polifenoli so pomembni za naše zdravje, saj ugodno vplivajo nanj in nas ščitijo pred boleznimi. So eden od temeljev zdrave prehrane, ker varujejo naše telo pred oksidativnim stresom in prostimi radikali. Težko je ovrednotiti prehrano oz. količino zaužitih fenolnih spojin preko analiz zaužite hrane, zato je smotrna uporaba metod za analizo SFS v telesnih tekočinah kot biomarkerjev zaužitih SFS.

Naša raziskava je obsegala skupino desetih preiskovank, katerih povprečna starost je 28 let. Tekom raziskave so preiskovanke zaužile na fakulteti pripravljene obroke po točno določenem meniju, med obroki pa so lahko pile samo vodo. Raziskava je potekala pet dni. Posameznice so pridobljene vzorce urina dostavljale na fakulteto, kjer so bili ustrezno skladiščeni v večjem številu paralelk.

Za prikaz korelacije med količino SFS v 24-urnem urinu in količine SFS jutranjega urina, normaliziranega na kreatinin, smo uporabili računalniški statistični program SPSS, ki nam je podal Pearsonov koeficient korelacije. Vrednost le tega pokaže za vzorce urina brez ekstrakcije na trdni fazi zmerno povezanost, pri določanju s SPE pa nizko povezanost.

Medina-Remón in sod. (2009) so analizirali SFS v jutranjem urinu, normaliziranim na kreatinin in ugotavljali korelacijo med izločenimi SFS in vnosom sadja in zelenjave. Navedli so, da obstoja pozitivna korelacija med zaužitim polifenoli iz sadja in zelenjave in izločenimi SFS.

Ugotovili so, da je koncentracija v urinu pri posamezniku odvisna od starosti, rase, prehrane in spola (Wright in sod., 2001), katere študijo lahko primerjamo z našimi podatki in ugotovitvami.

Namen naše raziskave je bil, da z določanjem Pearsonovega koeficienta korelacije med SFS v 24-urnem urinu in SFS jutranjem urinu, normaliziranim na kreatinin ugotovimo, če lahko s poznavanjem vrednosti ene spremenljivke določimo drugo.

Ker pa smo pri preverjanju korelacije pri določanju brez SPE in s SPE ugotovili nizke in zmerne povezanosti, pri tako malem številu preiskovank ne moremo zagotoviti vrednosti ene spremenljivke, s katero bi določili drugo. Do napak pride lahko tudi zaradi oteženega zbiranja celodnevne urina, transporta in skladiščenja.

Vrednosti določenih količin SFS, normalizirano na kreatinin, ki smo jih določili v vzorcih z ekstrakcijo na trdni fazi, so načeloma manjše, kot tiste brez ekstrakcije, le v ponedeljek so pri vseh preiskovankah višje; glede na to, da se skozi kartušo prečistijo snovi, je edina možna razlaga, da je prišlo pri prvih vzorcev do napake pri meritvah.

5.2 SKLEPI

Predstavljeni rezultati nam podajo naslednje sklepe:

- Zavrnili smo hipotezo, da obstoja močna povezanost med količino skupnih fenolnih spojin v 24-urnem urinu in količino SFS v jutranjem urinu, normaliziranim na kreatinin.
- Potrdili smo hipotezo, da se količina SFS izločenih v 24-h urinu med posameznici statistično razlikuje, čeprav so zaužile isti obrok.
- Koncentracije SFS v vzorcih urina z ekstrakcijo na trdni fazi so, kot smo predvidevali, nižje od koncentracij v vzorcih urina brez SPE.
- Ugotovili smo zmerno povezanost med določenimi SFS v vzorcih urina brez in z ekstrakcijo.

V diplomskem delu smo ugotovili, da je urin primeren biomarker za določanje skupnih fenolnih spojin zahteven in kompleksen za določanje SFS. Če bi hoteli natančneje določiti SFS, bi morali poskus ponoviti in imeti večje število preiskovancev, da bi bili rezultati bolj optimalni.

6 POVZETEK

Rezultati naše raziskave so pokazali, da, čeprav so posameznice uživale iste obroke, obstoja med njimi zelo velika razlika v določenih skupnih fenolnih spojinah v urinu.

Epidemiološke študije nakazujejo na obratno povezavo med tveganjem za infarkt in porabo hrane, bogate z fenolnimi spojinami, kot so vino, sadje in zelenjava. Jasno povezavo so našli med tveganjem za pojav rakavih obolenj in uživanjem hrane bogate s fenolnimi spojinami. Biološka vzorca, kot sta kri in urin, imata velik pomen pri izdelavi natančnih ocen zaužitja polifenolov, čeprav je njihovo razmerje pogosto zelo zapleteno. Urin se šteje kot dober prehranski pokazatelj, saj so SFS v urinu v dobri povezanosti z vnosom polifenolov (Medina-Remón in sod., 2009).

Skupne fenolne spojine smo določili z modificirano Folin-Ciocalteu metodo, ki so jo objavili Medina-Remón in sod. (2009). Namen naše raziskave je bil določitev skupnih fenolnih spojin v urinu brez in z ekstrakcijo na trdni fazi.

V diplomski nalogi smo zavrnilo hipotezo povezanosti med količino SFS v 24-urnem in količino SFS v jutranjem urinu, normaliziranem na kreatinin pri vzorcih z ekstrakcijo na trdni fazi. Pri določanju korelacije med količino SFS v 24-urnem in količino SFS v jutranjem urinu, normaliziranem na kreatinin pri vzorcih brez ekstrakcije na trdni fazi pa se je izkazalo, da obstoja statistično značilna korelacija; dokazali smo zmerno povezanost, kjer Pearsonov koeficient korelacije znaša 0,47.

V okviru naloge smo dokazali, da se količina izločenih SFS razlikuje med posameznici, čeprav so tekom raziskave uživale iste obroke. Razlike v vrednosti SFS med posameznici so posledica različnega fiziološkega stanja, ter absorpcije in izločanja SFS v telesu.

Fitokemične snovi so bioaktivne snovi v rastlinski hrani, ki jih človeško telo ne more proizvajati samo. Zato flavonoidi, ki jih najdemo v zelenjavi, sadju semenih, vinu, pivu, zelenem in črnem čaju ter sojinah napitkih, pozitivno vplivajo na zdravje z njihovo antioksidativno učinkovitostjo. Vendar je učinkovitost prehranskih flavonoidov odvisna od njihovega metabolizma in absorpcije (Robles-Sardin in sod., 2010).

7 VIRI

- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32
- Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. Farmacevski vestnik, 48: 573-589
- Bohlmann F., Ullmann M. 2014. Hrana kot zdravilo: 140 živil za boljše zdravje. Kranj, Založba Narava: 52-52
- Boone L. 2014. Hranljiva rastlinska superhrana: najboljša prehrana za optimalno zdravje, energijo in izgubo kilogramov. Ljubljana, Založba BP: 7-7
- Carper J. 2008. Hrana-čudežno zdravilo. Del 3., S prehrano proti raku. Ljubljana, Arkadija: 76 str.
- Cheynier V., Moutounet M. 1992. Oxidative reactions of caffeic acid in model systems containing polyphenol oxidase. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40: 2038-2004
- Davison P.M. 1993. Parabens and phenolic compounds. V: Antimicrobials in food. Davison P.M., Branen A.L. (eds.). 2nd ed. New York, M. Dekker: 263-306
- Dolenc D. 2013. Praktikum iz organske kemije. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo. Medvode, Pleško: 70-70
- Dufresne C. J., Farnworth E. R. 2001. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. Journal of Nutritional Biochemistry, 12: 404-421
- Gavez G. 2010. Premagani sovražnik: biološko zdravljenje raka. Ljubljana, Založba Modrijan, d.o.o.: 246 str.
- Griffith D. P., Musher D. M., Itin C. 1976. Urease, the primary cause of infection included urinary stones. Investigative Urology, 13: 346-350
- Guidry V. T., Longnecker M. P., Aase H., Eggesbø M., Zeiner P., Reichborn-Kjennerud T., Knudsen G. P., Bertelsen R. J., Ye X., Calafat A. M., Engel S. M. 2015. Measurement of total and free urinary phenol and paraben concentrations over the course of pregnancy: assessing reliability and contamination of specimens in the norwegian mother and child cohort study Virginia. Environmental Health Perspectives, 123, 7: 705-711
- Gutteridge J. M., Halliwell B. 2010. Antioxidants: molecules, medicines, and myths. Biochemical and Biophysical Research Communications, 393: 561-564

- Ignat I., Volf I., Popa V. I. 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126: 1821-1835
- Joseph M.A., Lloyd W.R. 2004. Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health. *Phytochemistry*, 65, 9: 1199-1221
- Kač M. 2000. Oksidacija. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-10
- Karapinar M., Sengun I. Y. 2007. Antimicrobial effect of koruk (unripe grape - *Vitis vinifera*) juice against *Salmonella Typhimurium* on salad vegetables. *Food Control*, 18, 6: 702-706
- Knez Ž., Škerget M. 2009. Termodifuzijski separacijski procesi. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru: 292 str.
- Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-22
- Košmelj K. 2007. Uporabna statistika (elektronski vir). 2. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 239 str.
http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2721/Uporabna_statistika_okt_2007/Uporabna_statistika_01.pdf (10.5.2016)
- Marston A., Hostettmann K. 2006. Separation and quantification of flavonoids. V: Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. Andersen Ø. M., Markham K. R. (eds.). New York, CRC/Taylor & Francis: 1-37
- Medina-Remón A., Barrionuevo-González A., Zamora-Ros R., Andres-Lacueva C., Estruch R., Martínez-González M., Diez-Espino J., Lamuela-Raventos R. 2009. Rapid Folin-Ciocalteu method using microtiter 96-well plate cartridges for solid phase extraction to assess urinary total phenolic compounds, as a biomarker of total polyphenols intake. *Analytica Chimica Acta*, 634: 54-60
- Mennen L. I., Sapinho D., Ito H., Galan P., Hercberg S., Scalbert A. 2008. Urinary excretion of 13 dietary flavonoids and phenolic acids in free-living healthy subjects –variability and possible use as biomarkers of polyphenol intake. *European Journal of Clinical Nutrition*, 62: 519–525
- Meredith S. 2011. Premagajmo srčni infarkt in možgansko kap: načrt za samoobrambo v 10 korakih. Ljubljana, Mladinska knjiga: 110-110

- Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T. C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52, 4: 673-751
- Milič K., Kuščer S., Pirš M., Koren M., Percl M. 2008. Vitamini, minerali in druga prehranska dopolnila. 1. izd. Ljubljana, Mladinska knjiga: 75-79
- Mukhtar H., Ahmad N. 2000. Tea polyphenols: Prevention of cancer and optimizing health. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 6: 1698–1702
- Pandrey K.B., Rizvi S. I. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2, 5: 270-278
- Pérez-Jiménez J., Hubert J., Hooper L., Cassidy A., Manach C., Williamson G., Scalbert A. 2010. Urinary metabolites as biomarkers of polyphenol intake in humans: a systematic review. *American Journal of Clinical Nutrition*, 92, 4: 801-809
- Pinnock D. 2013. Zdravilna kuhinja: kako pomaga, kar užitnega ponuja narava. Brežice, Primus: 15-18
- Prior R., Wu X., Schich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4290-4302
- Ramirez-Sanchez I., Maya L., Ceballos G., Villarreal F. 2010. Fluorescent detection of (-)-epicatechin in microsamples from cacao seeds and cocoa products: Comparison with Folin-Ciocalteu method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 8: 790-793
- Reinhard T. 2014. Superživila: najbolj zdrava hrana na tem planetu. Ljubljana, Umco: 256 str.
- Robards K., Prenzler P. D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66: 401-436
- Robles-Sardin A. E., Bolanos-Villar A. V., Gustavo A. Gonzalez Aguilar G. A., De la Rosa L. A. 2010. Flavonoids and their relation to human health. V: Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry, nutritional value and stability. De la Rosa L. A., Alvarez-Parrilla E., Gonzalez-Aguilar G. A. (eds.). Ames, Wiley-Blackwell: 155-177
- Rozman B., Gašperlin M., Kristl J. 2006. Preventivno delovanje naravnih antioksidantov na nastanek kožnega raka pod vplivom ultravijoličnih žarkov. *Medicinski razgledi*, 45: 141-153
- Rupnik M. 2005. Fiziologija ledvic. *Medicinski razgledi*, 44: 235-256
- Salobir K. 2000. Antioksidanti v živilih – učinek na zdravje. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 287-294

- Saltveit M. E. 2010. Synthesis and metabolism of phenolic compounds. V: Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry, nutritional value and stability. De la Rosa L. A., Alvarez-Parrilla E., Gonzalez-Aguilar G. A. (eds.). Ames, Wiley-Blackwell: 89-101
- Skitek M., Trampuš Bakija A. 2001. Priporočeni postopek za odvzem, zbiranje, hranjenje, stabiliziranje in transport urina. Ljubljana, Slovensko združenje za klinično kemijo. 20 str.
- Song X., Wang J., Zhu J. 2009. Effect of porogenic solvent on selective performance of molecularly imprinted polymer for quercetin. *Materials Research*, 12, 3: 299-304
- Spencer J. P. E., Mohsen Abd El M. M., Minihane A.-M., Mathers J. C. 2008. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: Strengths, limitations and application in nutrition research. *British Journal of Nutrition*, 99: 12-22
- Torres J. L., Varela B., García M. T., Carillo J., Matito C., Centelles J. J., Cascante M., Sqrt X., Bobet R. 2002. Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts: Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 26: 7548-7555
- Tsao R., McCallum J. 2010. Chemistry of flavonoids. V: Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry, nutritional value and stability. De la Rosa L. A., Alvarez-Parrilla E., Gonzalez-Aguilar G. A. (eds.). Ames, Wiley-Blackwell: 131-155
- Vogrinčič M., Timoracka M., Melichacova S., Vollmannova A., Kreft I. 2010. Degradation of rutin and polyphenols during the preparation of tartary buckwheat bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8: 4883-4887
- Vrhovšek U. 2001. Flavonoidi kot predstavniki antioksidantov. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi 2001, Portorož, 8.-9. november 2001. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 97-107
- Zamora-Ros R., Rabassa M., Cherubini A., Urpí-Sardà M., Llorach R., Bandinelli S., Ferrucci L., Andres-Lacueva C. 2011. Comparison of 24-h volume and creatinine-corrected total urinary polyphenol as a biomarker of total dietary polyphenols in the Invecchiare InCHIANTI study. *Analytica Chimica Acta*, 704: 110-115
- Waterhouse A. L. 2002. Determination of total phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 6 : 1-8
- Wright J.G., Boddy A.V., Highley M., Fenwick J., McGill A., Calvert A.H. 2001. Estimation of glomerular filtration rate in cancer patients. *British Journal of Cancer*, 84: 452-459

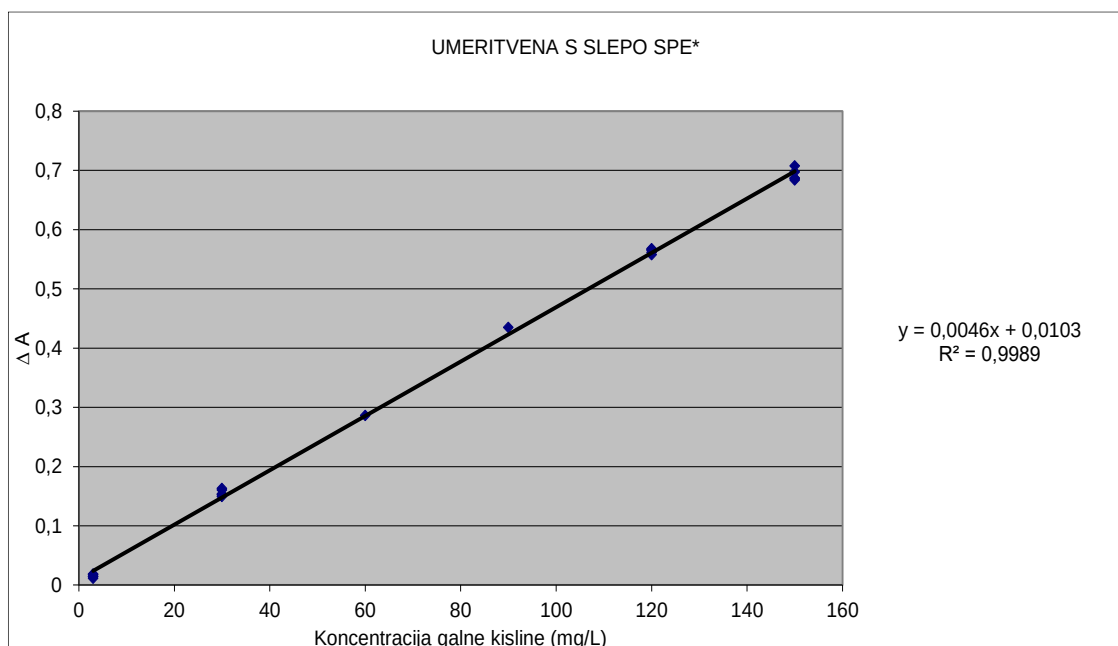
ZAHVALA

V prvi vrsti gre zahvala mentorici prof. dr. Tatjani Košmerl za vso strokovno pomoč in podporo pri sestavljanju diplomskega dela. Hvala in poklon tudi žal preminulemu somentorju prof. ddr. Marjanu Simčiču. Zahvaljujem se tudi izr. prof. dr. Heleni Abramovič za hitro recenzijo diplomskega dela. Za pomoč, ki sem jo bila deležna pri izvedbi analiz v laboratoriju in koristne nasvete bi se zahvalila Kseniji Podgrajšek. Za koristne napotke pri pisanju diplomske naloge in vzpodbudne besede bi se lepo zahvalila prijateljici Sari Vajdič.

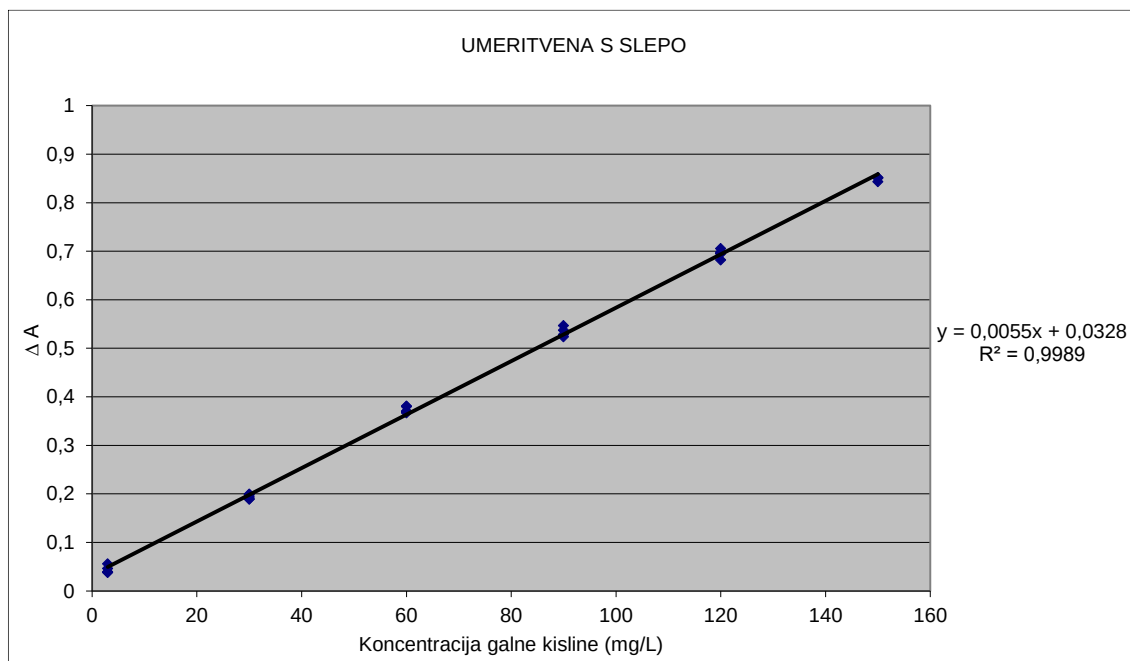
Posebej bi se zahvalila mojim staršem za finančno in moralno podporo tekom študija in partnerju za potrpežljivost in razumevanje.

Nazadnje bi se zahvalila vsem, ki so kakorkoli prispevali k mojem študiju in pisanju diplomskega dela.

PRILOGE



Priloga A: Umeritvena krivulja za izračun količine izločenih SFS s predhodno ekstrakcijo na trdni fazi



Priloga B: Umeritvena krivulja za izračun količine izločenih SFS brez ekstrakcije na trdni fazi

Priloga C: Izračunana vrednost Pearsonovega koeficienta korelacije (r) med koncentracijo dnevno izločenih SFS, normaliziranih na kreatinin z ekstrakcijo (s SPE) in koncentracijo dnevno izločenih SFS, normaliziranih na kreatinin brez SPE za vsako preiskovanko

Oseba (vsi dnevi)	Pearsonov koeficient korelacije (r)
A	0,289
B	0,334
C	0,010
D	0,164
E	0,402
F	0,518
I	0,130
J	0,302
K	0,064
L	0,365

Priloga D: Izračunana vrednost Pearsonovega koeficienta korelacije (r) med koncentracijo dnevno izločenih SFS, normaliziranih na kreatinin z ekstrakcijo (s SPE) in koncentracijo dnevno izločenih SFS, normaliziranih na kreatinin brez SPE (za vsak posamezen dan)

Dan (vse osebe)	Pearsonov koeficient korelacije (r)
PONEDELJEK	0,169
TOREK	0,771
SREDA	0,239
ČETRTEK	0,274
PETEK	0,176

Priloga E: Izračunana vrednost Pearsonovega koeficienta korelacije (r) med količino dnevno izločenih SFS in koncentracijo SFS jutranjega urina, normaliziranega na kreatinin pri določanju brez ekstrakcije na trdni fazi (za vsako posameznico)

Oseba (vsi dnevi)	Pearsonov koeficient korelacije (r)
A	0,590
B	0,413
C	-0,087
D	0,584
E	0,046
F	0,547
I	0,591
J	-0,015
K	0,521
L	0,480

Priloga F: Izračunana vrednost Pearsonovega koeficienta korelacije (r) med količino dnevno izločenih SFS in koncentracijo SFS jutranjega urina, normaliziranega na kreatinin pri določanju brez ekstrakcije na trdni fazi (za vsak posamezni dan)

Dan (vse osebe)	Pearsonov koeficient korelacije (r)
PONEDELJEK	0,353
TOREK	0,387
SREDA	0,644
ČETRTEK	0,669
PETEK	0,740

Priloga G: Podatki preiskovank, ki so sodelovale v raziskavi

Preiskovanka	Starost (let)	Teža (kg)	Višina (cm)	Indeks telesne mase (ITM)
A	33	79,4	163	29,9
B	29	54	172	18,3
C	31	53,9	165	19,8
D	29	52,8	169	18,5
E	29	61,8	165	22,7
F	27	47,2	157	19,1
I	25	57,9	168	20,5
J	25	53,9	168	19,1
K	24	62,2	168	22,0
L	28	51,3	158	20,5

Priloga H: Jedilnik preiskovank, razdeljen na posamične obroke v raziskavi

POSAMEZEN OBROK / DAN	PONEDELJEK	TOREK	SREDA	ČETRTEK	PETEK
ZAJTRK	maslo, marmelada, toast, mleko	skutin namaz s papriko in peteršiljem, bela kajzerica	viki krema, toast	skutin namaz z drobnjakom, bela kajzerica	marmelada, maslo, bela kajzerica
DOPOLDANSKA MALICA	sendvič poli, sok pingo	rogljič, kompot	sendvič s savinjskim želodcem, kumare, čaj	sosedovo pecivo, sojino mleko	sendvič s savinjskim želodcem
KOSILO	fižolova enolončnica, bela kajzerica	rižota z lososom cvetača v solati	testenine po bolonjsko, monte	riba, krompirjeva solata, duplo	piščanec z bučkami, polenta, kinder maxi king
POPOLDANSKA MALICA	banana	rezina z oreščki, sojino mleko	banana, skutka	oreški	banana
VEČERJA	mlečni riž	avokadov namaz, toast	cmoki z mareličnim nadevom, jagoda, kompot	namaz iz leče, temna kajzerica, kumare	sir, orehi, vložena zelenjava, bruskete