

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Blaž GROBIN

**STANDARDIZACIJA TESTOV ZA DOLOČITEV
ANTIOKSIDACIJSKEGA POTENCIALA**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Blaž GROBİN

**STANDARDIZACIJA TESTOV ZA DOLOČITEV ANTIOKSIDACIJSKEGA
POTENCIALA**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo

**STANDARDIZATION OF THE ASSAYS FOR THE EVALUATION OF
ANTIOXIDANT POTENTIAL**

M. Sc. THESIS
Master Study Programmes: Field Food Science and Technology

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Živilstvo. Delo je bilo opravljeno na Katedri za biokemijo in kemijo živil na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala izr. prof. dr. Blaža Cigića, za somentorico izr. prof. dr. Heleno Abramovič in za recenzentko prof. dr. Leo Demšar

Mentor: izr. prof. dr. Blaž CIGIĆ

Somentorica: izr. prof. dr. Helena ABRAMOVIČ

Recenzentka: prof. dr. Lea DEMŠAR

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno nemejeno 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.

Blaž Grobin

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 663.094.3.097.8:5771:543.637(043)=163.6
KG	živila/čaj/kava/pivo/jabolčni sok/ prehransko dopolnilo/antioksidanti/analizne metode/ABTS/DPPH/Folin-Ciocalteu
AV	GROBIN, Blaž dipl. inž. živ. in preh. (UN)
SA	CIGIĆ, Blaž (mentor) / ABRAMOVIČ, Helena (somentorica) / DEMŠAR, Lea (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2016
IN	STANDARDIZACIJA TESTOV ZA DOLOČITEV ANTIOKSIDACIJSKEGA POTENCIALA
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo)
OP	XII, 58 str., 18 pregl., 28 sl., 12 pril., 121 vir
IJ	sl
JL	sl/en
AI	V okviru magistrske naloge smo analizirali vpliv izbora metode in sestave topila na reaktivnost modelnih antioksidantov in vzorcev pijač ter prehranskih dopolnil v prisotnosti 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kisline (ABTS), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila (DPPH) in Folin-Ciocalteau (FC) reagenta. Ugotovili smo, da imata tako izbor testa kot sestava topila velik vpliv na reaktivnost modelnih antioksidantov, z izjemo 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kisline (Troloks), ki smo ga posledično uporabili kot standard za določitev antioksidativnega potenciala (AOP). Pri analizi kinetičnega poteka reakcije vzorcev v ABTS in DPPH testih smo ugotovili, da hitri sledi počasna faza, ki v večini primerov tudi po treh urah še ni zaključena. Vsem vzorcem smo po enourni inkubaciji določili AOP z različnimi metodami in ugotovili velika odstopanja v odvisnosti od izbora testa in topila. Največje razlike smo ugotovili pri svetlem pivu, kjer je bil razpon AOP več kot 7-kraten, najmanjše pa pri zelenem čaju, kjer je največji določen AOP približno dvakratnik najmanjšega. V povprečju smo največje AOP določili s FC metodo, najmanjše pa z DPPH metodo v metanolu. Korelacijska analiza je razkrila veliko stopnjo korelacije v okviru DPPH in ABTS testov. Rezultati FC testa pa najbolje korelirajo z ABTS in DPPH testi, ki so izvedeni pri pH 7,4. Izbor metode ima podoben vpliv na reaktivnost strukturno podobnih vzorcev, saj je v takšnih primerih stopnja korelacije zelo velika.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND	Du2
DC	UDC 663.094.3.097.8:5771:543.637(043)=163.6
CX	foods/tea/coffee/beer/apple juice/ dietary supplements/antioxidants/analitycal methods/ABTS/DPPH/Folin-Ciocalteu
AU	GROBIN, Blaž
AA	CIGIĆ, Blaž (supervisor) / ABRAMOVIČ, Helena (co-advisor) / DEMŠAR, Lea (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY	2016
TY	STANDARDIZATION OF THE ASSAYS FOR THE EVALUATION OF ANTIOXIDANT POTENTIAL
DT	M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Food Science and Technology)
NO	XII, 58 p., 18 tab., 28 fig., 12 ann., 121 ref.
LA	sl
AI	sl/en
AB	In the master's thesis, we have analysed the influence of the selected method and composition of the solvent on the reactivity of model antioxidants, liquid samples and dietary supplements in the presence of 2,2'-azino-bis-3-etylbenzotiazolin-6-sulfonic acid (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and the Folin-Ciocalteu (FC) reagent. We have found that both, different tests and solvents have a large influence on the reactivity of model antioxidant, with the exception of 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), which was consequently used as a standard for determining the antioxidant potential (AOP). In analyzing the kinetic reaction of samples in ABTS and DPPH tests we found that rapid phase is followed by slow one that in most cases after three hours has not been completed. The AOP of samples was determined with different methods after one-hour incubation. A large deviation between the AOP values depending on the selection of the test and the solvent was observed. The largest difference (more than 7-fold) of AOP was found in the light beer, and the smallest in green tea, where the highest AOP is approximately twice the higher of the smallest one. In average we determine the largest AOP in FC method and the smallest AOP with DPPH method in methanol. Correlation analysis revealed a high degree of correlation within DPPH and ABTS tests. The results of FC test have the highest correlation with ABTS and DPPH tests at pH 7.4. The selection of the method has a similar effect on the reactivity of structurally similar samples and in such cases the degree of correlation is very high.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 OKSIDACIJA IN ANTIOKSIDANTI	2
2.2 RADIKALI	2
2.3 ANTIOKSIDANTI V ANALIZIRANIH VZORCIH	2
2.3.1 Zeleni in črni čaj	2
2.3.2 Nepražena in pražena kava	3
2.3.3 Svetlo pivo	4
2.3.4 Jabolčni sok	4
2.3.5 Prehransko dopolnilo brusnice z in brez vitamin C	5
2.4 MODELNI ANTIOKSIDANTI	5
2.4.1 L-askorbinska kislina in dehidroaskorbinska kislina	6
2.4.2 Epigalokatehin galat	6
2.4.3 Galna kislina	6
2.4.4 Katehin	7
2.4.5 Kavna kislina	7
2.4.6 Klorogenska kislina	8
2.4.7 Troloks	9
2.5 METODE ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNEGA POTENCIALA	9
2.5.1 Spektrofotometrično določanje AOP z ABTS radikalom	10
2.5.2 Spektrofotometrično določanje AOP z DPPH radikalom	10
2.5.3 Spektrofotometrično določanje fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu reagentom	10
3 MATERIALI IN METODE	11
3.1 MATERIALI	11
3.1.1 Vzorci	11
3.1.1.1 Priprava nepražene in pražene kave za test	11
3.1.1.2 Priprava črnega in zelenega čaja za test	12
3.1.1.3 Priprava svetlega piva in jabolčnega soka za test	12
3.1.1.4 Priprava prehranskega dopolnila z brusnicami za test	12

3.1.2 Modelni antioksidanti	12
3.1.3 Reagenti in topila	13
3.1.3.1 Priprava fosfatnega in acetatnega pufra.....	13
3.1.3.2 Priprava delovne raztopine Folin-Ciocalteu reagenta	13
3.1.3.3 Priprava 20 % Na ₂ CO ₃	13
3.1.3.4 Priprava DPPH reagenta.....	13
3.1.3.5 Priprava ABTS reagenta	14
3.1.3.6 Priprava železovega sulfata heptahidrata	14
3.1.4 Laboratorijska oprema	14
3.2 METODE DELA	15
3.2.1 Izvedba testov za določevanje AOP	15
3.2.1.1 ABTS in DPPH testa	15
3.2.1.2 Folin-Ciocalteau test.....	16
3.2.2 Optimizacija razredčitev vzorcev v testih za določevanje AOP	16
3.2.3 Priprava umeritvenih krivulj z modelnimi antioksidanti za določevanje AOP.....	17
3.2.4 Analiza kinetičnega poteka reakcije antioksidantov v vzorcih za ABTS in DPPH testa	18
3.2.5 Določanje vode v zračni sušini.....	18
3.3 SHEMATSKI PRIKAZ POTEKA RAZISKOVALNEGA DELA.....	20
4 REZULTATI Z RAZPRAVO	21
4.1 UMERITVENE KRIVULJA ZA MODELNE ANTIOKSIDANTE	21
4.1.1 Umeritvena krivulja za Troloks v ABTS, DPPH in FC testih.....	21
4.1.2 Reaktivnosti modelnih antioksidantov v DPPH, ABTS in FC testih v primerjavi s Troloksom	24
4.2 HITROST REAKCIJE ANTIOKSIDANTOV V IZBRANIH PIJAČAH IN PREHRANSKIH DOPOLNILIH Z RADIKALOMA ABTS IN DPPH V RAZLIČNIH TOPILIH	26
4.2.1 Stabilnost ABTS in DPPH v različnih topilih	26
4.2.2 Potek reakcije antioksidantov v izbranih vzorcih pijač in prehranskih dopolnil z radikaloma ABTS in DPPH v različnih topilih.....	28
4.3 AOP IZBRANIH PIJAČ IN PREHRANSKIH DOPOLNIL, DOLOČEN Z RADIKALOMA ABTS IN DPPH TER S FOLIN-CIOCALTEAU METODO	32
4.3.1 AOP zelenega in črnega čaja	32
4.3.2 AOP nepražene in pražene kave	35
4.3.3 AOP piva	36
4.3.4 AOP jabolčnega soka	37
4.3.5 AOP prehranskega dopolnila iz brusnic	38
4.4 KORELACIJSKE ANALIZE.....	40
4.4.1 Reaktivnost modelnih antioksidantov in vzorcev pijač ter prehranskih dopolnil v ABTS, DPPH in FC testih	40
4.4.2 Statistično ovrednotenje razlik v reaktivnosti v ABTS, DPPH in FC testih za posamezne vzorce	41
4.4.3 Korelacijska analiza različnih testov za določevanje AOP.....	42
4.4.4 Korelacijska analiza reaktivnosti modelnih antioksidantih v različnih testih za določevanje AOP.....	43

4.4.5 Korelacijska analiza reaktivnosti vzorcev pijač in prehranskih dopolnil v različnih testih za določevanje AOP	44
4.4.6 Korelacijska analiza reaktivnosti vzorcev pijač in prehranskih dopolnil z reaktivnostjo modelnih antioksidantov v različnih testih za določevanje AOP.....	45
5 SKLEPI	48
6 POVZETEK	49
7 VIRI	51
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Vzorci uporabljeni v nalogi.....	11
Preglednica 2:	Modelni antioksidanti uporabljeni v nalogi	12
Preglednica 3:	Reagenti uporabljeni v nalogi	13
Preglednica 4:	Razredčitve vzorcev pri izvedbi ABTS, DPPH in FC testov; koncentracija je izražena kot masa suhe snovi (v g) na 1 raztopine	17
Preglednica 5:	Območje koncentracij modelnih antioksidantov v ABTS, DPPH in FC testih	17
Preglednica 6:	Razredčitve pri kinetičnih meritvah	18
Preglednica 7:	AOP zelenih čajev, določen z različnimi metodami	33
Preglednica 8:	AOP črnih čajev, določen z različnimi metodami	34
Preglednica 9:	AOP nepražena in pražene kave, določen z različnimi metodami	36
Preglednica 10:	AOP svetlih piv, določen z različnimi metodami	37
Preglednica 11:	AOP jabolčnega soka, določen z različnimi metodami	38
Preglednica 12:	AOP brusnic določen z različnimi metodami	40
Preglednica 13:	Množina izmenjanih elektronov, ki jih modelni antioksidanti ter izbrane pijače in prehranska dopolnila izmenjajo v reakcijah z ABTS, DPPH in FC reagenti.....	41
Preglednica 14:	Razmerje med največjim in najmanjšim številom izmenjanih elektronov znotraj različnih izvedb DPPH testa, ABTS testa in za vse metode skupaj ter koeficient variacije.....	42
Preglednica 15:	Medsebojna povezanost ABTS in DPPH metod v različnih topilih ter FC metode določena s Pearsonovimi korelacijskimi koeficienti	43
Preglednica 16:	Primerjava reaktivnosti modelnih antioksidantov v ABTS in DPPH testih ter v FC testu, določena s Pearsonovimi korelacijskimi koeficienti.....	44
Preglednica 17:	Primerjava reaktivnosti vzorcev živil in prehranskih dopolnil v ABTS in DPPH testih ter v FC testu določena s Pearsonovimi korelacijskimi koeficienti.....	45
Preglednica 18:	Povezava med reaktivnostjo vzorcev živil in prehranskih dopolnil ter reaktivnostjo modelnih antioksidantov v ABTS in DPPH testih ter v FC testu določena s Pearsonovimi korelacijskimi koeficienti	45

KAZALO SLIK

Slika 1:	Pretvorba askorbinske kisline (A) v dehidroaskorbinsko kislino (C) preko semidehidroaskorbinske kisline (B) (Burini, 2007).....	6
Slika 2:	Kislinsko bazna disociacija –COOH skupine v GK (Lu in sod., 2009)	7
Slika 3:	Struktturna formula katehina (A), semikinona (B) in kinona (C) (Janeiro in Oliveira Brett, 2004).....	7
Slika 4:	Deprotonacija in pKa vrednosti –COOH in –OH skupine v molekuli kavne kisline (Genaro-Mattos in sod., 2015)	8
Slika 5:	Glavne oblike klorogenske kisline, ki se nahajajo v kavi (Stalmach in sod., 2006).....	9
Slika 6:	Deprotonacija in pKa vrednosti –COOH in –OH skupine v molekuli Troloksa (Alberto in sod., 2013).....	9
Slika 7:	Shematski prikaz priprave vzorcev z ABTS in DPPH metodo	15
Slika 8:	Shematski prikaz priprave vzorcev z Folin-Ciocalteau metodo	16
Slika 9:	Shematski prikaz poteka raziskovalnega dela	20
Slika 10:	Grafični prikaz umeritvene krivulje za Troloks po DPPH, ABTS in FC metodi	21
Slika 11:	Grafični prikaz absorpcijskega spektra DPPH [•] in DPPH-H v topilu etanola in fosfatni pufer s pH 7,4 (1:1, v/v)	22
Slika 12:	Reaktivnost Fe ²⁺ ionov pri koncentraciji 100 µmol/l v Folin-Ciocalteu testu ..	23
Slika 13:	Relativna aktivnost modelnih antioksidantov v primerjavi s Troloksom v ABTS, DPPH in FC testih	25
Slika 14:	Stabilnost ABTS radikala pri različnih začetnih koncentracijah v izbranih topilih	27
Slika 15:	Stabilnost DPPH radikala pri različnih začetnih koncentracijah v izbranih topilih	27
Slika 16:	Hitrost reakcije med antioksidanti v prehranskem dopolnilu brez dodanega vitamina C z ABTS radikalom ter DPPH radikalom v različnih topilih	28
Slika 17:	Hitrost reakcije med antioksidanti v svetlem pivu z ABTS radikalom ter DPPH radikalom v različnih topilih	29
Slika 18:	Hitrost reakcije med antioksidanti v jabolčnem soku z ABTS radikalom ter DPPH radikalom v različnih topilih	29
Slika 19:	Hitrost reakcije med antioksidanti v nepraženi kavi z ABTS radikalom ter DPPH radikalom v različnih topilih	30
Slika 20:	Hitrost reakcije med antioksidanti v zelenem čaju z ABTS radikalom ter DPPH radikalom v različnih topilih	31
Slika 21:	Primerjava AOP zelenega čaja, ki je določen z ABTS (zelena), DPPH (vijolična) in FC (modra) metodo	33
Slika 22:	Primerjava AOP črnega čaja, ki je določen z ABTS (zelena), DPPH (vijolična) in FC (modra) metodo	34
Slika 23:	Primerjava AOP nepražene kave, ki je določen z ABTS (zelena), DPPH (vijolična) in FC (modra) metodo	35
Slika 24:	Primerjava AOP pražene kave, ki je določen z ABTS (zelena), DPPH (vijolična) in FC (modra) metodo	35
Slika 25:	Primerjava AOP svetlega piva, ki je določen z ABTS (zelena), DPPH (vijolična) in FC (modra) metodo	37

Slika 26:	Primerjava AOP jabolčnega soka, ki je določen z ABTS (zelena), DPPH (vijolična) in FC (modra) metodo.....	38
Slika 27:	Primerjava AOP prehranskega dopolnila brez vit. C, ki je določen z ABTS (zelena), DPPH (vijolična) in FC (modra) metodo (rezultati predstavljajo povprečje \pm SD petih neodvisnih poskusov vključujoč ponovno tehtanje in razredčevanje vzorca ter pripravo radikala)	39
Slika 28:	Primerjava AOP prehranskega dopolnila z vit. C, ki je določen z ABTS (zelena), DPPH (vijolična) in FC (modra) metodo.....	40

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Grafični prikaz umeritvene krivulje železovega (II) sulfata hepta hidrata s FC metodo
- Priloga B: Grafični prikaz vpliva topila in volumna svetlega piva dodanega v reakcijsko zmes (1 ml) na redukcijo radikala DPPH
- Priloga C: Grafični prikaz vpliva topila in volumna jabolčnega soka dodanega v reakcijsko zmes (1 ml) na redukcijo radikala DPPH
- Priloga D: Grafični prikaz vpliva topila in volumna prehranskega dopolnila brez vit. C v reakcijsko zmes (1 ml) na redukcijo radikala DPPH
- Priloga E: Grafični prikaz umeritvene krivulje za askorbinsko kislino po DPPH, ABTS in FC metodi
- Priloga F: Grafični prikaz umeritvene krivulje za epigalokatehin galat po DPPH, ABTS in FC metodi
- Priloga G: Grafični prikaz umeritvene krivulje za galno kislino po DPPH, ABTS in FC metodi
- Priloga H: Grafični prikaz umeritvene krivulje za dehidroaskorbinsko kislino po DPPH, ABTS in FC metodi
- Priloga I: Grafični prikaz umeritvene krivulje za catehin po DPPH, ABTS in FC metodi
- Priloga J: Grafični prikaz umeritvene krivulje za kavno kislino po DPPH, ABTS in FC metodi
- Priloga K: Grafični prikaz umeritvene krivulje za klorogensko kislino po DPPH, ABTS in FC metodi
- Priloga L: UV-VIS spektri modelnih antioksidantov

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ABTS	2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonska kislina)
AK	askorbinska kislina
AOP	antioksidativni potencial
CQA	klorogenska kislina
DHA	dehidroaskorbinska kislina
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EGCG	epigalokatehin galat
EtOH	etanol
FC	Folin-Ciocalteu
GK	galna kislina
KA	katehin
KK	kavna kislina
KV	koeficient variacije
MeOH	metanol
mQ	milliQ voda
PD	prehransko dopolnilo
R	Pearsonov koeficient korelacji
R ²	koeficient determinacije
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
s.s.	suha snov
TE	troloks ekvivalent
TEAC	troloks ekvivalent antioksidativna kapaciteta

1 UVOD

Porušeno razmerje med antioksidanti in radikali, ki se neprestano tvorijo pri celičnem metabolizmu, vodi do oksidativnega stresa. Različni okoljski dejavniki, vključno z UV svetlobo, patogenimi mikroorganizmi, ksenobiotiki ter prevelika/premajhna koncentracija kisika lahko prispevajo k porušenju tega ravnotežja. Oksidativni stres zmanjšujejo endogeni antioksidanti kakor tudi nekatere molekule kot vitamina C in E, fenolne spojine in karotenoidi, ki jih zaužijemo z vsakdanjo prehrano, predvsem z vnosom sadja in zelenjave. Mnoge raziskave so pokazale vpliv zaužitih antioksidantov na zmanjšano pojavnost nekaterih kroničnih bolezni, kot so rak, diabetes in bolezni srca in ožilja (Podsèdek, 2007; Chanda in Dave, 2009). Zaradi vsega naštetege obstaja velik interes za vrednotenje antioksidativnega potenciala (AOP) živil.

V literaturi zasledimo, da se uporablja več kot deset različnih metod za določevanje AOP, oziroma določevanje vsebnosti antioksidantov v vzorcih (Chanda in Dave, 2009). Zaradi relativno enostavne izvedbe se pogostokrat uporablajo spektrofotometrične metode. Velika razširjenost metod prinaša s sabo tudi slabosti in pomanjkljivosti. Metode niso standardizirane na nivoju eksperimentalnih pogojev (pH, čas, sestava topila, temperatura) kakor tudi pri uporabi standardnih antioksidantov (Troloks, askorbinska kislina, različne fenolne spojine), s katerimi se izraža vsebnost skupnih antioksidantov v določenem vzorcu.

V okviru magistrskega dela smo se osredotočili na metodi, ki temeljita na reakciji antioksidantov z radikaloma 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) in 2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazoline-6-sulfonsko kislino (ABTS) ter Folin-Ciocalteu (FC) metodo, ki temelji na reakciji antioksidantov z molibdati in volframati. Z izbranimi metodami smo analizirali potek reakcij modelnih antioksidantov v različnih topilih ter pri enakih pogojih določali AOP svetlemu pivu, jabolčnemu soku, zelenemu in črnemu čaju, zeleni in praženi kavi ter prehranskemu dopolnilu iz brusnic z in brez vitamina C.

1.1 NAMEN DELA

V testih smo analizirali kinetičen potek reakcije in vpliv koncentracije antioksidantov v testu na potek reakcije. Poleg modelnih antioksidantov smo na enak način analizirali tudi izbrane realne vzorce živil. Na osnovi pridobljenih rezultatov smo ovrednotili uporabnost modelnih antioksidantov za namen standardizacije testov za določitev AOP.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Predvidevamo, da bodo sestava topila, pH in koncentracija antioksidantov v reakcijski zmesi vplivali na potek reakcije v FC, DPPH in ABTS testih.
- Predvidevamo, da bo izbor metode in pogojev reakcije vplival na določen AOP.
- Predvidevamo, da bomo lahko na osnovi pridobljenih rezultatov ovrednotili uporabnost modelnih antioksidantov za namen standardizacije AOP živil.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OKSIDACIJA IN ANTIOKSIDANTI

Reaktivne kisikove zvrsti (ROS) kot na primer: vodikov peroksid H_2O_2 in superoksidni anionski radikal O_2^- nastajajo v številnih celičnih reakcijah. Molekule, ki so najbolj dovetne za poškodbe s prostimi radikali, so lipidi (peroksidacija nenasičenih maščobnih kislin v membranah), proteini (modifikacija aminokislin) in nukleinske kisline. Tvorbo in akumulacijo ROS se *in vivo* preprečuje z antioksidativnimi sistemi, kot so nizko molekularni antioksidanti (askorbinska kislina, glutation, tokoferol), ter z encimi, ki regenerirajo oksidirane antioksidante ali razgrajujejo ROS (superoksid dismutaza, glutation peroksidaza, glutation reduktaza, katalaza) (Blokhina in sod., 2003).

Hrana vsebuje poleg makrohranil tudi nekatere druge sestavine, kot so antioksidanti, ki vplivajo na stabilnost samega živila ter na zdravje posameznika, ki ta živila zaužije. Z antioksidanti so bogata predvsem nekatera živila rastlinskega izvora, kot so: sadje, zelenjava, čaji, rdeče vino, kava in kakav. Pomemben delež k skupnim antioksidantom prispevajo spojine, ki imajo na aromatski obroč vezano $-OH$ skupino. To so tokoferoli, flavonoidi, tanini in lignini. Antioksidanti pogostokrat delujejo kooperativno in so vpleteni v številne redoks reakcije. V nekaterih primerih prekomerna vsebnost antioksidantov ne izboljša antioksidativne obrambe, ampak deluje tudi prooksidativno (Blokhina in sod., 2003; Roginsky in Lissi, 2005).

2.2 RADIKALI

Radikali so molekule, atomi ali ioni, ki vsebujejo vsaj en nesparjeni elektron, to je elektron, ki je sam v svoji orbitali. Pri vzpostavitvi kemijske vezi si atomi delijo elektronski par. Večina radikalov nastane kot posledica homolitične cepitve kovalentnih vezi. Radikali so pogostokrat zelo reaktivni in se povezujejo z drugimi radikali ali reagirajo z molekulami, da nastane nov radikal (Radical, 2015).

2.3 ANTIOKSIDANTI V ANALIZIRANIH VZORCIH

2.3.1 Zeleni in črni čaj

Naravni habitat čaja je na zahodu Indije med Nagalanskimi, Maniprskimi in Lushainskimi griči preko gričevja Mjanmara (Burma) vse do province Zhejiang na vzhodu Kitajske in južno na območju Tajske in Vietnam. Poznamo tri glavne variacije rastline čaja med njimi so kitajski zeleni čaj (*Camellia sinensis* var. *sinensis*), asamski beli čaj (*Camellia sinensis* var. *assamica*) in kamboški čaj (*Camellia sinensis* var. *lasiocalyx*). Med različnimi sortami obstaja veliko število različnih hibridov. Pri načrtovanju plantaž je za rast rastlin pomembno podnebje, kislota tal in razpoložljiva delovna sila. Ustrezno podnebje ima minimalno letno količino padavin (od 1140 do 1270 mm/m²) in povprečno temperaturo nad 11 °C. Tla za gojenje čajnih rastlin morajo biti kisla, saj rastline ne uspevajo na alkalknih tleh. Ugodna kislota tal je pri pH od 5,4 do 5,8 ali manj (Willson in Clifford, 1992; Hicks, 2001; Tea production, 2015).

Čaje razdelimo v šest kategorij glede na tehnološki postopek obdelave (Tong, 2010):

- beli čaj: uvel in neoksidiran,
- rumeni čaj: neuvel in neoksidiran dovoljeno do rumene barve,

- zeleni čaj: neuvel in neoksidiran,
- oolong čaj: uvel, poškodovan in delno oksidiran,
- črni čaj: uvel, možno drobljenje in v celoti oksidiran in
- post-fermentirani čaj: zeleni čaj, ki je fermentiran.

Obrane liste čaja obdelajo odvisno od vrste produkta in procesa. Značilni tehnološki procesi so: venjenje, maceriranje, oksidacija, fiksiranje, valjanje, sušenje in staranje ali sekundarna fermentacija. Po obiranju liste posušijo, saj v nasprotnem primeru začnejo veneti in oksidirati. Encimsko katalizirana oksidacija poteče znotraj celic in povzroči postopno spremembo barve zaradi razgradnje klorofila in sprostitev taninov. Proses oksidacije in polimerizacije se ustavi s segrevanjem, ki inaktivira delovanje encima polifenol-oksidaze (Tong, 2010; Willson in Clifford, 1992).

Razlika med zelenim in črnim čajem je v procesu obdelave listov. Zeleni čajni listi so fiksirani, obdelani, posušeni in vsebujejo 20-30 % katehinov v suhi snovi. Liste črnega čaja obdelajo v vseh fazah proizvodnega procesa. Obdelani listi vsebujejo manj katehinov (10 %) kot zeleni čaji, le-ti se transformirajo v teaflavine, tearubigine in druge oligomere (Wang in sod., 1994; Jiang in sod., 2015).

2.3.2 Nepražena in pražena kava

Kava je desetletja najbolj tržen prehrambni izdelek in najbolj priljubljena pijača na svetu. Leta 2014 je svetovna proizvodnja kave dosegla 8,5 milijona ton (ICO, 2015). Drevo kave (kavovec) spada v družino *Rubiaceae* rod *Coffea*. Na svetu poznamo več kot 80 različnih vrst kavovcev. Gospodarsko sta pomembni dve vrsti *Coffea arabica* in *Coffea canephora* imenovana robustika. *C. arabica* prispeva 60 % h globalnemu trgu in *C. canephora* predstavlja preostanek (Farah, 2012; ICO, 2015). Kavi *C. arabica* in *C. canephora* se v mnogih pogledih razlikuje, vključno z vplivom podnebja na rast, kemično sestavo, načini praženja, mletja praženih semen in kuhanja (Farah, 2012).

Aroma nepraženih kavnih zrn je drugačna od praženih kavnih zrn, saj pridobi kava s praženjem značilno barvo in aroma. Visoka temperatura praženja povzroči vrsto fizikalnih in kemičnih sprememb v zrnu. Temperature pri praženju zrn so odvisne od vrste praženja, vendar ne višje od 240 °C. V začetni fazici izpari voda, sladkorji karamelizirajo, posledično se spremeni barva in kavna zrna nabreknejo. Pri višjih temperaturah praženja nad 160 °C poteka Maillardova reakcija med beljakovinami in ogljikovimi hidrati vključno s Streckerjevo razgradnjo in nastankom aldehydov. Prav tako potekajo druge kemijske reakcije med nizko in visoko molekularnimi spojinami (Farah, 2012). Druga spremenljivka, ki vpliva na kemično sestavo napitka kave, je način priprave napitka. Delež kave v vodi se v različnih državah precej razlikuje. Običajna zatehta kave je med 8 in 40 g v 100 ml vode (Farah, 2012; Ludwig in sod., 2014). Temperatura vode naj bi bila nad 90 °C. Vendar pa je pogost način pri pripravi tudi ta, da se kavo izpostavi nekaj minutnemu vrenju. Temu sledi posedanje ali filtracija. V zahodnem svetu je običajna tudi ekstrakcija zmlete kave pri povišanih tlakih v kavnih avtomatih (Farah, 2012). Prav tako je pomembna velikost delcev kave v času ekstrakcije, ki se giblje od prahu do grobih delcev (Wesolowski in Gawalek, 2008; Farah, 2012).

Med fenolnimi spojinami najdemo v kavnih zrnih največ klorogenske kisline in njenih derivatov. V prevretku nepražene kave se nahaja več kot 40 različnih izomer in derivatov klorogenske kisline, ki predstavljajo med 3,5 do 14 % suhe snovi. Med njimi je največ kafeoil kina, dikafeoil kina, ferulo kina, p-kumaroil kina in kafeoil-ferulo kina kislin (Narita in Inouye, 2011; Dziki in sod., 2015), ki predstavljajo približno 80 % vseh derivatov klorogenske kisline v nepraženi kavi. Te kisline dajejo nepraženi kavi astringenten, grenak in kisel okus. Prevelika količina fenolnih kislin negativno vpliva na okus zaradi oksidacije in razgradnih produktov. Termično nestabilne klorogenske kisline se med praženjem pretvorijo, izomerizirajo, epimerizirajo, laktonizirajo in razgradijo do nizko molekularnih spojin, ki dajejo kavi značilno aroma (Nicoli in sod., 1997; Sacchetti in sod., 2009; Farah, 2012). Pri praženju se tvorijo melanoidini, ki prispevajo k AOP kave. Nekateri avtorji so ugotovili, da krajiš kot je proces praženja, višji je AOP pražene kave (Delgado-Andrade in sod., 2005; Vignoli in sod., 2011). Med praženjem prihaja tudi do zmanjšanja vsebnosti nepolarnih antioksidantov, kot so tokoferoli (Farah, 2012). Na kemijsko sestavo napitka kave vpliva način priprave. V splošnem velja, da lahko 100 ml napitka vsebuje od 20 mg do 200 mg klorogenskih kislin (Farah, 2012; Ludwig in sod., 2014). Klorogenske kisline so v kavi prisotne v precej večjih koncentracijah kot v nekaterih drugih živilih (Escarpa in González, 2001; Farah, 2012).

2.3.3 Svetlo pivo

Pivo je alkoholna pičača, ki jo pripravijo s fermentiranjem sladkorjev, katerega vir je škrob. V Evropi, predvsem v Nemčiji, pivo tradicionalno pripravlja iz ječmenovega slada. Slad se pripravi s kalitvijo slajenega in neslajenega žita. V kotlu zmešajo slad in vodo, ki se kuha in pri določenih temperaturah encimi v sladu razgrajujejo škrob. Kuhanje sladice je namenjeno sterilizaciji, koagulaciji beljakovin in izhlapevanju nezaželenih hlapnih snovi. Med kuhanjem dodajo hmelj, ki daje pivu grenak okus. Po kuhanju sladico ohladijo, dodajo kvasni sev, sladica se v fermentorju s pomočjo seva kvasovk fermentira. Poznamo zgornjo in spodnjo fermentacijo, ki je odvisna od seva kvasovk. Končni izdelek je odvisen od surovin in tehnološkega postopka (Noonan, 2003).

Rezultati predhodnih raziskave so pokazali, da imajo vsa piva antioksidativne lastnosti. Antioksidativne lastnosti so odvisne od vsebnosti ekstrakta in barve piva. Različni dodatki v pivu vplivajo na AOP (Polak in sod., 2013). Nekatere raziskave so pokazale, da se v procesu kuhanja ob dodatku hmelja vsebnost polifenolov v pivini trikrat poveča. Na povišanje vsebnosti polifenolov najbolj vpliva dodajanje hmelja v pivino in proces fermentacije, saj etanol izboljša ekstrakcijo polifenolov iz hmelja. K AOP piva naj bi največ prispevali katehin, kavna, ferulna, sinapinska kislina in tudi nekatere druge še neidentificirane fenolne spojine (Pascoe in sod., 2003; Leitao in sod., 2011).

2.3.4 Jabolčni sok

Jabolčni sok je sadni sok, ki ga macerirajo in stiskajo iz jabolk. Sok iz jabolk se v tehnološkem postopku lahko encimsko, mehansko ali kemijsko obdela. Na koncu verige sledi embaliranje v normalni ali v kontrolirani atmosferi (FAS/USDA, 2005). Pri predelavi jabolčnega soka se izgubi do 40 % polifenolov in AOP jabolčnega soka se v primerjavi s svežimi jabolki zniža med 20 in 88 % (Dietrich in sod., 2003; Zhang in sod., 2008). Z različnimi tehnološkimi postopki je možno vplivati na AOP jabolčnega soka. S sonifikacijo povišajo AOP (Abid in sod., 2013), z ultrafiltracijo pa znižajo AOP do 50 % (Dietrich in sod., 2003), medtem ko tehnologija z ultra visokimi tlaki ohrani polifenole v jabolčnem soku

(Suárez-Jacobo in sod., 2011). Vsebnost fenolnih spojin v soku je odvisna od sorte in zrelosti jabolk (Hodnik, 2014). Polifenoli v jabolčnem soku vplivajo na AOP, kelirajo kovinske ione in prispevajo k porjavenju. Vsebnost fenolov v vzorcu se lahko uporablja kot kazalec AOP, prav tako se lahko vsebnost fenolov navaja na embalažni enoti kot naravni vir antioksidantov v funkcionalnih živilih (Martínez in sod., 2012). Pri presoji funkcionalnosti sokov so ugotovili, da obstaja korelacija med instrumentalno zaznavo okusa, kemijsko sestavo in AOP. V primerjavi z ostali sokovi (pomarančni, brusnični) ima jabolčni sok manjšo vsebnost skupnih fenolov in nižji AOP (Granato in sod., 2015). V različnih sortah jabolk prevladujejo naslednji polifenoli: flavan-3-ol, hidroksicimetna kislina, kvercetin, rutin, epikatehin, katechin ter derivati klorogenske kisline in kavne kisline (Oszmiański in Wojdyło, 2007).

2.3.5 Prehransko dopolnilo brusnice z in brez vitamin C

Prehranska dopolnila so zgoščen vir hranil, ki dopolnjujejo polnovredno prehrano. Preparati se tržijo v obliki tablet, kapsul, prahu, granul in tekočin. Dodan vitamin ali mineral izboljša hranilno vrednost in včasih zagotovi posebna hranila, ki primanjkujejo določeni populaciji ljudi. V Združenih državah Amerike (ZDA) dodajajo minerale in vitamine v živilske izdelke, kot so pijače, kuhijske soli, moke in pekovski izdelki (Nutritional supplement, 2015). V Evropi to področje ureja direktiva 2002/46/EC. Direktiva določa usklajen seznam vitaminov in mineralov, ki jih lahko dodajajo v prehranske namene (Directive 2002/46 of..., 2002). Minerale in vitamine naj bi dodajali zaradi njihovega ugodnega vpliva na zdravje ljudi. Kljub mnogim pozitivnim rezultatom (ugoden vpliv na zdravje) so rezultati nekaterih raziskav ugotovili celo negativno povezavo z zdravjem. Obogatitev z beta karotenom, vitaminom A in vitaminom E lahko celo poveča smrtnost. Vloge vitamina C in selena na umrljivost niso dokazali (Bjelakovic in sod., 2007). V nekaterih raziskavah so ugotovili, da npr. sintetični antioksidanti potencialno negativno vplivajo na zdravje ljudi (Lobo in sod., 2010).

Brusnice so manjše plazeče rastline rodu *Vaccinium*, družine *Ericaceae* (vresnic). Poznamo več vrst brusnic. Brusnice (*V. oxycoccus*) rastejo na močvirnih zemljiščih v severni Ameriki, Aziji in Evropi (Cranberry, 2015; *Vaccinium macrocarpon* (American Cranberry), 2015.). Ameriška brusnica (*V. macrocarpon*) raste v SZ predelu ZDA. Rastlina je bolj robustna kot *V. oxycoccus*. Razlikuje se v obliki, barvi in velikosti jagod. Brusnica *V. vitis-idaea*, znana tudi kot gorska brusnica, naravno raste v severni Evropi, predvsem v Skandinaviji in v ZDA. Rdeča brusnica *V. erythrocarpum* raste v gorskih območjih Kanade in na severu ZDA.

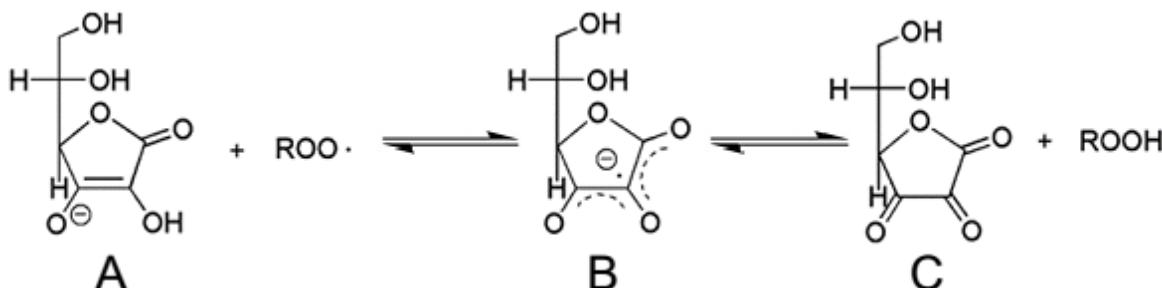
Izolati brusnic vsebujejo mnoge flavanole in proantocianide, ki so sestavljeni iz monomernih, dimernih, trimernih in večjih polimernih enot. Antociani v vzorcu so večinoma sestavljeni iz galaktozidov in arabinozidov cianidina in peonidina. Identitete spojin so bile potrjene z uporabo jedrske magnetne resonance. Na AOP vplivajo predvsem flavanoli, medtem ko imajo antociani manjši vpliv (Singh in sod., 2009; Grace in sod., 2014).

2.4 MODELNI ANTIOKSIDANTI

Mnogi raziskovalni modeli so bili vzpostavljeni v kemijskih ali bioloških sistemih za preučevanje mehanizmov delovanja antioksidantov in za prepoznavanje novih antioksidantov. Modelni antioksidanti imajo bolj ali manj znan mehanizem delovanja, kot so lovljenje prostih radikalov, keliranje ionov ter vpliv na delovanje ali izražanje encimskih antioksidantov. Uporaba modelnih antioksidantov z znano kemijsko strukturo olajšajo natančno preučevanje delovanja antioksidantov (Lü in sod., 2010).

2.4.1 L-askorbinska kislina in dehidroaskorbinska kislina

L-askorbinska kislina (L-AK) je antioksidant, ki ga najdemo predvsem v sveži zelenjadi in sadju. Pri oksidaciji AK nastane L- dehidroaskorbinska kislina (DHA). Obe molekuli skupaj predstavlja vitamin C, saj se v organizmu v encimsko kataliziranih reakcijah lahko medsebojno pretvarjata. V celice se z različnimi transporterji lahko preneseta tako L-AK kot DHA. Znotraj celic se DHA reducira do AK, ki je antioksidant in deluje kot lovilec prostih radikalov (Welch in sod., 1995; Huang in sod., 2001; Burini, 2007). L-AK je nestabilna molekula in se hitro oksidira, kar rezultira v zmanjšanju antioksidativne moči. Dejavniki, kot so prisotnost bakrovih in železovih ionov, izpostavljenosti višjim temperaturam, prisotnost kisika in nevtralen ali bazičen pH pospešijo oksidacijo (Vitamin C, 2015).



Slika 1: Pretvorba askorbinske kisline (A) v dehidroaskorbinsko kislino (C) preko semidehidroaskorbinske kisline (B) (Burini, 2007)

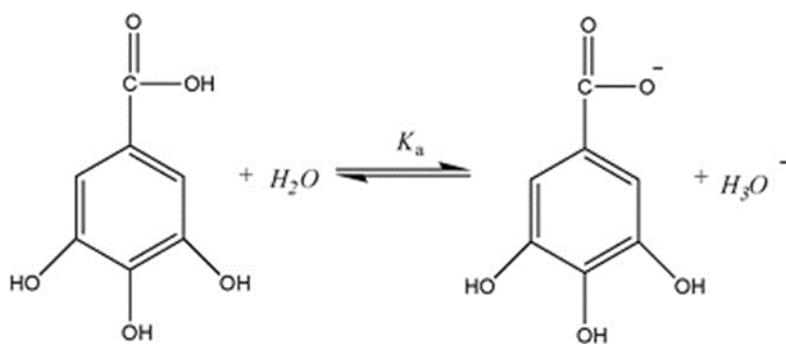
2.4.2 Epigalokatehin galat

Epigalokatehin-3-galat (EGCG) spojina galne kisline (GK) in epigalokatehina, ki sta povezana z estrsko vezjo med karboksilno in hidroksilno skupino (Burini, 2007). V širšem smislu ga uvrščamo med katehine. Med katehini je EGCG najbolj razširjen. V zelenem čaju predstavlja do ene tretjine vseh antioksidantov ($\approx 7 \text{ g}/100 \text{ g s.s.}$), medtem ko je v črnem čaju, zaradi tehnološkega postopka izdelave čaja, vsebnost bistveno nižja. Med fermentacijo pri postopku izdelave črnega čaja potekajo reakcije oksidacije in epimeriziraje do oligomernih teoflavinov (Schroeder in sod., 2009). Na potek reakcije imajo velik vpliv temperatura, pH, prisotnost kisika ter vsebnost antioksidantov in drugih komponent v čaju (Sang in sod., 2005).

2.4.3 Galna kislina

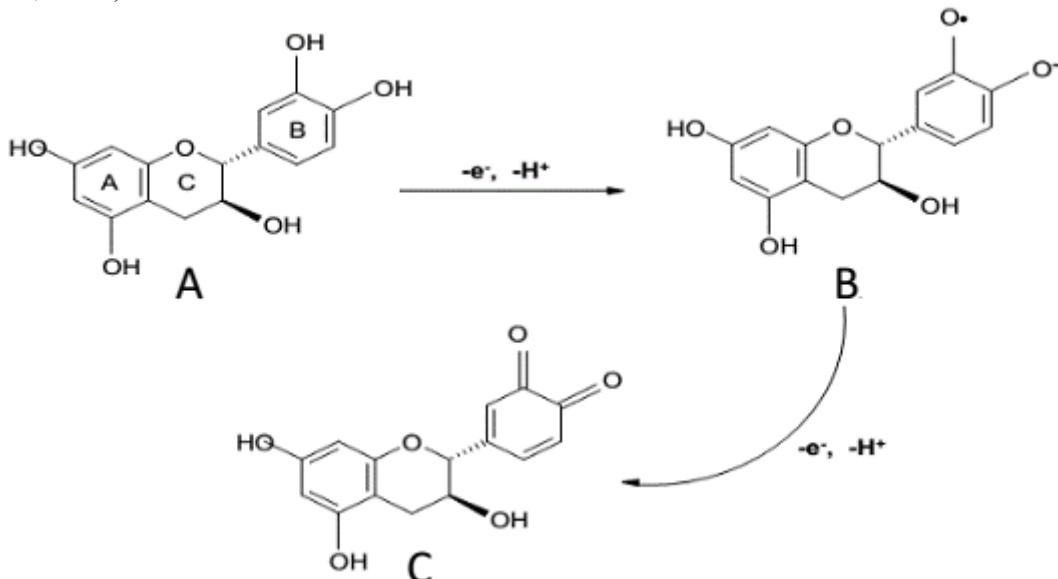
Galna kislina (GK) je po IUPAC nomenklaturi 3,4,5-trihidroksibenzojska kislina. GK je prisotna v mnogih rastlinah v prosti obliki ali v obliki estrov z drugimi fenolnimi spojinami in ogljikovimi hidrati (Gallic acid, 2015).

GK lahko v kislinsko baznih reakcijah izmenja štiri protone. pKa vrednost za karboksilno skupino je 4,0, za fenolne skupine pa 8,7, 11,4 in več kot 13. GK stopa v redoks reakcije in pri tem se tvorijo fenoksilni radikali, ki so stabilni v nevtralnem pH (Dwibedy in sod., 1999). Na potek oksidacije GK imajo velik vpliv redoks aktivni ioni. Potek oksidacije GK v prisotnosti Fe^{2+} ionov je odvisen od pH. Hitrost oksidacije je najmanjša pri pH 7, medtem ko se pri nižaju pH do 3 in višanju pH do 10 hitrost oksidacije povečuje (Strlic in sod., 2002).

Slika 2: Kisilinsko bazna disociacija $-COOH$ skupine v GK (Lu in sod., 2009)

2.4.4 Katehin

Katehin (KA) je del molekularne družine flavonoidov, podskupine flavan-3-olov. Najdemo ga v številnih rastlinah: v listih čajevca, rdečem vinu, čokoladi, jagodah in jabolkih. Rastlinam koristi predvsem kot antioksidativni polifenol, ki je sekundarni metabolit (Dixon in sod., 2005).



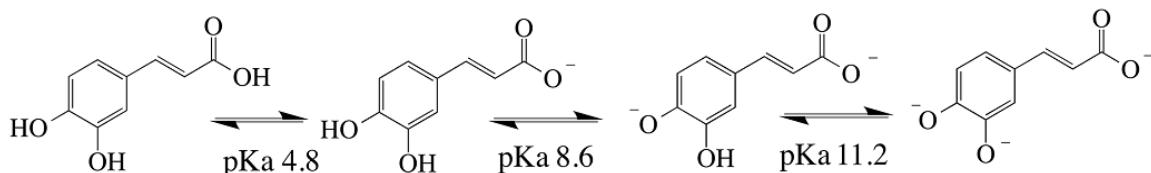
Slika 3: Strukturna formula katehina (A), semikinona (B) in kinona (C) (Janeiro in Oliveira Brett, 2004)

Katehin je sestavljen iz treh obročev. Na obroču C sta dva kiralna centra. Če sta OH skupina na obroču C in obroč B v trans položaju, se spojina imenuje katehin (ločimo (+)-catehin in (-)-catehin), če sta v trans konfiguraciji pa spojino imenujemo epikatehin (ločimo (+)-epikatehin in (-)-epikatehin). Aromatska obroča A in B imata strukturo resorcinola oziroma katehola. Zaradi večjega števila fenolnih skupin, ki lahko vstopajo v redoks reakcije, je potek oksidacije katehina kompleksen (Janeiro in Oliveira Brett, 2004). Predhodne raziskave so pokazale, da je AOP potencial katehina, ki so ga določili z DPPH testom, odvisen od izbora topila kakor tudi koncentracije katehina v testu (Goupy in sod., 2003).

2.4.5 Kavna kislina

Kavna kislina (KK) je fenolna spojina, ki se nahaja v kavnih zrnih. Številne raziskave nakazujejo protivnetno, anti-mutageno, antibakterijsko in anti-rakotvorno delovanje. Ugotovitve lahko povežemo z antioksidativnim delovanjem. V *in vitro* pogojih KK učinkovito kelira železove ione in s tem zmanjšuje nastanek hidroksilnih radikalov in

peroksidacijo lipidov. V testih s peroksidacijo lipidov deluje kot kovinski kelator ali donor vodika tako, da stabilizira peroksilni in alkoksilni radikal. Delovanje KK je neposredno povezano s pH raztopine. Višji kot je pH raztopine, večji je AOP. Poleg tega so potrdili antioksidativni potencial tudi v lipidnih membranah, kar nakazuje na učinkovitost v hidrofobnem okolju (Genaro-Mattos in sod., 2015).

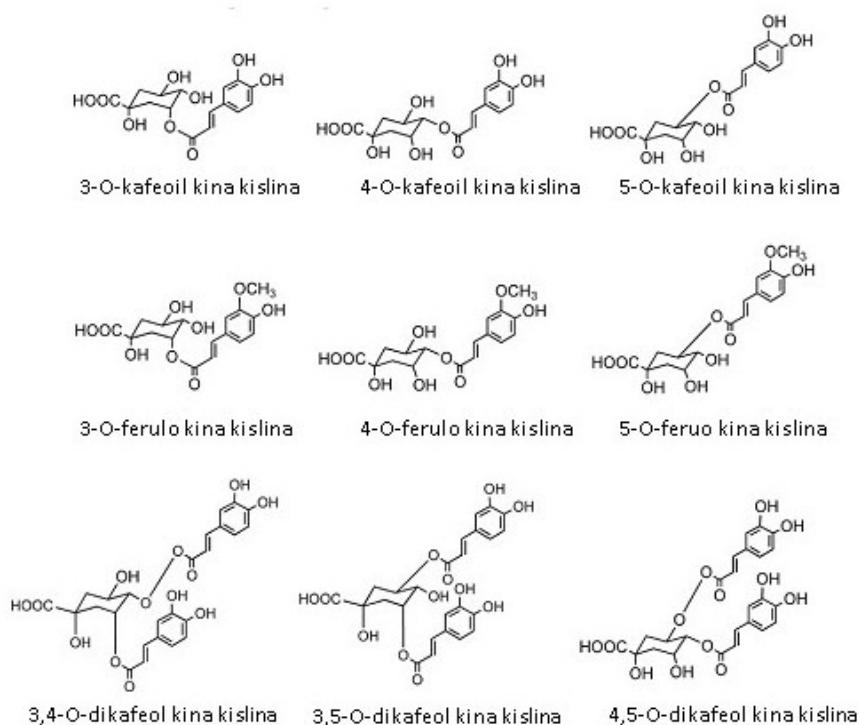


Slika 4: Deprotonacija in pKa vrednosti $-\text{COOH}$ in $-\text{OH}$ skupine v molekuli kavne kisline (Genaro-Mattos in sod., 2015)

Na sliki 4 so predstavljene štiri različne oblike KK; prevladujoča oblika je odvisna od pH raztopine. V modelnih sistemih so ugotovili, da je v KK v nevtralnem pH boljši antioksidant kot v bolj kislih raztopinah, kar so pripisali učinkovitejšemu keliranju Fe^{2+} ionov (Genaro-Mattos in sod., 2015).

2.4.6 Klorogenska kislina

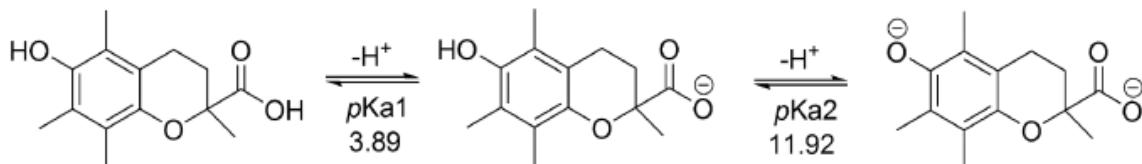
S pojmom klorogenske kisline (CQA) pogostokrat poimenujemo različne estre kavne in kina kisline, v nekaterih primerih tudi estre ferulne in p-kumarne kisline s kina kislino (Farah, 2012). V ožjem smislu s pojmom klorogenska kislina imenujemo 3-kafeoil kina kislino (CQA), ki je naravna snov, prisotna v številnih rastlinah in je intermediat v sintezi lignina (Clifford, 1999; Narita in Inouye, 2013). Poleg izomere na C3 kina kisline, so pogoste tudi izomere na C4 in C5, ki se lahko medsebojno pretvarjajo. V višjem pH okolju se 5-CQA hitreje razgrajuje pri tem nastajata izomerna produkta (3-CQA in 4-CQA). Vse tri strukture imajo podoben AOP (Stalmach in sod., 2006; Narita in Inouye, 2013).



Slika 5: Glavne oblike klorogenske kisline, ki se nahajajo v kavi (Stalmach in sod., 2006)

2.4.7 Troloks

Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kislina) je vodotopna spojina, ki ima podobne lastnosti kot vitamina E, saj se od alfa-tokoferola razlikuje le po tem, da nima alkilnega repa, ampak karboksilno skupino, ki poveča hidrofilnost. Uporablja se v bioloških ali biokemičnih poskusih kot referenčna snov za določanje AOP (Alberto in sod., 2013).

Slika 6: Deprotonacija in pKa vrednosti $-COOH$ in $-OH$ skupine v molekuli Troloksa (Alberto in sod., 2013)

Mehanizem, s katerim Troloks reagira z radikali, je odvisen od kemijskega okolja, ki ima tudi manjši vpliv na hitrost reakcije z radikali (Alberto in sod., 2013).

2.5 METODE ZA DOLOČANJE ANTOOKSIDATIVNEGA POTENCIALA

Pojem antioksidativni potencial se nanaša na sposobnost spojine ali sistema pretvoriti oksidante (npr. radikale) v manj oz. nereaktivne oblike. AOP spojin ali kompleksnih mešanic največkrat ovrednotimo s spojinami, ki fluorescirajo ali absorbirajo v vidnem delu spektra, kar pomeni, da za eksperimentalno delo ne potrebuje drage opreme. Metode so lahko indirektne, kot je npr. ORAC (oxygen radical absorbance capacity), kjer je tarčna molekula protein fluorescein, ki se v prisotnosti radikalov, ki jih generiramo v testni raztopini, razgradi in fluorescenca se zmanjša. Uveljavila se je tudi metoda, ki temelji na razbarvanju β -karotena v prisotnosti linolenske kisline, ki je vir radikalov. Če takšnim mešanicam dodamo

antioksidante, ti stabilizirajo radikale in posledično je hitrost razgradnja tarčna molekule zmanjšana (Huang in sod., 2005).

AOP se lahko še enostavneje določi v primerih, ko antioksidanti direktno reagirajo s prostimi radikali ali drugimi oksidanti, katerih molarni absorbcijski koeficient se spremeni po reakciji z antioksidanti. Med največkrat uporabljenimi probami sta kromogena radikala 2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonska kislina) (ABTS) in 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), katerima se po redukciji zmanjša absorbanca v vidnem delu spektra. V splošnem lahko med metode za določevanje AOP uvrščamo tudi Folin-Ciocalteau metodo, kjer se kot posledica redukcije molibdatov in volframativov poveča absorbanca v vidnem delu spektra. Tako FC metoda kot metode s kromogenimi radikalni v alkoholnih in vodnih raztopinah temeljijo na prenosu elektrona (ET) od antioksidanta na oksidant (Huang in sod., 2005).

2.5.1 Spektrofotometrično določanje AOP z ABTS radikalom

Oksidiran modro-zelen ABTS radikal se doda v reakcijsko mešanico v prisotnosti lipofilnih kot tudi hidrofilnih antioksidantov. Antioksidant odda vodikov atom, posledično se ABTS reducira in s tem se reakcijska mešanica razbarva. Razbarvanje reakcijske mešanice se meri spektrofotometrično pri absorpcijskem maksimumu radikala pri valovnih dolžinah 414, 645, 734 in 815 nm (Huang in sod., 2005; Chanda in Dave, 2009; Alam in sod., 2013). Na višino signala vplivajo različni dejavniki, kot so: koncentracija antioksidanta, kovinski ioni in sestava topila (Dawidowicz in Olszowy, 2011). Končne rezultate lahko izrazimo kot TEAC (Trolox Equivalent Antioxidative Capacity), vrednost TEAC predstavlja koncentracijo modelnega antioksidanta, Troloksa, ki ima enak učinek kot preiskovani antioksidant pri izbrani koncentraciji (Huang in sod., 2005; Chanda in Dave, 2009; Alam in sod., 2013).

2.5.2 Spektrofotometrično določanje AOP z DPPH radikalom

Oksidiran DPPH radikal z nesparjenim delokaliziranim elektronom je v raztopini vijolično obarvan. Ob dodatku DPPH radikala v reakcijsko mešanico z antioksidantom, le-ta odda vodikov atom, posledično se DPPH reducira v $DPPH_2$ in s tem se reakcijska mešanica razbarva. Absorbanca se meri spektrofotometrično pri absorpcijskem maksimumu v območju valovnih dolžin med 517 in 520 nm (Chanda in Dave, 2009; Alam in sod., 2013). Končne rezultate lahko izrazimo kot ekvivalent Troloksa. Pomanjkljivost DPPH metode je razpad radikala, kar vpliva na nižji končni signal v reakcijski mešanici. Xie in Schaich (2014) menita, da se pri tej metodi precenjuje aktivnost polifenolov in podcenjuje monofenole (Xie in Schaich, 2014).

2.5.3 Spektrofotometrično določanje fenolnih spojin s Folin-Ciocalteu reagentom

FC reagent vsebuje fosfomolibdate in fosfovolfamate. V alkalni reakcijski mešanici fenolne spojine reducirajo Mo(VI) v Mo(V). Posledično nastane kompleks, ki modro obarva reakcijsko mešanico. Absorbanca nastalega kompleksa v reakcijski mešanici se izmeri spektrofotometrično pri valovni dolžini 765 nm. Prednosti metode so: nizki stroški, dostopnost reagenta, preprosta izvedba eksperimentalnega dela, pri vzorčenju se pojavi manj motenj in podatki se lahko primerjajo s literaturo (Berker in sod., 2013).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorci

Preglednica 1: Vzorci uporabljeni v nalogi

Izdelek	Opis	Rok uporabe	Lot	Proizvajalec	Masa	Ostalo
Gvatemala Finca La Providencia	Pražena kava (100 % <i>C. arabica</i>)	02.2016 Praženje: 16.03.2015	15/05	Katja Turk Escobar s.p. Grilcev grič 12 1360 Vrhnika	100 g	Regija: Okolica jezera Atitlan Nadmorska višina: 1500 – 1700 m Vrsta: Bourbon, Typica, Caturra
Gvatemala Finca La Providencia	Nepražena kava (100 % <i>C. arabica</i>)					
Green Tea	zeleni čaj	04.2017	CH:927867 L 09 KZ	Winston tea company LTD London E10 6Y PO BOX 54433	20 x 1,75g = 35 g	Fenoli (prisotni v čaju) 95 mg/čajno vrečko
						Fenoli (prisotni v čaju) 80 mg/čajno vrečko
Brusnifem	uprašeni plodovi brusnice Cran Max	02.2018	06718	Medex d.o.o. Linhartova cesta 49 A 1000 Ljubljana	30 x 350 mg = 10,5 g	Uprašeni plodovi brusnice Cran Max 71 % 1 kapsula vsebuje 250 mg izvlečka brusnic
Cranberry kapseln	izvleček brusnic z vitaminom C	11.2017	L4302/2	Sunlife Produktions- und Vertriebsgesellschaft mbH Schierbusch 3 D-33161 Hövelhof	60 x 524 mg = 31,44 g	Izvleček brusnic 57 %, L-askorbinska kislina 1 kapsula vsebuje 300 mg izvlečka brusnic 18 mg proantocianov 100 mg vit C
Fructal superior	100 % jabolčni sok iz zgoščenega sadnega soka	14.07.16 (21:12)		Fructal d.d. Tovarniška cesta 7 5270 Ajdovščina	200 ml	Pasteriziran 100 % jabolčni sok iz zgoščenega sadnega soka
Union	svetlo pivo Union	17.12.2015 (19:05)	171214	Pivovarna Union d.d. Pivovarniška 2 1000 Ljubljana	0,33 l 4,9% vol	Voda, ječmenov slad, ječmen, hmelj

3.1.1.1 Priprava nepražene in pražene kave za test

Vzorca kave sta identična, razlikujeta se v toplotni obdelavi (praženju) zrn. Vzorce kave smo dobili v pražarni Escobar na Vrhniki, kjer so nam kavo tudi spražili. S pomočjo analitičnega mlina smo cela zrna kave zmleli in sejali skozi sito, da smo dobili delce enake velikosti. Po sejanju smo vzorce prenesli v 50 ml falkonke in prepihalni z dušikom. Falkonko z vzorcem smo skladiščili v zamrzovalniku na -80 °C do uporabe. S hlajenjem vzorca in posod za mletje z ledom ter kratkim časom priprave mletega vzorca smo skušali zmanjšati oksidacijo vzorca.

Najprej smo stehitali prazno čašo z magnetnim mešalom za kasnejši izračun dodane mQ vode. V prazno čašo smo zatehtali 6 g pražene ali nepražene kave. Sočasno smo v drugi čaši segrevali mQ vodo do vretja. Vrelo mQ vodo (cca 110 ml) smo prelili v čašo z vzorcem ter jo takoj postavili na magnetno mešalo, kjer se je vsebina mešala 5 minut pri 300 obratih na

minuto. Izparevanje vode iz čaše smo preprečili z pokritjem čaše z uporabo urnega stekla. Po končanem mešanju vzorca, smo celotno čašo s vsebino stehtali. Iz razlike mas polne čaše s kuhanjo kavo in prazne čaše z mešalom in vzorcem smo izračunali količino dodane mQ vode v čašo. Po tehtanju sledi filtracija vzorca skozi filtrirni papir, kjer smo prvi tok (20-30 s) filtrata zavrgli in v centrifugirko ulovili drugi tok. Celoten postopek, od kuhanja vzorca do filtrata v centrifugirki je potekal največ 6 min (5 min kuhanja in 1 min filtriranja +/- 30 s). Za sklop analiz smo filtrat zmeraj sveže pripravili in ga v roku 1 ure v analizi uporabili.

3.1.1.2 Priprava črnega in zelenega čaja za test

Vzorca črnega in zelenega čaja sta bila kupljena v izbrani trgovini. Iz čajnih vrečk smo vsebino prenesli v terilnico in dodatno vzorec zdrobili. Po drobljenju smo vzorec prenesli v 15 ml falkonke in vzorec v falkonki prepihalo z dušikom. Falkonke z vzorcem smo skladiščili v zamrzovalniku na -80 °C do uporabe. Čas priprave, od mletja do skladiščenja vzorcev v zamrzovalniku ni presegel ene ure.

Kot smo opisali v drugem odstavku poglavja 3.1.1.1. pri pripravi kave za test, smo po istem postopku pripravili črni in zeleni čaj za test. Postopek se je razlikoval v zatehti vzorca. V čašo smo zatehtali 1 g črnega ali zelenega čaja.

3.1.1.3 Priprava svetlega piva in jabolčnega soka za test

Vzorce smo skladiščili po priporočilih proizvajalca. Za poskus smo vedno na novo odprli embalažo svetlega piva ali jabolčnega soka. Iz sveže odprte embalaže smo prenesli 2 ml vzorca v centrifugirko. Vzorec smo v roku 1 ure v analizi uporabili.

3.1.1.4 Priprava prehranskega dopolnila z brusnicami za test

Vzorec prehranskega dopolnila smo skladiščili po priporočilih proizvajalca. V 15 ml falkonko smo zatehtali določeno količino prehranskega dopolnila in dodali mQ vodo. Končna koncentracija prehranskega dopolnila v falkonki je 10 mg/ml. Suspenzijo vzorca smo 2 minuti mešali na vrtinčniku, 3 minute v ultrazvočni kopeli in 1 minuto smo falkonko v roki močno pretresli. Po mešanju smo vsebino v falkonki centrifugirali za nekaj sekund in zatem z uporabo brizge izvedli filtracijo skozi 0,45 µm filter. Filtrat smo ujeli v centrifugirko in ga v roku ene ure uporabili v analizi.

3.1.2 Modelni antioksidanti

Preglednica 2: Modelni antioksidanti uporabljeni v nalogi

Modelni antioksidant	Proizvajalec	Čistost reagent	EC številka
(-)-Epigalokatehin galat (teavigo)	DSM Food Specialties B.V.	≥80 % (HPLC)	/
(+)-Katehin hidrat	Sigma-Aldrich	≥98 % (HPLC)	205-825-1
Kavna kislina	Sigma-Aldrich	≥98 % (HPLC)	206-361-2
Klorogenska kislina (hemihidrat)	Aldrich (Fluka)	≥98 % (T)	206-325-6
Dehidroaskorbinska kislina	Sigma-Aldrich	≥65 %	207-720-6
Galna kislina (monohidrat)	Sigma-Aldrich	≥98 %	205-749-9
L-Askorbinska kislina	Sigma-Aldrich	/	200-066-2
Troloks	Sigma-Aldrich	97 %	258-422-8

Izhodno raztopino modelnih antioksidantov v metanolu s koncentracijo 5 mmol/l smo pripravili v falkonki. Pripravljene raztopine smo hranili v zamrzovalniku na -20 °C do uporabe. Raztopine Troloksa, AK in DHA smo pripravili po prilagojeni metodi. Troloks smo raztopili v w/v 10 % EtOH in dodali mQ vodo do koncentracije Troloksa 1 mmol/l. Raztopini

AK in DHA smo zaradi reaktivnosti pripravili sveži pred poskusom. AK smo raztopili v mQ vodi pri koncentraciji 5 mmol/l. DHA smo raztopili v zmesi 10 mM fosfatnega pufra pH 7,4 in mQ vode (1:1, v/v) pri koncentraciji 10 mmol/l. Pred uporabo smo vse modelne antioksidante ustrezno redčili v mQ vodi do željene koncentracije.

3.1.3 Reagenti in topila

Preglednica 3: Reagenti uporabljeni v nalogi

Reagent	Proizvajalec	Čistost reagent	EC številka
ABTS	Sigma-Aldrich	≥98 % (HPLC)	250-396-6
DPPH	Sigma-Aldrich	/	217-591-8
Etanol	Sigma-Aldrich	96 % (v/v)	200-578-6
Fe ₂ SO ₄ * 7 H ₂ O	Merck	/	1.03965.0500
Folin-Ciocalteu reagent	Sigma-Aldrich	/	47641-100ML-F
NaOH	Merck	98 %	011-002-00-6
Manganov dioksid (MnO ₂)	Kemika	85-90 %	/
Metanol	Merck	/	200-659-6
mQ H ₂ O	/	/	/
Natrijevev karbonat	Merck	100 %	207-838-8
Ocetna kislina	Merck	100 %	200-580-7
Natrijev hidrogen fosfat-dihidrat	Merck	/	1.06342.0250

3.1.3.1 Priprava fosfatnega in acetatnega pufra

Postopka priprave fosfatnega in acetatnega pufra sta podobna. V čašo smo zatehtali ustrezno količino NaH₂PO₄ oz. ocetne kisline in dodali mQ vodo do skupnega volumena 400 ml. S NaOH smo uravnnavali pH. Raztopino z uravnanim pH smo prelili v 500 ml bučko in do oznake dopolnili z mQ vodo ter dobro premešali. Po mešanju smo vsebino iz bučke prenesli v schot steklenico in steklenico shranili na sobni temperaturi do uporabe. Z opisanim postopkom smo pripravili 100 mM raztopino fosfatnega pufra s pH 7,4 oz. 500 mM raztopino acetatnega pufra s pH 5,0, ki smo ju pred poskusom z mQ vodo razredčili v razmerju 1:10.

3.1.3.2 Priprava delovne raztopine Folin-Ciocalteu reagenta

Iz steklenice, v kateri je FC reagent, smo odmerili določen volumen in v redčili z mQ vodo v razmerju 1:2. Raztopino smo uporabili v roku 1 ure (Hodnik, 2014).

3.1.3.3 Priprava 20 % Na₂CO₃

V falkonko smo zatehtali 6 g Na₂CO₃ in dodali 24 g mQ vode. Raztopino v falkonki smo dobro premešali in skladiščili na sobni temperaturi do uporabe (Hodnik, 2014).

3.1.3.4 Priprava DPPH reagenta

4 mg DPPH reagenta smo stehitali v falkonko in dodali 10 ml metanola. Tako smo pripravili izhodno raztopino s koncentracijo reagenta ≈ 1 mM. Z redčenjem izhodne raztopine z metanolom in spektrofotometričnim določanjem absorbance pri 520 nm smo pripravili delovno raztopino z absorbanco ≈ 2. V test smo dodali polovični volumen raztopine radikala glede na celotni volumen reakcijske mešanice, posledično je bila absorbanca vzorca ≈ 1,0 (Hodnik, 2014).

3.1.3.5 Priprava ABTS reagenta

V čašo smo zatehtali 25 mg ABTS reagenta in 70 mg MnO₂ in dodali 10 ml mQ vode. Vsebino v čaši smo eno uro mešali v odsotnosti svetlobe. Sledi centrifugiranje raztopine za nekaj sekund in filtracija skozi 0,45 µm filter v novo falkonko. Pripravljeno raztopino smo shranili v hladilniku do uporabe. Z redčenjem izhodne raztopine z mQ vodo in spektrofotometričnim določanjem absorbance pri 734 nm smo pripravili delovno raztopino z absorbanco ≈ 2. V test smo dodali polovični volumen raztopine radikala glede na celotni volumen reakcijske mešanice. Posledično je bila absorbanca vzorca ≈ 1,0 (Hodnik, 2014).

3.1.3.6 Priprava železovega sulfata heptahidrata

V falkonki smo pripravili izhodno raztopino Fe₂SO₄ z mQ vodo pri koncentraciji 2 mmol/l. Pripravljeno raztopino smo hranili na sobni temperaturi in pred uporabo ustrezeno redčili z mQ vodo do želene koncentracije.

3.1.4 Laboratorijska oprema

Aparature:

- analitska tehnicka,
- analitski mlin (IKA, A 11 basic),
- centrifuga 1 (Domel, Tehnica Centric 322B),
- centrifuga 2, (Tegtbuca Cebtric 200),
- hladilnik (+ 4 °C),
- kuhalnik,
- laboratorijska zamrzovalnika (-20 °C in -80 °C).
- ledomat,
- lij,
- pH meter,
- tehnicka (Exacta 2200 EB),
- termostatski blok,
- UV-VIS spektrofotometra (HP, Agilent 845 in Varian Cary, 100 bio) in
- vrtinčnik.

Ostala laboratorijske oprema:

- avtomatske pipete (Eppendorf ; 2,5-5 µl, 10-100 µl, 0,1-1 ml in 0,5-5 ml),
- brizge,
- centrifugirke (15 ml in 50 ml, TPP),
- čaše (SCHOTT/SIMAX, 10 ml in 250 ml),
- dušikova bomba (N₂),
- filter (Sartotius stedim 0,20 µM),
- filtrni papir (Sartotius stedim, 125mm 84 g/m²),
- kapalke,
- kivete (Brand, 1,5 ml makro PS),
- kvarčne kivete s pokrovčki (1 ml),
- magnetno mešalo,
- mikrocentrifugirke (1,5 ml in 2 ml),
- schot steklenica (500 ml),
- sito,

- škarje,
- štoparica,
- T.I.P.S. (Eppendorf, Standard Bulk),
- terilnice,
- urno steklo in
- žličke.

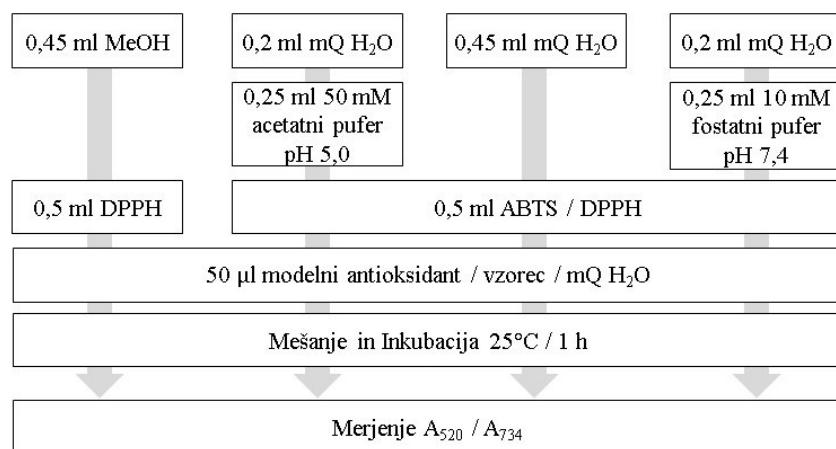
3.2 METODE DELA

3.2.1 Izvedba testov za določevanje AOP

3.2.1.1 ABTS in DPPH testa

Za določanje AOP smo v 1,5 ml mikrocentrifugirko odpipetirali 0,5 ml raztopine radikala ABTS ali DPPH z absorbanco ≈ 2 . Poleg radikalov smo v reakcijsko mešanico dodali ustrezena topila. Skupen volumen dodanih topil je bil v vseh primerih 0,45 ml. Uporabljena topila v DPPH testu so bila 0,2 ml mQ vode in 0,25 ml acetatnega pufra pH 5; 0,2 ml mQ vode in 0,25 ml fosfatnega pufra pH 7,4; 0,45 ml metanola ali 0,45 ml mQ vode. Uporabljena topila v ABTS testu so bila 0,2 ml mQ vode in 0,25 ml acetatnega pufra pH 5; 0,2 ml mQ vode in 0,25 ml fosfatnega pufra pH 7,4 ali 0,45 ml mQ vode. Koncentracije uporabljenih pufrov so opisane v poglavju 3.1.3. Tako pripravljeni zmesi (volumen = 0,45 ml) smo dodali raztopino radikala (0,5 ml) in na vrtinčniku premešali. Zatem smo dodali 50 μ l ustrezeno razredčenega vzorca, ustrezeno razredčenega modelnega antioksidanta ali mQ vode v primeru kontrolnega vzorca in takoj ponovno premešali na vrtinčniku. Skupni volumen reakcijske mešanice je bil vedno 1 ml.

Po dodatku standarda/vzorca smo začeli meriti čas. Mikrocentrifugirke smo takoj postavili v termoblok na temperaturo 25 °C in v temi inkubirali 1 uro. Po inkubaciji (60 ± 3 min) od dodanega vzorca/standarda smo vsebino v mikrocentrifugirki prenesli v ozke polistirenske kivete in pomerili absorbanco pri valovni dolžini 734 nm za ABTS (A_{734}) in pri 520 nm za DPPH (A_{520}). Rezultat smo podali kot razliko med absorbanco kontrolnega vzorca in absorbanco vzorca (dA).

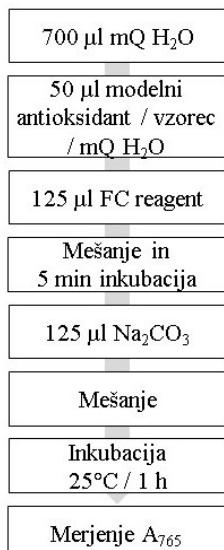


Slika 7: Shematski prikaz priprave vzorcev z ABTS in DPPH metodo

3.2.1.2 Folin-Ciocalteau test

Pri FC testu smo v vsako 1,5 ml mikrocentrifugirko odpipetirali 0,7 ml mQ vode in 50 µl raztopine standarda/vzorca ali mQ vode v primeru slepe probe ter premešali na vrtinčniku. Tako pripravljeni raztopini smo dodali 125 µl FC reagenta (priprava v poglavju 3.1.3) in ponovno premešali. Raztopino smo takoj prenesli v termoblok (25 °C) in inkubirali 5 min. Po petih minutah smo dodali 125 µl 20 % raztopine Na₂CO₃, premešali na vrtinčniku in inkubirali še 55 min v termobloku pri 25 °C. Po inkubaciji (60 ± 3 min) od dodanega vzorca/standarda smo reakcijsko mešanico prenesli v ozko polistirensko kiveto in pomerili absorbanco pri 765 nm (A₇₆₅). Instrument smo predhodno umerili na nič z mQ vodo.

Zaradi boljšega razumevanja reakcije FC reagenta z antioksidantom smo naredili umeritveno krivuljo pri različnih koncentracijah železovega(II) sulfata. Železov(II) sulfat je komercialno dostopen v obliki železovega sulfata heptahidrata. Značilnost železovega(II) iona je sposobnost oddaje enega elektrona pri tem se Fe(II) v vodnem okolju oksidira v Fe(III) (Génin in sod., 1996). Absorbanco smo spektrometrično izmerili in rezultate grafično uredili. Iz grafa smo odčitali naklon premice, le-tega smo primerjali s naklonom premice posamezne umeritvene krivulje modelnih antioksidantov. Iz kvocienta naklonov premic smo izračunali prenos elektronov.



Slika 8: Shematski prikaz priprave vzorcev z Folin-Ciocalteau metodo

3.2.2 Optimizacija razredčitev vzorcev v testih za določevanje AOP

Vzorci živil, ki smo jih analizirali, so vsebovali različne koncentracije antioksidantov. Za določevanje AOP smo uporabljali različne teste in v okviru posameznega testa tudi različna topila. Ker je reaktivnost antioksidantov odvisna od izbranega testa in kemijskega okolja, v katerem reakcija poteka, smo za posamezne vzorce živil optimizirali razredčitve vzorcev, da bi prišli v ustrezeno merilno območje. Razredčitve smo optimizirali tako, da je bila končna absorbanca po 60 minutni inkubaciji vzorcev v ABTS in DPPH testih med 30 % in 70 % absorbance, ki smo jo določili za kontrolni vzorec. Izjemo je predstavljala le meritev pri DPPH testu v prisotnosti pufra pH 7,4, kjer smo razredčitev optimizirali tako, da je bila absorbanca med 65 % in 85 % absorbance, ki jo je imel kontrolni vzorec (razlogi bodo pojasnjeni kasneje). Pri FC testu smo razredčitve optimizirali tako, da je bila absorbanca raztopine vzorcev, od katere smo odšteli absorbanco kontrolnega vzorca pri 765 nm v

območju od 0,2 do 0,5. Ustrezne razredčitve za posamezne vzorce so prikazane v preglednici 4. Razredčitve, ki smo jih ugotovili v postopku optimizacije, smo kasneje uporabili za določevanje AOP posameznih vzorcev. Meritve, ki so prikazane v sekiji rezultati, predstavljajo povprečje treh neodvisnih eksperimentov. Pri tem je kot neodvisen eksperiment mišljeno kuhanje kave/čaje, na novo odprta steklenica piva/soka iz iste serije, ali na novo raztopljeni tabletta prehranskega dopolnila. Pri vsakem od neodvisnih eksperimentov smo imeli za kontrolni vzorec 3 paralelke in za posamezen vzorec 2 paraleki v okviru posameznega testa (npr. DPPH v metanolu).

Preglednica 4: Razredčitve vzorcev pri izvedbi ABTS, DPPH in FC testov; koncentracija je izražena kot masa suhe snovi (v g) na 1 raztopine

Vzorci	Koncentracija vzorca (g/l)	Končna razredčitev vzorca v testu (1:X)							
		DPPH				ABTS			FC
		MeOH	H ₂ O	pH 5,0	pH 7,4	H ₂ O	pH 5,0	pH 7,4	H ₂ O
Črni čaj	10,0 ± 0,4	300	300	500	500	700	500	700	300
Zeleni čaj	9,7 ± 0,2	400	400	700	400	700	700	1000	400
Pražena kava	58,9 ± 1,5	500	500	1000	1000	1000	1000	1500	500
Nepražena kava	58,4 ± 0,3	500	500	800	800	500	500	800	500
Svetlo pivo	/	40	40	40	80	80	150	150	80
Jabolčni sok	/	60	60	60	80	40	80	150	60
PD z vit. C	10,0	750	750	750	750	1000	750	1000	1000
PD brez vit. C	10,0	20	20	20	20	40	40	40	20

3.2.3 Priprava umeritvenih krivulj z modelnimi antioksidanti za določevanje AOP

Za pripravo umeritvenih krivulj smo ustrezno razredčili raztopine modelnih antioksidantov. Potek eksperimentalnega dela je bil enak, kot je opisano v poglavju 3.2.1. Postopek se razlikuje edino v tem, da smo pri pipetiranju standardnih raztopin z volumni manjšimi od 50 µl razliko do tega volumna nadomestili z mQ vodo. Na osnovi opravljenih meritev smo pripravili umeritvene krivulje, ki so predstavljene v obliki prilog (priloga E do K). Potrdili smo linearno odvisnost absorbance od koncentracije in določene naklone uporabili za primerjavo antioksidativnega potenciala posameznih antioksidantov v odvisnosti od testa in izbranega topila. Območje koncentracij (µmol/l) antioksidantov v posameznih testih so prikazani v preglednici 5.

Preglednica 5: Območje koncentracij modelnih antioksidantov v ABTS, DPPH in FC testih

Okolje poskusa		Območje koncentracij (µmol/l) modelnih antioksidantov							
		AK	EGCG	GK	DHA	KA	KK	CQA	Troloks
DPPH	MeOH	4-40	1,4-7	2,6-13	100-500	3-15	8-40	6-30	5-35
	mQ H ₂ O	4-40	1,4-7	2,6-13	100-500	3-15	8-40	6-30	5-35
	pH 5,0	4-40	1,4-7	2,6-13	100-500	3-15	8-40	6-30	5-35
	pH 7,4	4-40	0,8-4	2,6-13	20-200	1,6-8	3-15	2-10	5-35
ABTS	mQ H ₂ O	4-40	1,4-7	1,6-8,0	100-500	1,6-6,4	8-40	6-30	5-35
	pH 5,0	4-40	0,8-4	1,6-8,0	100-500	1,6-6,4	8-40	6-30	5-35
	pH 7,4	4-40	0,8-4	1,6-8,0	20-200	1,6-6,4	8-40	4-20	5-35
FC	mQ H ₂ O	4-40	3-15	6-30	10-100	3-15	3-15	6-30	5-35

3.2.4 Analiza kinetičnega poteka reakcije antioksidantov v vzorcih za ABTS in DPPH testa

Kinetičen potek reakcije antioksidantov z radikaloma ABTS (mQ voda, fosfatni pufer pH 7,4) in DPPH (metanol, fosfatni pufer pH 7,4) smo kontinuirno spremljali s spektrofotometrom Varian Cary 100 BIO pri 25 °C (termostatirana celica). Raztopine radikalov in ustreznih pufrov smo pripravili, kot je opisano v poglavju 3.1.3. Raztopine, ki niso vsebovale vzorca (0,95 ml), smo v kvarčnih kivetah s pokrovčkom inkubirali 10 min. Že pred dodatkom vzorca smo pričeli z merjenjem absorbance. Po 10 min smo kvarčne kivete vzeli iz termostatirane celice in dodali 50 µl ustrezeno razredčenega vzorca, vsebino dobro premešali in takoj vstavili v termostatirano celico. Po dodatku vzorca smo še 240 min spremljali absorbanco pri izbrani valovni dolžini. Interval merjenja je bil 25 sek.

Preglednica 6: Razredčitve pri kinetičnih meritvah

Vzorec	Razredčitveni faktorji	Metoda
Zeleni čaj*	1:1600	ABTS*
	1:1000	DPPH**
Nepražena kava*	1:1600	ABTS*
		DPPH**
Svetlo pivo**	1:300	ABTS*
	1:200	DPPH**
Jabolčni sok**	1:250	ABTS*
	1:150	DPPH**
Prehransko dopolnilo brez vit. C*	1:40	ABTS*
	1:20	DPPH**

*vzorec vsebuje 10 mg s.s./ml

**nerazredčena pičača

3.2.5 Določanje vode v zračni sušini

Praženi, nepraženi kavi, črnemu in zelenemu čaju smo določili zračno sušino. Zračno suhe vzorce smo v treh paralelkah stehtali v predhodno posušene tehtiče. Vzorce smo sušili pri 105 °C do konstantne mase, jih ohladili v eksikatorju in ponovno stehtali. Iz razlike mas smo izračunali suho snov v vzorcu (Plestenjak in Golob, 2003).

$$Vsebnost\ suhe\ snovi(g/100g) = \frac{b}{a} \cdot 100 \quad \dots(1)$$

a = odtehta vzorca (g)

b = masa vzorca po sušenju (g)

Vsebnost suhe snovi pri zelenem in črnem čaju je bila v povprečju 95,16 % in 94,69 %, medtem ko je bila pražena kava skoraj popolnoma suha (99,05 %). Nepražena kava je med vsemi vzorci vsebovala največ vode (9,86 %).

3.2.6 Statistična obdelava podatkov

Rezultate različnih analiz smo zbrali in jih uredili s programom Microsoft Office EXCEL 2013. Podatke smo ovrednotili z naslednjimi statističnimi parametri.

- aritmetična sredina – povprečje,
- standardni odklon od vzorca in populacije,
- koeficient variacije,
- Pearsonov koeficient korelacije in
- koeficient determinacije.

Aritmetična sredina je definirana kot kvocient med vsoto vseh vrednosti spremenljivk in skupnim številom enot. Izračunamo jo za številske spremenljivke, ki so približno normalno porazdeljene (Adamič, 1995).

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \times \sum_{i=1}^n x_i \quad \dots(2)$$

\bar{x} = aritmetična sredina

N = število vseh enot x_i

$\sum x_i$ = vsota vseh števil

Standardni odklon v statistiki pove razpršenost vrednosti v populaciji. Definiran je kot kvadratni koren variance. Poznamo dva standardna odklona, σ (sigma) odklon celotne populacije ali njene naključne spremenljivke in s (odklon od vzorca) odklon posameznega vzorca statistične populacije (Adamič, 1995). V magistrskem delu smo uporabili odklon od vzorca.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N}} \quad \dots(3)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}} \quad \dots(4)$$

σ = odklon od celotne populacije

s = odklon od vzorca

N = število vseh enot x_i

x_i = i-ta enota od populacije

\bar{x} = aritmetična sredina populacije

Koefficient variacije se nanaša na razmerje med standardnim odklonom (SD) in aritmetično sredino in to izrazimo kot odstotek (Adamič, 1995).

$$KV(\%) = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \quad \dots(5)$$

KV = koefficient variacije

SD = standardni odklon, varianca

\bar{x} = aritmetična sredina

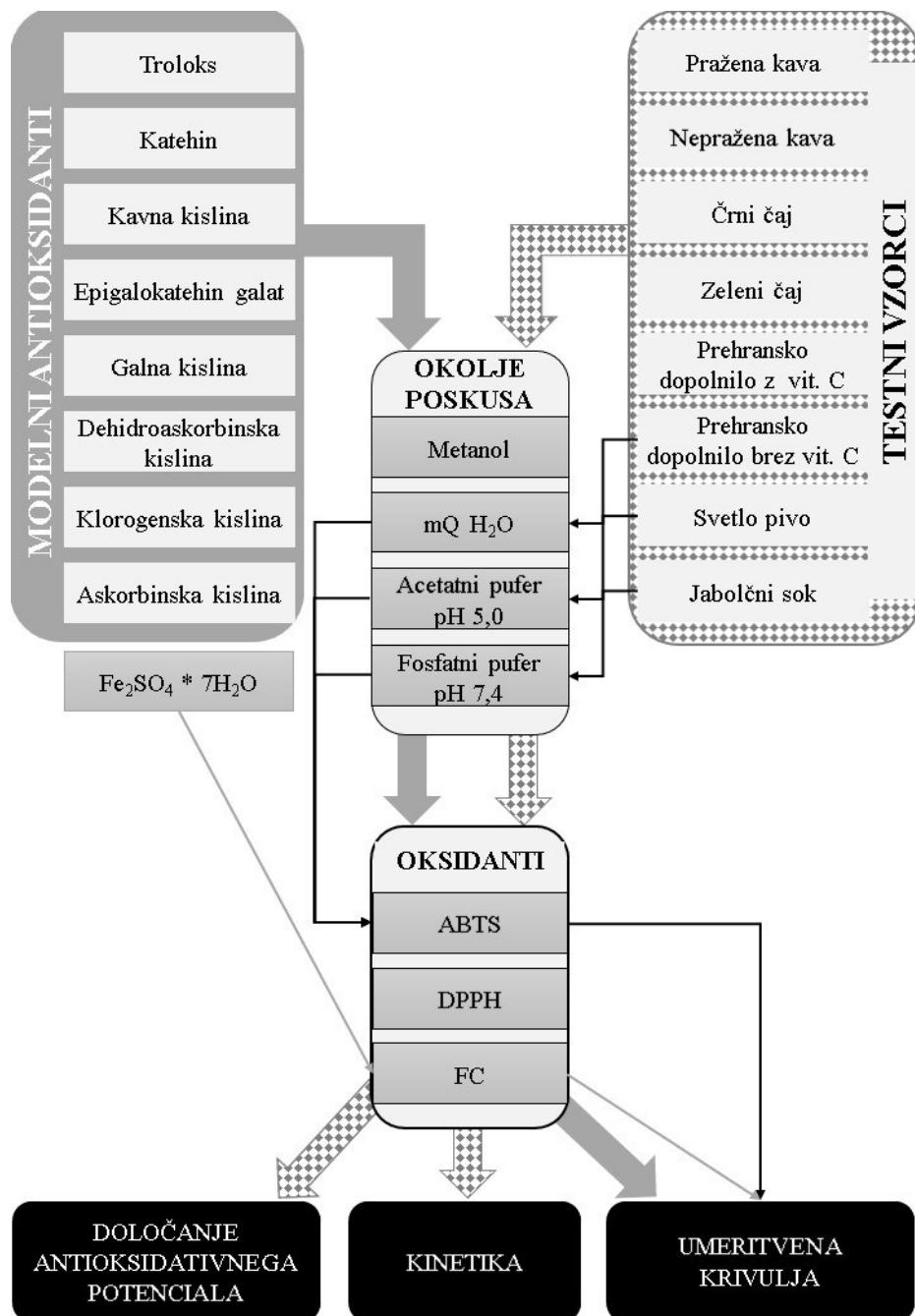
Z metodo regresije in korelacije preučujemo medsebojno zvezo dveh spremenljivk. O regresiji govorimo, kadar imamo neodvisno spremenljivko (y), ki jo v naprej določimo in odvisno spremenljivko, ki jo opisuje matematična funkcija $y = f(x)$. Regresijska analiza se v grafični obliki predstavlja kot linearна funkcija (Adamič, 1995). Korelacija je statistična metoda za analizo dveh spremenljivk, ki sta neodvisni med seboj. V magistrskem delu smo izbrali enačbo Pearsonovega korelačijskega koeficiente, ki je merilo linearne povezave med dvema spremenljivkama. Vrednosti Pearsonovega koeficiente korelacije so med +1 in -1, kjer +1 (ali -1) pomeni popolno pozitivno (ali negativno) linearno povezavo. Negativna linearna povezava se na grafu odvisnosti prikazuje z padajočo črto, obraten prikaz se predstavlja s pozitivno linearno povezavo. Vrednost Pearsonovega koeficiente 0 označuje ničelno povezanost spremenljivk (Bairamov in sod., 2003; Nadarajah in sod., 2003). S programom Microsoft Office EXCEL 2013 smo s PEARSON statistično funkcijo izračunali Pearsonov koeficient korelacije med dvema neodvisnima spremenljivkama.

$$r_{xy} := \frac{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \cdot \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad \dots(6)$$

r_{xy} = Pearsonov koeficient korelacije (Bairamov in sod., 2003)

Koeficient determinacije določuje delež variabilnosti za odvisne spremenljivke s strani statističnega modela. Koeficient determinacije je enak kvadratu Pearsonovega koreacijskega koeficiente, ki se navaja kot R^2 (Košmelj, 2001). S programom Microsoft Office EXCEL 2013 smo s RSQ statistično funkcijo, izračunali koeficient determinacije.

3.3 SHEMATSKI PRIKAZ POTEKA RAZISKOVALNEGA DELA



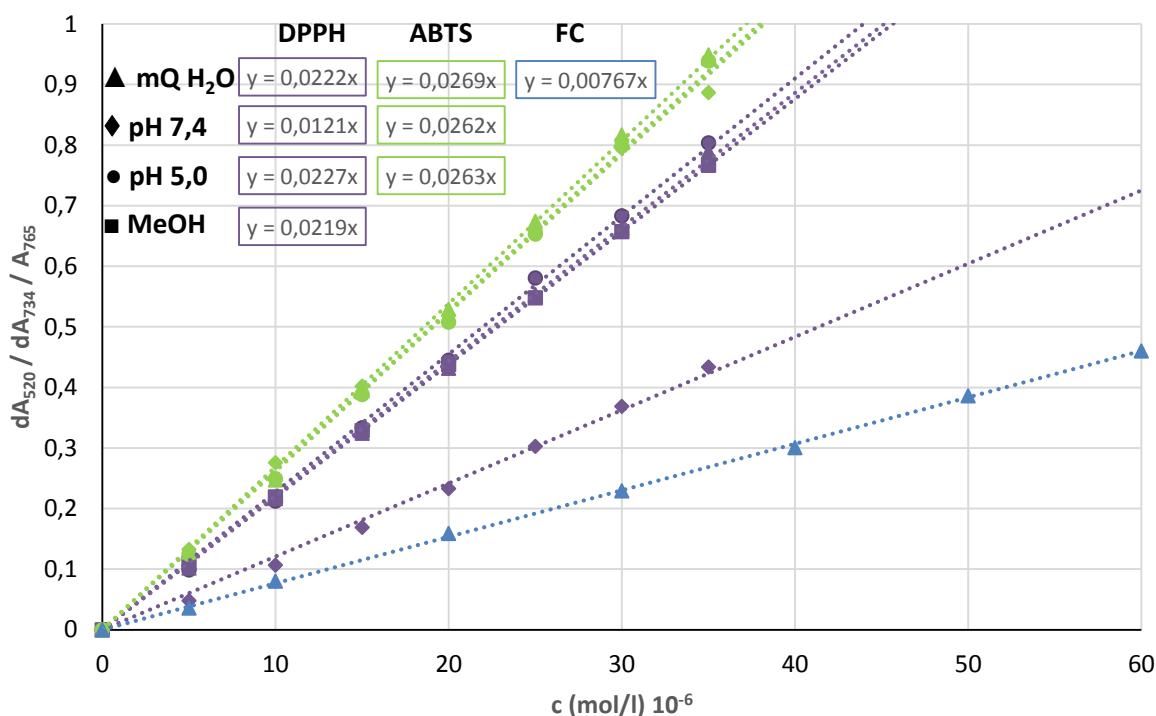
Slika 9: Shematski prikaz poteka raziskovalnega dela

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 UMERITVENE KRIVULJJE ZA MODELNE ANTOOKSIDANTE

4.1.1 Umeritvena krivulja za Troloks v ABTS, DPPH in FC testih

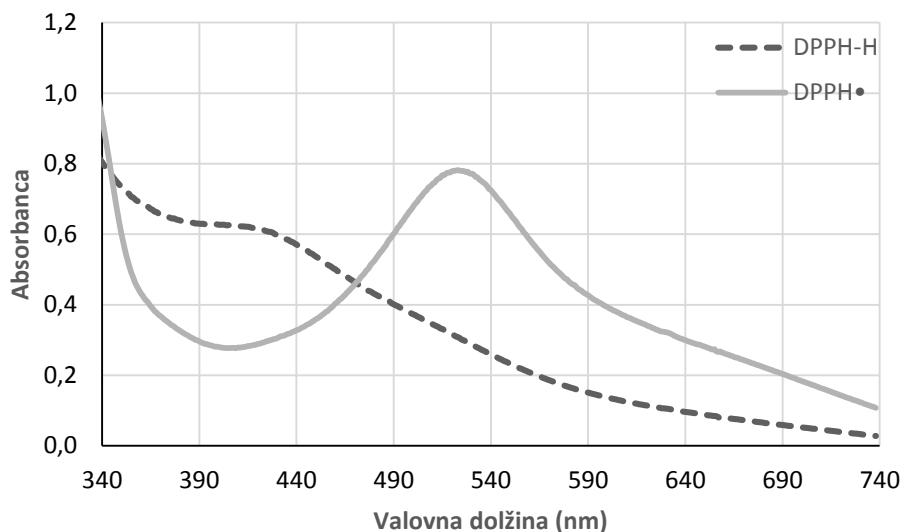
V magistrski nalogi smo proučevali vpliv kemijskega okolja (topilo) na reakcijo antioksidantov z radikaloma $\text{DPPH}^{\cdot+}$ in $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (zaredi enostavnosti kasneje uporabljamo tudi neradikalni zapis) ter s FC reagentom. Osnovni namen je bil ugotoviti, kako izbira reakcijskih pogojev in testa vpliva na določen antioksidativni potencial kompleksnih vzorcev ter na reaktivnost modelnih antioksidantov. Ker se vsebnost antioksidantov določenih z ABTS in DPPH metodama pogostokrat izraža v molarnih ekvivalentih Troloksa, smo najprej analizirali reaktivnost le tega.



Slika 10: Grafični prikaz umeritvene krivulje za Troloks po DPPH, ABTS in FC metodi

Na sliki 10 so prikazane umeritvene krivulje za Troloks po ABTS, DPPH in FC metodi. V testiranem koncentracijskem območju smo določili linearno odvisnost absorbance (A_{520} , A_{734} in A_{765}) od koncentracije. Zaradi različnih testov in uporabljenih topil in radikalov se nakloni premic med seboj razlikujejo. Največje občutljivosti (naklon krivulje) smo določili pri ABTS metodi (zelena barva) sledi DPPH metoda (vijolična barva) ter najmanjši signal pri FC (modra barva) metodi. Znotraj ABTS metode smo najvišji signal (dA_{734}) pri enaki koncentraciji Troloksa določili v mQ vodi, sledita pH 5,0 in pH 7,4, razlike med nakloni so majhne. Znotraj DPPH metode smo največjo vrednost (dA_{520}) pri enaki koncentraciji Troloksa določili v pufru s pH 5,0, sledita mQ voda in metanol. Tudi tu so razlike med nakloni majhne. Veliko odstopanje od ostalih pogojev smo določili pri pH 7,4, kjer je naklon premice bistveno drugačen od naklonov premic v ostalih topilih. Ko smo posneli absorpcijski spekter raztopine, kjer smo DPPH dodali velik molarni presežek Troloksa, smo ugotovili, da tudi produkt reakcije DPPH_2 absorbira pri 520 nm (Slika 11). Manjšo dA_{520}

tako najverjetneje lahko pripisemo prispevku DPPH₂ k absorbanci in ne manjši reaktivnosti Troloksa pri fiziološkem pH. Prispevek DPPH₂ k absorbanci pri 520 nm v nevtralnem pH so predhodno opazili že drugi avtorji (Friaa in Brault, 2006). Občutljivost določena s FC metodo je bila manjša v primerjavi z občutljivostjo v testih z obema radikaloma.



Slika 11: Grafični prikaz absorpcijskega spektra DPPH[•] in DPPH-H v topilu etanola in fosfatni pufer s pH 7,4 (1:1, v/v)

Umeritveno krivuljo, ki smo jo pripravili s Troloksom s FC metodo (A₇₆₅), smo uporabili za vrednotenje vsebnosti polifenolov v testiranih vzorcih (nepražena in pražena kava, zelen in črni čaj, prehransko dopolnilo brusnic z in brez vit. C, svetlo pivo in jabolčni sok), ki smo jih izražali kot ekvivalent Troloksa. Vrednosti so podane na slikah 21 do 28 in v preglednicah 7 do 12.

V okviru diplomskih nalog starega študija (Bertalanič, 2011; Hodnik, 2014) je bila reaktivnost Troloksa že analizirana pri nekaterih pogojih, ki smo jih uporabili v magistrski nalogi. Ugotovljen naklon za Troloks v FC testu 0,00767 l/µmol je primerljiv s predhodnimi rezultati, 0,0078 l/µmol (Bertalanič, 2011) in 0,0079 l/µmol (Hodnik, 2014). Pri določenih naklonih z ABTS in DPPH metodo prihaja do manjših razlik med raziskavami, vendar te niso višje od 10 % pri nobenem od pogojev. Razlike lahko pripisemo tudi manjšim spremembam reakcijskih pogojev, saj je npr. Hodnik (2014) uporabljal Tris pufer za pH 7,4, hkrati pa je eksperimenta izvajal brez regulacije temperature.

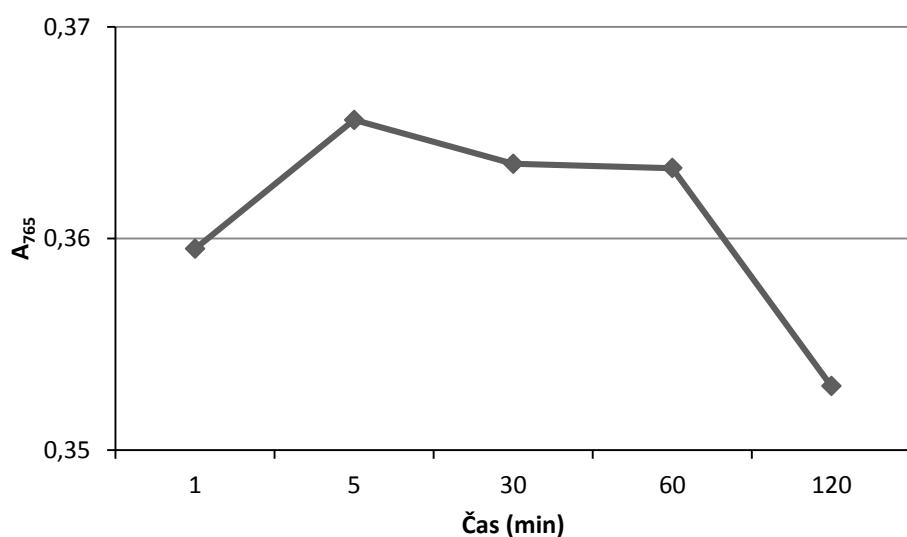
Molarni absorpcijski koeficienti DPPH in ABTS so znani, zato lahko z upoštevanjem le teh ocenimo število izmenjanih elektronov s Troloksom, oziroma molarno razmerje v posameznem testu. Molarni absorpcijski koeficient (ϵ) ABTS radikala pri λ 734 nm vodnem okolju je (15000 ± 549) mol⁻¹ l cm⁻¹ (Re in sod., 1999). Če upoštevamo, da je naklon umeritvene krivulje za Troloks v ABTS testu v mQ vodi (meritev v 1 cm kivet) enak 0,0269 l/µmol, lahko izračunamo, da je molarno razmerje med ABTS radikalom in Troloksom enako 26900/15000. To torej pomeni, da se pri oksidaciji Troloksa z ABTS izmenja 1,79 elektrona. Primerljive vrednosti dobimo tudi za potek reakcije pri pH 5 (1,79) in pH 7,4

(1,74). Za določanje AOP vzorcem z ABTS radikalom so tudi v preteklosti uporabljali fosfatne pufre (Henriquez in sod., 2002) in acetatne pufre (Ozgen in sod., 2006).

V literaturi najdemo različne podatke za molarni absorpcijski koeficient DPPH v alkoholnih raztopinah. Največkrat se uporablja vrednost $12000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Molyneux, 2004), zato smo jo tudi mi uporabili, ko smo računali molarno razmerje v reakciji med DPPH in Troloksom. Upoštevajoč naklone umeritvenih krivulj za reakcije v metanolu ($0,021 \text{ l}/\mu\text{mol}$), mešanici metanola in mQ vode ($0,0222 \text{ l}/\mu\text{mol}$), ter metanola in acetatnega pufra ($0,0227 \text{ l}/\mu\text{mol}$) lahko izračunamo, da je molarno razmerje med DPPH in Troloksom 1,75 za reakcijo v metanolu, 1,85 za reakcijo v mešanici metanola in mQ vode ter 1,89 za reakcijo v mešanici etanola in acetatnega pufra. Primerljiva molska razmerja so ugotovili tudi drugi avtorji (Musialik in Litwinienko, 2005; Prevc in sod., 2015a).

V kislih pH-jih lahko zanemarimo prispevek produkta DPPH_2 k absorbanci, medtem ko ta občutno prispeva k absorbanci v nevtralnem pH, kot je razvidno iz slike 11 in iz literature (Friaa in Brault, 2006). Pri testu v fosfatnem pufrom (pH 7,4) dosega rezidualna absorbanca DPPH_2 41 % absorbance radikala DPPH pri 520 nm (slika 11). Upoštevajoč naklon umeritvene krivulje ($0,0121 \text{ l}/\mu\text{mol}$) in rezidualno absorbanco zaradi DPPH_2 , ter molarni absorpcijski koeficient DPPH pri pH 7,4 $10700 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Friaa in Brault, 2006), lahko izračunamo, da je število izmerjenih elektronov ter molsko razmerje med DPPH in Troloksom enako $20508/10700$, oziroma 1,92. Za določanje AOP z DPPH radikalom so tudi v nekaterih drugih raziskavah uporabljali fosfatne (Andrei in sod., 2014) in acetatne pufre (Noipa in sod., 2011).

Primerjava med ABTS in DPPH metodo glede števila izmenjanih elektronov razkrije, da je to v vseh pomerjenih pogojih med 1,74 in 1,92. Tako izbor testa kot kemijsko okolje (topilo) le malo vplivata na molsko razmerje. Večina ostalih avtorjev poroča, da je molsko razmerje med 1,9 in 2. Če upoštevamo čistost Troloksa (97 %) ugotovimo, da so določena molska razmerja med radikaloma in Troloksom primerljiva z literaturo.



Slika 12: Reaktivnost Fe^{2+} ionov pri koncentraciji $100 \mu\text{mol/l}$ v Folin-Ciocalteu testu

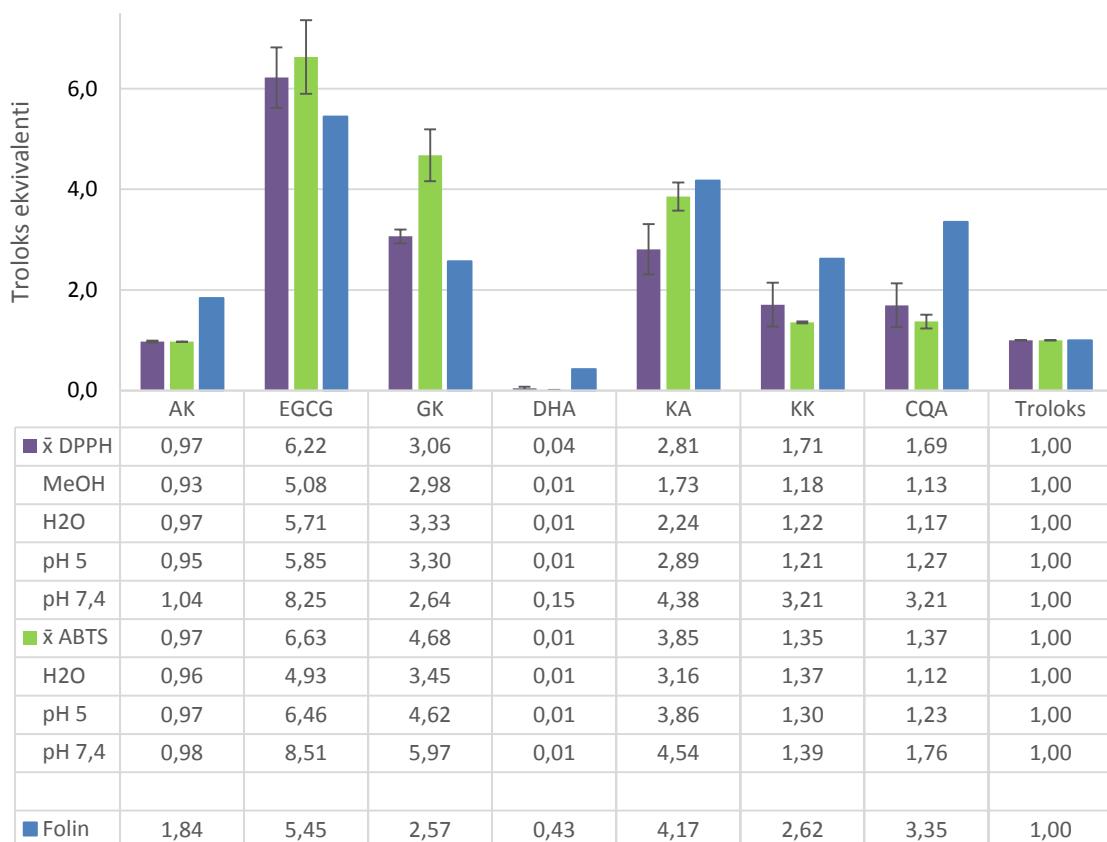
Reaktivnosti, oziroma števila izmenjanih elektronov pri oksidaciji Troloksa s FC reagentom ni mogoče izračunati iz molarne absorpcijskega koeficiente, saj le ta za produkte reakcije (reducirani molibdati in volframati iz FC reagenta) ni določen. Da bi lahko ocenili reaktivnost Troloksa v reakciji s FC reagentom, smo le to primerjali s Fe^{2+} ioni pri koncentraciji 100 $\mu\text{mol/l}$, ki se lahko oksidirajo do stanja Fe^{3+} , oziroma izmenjajo en elektron. Na sliki 12 je prikazana odvisnost A_{765} , od časa dodatka karbonata v raztopino po pričetku reakcije med Fe^{2+} ioni in FC reagentom. Pri 5 minutni inkubaciji, kar je enako kot pri meritvi vzorcev in modelnih antioksidantov, smo določili A_{765} vrednost 0,365. Upoštevajoč naklon umeritvene krivulje za Troloks ($0,00767 \text{ l}/\mu\text{mol}$) lahko ugotovimo, da Troloks v FC testu izmenja 2,1 elektrona ($0,767 / 3,65$), če predpostavimo, da se Fe^{2+} oksidira samo do Fe^{3+} .

Na osnovi reaktivnosti Troloksa z ABTS, DPPH in FC reagentom lahko ugotovimo, da izbira testa le malo vpliva na njegovo reaktivnost. Povprečno število izmenjanih elektronov v vseh testih = $1,85 \pm 0,12$; upoštevajoč 97 % čistost pa $1,90 \pm 0,13$. Troloks je posledično zelo uporaben standard, saj tako kemijsko okolje kot izbor testa le malo vplivata na število izmenjanih elektronov.

4.1.2 Reaktivnosti modelnih antioksidantov v DPPH, ABTS in FC testih v primerjavi s Troloksom

V nadaljevanju raziskave smo pripravili umeritvene krivulje za različne modelne antioksidante in vzorce. Za vsak test smo predpostavili linearno odvisnost absorbance od koncentracije antioksidantov. Umeritvene krivulje za modelne antioksidante AK, EGCG, GA, DHA, KA, KK in CQA so predstavljene v prilogah E do K. Iz prikazanih rezultatov je razvidno, da lahko uporabimo linearno funkcijo za analizo umeritvenih krivulj. Izjemo predstavlja katehin v DPPH testu (priloga I), kjer je razvidno, da ni linearne odvisnosti. Tudi drugi avtorji so opazili, da je potek reakcije nekaterih drugih antioksidantov odvisen od njihove koncentracije v testu (Goupy in sod., 2003; Prevc in sod., 2015b). Kljub temu smo tudi podatke za KA v DPPH analizirali z linearno funkcijo. Umeritvene krivulje za realne vzorce tj. svetlo pivo, jabolčni sok in prehransko dopolnilo brusnic brez vit. C, so predstavljene v prilogah B do D.

Pridobljene podatke o naklonu umeritvenih krivulj za posamezne antioksidante v različnih testih in topilih smo primerjali z naklonom za Troloks in tako pridobili molsko razmerje med izbranim antioksidantom in Troloksom v ustreznih pogojih (slika 13). Za vsak antioksidant smo izračunali tudi povprečno molsko razmerje določeno z DPPH ter ABTS testi v različnih topilih (slika 13). Ker smo pri Troloksu ugotovili le majhne razlike v številu izmenjanih elektronov med posameznimi pogoji, velika razlika med posameznimi testi in velika standardna deviacija znotraj posameznega testa pomeni, da ima izbor testa ter izbor topila znotraj posameznega testa velik vpliv na število izmenjanih elektronov oziroma molsko razmerje s Troloksom.



Slika 13: Relativna aktivnost modelnih antioksidantov v primerjavi s Troloksom v ABTS, DPPH in FC testih

Kvociente naklonov linearnih umeritvenih krivulj med modelnimi antioksidanti in Troloksom, ki smo jih predstavili na sliki 13, smo primerjali s kvocienti naklonov linearnih umeritvenih krivulj pridobljenih v diplomskej delih Bertalanič (2011) in Hodnik (2014). Pri FC metodi so kvocienti naklonov umeritvenih krivulj GK, KA, KK in AK (2,63, 3,37, 2,58 in 1,83) (Bertalanič, 2011) primerljivi z enakimi modelnimi antioksidanti (2,57, 4,17, 2,62 in 1,84) v magistrski nalogi. V primerjavi z diplomskim delom Hodnik (2014) prihaja do večjih odstopanj v rezultatih GK, CQA in EGC in EGCG ($1,6 \pm 0,06$, $2,3 \pm 0,45$ in $9,1 \pm 3,93$) od naših rezultatov (2,57, 3,35 in 5,45). Do podobnih rezultatov prihaja pri KA, DHA in AK ($3,6 \pm 0,21$, $0,45 \pm 0,12$ in $1,4 \pm 0,32$) (Hodnik, 2014). Večje razlike za nekatere modelne antioksidante, ki jih je določil Hodnik (2014), bi lahko pripisali dejству, da v okviru te diplomske naloge ni bilo regulacije temperature ter, da so bila molska razmerja med modelnim antioksidanti in Troloksom določena na osnovi umeritvene točke in ne umeritvene krivulje.

Iz slike 13 je razvidno, da večina modelnih antioksidantov izmenja največje število elektronov v FC testu kot v ABTS in DPPH testu. Izjemo predstavljata GK in EGC, kjer se večje število elektronov izmenja v ABTS in DPPH testih. Kot je razvidno iz samega imena, sta spojini sorodni in imata tudi soroden UV spekter (priloga L). EGC je večja in kompleksnejša molekula, kar se kaže tudi v višjem povprečnem antioksidativnemu učinku od GK (1,85-krat).

Med askorbinsko kislino in Troloksom v ABTS in DPPH testih ni večjih razlik, saj je v vseh primerih število izmenjanih elektronov ≈ 2 . Do velikih razlik pa prihaja pri FC testu, kjer je askorbinska kislina skoraj dvakrat bolj učinkovita od Troloksa. Iz podatkov na sliki 13 razvidno, da je v FC testu aktivna tudi DHA (oksidirana AK) torej najverjetneje večjo aktivnost AK pripisemo DHA, oziroma njenim razpadnim produktom.

Pri vseh analiziranih polifenolnih antioksidantih lahko opazimo velike standardne deviacije znotraj posamezne metode v različnih topilih. To pomeni, da so ti modelni antioksidanti manj primerni za standardizacijo AOP, saj je za standard izredno pomembno, da je reaktivnost le tega v različnih pogojih ter metodah podobna. Na osnovi podatkov je razvidno, da je najbolj primeren antioksidant Troloks, ker v vseh testiranih pogojih izmenja približno dva elektrona.

Iz literaturnih podatkov lahko razberemo, da se AOP določen z ABTS ali DPPH metodo lahko izraža kot ekvivalente različnih modelnih antioksidantov. Največkrat se izraža kot ekvivalenti Troloksa (Thaipong in sod., 2006). V literaturi pa najdemo tudi normalizacijo na askorbinsko kislino (Saw in sod., 2015), katehin (Vinson in sod., 2003), klorogensko (Delgado-Andrade in sod., 2005), kavno (Spigno in sod., 2007), galno kislino (Shahdadi in sod., 2015) in tudi druge antioksidante. Glede na rezultate predstavljeni na sliki 13, ter dejstva, da so eksperimentalni pogoji v mnogih člankih relativno slabo opisani (npr. podrobna sestava topila, temperatura, čas reakcije) je zelo težko primerjati rezultate različnih raziskav, saj že sam izbor metode in eksperimentalnih pogojev močno vpliva v na določen AOP modelnih antioksidantov.

Zanimivo je, da se GK uporablja praktično kot edini standard v FC testu. Iz podatkov predstavljenih na sliki 13 je razvidno, da je GK manj reaktivna v FC testu kot v DPPH ali ABTS testih. Posledično z normalizacijo na GK v FC testu dobimo višji AOP kot pa če GK uporabimo kot standard v ABTS in DPPH testih. Na osnovi rezultatov pridobljenih v okviru magistrske naloge predlagamo, da se tudi za FC test uporablja Troloks za izražanje vsebnosti antioksidantov v realnih vzorcih, saj je zaradi uniformne reaktivnosti standarda možna tudi primerjava med različnimi testi.

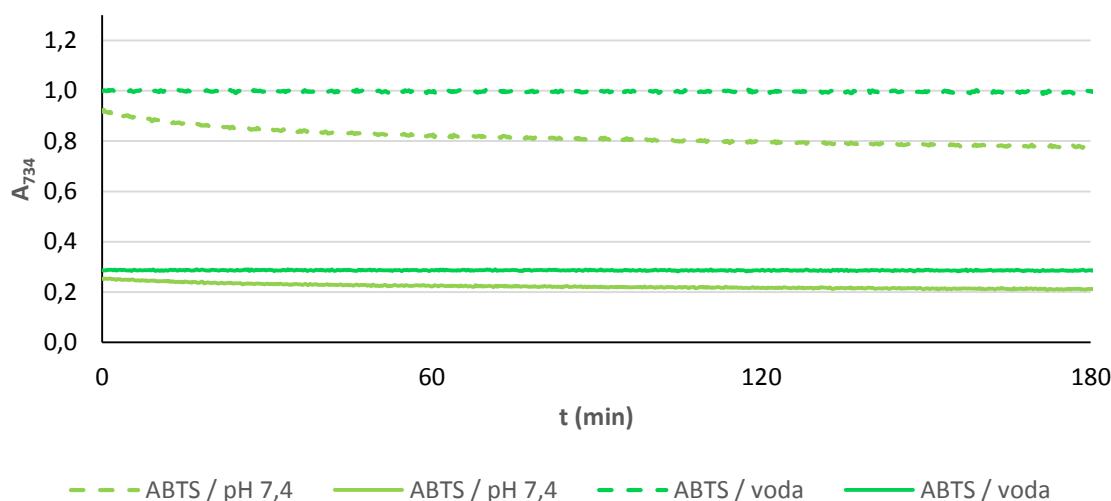
4.2 HITROST REAKCIJE ANTIOKSIDANTOV V IZBRANIH PIJAČAH IN PREHRANSKIH DOPOLNILIH Z RADIKALOMA ABTS IN DPPH V RAZLIČNIH TOPILIH

Podatki o učinkovitosti antioksidantov, ki smo jih predstavili v poglavju 4.1., so pridobljeni po 60 minutni inkubaciji modelnih antioksidantov z radikaloma ABTS in DPPH ter s FC reagentom. Predhodne raziskave (Bertalanič, 2011; Prevc in sod., 2015a) so pokazale, da je Troloks antioksidant, ki relativno hitro reagira s kromogenimi radikali v protičnih topilih in je reakcija po 1 uri že končana. Realni vzorci živil vsebuje kompleksno zmes antioksidantov. Mnogi med njimi reagirajo počasi, oziroma imajo večstopenjski potek oksidacije. Zaradi tega smo preverili kakšen je kinetičen potek oksidacije antioksidantov v izbranih vzorcih z radikaloma ABTS in DPPH. Pred analizo vzorcev smo preverili stabilnost radikalov ABTS in DPPH v izbranih topilih.

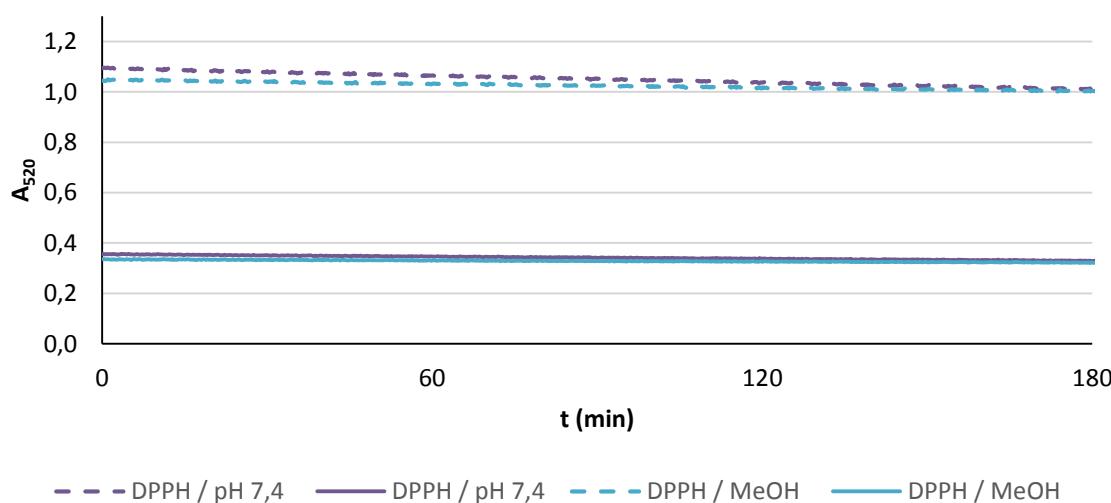
4.2.1 Stabilnost ABTS in DPPH v različnih topilih

Na slikah 14 in 15 je prikazan vpliv inkubacije različnih koncentracij ABTS in DPPH v izbranih topilih na spremembo absorbance v odsotnosti antioksidantov. S pomočjo teh

prikazov lahko ocenimo stabilnost radikala v času 180 min. Čas analize mora biti izbran tako, da bo v izbranem časovnem intervalu radikal (ABTS in DPPH) stabilen ter, da sprememba absorbance na časovno enoto pri merjenih vzorcih ne bo prevelika. Če določamo AOP pri časih, ko je $\Delta dA/\Delta t$ relativno velik, lahko majhne razlike v časih meritve vplivajo na rezultat in s tem prispevajo k višji napaki. To se pogostokrat zgodi, če pomerimo veliko število vzorcev.



Slika 14: Stabilnost ABTS radikala pri različnih začetnih koncentracijah v izbranih topilih



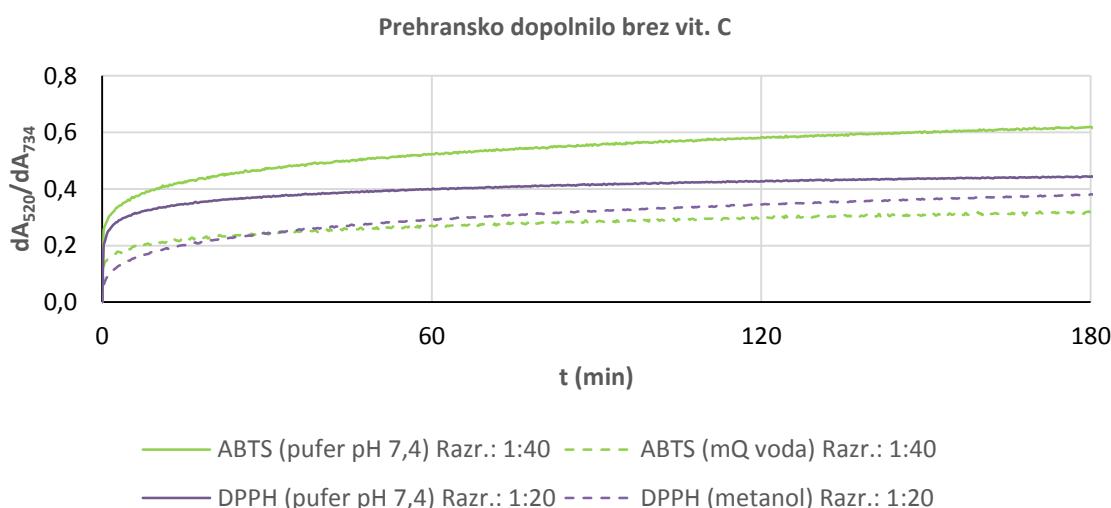
Slika 15: Stabilnost DPPH radikala pri različnih začetnih koncentracijah v izbranih topilih

ABTS radikal je precej bolj stabilen v vodi kot v fosfatnem pufru pH 7,4. Pri manjši začetni absorbanci (koncentraciji) je hitrost sprememba absorbance manjša. Primerjava dA/dt za enake začetne koncentracije razkrije, da je v pufru s pH 7,4 hitrost razpada približno 30x večja kot v mQ vodi. V pufru s pH 7,4 se po 1 uri absorbanca zmanjša za približno 10 %.

Stabilnost DPPH radikala smo preverjali v pufru s pH 7,4 in v metanolu. Tudi v tem primeru smo ugotovili, da je hitrost razpada manjša pri manjši koncentraciji radikala tako v metanolu kot v fosfatnem pufru. Absorbanca se linearno spreminja kot funkcija temperature v

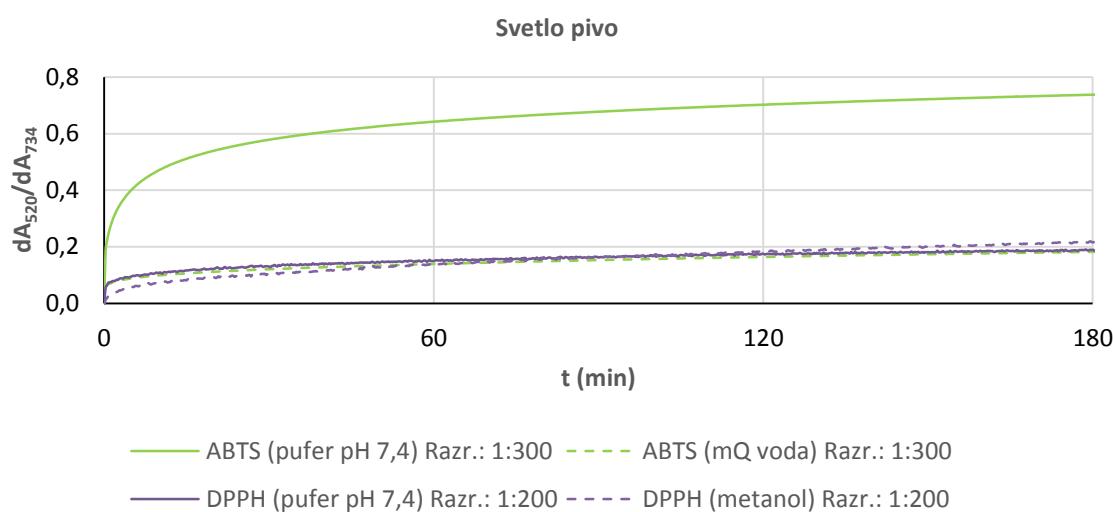
celotnem območju. V fosfatnem pufru se absorbanca zmanjša za 2,5 % na uro in v metanolu za 1,4 % na uro. Če predvidevamo, da je zmanjšanje absorbance posledica pretvorbe DPPH v $DPPH_2$, lahko ocenimo, da se je v fosfatnem pufru pH 7,4, kjer k absorbanci prispeva tudi reducirana oblika ($\approx 40\%$ absorbance DPPH), reduciralo $\approx 4\%$ DPPH. Do podobnih ugotovitev je prišel tudi Hodnik (2014), ki je tudi pokazal, da sta radikala ABTS in DPPH manj stabilna v nevtralnem pH kot pa v raztopinah s pH 5, oziroma v odsotnosti pufra.

4.2.2 Potek reakcije antioksidantov v izbranih vzorcih pijač in prehranskih dopolnil z radikaloma ABTS in DPPH v različnih topilih



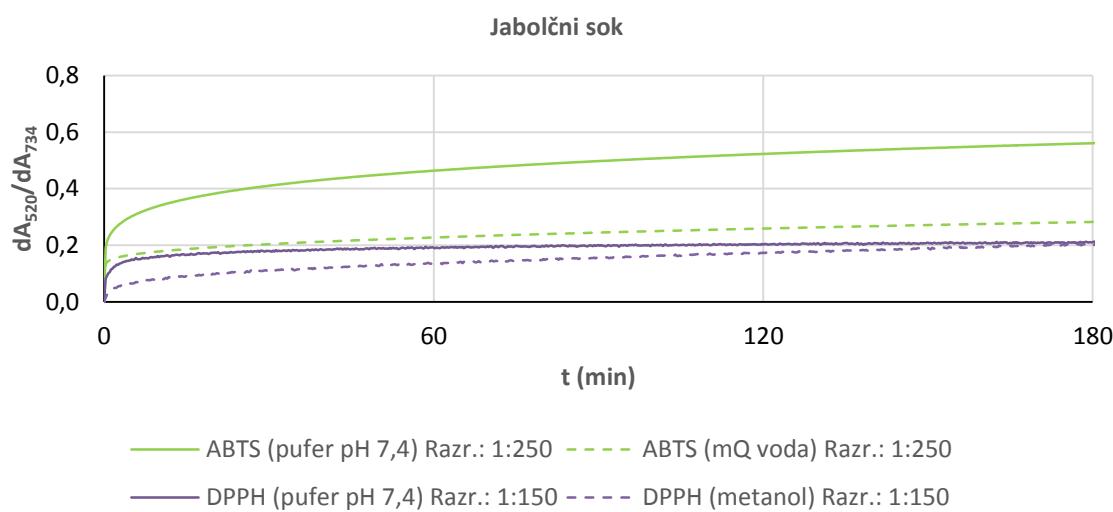
Slika 16: Hitrost reakcije med antioksidanti v prehranskem dopolnilu brez dodanega vitamina C z ABTS radikalom ter DPPH radikalom v različnih topilih

Na sliki 16 je prikazana sprememba absorbance kot funkcija časa, ki je posledica redukcije radikalov ABTS in DPPH z antioksidanti, ki se nahajajo v prehranskem dopolnilu iz brusnice. ABTS test smo pri enakih razredčitvah izvedli v fosfatnem pufru pH 7,4 in v mQ vodi. DPPH test pa pri dvakrat višji koncentraciji antioksidantov v metanolu ter mešanici metanola in fosfatnega pufra pH 7,4. Primerjava obeh uporabljenih topil v ABTS testu razkrije velike razlike. Že po eni minutu po dodatku ustrezne razredčitve vzorca se absorbanca pri pH 7,4 zmanjša za 0,29, v mQ vodi pa za 0,15. Tudi pri daljši inkubaciji poteka reakcija hitreje pri pH 7,4 tako, da je pri vseh časih razmerje med absorbancama približno enako 2:1. Tudi v DPPH testu poteka reakcija hitreje v prisotnosti pufra. Po eni minutu se pri pH 7,4 absorbanca spremeni za 0,25, v metanolu pa za 0,09. Če upoštevamo, da $DPPH_2$ prispeva k absorbanci pri 520 nm, lahko ugotovimo, da je število izmenjanih elektronov po 1 minuti približno petkrat večje v pufru kot v metanolu. Po daljšem času inkubacije je relativna sprememba absorbance večja v metanolu vendar je tudi po 3 urni inkubaciji število izmenjanih elektronov približno dvakrat večje v prisotnosti pufra.



Slika 17: Hitrost reakcije med antioksidanti v svetlem pivu z ABTS radikalom ter DPPH radikalom v različnih topilih

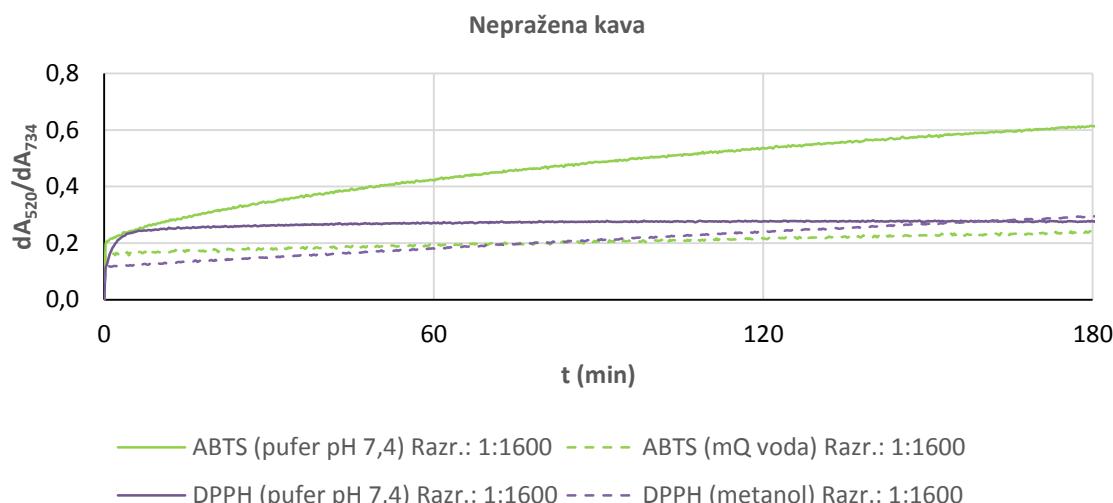
Ko smo analizirali kinetičen potek reakcije antioksidantov v pivu z radikaloma ABTS in DPPH v različnih topilih (slika 17), smo ugotovili izjemno velike razlike pri ABTS testu. Pri izbrani razredčitvi se je tudi pri pivu v prvi minuti po dodatku vzorca absorbanca pri pH 7,4 zmanjšala za 0,29 in v mQ vodi za 0,15. Za razliko od prehranskega dopolnila na osnovi brusnice pa je bila relativna sprememba absorbance pri daljših časih inkubacije pri pH 7,4 precej večja kot v mQ vodi, tako da je bilo razmerje absorbanc (tudi število izmenjanih elektronov) po eni uri že večje od štiri. Tudi v DPPH testu na začetku reakcija hitreje poteka v fosfatnem pufru, vendar je pri daljših časih inkubacije relativna sprememba absorbance večja v metanolu, čeprav je število izmenjanih elektronov po tri urni inkubaciji še vedno večje v fosfatnem pufru.



Slika 18: Hitrost reakcije med antioksidanti v jabolčnem soku z ABTS radikalom ter DPPH radikalom v različnih topilih

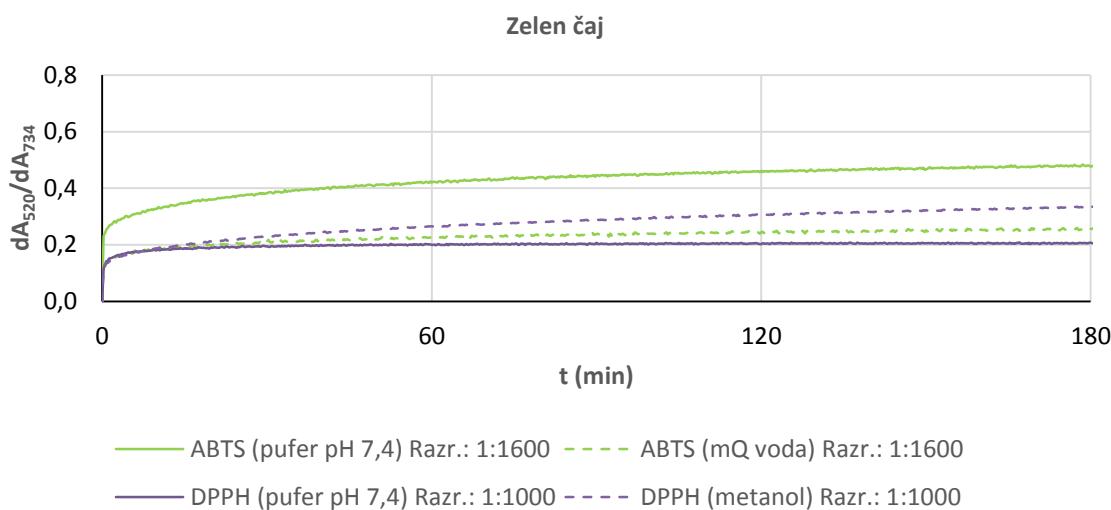
Na sliki 18 je prikazana sprememba absorbance kot posledica dodatka razredčenega jabolčnega soka v raztopine ABTS in DPPH. Po prvi minutni se absorbanca v ABTS testu v

fosfatnem pufru zmanjša za 0,24, v mQ vodi pa za 0,07. Tudi pri daljših časih je sprememba absorbance večja v fosfatnem pufru pH 7,4, vendar je relativna sprememba absorbance večja v mQ vodi, tako da je po treh urah inkubacije razmerje absorbanc in s tem števila izmenjanih elektronov 2:1. Do podobnih ugotovitev za jabolčni sok je prišel tudi Hodnik (2014). Razmerje spremembe absorbanc v DPPH testu po eno minutni inkubaciji je 2,9. Kasneje je relativna sprememba absorbance večja v metanolu in po treh urah je sprememba absorbance v obeh topilih praktično enaka. Omeniti pa je potrebno, da je število izmenjanih elektronov še vedno večje v prisotnosti fosfatnega pufra.



Slika 19: Hitrost reakcije med antioksidanti v nepraženi kavi z ABTS radikalom ter DPPH radikalom v različnih topilih

Na sliki 19 je prikazana hitrost reakcije antioksidantov prisotnih v ekstraktu nepražene kave z radikaloma ABTS in DPPH. V prvi minuti po dodatku vzorca se absorbanca v ABTS testu pri pH 7,4 zmanjša za 0,21 in v mQ vodi za 0,17. Sprememba absorbance tako relativna kot absolutna pri daljših časih inkubacije je precej večja v fosfatnem pufru pH 7,4, tako da je po tri urni inkubaciji razmerje absorbanc in s tem izmenjanih elektronov večje od 2:1. V DPPH testu pa je kinetičen potek reakcije drugačen. Po eni minuti se pri izbrani razredčitvi absorbanca v fosfatnem pufru spremeni za 0,16 v metanolu pa za 0,12. V fosfatnem pufru se po 20 minutah absorbanca praktično ne spreminja več, medtem ko v metanolu reakcija še vedno poteka. Po treh urah je sprememba absorbance v metanolu celo večja od spremembe absorbance v fosfatnem pufru, vendar je tudi tu število izmenjanih elektronov večje v prisotnosti fosfatnega pufra.



Slika 20: Hitrost reakcije med antioksidanti v zelenem čaju z ABTS radikalom ter DPPH radikalom v različnih topilih

Kinetičen potek reakcije antioksidantov v zelenem čaju (slika 20) je na določen način podoben preostalim analiziranim vzorcem, saj hitri fazi sledi počasna faza, ki pa se za posamezen test oziroma topilo razlikuje. Pri ABTS testu lahko opazimo veliko podobnost s kinetičnim potekom reakcije s prehranskim dopolnilom na osnovi brusnice, saj je v obeh primerih razmerje absorbanc po 1 minuti in po treh urah približno enako 2:1 in s tem tudi število izmenjanih elektronov. V DPPH testu je po 1 minuti razmerje absorbanc 1:1, medtem ko je po treh urah inkubacije sprememba absorbance večja v metanolu kot v fosfatnem pufru, kar kaže, da je pri daljših časih inkubacije relativne spremembe absorbance večja v metanolu. Tako kot za vseh analizirane vzorce velja tudi za ekstrakt zelenega čaja, da je tudi po treh urah (in seveda v vseh krajših časih) število izmenjanih elektronov v DPPH testu večje v fosfatnem pufru kot v metanolu.

V okviru študija kinetičnega poteka reakcije za vzorce, katerim smo določali AOP, smo uporabili le pet vzorcev od osmih. V te eksperimente nismo vključili črnega čaja in pražene kave, saj smo predvidevali, da je sestava antioksidantov in s tem tudi kinetičen potek reakcije podobna zelenemu čaju in nepraženi kavi. Prehranskega dopolnila na osnovi brusnice z dodanim vitaminom C pa nismo analizirali zato, ker je prevladujoč antioksidant v tej mešanici askorbinska kislina, za katero pa je znan kinetičen potek reakcije, ki je izjemno hitra (Brandwilliams in sod., 1995).

Kljub opaženim razlikam med posameznimi vzorci pa lahko ugotovimo nekaj skupnih značilnosti. Tako v ABTS testu kot v DPPH testu je v vseh primerih število izmenjanih elektronov večje v prisotnosti fosfatnega pufra pH 7,4, kot pa v metanolu (DPPH), oziroma vodi (ABTS). To se sklada s prejšnjimi ugotovitvami, da ionizirane oblike fenolnih spojin (fenolatni ioni) precej hitreje reagirajo s kromogenimi radikali (Prevc in sod., 2013). Analiza kinetičnih krivulj razkrije kompleksen potek reakcije. Opazna je hitra faza (velika sprememba absorbance v kratkem času-npr. 1 minuta), kateri sledi počasna faza. Takšne oblike krivulj bi lahko pripisali heterogeni mešanici antioksidantov, kjer nekateri reagirajo hitro, drugi pa počasneje. Toda takšne oblike krivulj, so opazili že nekateri drugi avtorji, ko so analizirali kinetiko modelnih antioksidantov (Goupy in sod., 2003; Terpinc in Abramovič,

2010; Prevc in sod., 2015b). Hitro fazo so pripisali oksidaciji obstoječih fenolnih skupin, počasno fazo pa oksidaciji produktov, ki nastanejo iz delno oksidiranih fenolnih spojin kot rezultat substitucij na aromatskem obroču oziroma reakcijam oligomerizacije. Oksidacija takšnih sekundarnih produktov lahko pomembno prispeva k skupnemu AOP (Goupy in sod. 2003; Abramovič in Abram, 2005; Bertalanič, 2011; Prevc in sod., 2013; Prevc in sod., 2015b).

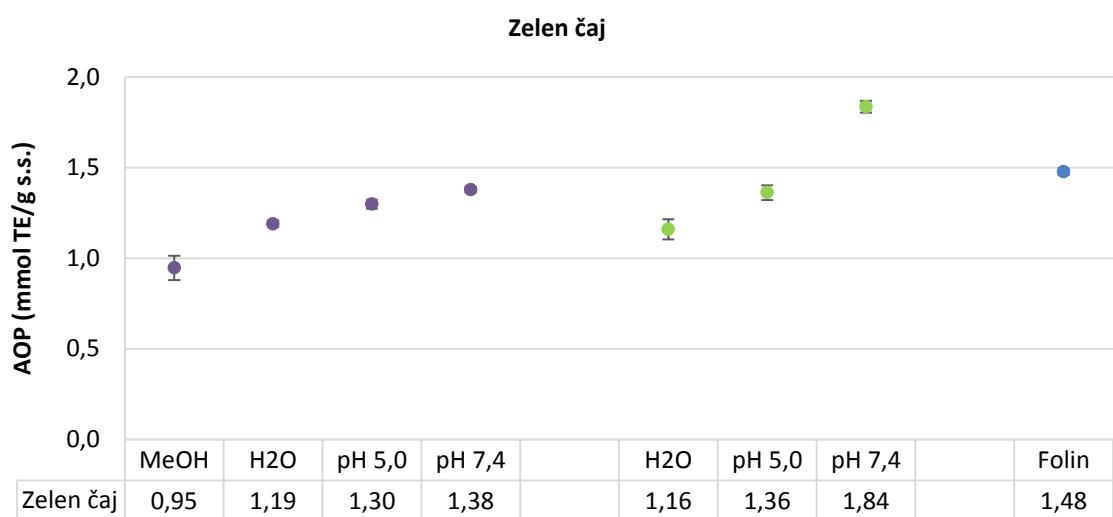
Na osnovi rezultatov prikazanih na slikah 16 do 20 lahko ugotovimo, da je ena urna inkubacija, ki smo jo uporabili za vrednotenje AOP standardov primera tudi za izbrane vzorce, saj je $\Delta A/\Delta t$ pri času okoli 60 minut v večini primerov relativno majhna, kar zmanjša napako pri določitvi AOP in manjših razlikah v času meritve. $\Delta A/\Delta t$ je seveda še manjši po treh urah, toda zaradi nestabilnosti kromogenih radikalov v odsotnosti antioksidantov, smo se vseeno odločili izbrati krajši čas. Na drugi strani bi lahko meritve opravljali tudi po precej krajši inkubaciji (npr. 5 min), toda v tem primeru je možnost napak, oziroma vpliv spremenljivk, kot sta čas in temperatura na izmerjeno absorbanco velika, kar bi zagotovo prispevalo k višji napaki meritve. Potrebno se je zavedati, da s tem, ko izberemo čas, po katerem merimo absorbanco, vplivamo tudi na vrednost določenega AOP. Vrednosti, ki jih podajamo v naslednjem poglavju tako niso absolutne, ampak so pogojene s spremenljivkami, kot so čas reakcije, temperatura in izbor topila pri posamezni metodi.

4.3 AOP IZBRANIH PIJAČ IN PREHRANSKIH DOPOLNIL, DOLOČEN Z RADIKALOMA ABTS IN DPPH TER S FOLIN-CIocalteau metodo

Izmerjene vrednosti dA_{520} , dA_{734} , A_{765} pri znanih razredčitvah izbranih pijač in prehranskih dopolnil (preglednica 4) smo uporabili za izračun AOP z DPPH, ABTS in FC metodami. Rezultate smo normalizirali glede na reaktivnost Troloksa pri enakih pogojih (slika 10). AOP smo izrazili kot Troloks ekvivalente na gram suhe snovi, oziroma na liter pijače določen s posamezno metodo in v ustremnem topilu (slika 21-28).

4.3.1 AOP zelenega in črnega čaja

Na sliki 21 so predstavljeni rezultati določitve AOP zelenega čaja v FC, DPPH in ABTS testih. Tako izbor metode kot izbor topila znotraj posamezne metode ima velik vpliv na določen AOP. Najvišjo vrednost smo določili v ABTS testu v pufru s pH 7,4 ($1,84 \pm 0,01$) in najnižjo vrednost v DPPH testu v metanolu ($1,02 \pm 0,07$). Do razlik prihaja tudi znotraj posameznega testa. Najvišji določen AOP v DPPH testu (pH 7,4) je za 35 % odstotkov višji od najnižjega določenega AOP v metanolu. Še višja je razlika v ABTS testu, kjer je AOP določen v pufru s pH 7,4 za 59 % višji od AOP določenega v mQ vodi. AOP določen v FC testu je višji od vseh meritve razen od AOP določenega v ABTS testu pri pH 7,4.



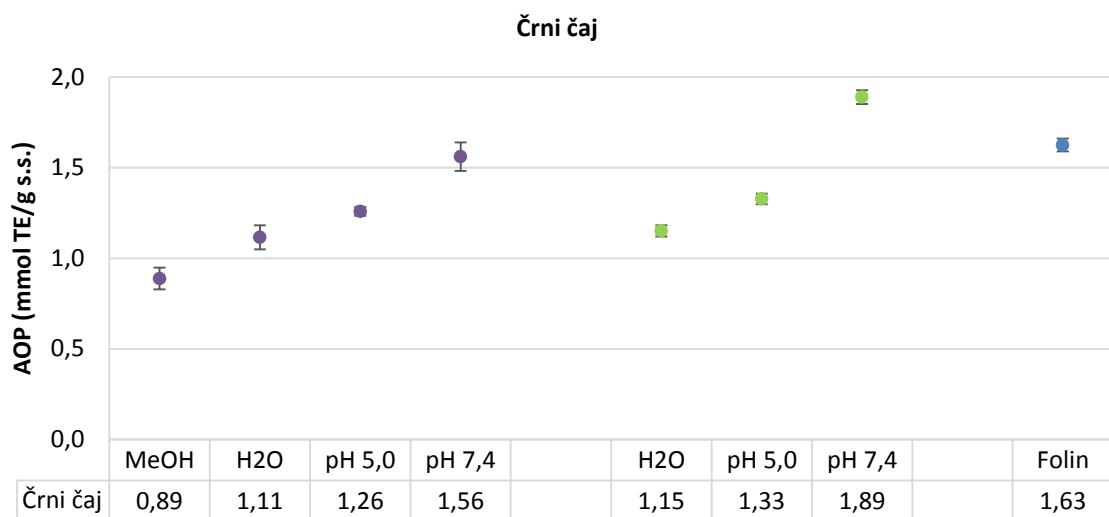
Slika 21: Primerjava AOP zelenega čaja, ki je določen z ABTS (zelena), DPPH (vijolična) in FC (modra) metodo

Preglednica 7: AOP zelenih čajev, določen z različnimi metodami

Vir	ABTS (mmol TE/g s.s.)	DPPH (mmol TE/g s.s.)	FC (mmol TE/g s.s.)
Floegel in sod. (2011)	0,79	0,71	/
Carloni in sod. (2013)	2,20	/	2,42
Duda-Chodak in sod. (2008)	1,25-4,13	0,52-1,41	/
Chan in sod. (2007)	/	1,48	2,89
Komes in sod. (2010)	1,92	1,45	3,87
Almajano in sod. (2008)	423	/	2,10
Naše delo ^a	1,45 ± 0,28	1,20 ± 0,16	1,48

a – povprečje določitev v različnih topilih

V preglednici 7 so predstavljeni podatki o AOP zelenih čajev, ki so bili določeni z različnimi metodami. Kot standardi so bili v teh raziskavah poleg Troloksa uporabljeni še AK in GK, na katere so bili normalizirani vsi rezultati za določitev AOP s FC metodo. V skladu s podatki na sliki 13 smo na osnovi molarne reaktivnosti GK in AK v primerjavi s Troloksom vse rezultate izrazili kot ekvivalente slednjega. Iz preglednice 7 je razvidno, da so vrednosti AOP v območju nekaj pod 1 mmol TE/g do nekaj mmol TE/g kar se sklada z rezultati v magistrski nalogi. Izkema je zelo velik AOP določen z ABTS metodo (Almajano in sod., 2008), ki pa je lahko tudi posledica napačnega preračunavanja, ozziroma izražanja rezultatov. V splošnem lahko ugotovimo, da vsi avtorji določajo višje vsebnosti AOP z ABTS kot z DPPH metodo, kar se sklada z rezultati naše raziskave. V večini primerov je najvišji AOP določen s FC metodo. Omeniti je potrebno, da so bili DPPH in ABTS testi v teh raziskavah opravljeni v metanolu, ozziroma v vodi, kjer smo tudi za čaj, ki smo ga analizirali v okviru naloge, določili najmanjši AOP. Relativno velike razlike med raziskavami so lahko posledica izbora različnih sort čajev ali izgube AOP, ki je povezana s staranjem. Duda-Chodak in sodelavci (2008) so pokazali, da je že en mesec po odpiranju embalaže, AOP čaja manjši tudi do 35 %.



Slika 22: Primerjava AOP črnega čaja, ki je določen z ABTS (zelena), DPPH (vijolična) in FC (modra) metodo

Primerjava zelenega čaja (slika 21) in črnega čaja (slika 22) razkrije, da imata topila in izbor metode podoben vpliv na določen AOP. Za oba čaja smo najvišji AOP z radikaloma določili v fosftanih pufrih pH 7,4, najmanjši pa v metanolu (DPPH), oziroma vodi (ABTS). Če je vpliv topila pri obeh čajih na določen AOP v ABTS testu praktično enak, so razlike med čajema pri DPPH testu večje. Za črni čaj v pH 7,4 smo določili za 76 % višji AOP kot v metanolu, za zeleni čaj pa je razlika v AOP med obema topiloma manjša. Čeprav med čajema ni večjih razlik v povprečnem AOP-ju, ne moremo trditi, da fermentacija (črni čaj) ne vpliva na AOP čaja.

Preglednica 8: AOP črnih čajev, določen z različnimi metodami

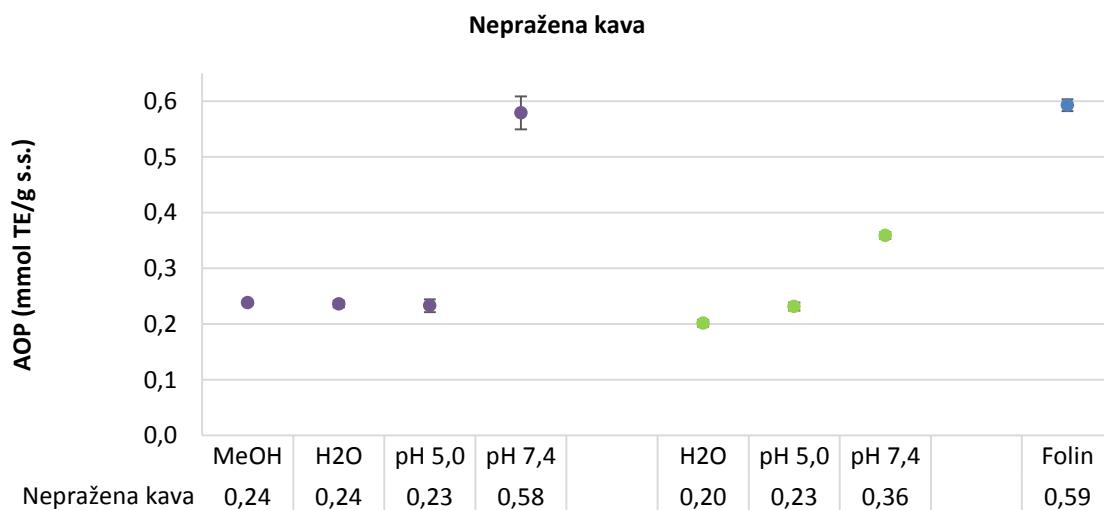
Vir	ABTS (mmol TE/g s.s.)	DPPH (mmol TE/g s.s.)	FC (mmol TE/g s.s.)
Floegel in sod. (2011)	0,54	0,84	/
Carloni in sod. (2013)	1,36	/	1,53
Duda-Chodak in sod. (2008)	0,79-2,32	0,27-0,80	/
Chan in sod. (2007)	/	0,65	1,28
Almajano in sod. (2008)	251	/	1,83
Naše delo ^a	1,46 ± 0,31	1,21 ± 0,24	1,63

a – povprečje določitev v različnih topilih

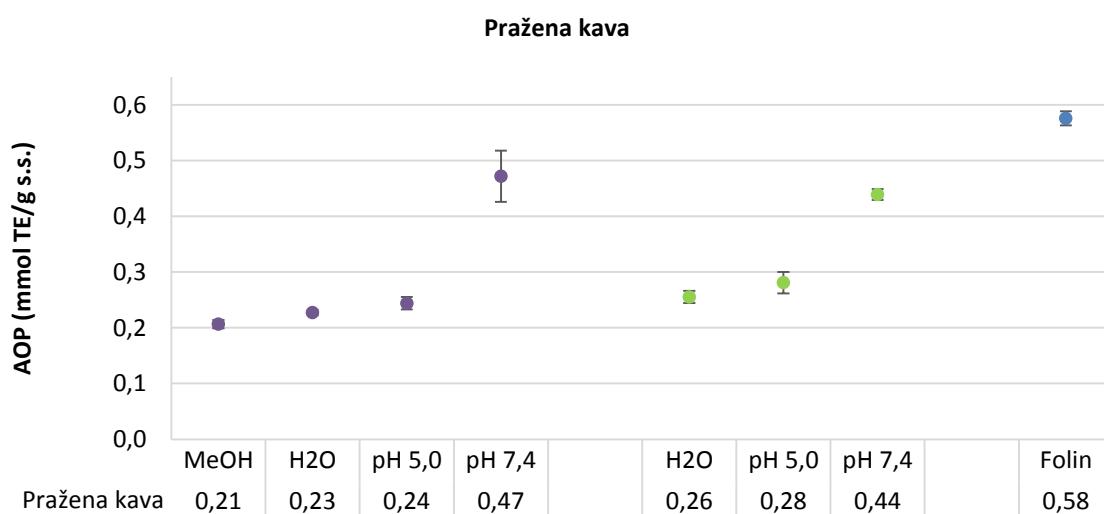
Iz rezultatov v preglednici 8 je razvidno, da so vsi avtorji najvišji AOP določili s FC reagentom, kar se sklada z rezultati naše raziskave. Povprečna vrednost za AOP določena z DPPH metodo v okviru magistrskega dela je višja od rezultatov drugih avtorjev. Toda, če upoštevamo dejstvo, da so DPPH testi največkrat opravljeni v metanolu, kjer smo mi določili najnižji AOP lahko ugotovimo, da večjih razlik med rezultati ni. Primerjava rezultatov v preglednici 7 in 8 razkrije tudi, da je večina avtorjev določila nižji AOP črnih kot zelenih čajev, kar je pričakovani rezultat, saj med fermentacijo čaja poteka tudi delna oksidacija fenolnih spojin. Tudi za črne čaje velja, da se jim zmanjšuje AOP po odprtju embalaže (Duda-Chodak in sod., 2008).

4.3.2 AOP nepražene in pražene kave

Vzorce kave smo dobili v pražarni Escobar na Vrhniki, kjer so nam kavo tudi spražili. Posledično smo lahko primerjali vpliv praženja na AOP določen z različnimi testi in topili. V splošnem lahko ugotovimo, da ima izbor testa in topila večji vpliv na določen AOP kot pa sam proces praženja (slike 23 in 24), saj v dveh primerih pri DPPH metodi (mQ voda in pufer pH 5) sploh nismo ugotovili statistično značilnih razlik med nepraženo in praženo kavo. Razlike so višje v ABTS testu v vseh topilih, kjer smo v praženi kavi določili za 22-27 % večji AOP kot v nepraženi kavi. Primerjava čajev in kav razkrije, da za oba tipa vzorcev največji AOP s kromogenima radikaloma določimo v pufru pH 7,4, le da je pri obeh vzorcih kav razlika večja kot pri čajih. V DPPH testu v pufru pH 7,4 za nepraženo kavo določimo za 148 % večji AOP kot v pufru pH 5 (najmanjši AOP), za praženo kavo pa 129 % večji AOP kot v metanolu (najmanjši AOP). Nekaj manjši je vpliv topila v ABTS testu, ko v pufru pH 7,4 za nepraženo in praženo kavo določimo za 79 %, oziroma 72 % večji AOP kot mQ vodi. S FC testom tako za nepražen kot za praženo kavo določimo največji AOP, vendar je razlika statistično značilna le za praženo kavo.



Slika 23: Primerjava AOP nepražene kave, ki je določen z ABTS (zelena), DPPH (vijolična) in FC (modra) metodo



Slika 24: Primerjava AOP pražene kave, ki je določen z ABTS (zelena), DPPH (vijolična) in FC (modra) metodo

Čaj in kava sta med najbolj razširjenimi pijačami, saj se jih uživa praktično po celi svetu. Primerjava rezultatov pridobljenih v okviru magisterija za analizirane vzorce čaja in kave razkrije, da je razpon AOP pri čajih 0,89 - 1,89 mmol TE/g s.s., pri kavah pa 0,21 - 0,59 mmol TE/g s.s.. Tudi primerjava podatkov za določen AOP čajev (preglednica 7 in 8) in kave (preglednica 9), ki so rezultat dela drugih avtorjev, razkrije, da kava na enoto mase vsebuje manj antioksidantov kot čaj. AOP vrednosti kave, ki smo jih določili v okviru magistrskega študija, so primerljive z rezultati drugih avtorjev. Od ostalih izstopajo predvsem rezultati Pérez-Hernández in sod. (2012), kjer so za enake vzorce kave določili nekajkrat višje vrednosti z DPPH metodo kot z ABTS. Velikih razlik ne moremo pripisati uporabi topila, saj so DPPH test izvajali v metanolu in ne v nevtralnem pH, kjer bi posledično lahko določili višje vsebnosti antioksidantov (sliki 23 in 24). AOP kave so določali mnogi avtorji, vendar v mnogih primerih iz načinov podajanja rezultatov ni bilo mogoče izračunati vsebnosti antioksidantov, ki je normalizirana na maso kave, zato je število člankov, s katerimi primerjamo rezultate naše raziskave, relativno majhno.

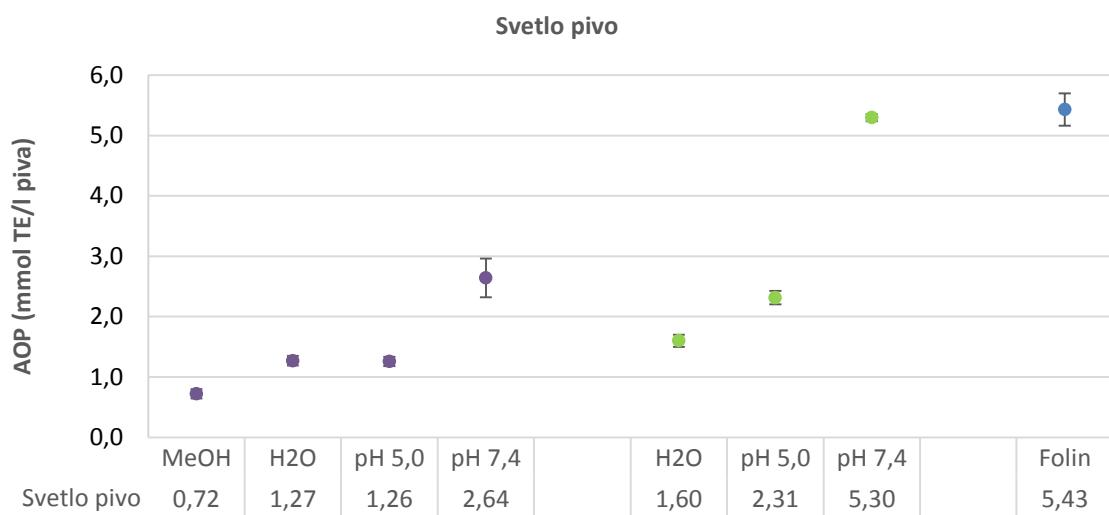
Preglednica 9: AOP nepražena in pražene kave, določen z različnimi metodami

Vir		ABTS (mmol TE/g s.s.)	DPPH (mmol TE/g s.s.)	FC (mmol TE/g s.s.)
Martínez in sod. (2012)	Nepražena kava	0,2-0,23	0,8-0,84	0,33-0,38
Pilipczuk in sod. (2015)		0,24-0,3	0,38-0,46	0,38-0,47
Perrone in sod. (2012)		0,36-0,5	/	/
Naše delo ^a		0,26 ± 0,07	0,32 ± 0,15	0,59
Pérez-Hernández in sod. (2012)	Pražena kava	0,2-0,24	0,69-0,94	0,26-0,38
Perrone in sod. (2012)		0,24-0,5		
Floegel in sod. (2011)		0,26	0,26	/
Kitzberger in sod. (2014)		0,15-0,22		0,25-0,28
Naše delo ^a		0,33 ± 0,08	0,29 ± 0,11	0,58

a – povprečje določitev v različnih topilih

4.3.3 AOP piva

V splošnem lahko ugotovimo, da pivo vsebuje milimolarne koncentracije antioksidantov, ki so izražene kot Troloks ekvivalenti. Vpliv topila znotraj posameznega testa na določen AOP je še višji kot pri čaju in kavi. Tako kot pri čaju in kavi tudi tu največ antioksidantov določimo pri pH 7,4 s kromogenimi radikali in s FC testom. V DPPH testu pri pH 7,4 določimo za 265 % večji AOP kot v metanolu. V ABTS testu pri pH 7,4 pa za 231 % večji AOP kot v mQ vodi. Najvišji AOP določimo s FC reagentom vendar se le ta statistično ne razlikuje od ABTS testa pri pH 7,4. Povprečna vrednost določenega AOP z ABTS je več kot enkrat večja od tiste določene z DPPH testom v različnih topilih. Razlika med metodami je tako precej večja kot pri vzorcih čaja in kave, kjer so se povprečne vrednosti razlikovale za približno 20 %.



Slika 25: Primerjava AOP svetlega piva, ki je določen z ABTS (zelena), DPPH (vijolična) in FC (modra) metodo

Vrednosti AOP, ki smo jih določili v okviru magistrske naloge, so v območju rezultatov drugih avtorjev (preglednica 10). Določeno izjemo predstavlja le ABTS test, kjer smo za pivo določili precej višje vsebnosti kot ostali avtorji. To lahko pripišemo predvsem dejству, da k višji povprečni vrednosti AOP v veliki meri prispevajo rezultati pri pH 7,4, medtem ko so preostali avtorji izvajali eksperimente v mQ vodi.

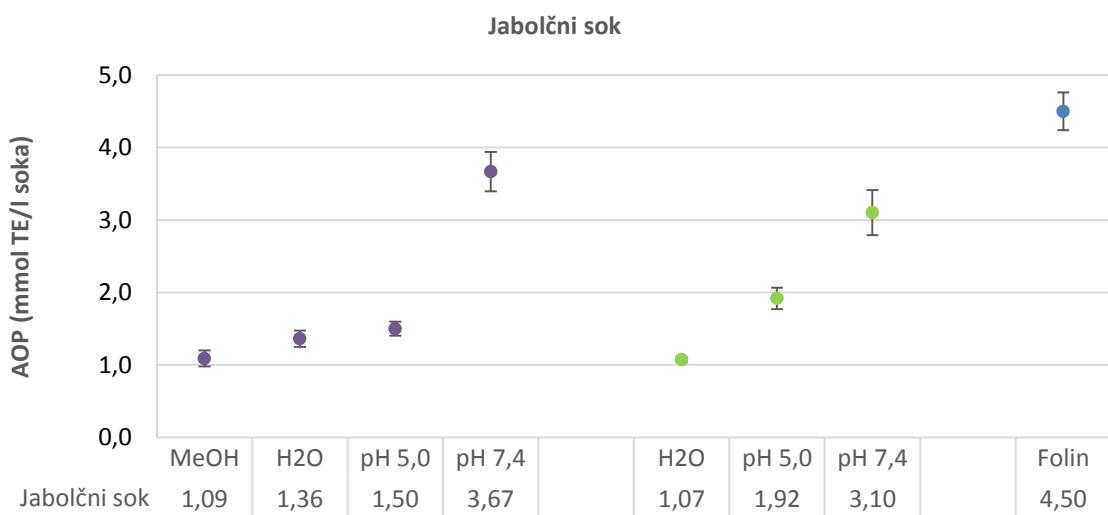
Preglednica 10: AOP svetlih piv, določen z različnimi metodami

Vir	ABTS (mmol TE/l piva)	DPPH (mmol TE/l piva)	FC (mmol TE/l piva)
Floegel in sod. (2011)	1,76-2,62	0,69-1,72	/
Vinson in sod. (2003)	/	/	0,76-4,33
Zhao in sod. (2010)	0,55-1,95	0,24-1,35	2,30-5,12 ^d
Mitić in sod. (2014)	0,14-0,32	0,26-0,83	4,96-8,23 ^d
Naše delo ^a	3,07 ± 1,60	1,47 ± 0,71	5,44 ± 0,27

a – povprečje določitev v različnih topilih

4.3.4 AOP jabolčnega soka

Rezultati meritev za vsebnost antioksidantov v jabolčnem soku so podobne tistim za pivo tako v smislu vpliva reakcijskih pogojev na določen AOP kot v absolutni vsebnosti antioksidantov. V pozitivnem smislu močno odstopajo AOP vrednosti določene pri pH 7,4 ter s FC testom, kjer smo statistično značilno določili najvišji AOP. V okviru posameznega testa s kromogenima radikaloma je največji določen AOP od najmanjšega višji za 237 % (DPPH), oziroma 189 % (ABTS).



Slika 26: Primerjava AOP jabolčnega soka, ki je določen z ABTS (zelena), DPPH (vijolična) in FC (modra) metodo

Preglednica 11: AOP jabolčnega soka, določen z različnimi metodami

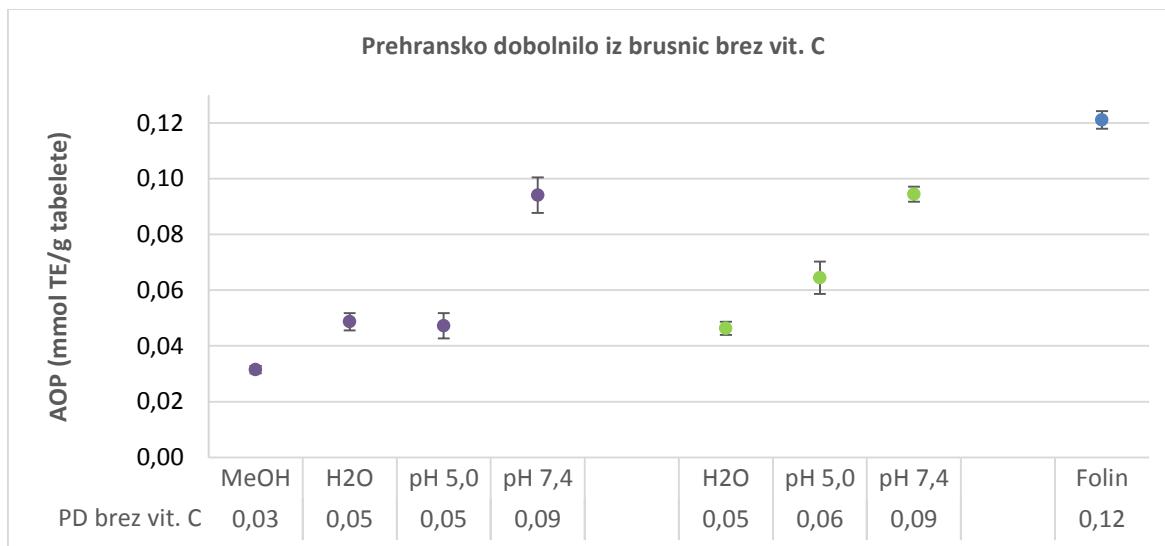
Vir	ABTS (mmol TE/l Sok)	DPPH (mmol TE/l Sok)	FC (mmol TE/l Sok)
Floegel in sod. (2011)	1,29	1,07	/
Kolniak-Ostek in sod. (2013)	0,19-0,69	0,68-2,39	/
Lachman in sod. (2006)	/	/	5,0-7,8
Abderrahim in sod. (2013)	/	1,11-1,34	/
Juranović Cindrić in sod. (2011)	1,23-1,6	/	6,2-9,7
Gliszczynska-Swiglo in Tyrakowska (2003)	1,10-1,95	/	/
Miller in Rice-Evans (1997)	0,840	/	/
Karaman in sod. (2010)	3,06-5,32	/	/
Naše delo ^a	2,03 ± 0,83	1,90 ± 1,03	4,5 ± 0,26

a – povprečje določitev v različnih topilih

V preglednici 11 so predstavljeni rezultati določevanja AOP jabolčnih sokov, ki smo jih pridobili iz literturnega pregleda. Iz preglednice je razvidno, da so rezultati, ki smo jih pridobili v okviru magistrske naloge primerljivi z literurnimi podatki, čeprav lahko opazimo tudi nekatera sistematična odstopanja. Ugotovimo lahko, da smo v primerjavi z rezultati drugih avtorjev določili nekaj manjši AOP s FC metodo. Slednje lahko pripisemo predvsem temu, da smo analizirali embaliran in v trgovini skladiščen jabolčni sok, v katerem se je zaradi reakcij oksidacije in/ali obarjanja vsebnost antioksidantov (fenolne spojine) zmanjšala, medtem ko so v večini preostalih del analizirali jabolčni sok takoj po stiskanju. Na drugi strani pa so povprečni rezultati za AOP določeni z DPPH in ABTS metodo v okviru naše raziskave odstopajo v pozitivnem smislu, saj smo v primerjavi z deli drugih avtorjev določili višji AOP. Odstopanje lahko v veliki meri pripisemo prispevku rezultatov določitve AOP pri pH 7,4, ki močno dvignejo povprečno vrednost AOP.

4.3.5 AOP prehranskega dopolnila iz brusnic

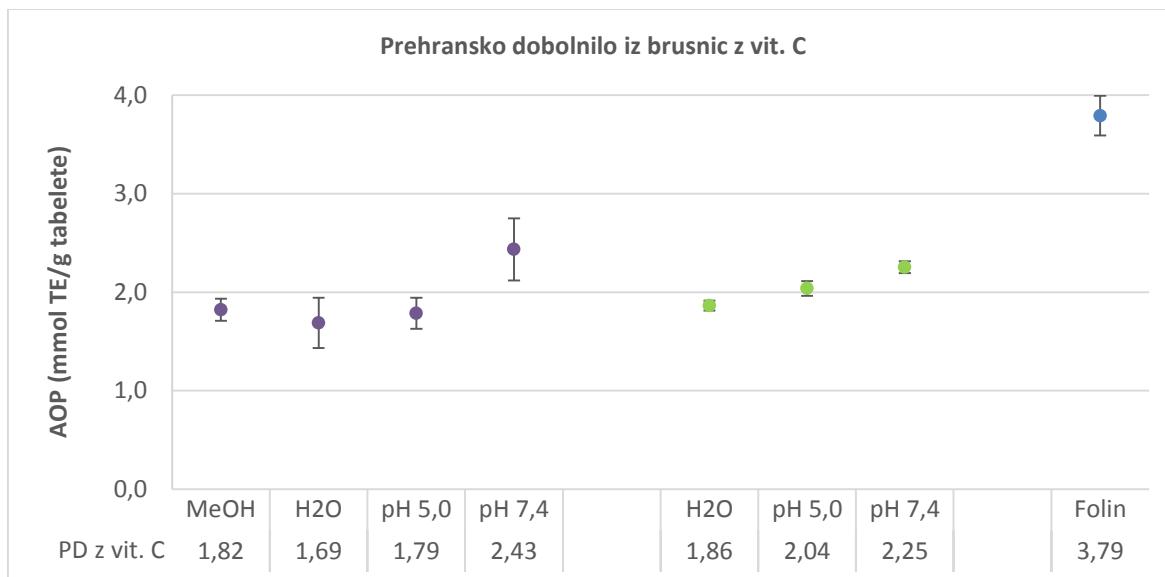
Na slikah 27 in 28 so predstavljene vrednosti AOP, ki smo jih z različnimi metodami in v različnih topilih določili za posušene plodove brusnic (slika 27) in za posušen ekstrakt brusnic kateremu je bil dodan vit. C (slika 28).



Slika 27: Primerjava AOP prehranskega dopolnila brez vit. C, ki je določen z ABTS (zelena), DPPH (vijolična) in FC (modra) metodo (rezultati predstavljajo povprečje \pm SD petih neodvisnih poskusov vključujuč ponovno tehtanje in razredčevanje vzorca ter pripravo radikala)

Primerjava AOP v obeh prehranskih dopolnilih razkrije velike razlike tako v absolutni vrednosti AOP kot pri vplivu topila na določen AOP. Prehransko dopolnilo brusnic z vit. C, ima skoraj za dva velikostna razreda višji AOP kot uprašeni plodovi brusnice. Iz podatkov o vsebnosti vit. C v prehranskem dopolnilu (100 mg /420 mg) lahko izračunamo, da je vsebnost vit. C v prehranskem dopolnilu 1,35 mmol/g. Če upoštevamo relativno učinkovitost askorbinske kisline v primerjavi s Troloksom (preglednica 12), lahko ugotovimo, da vit. C prispeva od 55 % do 78 % k skupnemu AOP obogatenega ekstrakta. Najmanjši prispevek vit. C k AOP je pri obeh kromogenih radikalih pri pH 7,4, kar se sklada z rezultati za ostale vzorce živil in modelne antioksidante, kjer smo z izjemno vit. C in Trolokso pri tem pH-ju določili občutno večji AOP. Na ta način je tudi prispevek fenolnih spojin v ekstraktu brusnice k celotnemu AOP pri pH 7,4 največji (ozioroma AK najmanjši). Primerjava podatkov v preglednici 12 ter slik 27 in 28 tudi razkrije veliko podobnost vpliva pH na določen AOP ekstrakta z dodatkom vit. C in same AK, saj sta povprečni vrednosti AOP za DPPH in ABTS upoštevajoč eksperimentalno napako določitve v obeh primerih enaki, medtem ko smo pri FC metodi v obeh primerih določili skoraj enkrat večji AOP. Kljub vsemu je vpliv topila znotraj posameznega testa na določen AOP ekstrakta z dodatkom vit. C večji kot pri sami AK (slika 13), kar lahko pripisemo prispevku antioksidantov iz brusnice. Na sliki 27 namreč vidimo, da je za prehransko dopolnilo brusnic brez vit. C znotraj ABTS in DPPH največji določen AOP več kot enkrat večji od najmanjšega.

Primerjava AOP za posušen ekstrakt brusnice s kavo in čajem razkrije, da so pri kavi vrednosti za AOP za približno 5-krat, pri čajih pa za več kot 10-krat večji. Seveda je potrebno upoštevati, da brusnice vsebujejo specifične antioksidante, ki jih v kavi in čaju ne najdemo, česar se moramo zavedati pri takem posploševanju.



Slika 28: Primerjava AOP prehranskega dopolnila z vit. C, ki je določen z ABTS (zelena), DPPH (vijolična) in FC (modra) metodo

Preglednica 12: AOP brusnic določen z različnimi metodami

Vir	ABTS (mmol TE/g PD)	DPPH (mmol TE/g PD)	FC (mmol TE/g PD)
Borowska in sod., (2009) ^b	0,07-0,13	0,26-0,52	0,22-0,43
Namiesnik in sod., (2013)	0,07	/	0,33
Rop in sod., (2010)	0,40-0,48	0,38-0,43	0,79-0,97
Akbulut in sod., (2008)	/	/	0,38
Našo delo ^a PD brusnic brez vit. C	0,068 ± 0,0199	0,055 ± 0,234	0,121 ± 0,003
Našo delo ^a PD brusnic z vit. C	2,05 ± 0,96	1,93 ± 0,29	3,79 ± 0,20

a – povprečje določitev v različnih topilih

b – preračunano na s.s.

Analiza literaturnih podatkov o vsebnosti antioksidantov v brusnicah (preglednica 12) razkrije, da so vrednosti za AOP, ki smo jih določili za uprašene brusnice brez dodanega vitamina C v večini primerov nekajkrat manjše od rezultatov ostalih avtorjev. Manjše vrednosti najverjetneje lahko pripišemo izgubam med sušenjem in skladiščenjem, saj so podatki ostalih avtorjev, ki so prikazani v preglednici, pridobljeni z analizo svežih plodov. V proporcionalnem smislu so rezultati v okviru magistrskega dela najbolj podobni rezultatom (Rop in sod., 2010), kjer so v FC testu določili približno enkrat večji AOP kot v ABTS in DPPH testih.

4.4 KORELACIJSKE ANALIZE

4.4.1 Reaktivnost modelnih antioksidantov in vzorcev pijač ter prehranskih dopolnil v ABTS, DPPH in FC testih

V okviru magistrske naloge smo generirali veliko število podatkov. Za osem modelnih antioksidantov in osem kompleksnih vzorcev smo določili reaktivnost v različnih izvedbah DPPH in ABTS testov ter v FC testu (skupaj osem izvedb za vsak vzorec). Ob upoštevanju molarnega absorpcijskega koeficiente ABTS in DPPH ter reaktivnosti Fe²⁺ ionov v FC testu smo lahko izmerjene spremembe absorbanc podali kot število izmenjanih elektronov v posamezni reakciji, ki je normalizirano na množino modelnega antioksidanta, oziroma

maso/volumen kompleksnega vzorca. Podatki so predstavljeni v preglednici 13. Za posamezen modelni antioksidant/vzorec je test z največjim številom izmenjanih elektronov označen z modro, z najmanjšim številom izmenjanih elektronov pa z rdečo barvo.

Preglednica 13: Množina izmenjanih elektronov, ki jih modelni antioksidanti ter izbrane pijače in prehranska dopolnila izmenjajo v reakcijah z ABTS, DPPH in FC reagenti

Vzorci	DPPH				ABTS			FC H ₂ O
	MeOH	H ₂ O	pH 5	pH 7,4	H ₂ O	pH 5	pH 7,4	
AK*	1,6	1,8	1,8	2,0	1,7	1,7	1,7	3,9
EGCG*	8,9	10,6	11,1	15,8	8,8	11,6	14,8	11,4
GK*	5,2	6,2	6,2	5,1	6,2	8,3	10,4	5,4
DHA*	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,9
KA*	3,0	4,1	5,5	8,4	5,7	6,9	7,9	8,8
KK*	2,1	2,3	2,3	6,2	2,5	2,3	2,4	5,5
CQA*	2,0	2,2	2,4	6,2	2,0	2,2	3,1	7,0
Troloks*	1,8	1,9	1,9	1,9	1,8	1,8	1,7	2,1
Zeleni čaj**	1,7	2,2	2,5	2,7	2,1	2,4	3,2	3,1
Črni čaj**	1,6	2,1	2,4	3,0	2,1	2,4	3,3	3,4
Nepražena kava**	0,4	0,4	0,4	1,1	0,4	0,4	0,6	1,2
Pražena kava**	0,4	0,4	0,5	0,9	0,5	0,5	0,8	1,2
PD z vit. C**	3,2	3,1	3,4	4,7	3,3	3,7	3,9	8,0
PD brez vit. C**	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,3
Jabolčni sok***	1,9	2,5	2,5	7,0	1,9	3,4	5,4	9,5
Svetlo pivo***	1,3	2,4	2,4	5,1	2,9	4,1	9,2	11,4

* mol izmenjanih elektronov/mol antioksidanta

**mmol izmenjanih elektronov/g s.s.

***mmol izmenjanih elektronov/l

Modra barva predstavlja največje število izmenjanih elektronov

Rdeča barva predstavlja najmanje število izmenjanih elektronov

Iz rezultatov v preglednici 13 je razviden velik razpon reaktivnosti antioksidantov v odvisnosti od izbranega testa. V splošnem lahko ugotovimo, da je reaktivnost največja v FC testu, saj z izjemo epigalokatehin galata, galne kislina, kavne kislina in zelenega čaja v vseh ostalih dvanajstih primerih določimo v FC testu največje število izmenjanih elektronov. Na drugi strani smo za dvanajst vzorcev določili najmanjo reaktivnost v DPPH testu v metanolu. Štiri izjeme so epigalokatehin galat, galna kislina, nepražena kava in prehransko dopolnilo brusnic z vit. C. Od vseh vzorcev tako najbolj odstopata galna kislina in epigalokatehin galat, kjer smo tako največjo kot najmanjo vrednost določili pri »atipičnih« pogojih.

4.4.2 Statistično ovrednotenje razlik v reaktivnosti v ABTS, DPPH in FC testih za posamezne vzorce

Podatki o številu izmenjanih elektronov so podrobnejše analizirani v preglednici 14. Za vsak modelni antioksidant/vzorec smo določili razmerje med največjim in najmanjšim številom izmenjanih elektronov ter koeficient variacije znotraj različnih izvedb DPPH testa, ABTS testa kakor tudi razlike v reaktivnosti upoštevajoč vseh osem načinov meritev za posamezen modelni antioksidant/vzorec.

Preglednica 14: Razmerje med največjim in najmanjšim številom izmenjanih elektronov znotraj različnih izvedb DPPH testa, ABTS testa in za vse metode skupaj ter koeficient variacije

Vzorci	DPPH		ABTS		Vse metode	
	max/min	KV (%)	max/min	KV (%)	max/min	KV (%)
AK*	1,2	9	1,0	1	2,4	37
EGCG*	1,8	26	1,7	26	1,7	22
GK*	1,2	11	1,7	25	2,0	28
DHA*	18,8	161	1,3	16	59,0	193
KA*	2,8	44	1,4	16	2,9	33
KK*	3,0	62	1,1	3	3,0	52
CQA*	3,1	63	1,5	23	3,6	60
Troloks*	1,1	4	1,0	2	1,2	6
Zeleni čaj**	1,6	19	1,5	22	1,9	21
Črni čaj**	1,9	27	1,6	25	2,1	26
Nepražena kava**	2,5	57	1,7	30	3,5	55
Pražena kava**	2,5	46	1,7	29	3,3	47
PD z vit. C**	1,5	20	1,2	8	2,5	39
PD brez vit. C**	3,3	52	2,0	34	4,6	51
Jabolčni sok***	3,7	66	2,8	49	5,0	64
Svetlo pivo***	4,0	59	3,2	62	9,0	75

* mol izmenjanih elektronov/mol antioksidanta

**mmol izmenjanih elektronov/g s.s.

***mmol izmenjanih elektronov/l

Odebeljena pisava predstavlja koeficient variacije <10 %

Iz rezultatov v preglednici 14 je razvidna velika razlika v reaktivnosti antioksidantov/vzorcev tako v okviru variant ABTS ali DPPH testov kakor tudi pri primerjavi vseh testov. Razlike so pričakovano največje, če primerjamo reaktivnost v vseh testih. Zodebeljeno pisavo smo označili rezultate, ki imajo koeficienti variacije nižji od 10 %. Med modelnimi antioksidanti je največje razmerje med največjim in najmanjšim številom izmenjanih elektronov pri dehidroaskorbinski kislini (≈ 59), najmanjše pa pri Troloksu (1,2), kjer je koeficient variacije le 6 %. Pri vzorcih smo največje razmerje določili pri svetlem pivu (9,0) najmanjše pa pri zelenem čaju (1,9). Koeficienti variacije za vzorce so v območju od 21 % (zeleni čaj) do 75 % (svetlo pivo). V okviru posameznega testa so koeficienti variacije manjši, a še vedno le za askorbinsko kislino in Troloks ne presegajo 10 % v okviru DPPH testa, oziroma za askorbinsko kislino, kavno kislino in Troloks, v okviru ABTS testa. V splošnem lahko ugotovimo, da so razlike pri vzorcih še večje, saj je le za prehransko dopolnilo z vit. C v ABTS testu koeficient variacije manjši od 10 %. Za vse ostale primere, tako znotraj posameznega testa kakor skupno velja, da presegajo 19 %.

4.4.3 Korelacijska analiza različnih testov za določevanje AOP

Izbor testa in topila ima torej nedvomno velik vpliv na število izmenjanih elektronov v reakciji. Mnogi avtorji poročajo, da obstaja velika korelacija med posameznimi testi za določevanje AOP, kar nedvomno lahko potrdimo tudi na osnovi analize reaktivnosti za 16 različnih vzorcev (8 modelnih antioksidantov + 8 kompleksnih vzorcev).

Preglednica 15: Medsebojna povezanost ABTS in DPPH metod v različnih topilih ter FC metode določena s Pearsonovimi korelacijskimi koeficienti

		Pearsonov korelacijski koeficient							
		DPPH				ABTS			FC
Radikal in topila		MeOH	H ₂ O	pH 5	pH 7,4	H ₂ O	pH 5	pH 7,4	H ₂ O
DPPH	H ₂ O	0,99							
	pH 5	0,98	0,99						
	pH 7,4	0,87	0,89	0,91					
ABTS	H ₂ O	0,95	0,97	0,98	0,87				
	pH 5	0,94	0,97	0,98	0,88	0,99			
	pH 7,4	0,87	0,92	0,92	0,85	0,93	0,96		
FC	H ₂ O	0,63	0,68	0,70	0,84	0,71	0,74	0,81	
Povprečje \bar{x}		0,89	0,92	0,92	0,87	0,92	0,92	0,90	0,73

Znotraj DPPH testa (vijolično) so korelacijski koeficienti v območju od 0,87-0,99. V negativnem smislu odstopa predvsem DPPH test pri pH 7,4, kjer smo ugotovili najslabše korelacije. Med različnimi izvedbami ABTS testov (zeleno) so korelacije v območju 0,93-0,99. Podobno kot pri DPPH testu lahko za ABTS test ugotovimo, da so pri pH 7,4 slabše korelacije. Za oba radikala tudi velja, da pH 7,4 bolje korelira z izvedbo testov pri pH 5 kot pa pri pogojih, ko v raztopino ni bil dodan kislinsko bazni par (metanol, voda). Primerjava različnih variant DPPH in ABTS testov (črno) razkrije, da so korelacije v območju od 0,85-0,98. Podobno kot za primerjave znotraj posameznega testa tudi tu velja, da najslabše korelacije določimo za pH 7,4, medtem ko za teste v metanolu, vodi ali pufru pH 5 korelacije niso manjše od 0,94. Primerjava FC testa (modro) z različni izvedbami DPPH in ABTS testov razkrije, da so korelacije v vseh primerih manjše od korelacij, ki smo jih ugotovili za oba radikala. Kljub temu pa lahko opazimo skupno značilnost FC testa, da so korelacijski koeficienti z ABTS in DPPH testoma največji pri pH 7,4. Slednje najverjetneje lahko pripisemo dejству, da FC test poteka v bazičnem pH-ju (dodatek Na₂CO₃).

Na osnovi statistične obdelave podatkov smo ugotovili veliko razliko v reaktivnosti med posameznimi antioksidanti/vzorci v odvisnosti od izbrane metode (preglednica 15). Relativno dobra korelacija med metodami (preglednica 15) torej še ne zagotavlja primerljivosti rezultatov med posameznimi raziskavami, ki so opravljene pri različnih pogojih. Tako se npr. tudi v primerih, ko smo ugotovili odlično korelacijo (0,99) pri DPPH_{MeOH}/DPPH_{H₂O} in ABTS_{H₂O}/ABTS_{pH5} lahko število izmenjanih elektronov pri nekaterih vzorcih razlikuje skoraj za dvakratnik (svetlo pivo-DPPH, jabolčni sok-ABTS).

4.4.4 Korelacijska analiza reaktivnosti modelnih antioksidantih v različnih testih za določevanje AOP

Razlike oziroma podobnosti v reaktivnosti modelnih antioksidantov v različnih testih smo ovrednotili s korelacijsko analizo (preglednica 16). Negativne korelacije so prikazane z zvezdico, pozitivne korelacije, ki presegajo 0,9 pa z odbeljeno pisavo. V preglednici 16 so za vsak posamezen modelni antioksidant prikazane tudi povprečne vrednosti Pearsonovih korelacijskih koeficientov.

Preglednica 16: Primerjava reaktivnosti modelnih antioksidantov v ABTS in DPPH testih ter v FC testu, določena s Pearsonovimi korelacijskimi koeficienti

Pearsonov korelacijski koeficient								
Vzorci	AK	EGCG	GK	DHA	KA	KK	CQA	Troloks
EGCG	0,07							
GK	-0,31*	0,35						
DHA	0,98	0,18	-0,37*					
KA	0,55	0,74	0,26	0,61				
KK	0,67	0,56	-0,43*	0,79	0,72			
CQA	0,81	0,55	-0,32*	0,90	0,77	0,96		
Troloks	0,90	0,15	-0,51*	0,91	0,52	0,76	0,83	
Povprečje \bar{x}	0,52	0,37	-0,19*	0,57	0,59	0,58	0,64	0,51

* predstavlja negativen Pearsonov korelacijski koeficient

Z odbeljeno pisavo smo predstavili Pearsonov korelacijski koeficient $>0,90$

Iz rezultatov prikazanih v preglednici, je razvidno, da od ostalih modelnih antioksidantov odstopa predvsem galna kislina, saj z večino ostalih antioksidantov opazimo celo negativno korelacijo (rdeča barva). To pomeni, da ima izbor testa za določitev AOP celo nasproten vpliv na reaktivnost kot pri primerjanem antioksidantu. Zanimivo je, da obstaja šibka korelacija med reaktivnostjo epigalokatehin galata in galne kisline, kar bi lahko pripisali podobni kemijski strukturi (EGCG je derivat GK). Tudi pri največjih določenih korelacijskih koeficientih (modra barva) ima struktura pomembno vlogo. Reaktivnost dehidroaskorbinske kisline, ki je oksidirana oblike askorbinske kisline, odlično korelira s slednjo (0,98). Podobno velja za korelacijo med kavno kislino in klorogensko kislino, ki je ester kavne kisline (0,96). V splošnem lahko ugotovimo, da so korelacije v reaktivnosti izbranih modelnih antioksidantov relativno slabe. Povprečna vrednost vseh korelacijskih koeficientov za galno ksilino z ostalimi antioksidanti je celo negativna, pri ostalih pa povprečna vrednost ne presega 0,64. Povprečje vseh korelacijskih koeficientov je 0,45. Relativno velike razlike lahko pripisemo tudi pestremu izboru modelnih antioksidantov, saj smo kot standarde uporabili hidroksicimetno kislino, trihidroksibenzojsko kislino in flavanol ter njihove derivate, vitamena C in sintetični kromanol.

4.4.5 Korelacijska analiza reaktivnosti vzorcev pijač in prehranskih dopolnil v različnih testih za določevanje AOP

Primerjava reaktivnosti vzorcev živil in prehranskih dopolnil (preglednica 17) razkrije, da je njihova reaktivnost v različnih testih precej bolj podobna kot pa pri standardih. Povprečen korelacijski koeficient za vse primerjane vzorce je kar 0,85 (0,45 za modelne antioksidante). Z vsemi ostalimi vzorci najbolj korelira reaktivnost pražene kave. Povprečna vrednost korelacijskih koeficientov za kavo je kar 0,93, pri čemer je najmanjši korelacijski koeficient 0,81, ostali pa so večji od 0,9. Pražena kava je izjemno kompleksen matriks, saj vsebuje antioksidante, ki so značilni za kavova zrna, kakor tudi antioksidante, ki nastanejo pri praženju kot posledica razgradnje fenolnih spojin, ter produkte Maillardove reakcije (Cho in sod., 2014).

Preglednica 17: Primerjava reaktivnosti vzorcev živil in prehranskih dopolnil v ABTS in DPPH testih ter v FC testu določena s Pearsonovimi korelacijskimi koeficienti

Pearsonov korelacijski koeficient								
Vzorci	Zeleni čaj	Črni čaj	Nepražena kava	Pražena kava	PD z vit. C	PD brez vit. C	Jabolčni sok	Svetlo pivo
Črni čaj	0,98							
Nepražena kava	0,65	0,78						
Pražena kava	0,81	0,90	0,95					
PD z vit. C	0,64	0,73	0,88	0,93				
PD brez vit. C	0,86	0,93	0,92	0,99	0,91			
Jabolčni sok	0,81	0,90	0,96	0,99	0,91	0,99		
Svetlo pivo	0,90	0,92	0,74	0,90	0,83	0,83	0,88	
Povprečje \bar{x}	0,81	0,88	0,84	0,93	0,83	0,91	0,92	0,87

Z odbeljeno pisavo smo predstavili Pearsonov korelacijski koeficient $>0,90$

Kompleksna sestava vseh analiziranih vzorcev je najverjetneje tudi razlog za ugotovljene večje korelacije kot v primeru modelnih antioksidantov, saj se relativno velike razlike v reaktivnosti posameznih spojin izničijo, ko so prisotne v kompleksni mešanici. Iz rezultatov v preglednici 17 je razvidna tudi odlična korelacija za zeleni in črni čaj (0,98) saj je sestava fenolnih spojin najverjetneje podobna. Dobra je tudi korelacija med praženo in nepraženo kavo (0,95).

4.4.6 Korelacijska analiza reaktivnosti vzorcev pijač in prehranskih dopolnil z reaktivnostjo modelnih antioksidantov v različnih testih za določevanje AOP

O povezavah v reaktivnosti posameznih modelnih antioksidantov in vzorcev pijač ter prehranskih dopolnil lahko sklepamo iz preglednice 18. Z zvezdico so označeni največji korelacijski koeficienti posameznega modelnega antioksidanta z realnim vzorcem in obratno. Z dvema zvezdicama so označeni primeri negativnih korelacijskih koeficientov.

Preglednica 18: Povezava med reaktivnostjo vzorcev živil in prehranskih dopolnil ter reaktivnostjo modelnih antioksidantov v ABTS in DPPH testih ter v FC testu določena s Pearsonovimi korelacijskimi koeficienti

Pearsonov korelacijski koeficient								
Vzorci	AK	EGCG	GK	DHA	KA	KK	CQA	Troloks
Zeleni čaj	0,54	0,72*	0,47*	0,54	0,88	0,49	0,64	0,46
Črni čaj	0,61	0,76*	0,32	0,65	0,94*	0,66	0,77	0,55
Nepražena kava	0,79	0,58	-0,29**	0,88	0,76	0,95*	1,00*	0,80
Pražena kava	0,83	0,58	-0,06**	0,89	0,87	0,86	0,95*	0,76
PD z vit. C	0,97*	0,25	-0,23**	0,99*	0,70	0,77	0,89	0,86*
PD brez vit. C	0,82	0,60	0,04	0,86	0,89	0,81	0,92*	0,74
Jabolčni sok	0,81	0,62	-0,06**	0,88	0,86	0,86	0,96*	0,76
Svetlo pivo	0,74	0,52	0,32	0,74	0,83*	0,55	0,72	0,53
Povprečje \bar{x}	0,76	0,58	0,06	0,80	0,84	0,74	0,86	0,68

* največji korelacijski koeficient posameznega modelnega antioksidanta z realnim vzorcem in obratno

** negativen Pearsonov korelacijski koeficient

Z odbeljeno pisavo smo predstavili Pearsonov korelacijski koeficient $>0,90$

Kot smo že ugotovili pri korelacijskih analizah reaktivnosti modelnih antioksidantov, odstopa od ostalih galna kislina, saj smo v polovici primerov ugotovili negativno korelacijo. V pozitivnem smislu od ostalih odstopa, resda s šibko pozitivno korelacijo (0,47), zeleni čaj. To bi lahko pripisali veliki vsebnosti epigalokatehin galata v čaju (Arts in sod., 2000), ki je derivat galne kislino. Posledično je še boljša kot z galno kislino pri obeh čajih korelacija z epigalokatehin galatom. Velik vpliv prevladujoče spojine lahko ugotovimo tudi na primeru

prehranskega dopolnila z dodanim vit. C, kjer smo ugotovili izjemno dobro korelacijo z modelnima antioksidantoma askorbinsko (0,97) in dehidroaskorbinsko (0,99) kislino. Pričakovana je, zaradi dobre korelacije obeh vitamerov vitamina C in Troloksa, dobra tudi korelacija slednjega s prehranskim dopolnilom z dodanim vit. C (0,86). Pri neprazenih kavah je dobro razvidno, da sta prevladujoča antioksidanta klorogenska kislina (1,00) in kavna kislina (0,95). Najverjetneje lahko tudi dobro korelacijo med katehinom in črnim čajem (0,94) povežemo s tem, da so derivati katehina pomembna sestavina čajev. V splošnem lahko ugotovimo, da imata največjo povprečno korelacijo z izbranimi živilimi katehin (0,84) in klorogenska kislina (0,86), kar bi lahko pripisali tudi veliki razširjenosti katehina in njegovih derivatov ter različnih klorogenskih kislin v živilih rastlinskega izvora (Huang in Ferraro, 1992).

Statistična analiza podatkov o reaktivnosti modelnih antioksidantov in vzorcev pijač ter prehranskih dopolnil je razkrila velike razlike v reaktivnosti tako na nivoju različnih variant posameznega testa (ABTS ali DPPH) kakor tudi pri medsebojni primerjavi vseh rezultatov. Podatke o AOP smo pridobili iz meritev, ki so potekale po 1 urni inkubaciji na 25 °C. Kakršnakoli sprememba časa inkubacije ali temperature (vpliva na hitrost reakcije) bi lahko rezultirala še v večjih razlikah v določenem AOP za enake vzorce. Izmed vseh analiziranih modelnih antioksidantov/vzorcev je edino Troloks imel standardno deviacijo, ki je manjša od 10 %, ko smo upoštevali vse izvedbe testov. Menimo, da je zaradi tega tudi najprimernejši standard za določevanje AOP, saj se njegova reaktivnost le malo spreminja v odvisnosti od izbranega testa, kar naj bi bila najpomembnejša lastnost spojine, ki se uporablja za normalizacijo rezultatov. Pogojno bi lahko kot primeren standard uporabili še askorbinsko kislino, vendar le pri testih z radikaloma ABTS in DPPH. Reaktivnost se v FC testu praktično podvoji, kar lahko pripisemo dehidroaskorbinski kislini. Galna kislina, ki se poleg Troloksa in askorbinske kisline pogostokrat uporablja kot standard, je manj primerna. Ugotovili smo namreč velike razlike v reaktivnosti, predvsem znotraj ABTS testa, kakor tudi atipično majhno reaktivnost v FC testu. Posledično so tudi korelacije reaktivnosti galne kisline z ostalimi modelnimi antioksidanti in vzorci izjemno slabe. Da bi sploh lahko primerjali določene vrednosti AOP različnih avtorjev je tako nujno navesti eksperimentalne pogoje (temperatura, čas, sestava topila, radikal/oksidant, koncentracije) in rezultate podati v obliki surovih podatkov kot spremembo absorbance ali pa normalizirane na standard, katerega reaktivnost se najmanj spreminja v različnih testih (Troloks).

V mnogih raziskavah so pokazali, da obstaja velika korelacija med določenim AOP za enak tip vzorcev z metodama ABTS, DPPH in z FC metodo (Paixão in sod., 2007; Teow in sod., 2007), kar kaže, da z vsemi analiziramo reaktivnost redoks aktivnih spojin. Toda dobra korelacija še ni zagotovilo za pravilnost meritev, saj lahko kljub odlični korelaciji (poglavlje 4.4.3) za enake vzorce določimo velike razlike v AOP v odvisnosti od variant testa (poglavlje 4.4.1).

Seveda se poraja vprašanje, katera od metod je najprimernejša za določevanje AOP. Dejstvo je, da v izvedbi ABTS in DPPH testov prihaja do velikih razlik tako v sestavi topila kot v trajanju reakcije, kar ima nedvomno velik vpliv na določen AOP v različnih raziskavah. Pogostokrat avtorji tudi ne poročajo o vseh podrobnostih testov z radikaloma ABTS in DPPH, tako da je praktično nemogoče primerjati rezultate različnih raziskav. Za FC test na druge strani je variacija v izvedbi eksperimentov precej manjša, saj nekaj minutni inkubaciji vzorca skupaj s FC reagentom sledi dodatek baze Na₂CO₃ in nadaljnja inkubacija v trajanju

60-90 minut preden se pomeri absorbanca. Poleg tega so pokazali (Bertalanič, 2011; Hodnik, 2014; Abramovič in sod., 2015), da imajo razlike v časih inkubacije le majhne vpliv na AOP vrednost, določeno s FC testom. Nenazadnje sem tudi sam v okviru magistrske naloge pokazal podobno (slika 13). Zaradi naštetega menim, da pri testih s kromogenimi radikali prihaja do večjih razlik v določeni vrednosti za AOP kot pa s FC reagentom. Kot najprimernejši standard pa lahko izpostavim Troloks, ki edini od analiziranih v okviru naloge izmenja približno enako število elektronov v ABTS, DPPH in FC testih.

5 SKLEPI

- Reaktivnost sintetičnega antioksidanta Troloks se le malo spreminja v ABTS, DPPH in FC testih. V omenjenih testih pri oksidaciji ena molekula Troloksa izmenja od 1,74 do 2,10 elektronov.
- Reaktivnost askorbinske kisline, dehidroaskorbinske kisline, galne kisline, katehina, epigalokatehin galata, klorogenske kisline in kavne kisline je močno odvisna od izbranega testa za določitev AOP.
- Večina modelnih antioksidantov izmenja največje število elektronov v FC testu in najmanjše število elektronov v DPPH testu, ko je topilo metanol.
- Pri umeritvenih krivuljah smo ugotovili linearno odvisnost spremembe absorbance kot funkcijo koncentracije antioksidanta. Izjemo predstavlja katehin, kjer smo pri DPPH testu ugotovili, da se reaktivnost z naraščajočo koncentracijo manjša.
- Pri analizi kinetičnega poteka reakcije vzorcev pijač (zeleni čaj, črni čaj, nepražena kava, pražena kava, jabolčni sok, svetlo pivo) in prehranskih dopolnil iz brusnic (prehransko dopolnilo brusnic z in brez vit. C) v ABTS in DPPH testih smo ugotovili velike razlike v poteku reakcije. V večini primerov velja, da tudi po treh urah inkubacije reakcija še vedno poteka. Odločili smo se, da bomo antioksidativni potencial izbranih vzorcev ovrednotili po enourni inkubaciji ter ga izrazili kot molarne ekvivalente Troloksa.
- Izbor metode za določevanje AOP in sestava topila imajo velik vpliv na reaktivnost vzorcev pijač in prehranskih dopolnil. Pri večini vzorcev se pri redoks reakciji največje število elektronov izmenja pri FC testu, najmanjše pa pri DPPH testu v metanolu.
- Izbor metode ima največji vpliv na potek reakcije antioksidantov v svetlem pivu, ko se pri FC testu izmenja kar devetkrat več elektronov kot pri DPPH testu v metanolu. Najmanjše razlika je pri zelenem čaju, kjer se pri ABTS testu pH 7,4 izmenja 1,9 krat več elektronov kot pri DPPH testu v metanolu.
- V splošnem lahko ugotovimo, da je pri izbranem modelnem antioksidantu/vzorcu v okviru ABTS ali DPPH testa število izmenjanih elektronov največje pri pH 7,4, najmanjše pa v primeru, ko v raztopino za določitev AOP ne dodamo pufra.
- Dobra korelacija med metodami za določitev AOP ne zagotavlja, da je število izmenjanih elektronov za posamezen vzorec pri obeh metodah približno enako.
- Število izmenjanih elektronov pri FC metodi najbolje korelira z ABTS in DPPH testi, kjer je pH topila 7,4.
- Korelacijska analiza razkrije, da ima izbor metode za določitev AOP podoben vpliv na reaktivnost strukturno podobnih matrikov (pravi in zeleni čaj, nepražena in pražena kava). Razvidna je tudi dobra korelacija modelnih antioksidantov in vzorcev, kjer so le ti med najpomembnejšimi antioksidanti (askorbinska kislina in prehransko dopolnilo brusnic z vit. C, kavna ter klorogenska kislina in kava, epigalokatehin galat in čaj).

6 POVZETEK

Za določitev AOP vzorcev se uporablja več deset različnih metod (Chanda in Dave, 2009). Zaradi lažje izvedbe eksperimentalnega dela smo uporabili spektrofotometrične metode. Osredotočili smo se na ABTS, DPPH in FC metode. ABTS in DPPH metodi temeljita na reakciji antioksidantov z radikaloma. FC metoda temelji na reakciji antioksidantov z molibdati in volframati.

Osnovni namen magistrskega dela je bil standardizirati teste za določitev antioksidativnega potenciala. V testih, ki smo jih izvedli z različnimi topili in radikali, smo opazovali kinetičen potek reakcij v odvisnosti od dodanega antioksidanta. Po enakem postopku kot modelne antioksidante smo analizirali tudi vzorce pijač in prehranskih dopolnil.

Pripravili smo osem različnih reakcijskih mešanic, v katerih smo določevali AOP. Reakcijske mešanice z ABTS radikalom smo pripravili v mQ vodi, fosfatnem pufru (pH 7,4) in acetatnem pufru (pH 5,0). Teste z DPPH radikalom smo pripravili v metanolu, mQ vodi, fosfatnem pufru (pH 7,4) in acetatnem pufru (pH 5,0). FC test smo opravili le po enem protokolu.

Analize smo opravili na osmih različnih modelnih antioksidantih: askorbinska kislina, klorogenska kislina, kavna kislina, dehidroaskobinska kislina, epigalokatehin galat, galna kislina, katehin in Troloks. Vsakega izmed njih smo v določeni koncentraciji dodali v vseh osem reakcijskih mešanic. Za analizo realnih vzorcev živil smo izbrali osem različnih vzorcev: nepraženo kavo, praženo kavo, zeleni čaj, črni čaj, prehransko dopolnilo brusnic z in brez dodanega vit. C, jabolčni sok in svetlo pivo. Po zgoraj opisanem postopku smo vsakega izmed njih v določeni razredčitvi dodali v vsako reakcijsko mešanico. Vse eksperimente smo ponovili v treh neodvisnih eksperimentih, ki so vključevali celoten potek priprave vzorca (npr. kuhanje čaja in kave, raztapljanje prehranskih dopolnil).

Za namen medsebojne primerjave vzorcev smo rezultate izrazili v ekvivalentih modelnega antioksidanta, katerega reaktivnost se najmanj spreminja v odvisnosti od izbora testa za določitev AOP. Ugotovili smo, da je to Troloks, kjer je povprečno število izmenjanih elektronov v osmih različnih testih 1,90 na molekulo, pri čemer je standardna deviacija števila izmenjanih elektronov 6 %.

Ugotovili smo, da prihaja do velikih razlik v določitvi AOP za enake vzorce. V splošnem lahko ugotovimo, da smo največji AOP, izražen kot ekvivalente Trolokса, določili v FC testu, sledita ABTS in DPPH testa pri pH 7,4, nato ABTS in DPPH testa pri pH 5, najmanjši AOP pa smo določili pri ABTS testih v primerih, ko v reakcijsko mešanico nismo dodali pufru. Največjo razliko v določenem AOP za enak vzorec smo določili pri svetlem pivu, kjer je razmerje med največjim in najmanjšim določenim AOP 7,5; najmanjsa, a še vedno velika, je razlika pri zelenem čaju, kjer je razmerje med največjim in najmanjšim določenim AOP 1,9.

Za name koreacijske analize smo pri vseh modelnih antioksidantih in vzorcih izračunali število izmenjanih elektronov v ABTS, DPPH in FC testih normaliziranih na množino antioksidanta, oziroma maso ali volumen raztopine vzorcev. Ugotovili smo zelo dobre korelacije v okviru posameznih variant ABTS in DPPH testov. Izjemo predstavljajo analize pri pH 7,4, kjer je korelacija slabša. Obratno pa velja za FC test, kjer rezultati bolje korelirajo

z eksperimenti pri pH 7,4 kot pa z eksperimenti v raztopinah z nižjim pH, oziroma v primerih, ko so bili eksperimenti opravljeni v raztopinah brez dodanega pufra.

Ugotovili smo dobro korelacijo, ko smo primerjali vpliv testa za določitev AOP na število izmenjanih elektronov pri strukturno podobnih spojinah, oziroma pri korelacji spojin, ki predstavljajo pomemben prispevek k AOP matriksa s katerim to spojino koreliramo. V splošnem lahko ugotovimo, da so korelacije med vzorci večje kot pa med modelnimi antioksidanti. To lahko pripisemo heterogeni sestavi vzorcev, kjer se zaradi kompleksne sestave razlike zabrišejo.

7 VIRI

- Abderrahim F., Arribas S.M., Gonzalez M.C., Condezo-Hoyos L. 2013. Rapid high-throughput assay to assess scavenging capacity index using DPPH. Food Chemistry, 141, 2: 788-794
- Abid M., Jabbar S., Wu T., Hashim M.M., Hu B., Lei S., Zhang X., Zeng X. 2013. Effect of ultrasound on different quality parameters of apple juice. Ultrasonics Sonochemistry, 20, 5: 1182-1187
- Abramovič H., Abram V. 2005. Physico-chemical properties, composition and oxidative stability of *Camelina sativa* oil. Food Technology and Biotechnology, 43, 1: 63-70
- Adamič Š. 1995. Temelji biostatistike. 2.izd. Ljubljana, Medicinska fakulteta-Inštitut za biomedicinsko informatiko: 195 str.
- Akbulut M., Calisir S., Marakoglu T., Coklar H. 2008. Chemical and technological properties of European cranberrybush (*Viburnum opulus L.*) fruits. Asian Journal of Chemistry, 20, 3: 1875-1885
- Alam M.N., Bristi N.J., Rafiquzzaman M. 2013. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal, 21, 2: 143-152
- Alberto M.E., Russo N., Grand A., Galano A. 2013. A physicochemical examination of the free radical scavenging activity of Trolox: mechanism, kinetics and influence of the environment. Physical Chemistry Chemical Physics, 15, 13: 4642-4650
- Almajano M.P., Carbo R., Jimenez J.A.L., Gordon M.H. 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. Food Chemistry, 108, 1: 55-63
- Andrei V., Bunea A.-I., Tudorache A., Gaspar S., Vasilescu A. 2014. Simple DPPH center dot-based electrochemical assay for the evaluation of the antioxidant capacity: a thorough comparison with spectrophotometric assays and evaluation with real-world samples. Electroanalysis, 26, 12: 2677-2685
- Arts I.C.W., van de Putte B., Hollman P.C.H. 2000. Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 5: 1752-1757
- Bairamov I., Kotz S., Kozubowski T. 2003. A new measure of linear local dependence. Statistics: A Journal of Theoretical and Applied Statistics, 37, 3: 243-258
- Berker K.I., Olgun F.A.O., Ozyurt D., Demirata B., Apak R. 2013. Modified Folin-Ciocalteu antioxidant capacity assay for measuring lipophilic antioxidants. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61, 20: 4783-4791
- Bertalanič L. 2011. Vpliv topila na določeno antioksidativno aktivnost vin in modelnih antioksidantov. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 81 str.
- Bjelakovic G., Nikolova D., Gluud L.L., Simonetti R.G., Gluud C. 2007. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention - Systematic review and meta-analysis. JAMA-Journal of the American Medical Association, 297, 8: 842-857
- Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. Annals of Botany, 91, 2: 179-194
- Borowska E.J., Mazur B., Kopciuch R.G., Buszewski B. 2009. Polyphenol, anthocyanin and resveratrol mass fractions and antioxidant properties of cranberry cultivars. Food Technology and Biotechnology, 47, 1: 56-61

- Brandwilliams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1995. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 28, 1: 25-30
- Burini G. 2007. Development of a quantitative method for the analysis of total l-ascorbic acid in foods by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 1154, 1-2: 97-102
- Carloni P., Tiano L., Padella L., Bacchetti T., Customu C., Kay A., Damiani E. 2013. Antioxidant activity of white, green and black tea obtained from the same tea cultivar. Food Research International, 53, 2: 900-908
- Chan E.W.C., Lim Y.Y., Chew Y.L. 2007. Antioxidant activity of *Camellia sinensis* leaves and tea from a lowland plantation in Malaysia. Food Chemistry, 102, 4: 1214-1222
- Chanda S., Dave R. 2009. *In vitro* models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. African Journal of Microbiology Research, 3, 13: 981-996
- Cho A.R., Park K.W., Kim K.M., Kim S.Y., Han J. 2014. Influence of roasting conditions on the antioxidant characteristics of colombian coffee (*Coffea arabica* L.) beans. Journal of Food Biochemistry, 38, 3: 271-280
- Clifford M.N. 1999. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. Journal of the Science of Food and Agriculture, 79, 3: 362-372
- Cranberry. 2015. V: Encyclopædia Britannica Online. London, Encyclopædia Britannica inc: 1 str.
<http://academic.eb.com/EBchecked/topic/141721/cranberry> (julij, 2015)
- Dawidowicz A., Olszowy M. 2011. Antioxidant properties of BHT estimated by ABTS assay in systems differing in pH or metal ion or water concentration. European Food Research and Technology, 232, 5: 837-842
- Delgado-Andrade C., Rufian-Henares J.A., Morales F.J. 2005. Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 20: 7832-7836
- Dietrich H., Rechner A., Patz C., Bitsch R., Bohm V., Bitsch I., Netzel M. 2003. Influence of processing on the phenolic antioxidants of apple juices. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 99, 1: 1-11
- Directive 2002/46/EC of the european parlament and of the concil of 10 June 2002 on approximation of the laws of the Member States relating to food supplements. 2002. Official Journal of the European Communities, 45, L183: 51-57
- Dixon R.A., Xie D.Y., Sharma S.B. 2005. Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research? New Phytologist, 165, 1: 9-28
- Duda-Chodak A., Tarko T., Sroka P., Satoria P. 2008. Antioxidant acitivity of different kinds of commercially available teas – diversity and changes during storage. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities 11, 4: #7
<http://www.ejpau.media.pl/volume11/issue4/art-07.html> (julij, 2015)
- Dwibedy P., R. Dey G., B. Naik D., Kishore K., N. Moorthy P. 1999. Pulse radiolysis studies on redox reactions of gallic acid: one electron oxidation of gallic acid by gallic acid-OH adduct. Physical Chemistry Chemical Physics, 1, 8: 1915-1918
- Dziki D., Gawlik-Dziki U., Pecio Ł., Różyło R., Świeca M., Krzykowski A., Rudy S. 2015. Ground green coffee beans as a functional food supplement – Preliminary study. LWT - Food Science and Technology, 63, 1: 691-699

- Escarpa A., González M.C. 2001. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Analytica Chimica Acta*, 427, 1: 119-127
- Farah A. 2012. Coffee constituents. V: *Coffee: emerging health effects and disease prevention*. Chu Y. F. (ed.). Ames. IFT Press, Wiley-Blackwell: 21-58
- FAS/USDA. 2005. World apple juice situation: global apple juice production continues to set new record, trade to remain strong in MY 2004/05. Washington, Foreign Agricultural Service, United States Department of Agriculture: 6 str.
<http://www.fas.usda.gov> (julij, 2015)
- Floegel A., Kim D.-O., Chung S.-J., Koo S.I., Chun O.K. 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 7: 1043-1048
- Friaa O., Brault D. 2006. Kinetics of the reaction between the antioxidant Trolox® and the free radical DPPH[·] in semi-aqueous solution. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 4, 12: 2417-2423
- Gallic acid. 2015. London, V: Encyclopædia Britannica Online. London, Encyclopædia Britannica inc: 1 str.
<http://academic.eb.com/EBchecked/topic/224366/gallic-acid> (julij, 2015)
- Genaro-Mattos T.C., Mauricio A.Q., Rettori D., Alonso A., Hermes-Lima M. 2015. Antioxidant activity of caffeic acid against Iron-Induced free radical generation-a chemical approach. *PLoS One*, 10, 6: e0129963, doi:10.1371/journal.phone.0129963: 12 str
- Génin J.M.R., Olowe A.A., Refait P., Simon L. 1996. On the stoichiometry and pourbaix diagram of Fe(II)-Fe(III) hydroxy-sulphate or sulphate-containing green rust 2: An electrochemical and Mössbauer spectroscopy study. *Corrosion Science*, 38, 10: 1751-1762
- Gliszczynska-Swiglo A., Tyrakowska B. 2003. Quality of commercial apple juices evaluated on the basis of the polyphenol content and the TEAC antioxidant activity. *Journal of Food Science*, 68, 5: 1844-1849
- Goupy P., Dufour C., Loonis M., Dangles O. 2003. Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3: 615-622
- Grace M.H., Esposito D., Dunlap K.L., Lila M.A. 2014. Comparative analysis of phenolic content and profile, antioxidant capacity, and anti-inflammatory bioactivity in wild alaskan and commercial vaccinium berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 18: 4007-4017
- Granato D., Karnopp A.R., van Ruth S.M. 2015. Characterization and comparison of phenolic composition, antioxidant capacity and instrumental taste profile of juices from different botanical origins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 10: 1997-2006
- Henriquez C., Aliaga C., Lissi E. 2002. Formation and decay of the ABTS derived radical cation: A comparison of different preparation procedures. *International Journal of Chemical Kinetics*, 34, 12: 659-665
- Hicks A. 2001. Review of global tea production and the impact on industry of the Asian economic situation. *Assumption University Journal of Technology*, 5, 2: 8 str
<http://www.assumptionjournal.au.edu/index.php/AUJournalofTechnology/issue/view/122> (julij, 2015)

- Hodnik M. 2014. Primerjava antioksidativne aktivnosti modelnih antioksidantov in pijač določene z DPPH, ABTS in Folin-Ciocalteu metodo. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 62 str.
- Huang D.J., Ou B.X., Prior R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6: 1841-1856
- Huang J., Agus D.B., Winfree C.J., Kiss S., Mack W.J., McTaggart R.A., Choudhri T.F., Kim L.J., Mocco J., Pinsky D.J. 2001. Dehydroascorbic acid, a blood–brain barrier transportable form of vitamin C, mediates potent cerebroprotection in experimental stroke. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 20: 11720-11724
- Huang M.T., Ferraro T. 1992. Phenolic-compounds in food and cancer prevention. *ACS Symposium Series*, 507: 8-34
- ICO. 2015. Total production by all exporting countries. London, International Coffee Organization: 1 str.
http://www.ico.org/trade_statistics.asp?section=Statistics (julij, 2015)
- Janeiro P., Oliveira Brett A.M. 2004. Catechin electrochemical oxidation mechanisms. *Analytica Chimica Acta*, 518, 1–2: 109-115
- Jiang H., Engelhardt U.H., Thräne C., Maiwald B., Stark J. 2015. Determination of flavonol glycosides in green tea, oolong tea and black tea by UHPLC compared to HPLC. *Food Chemistry*, 183: 30-35
- Juranović Cindrić I., Kunštić M., Zeiner M., Stingeder G., Rusak G. 2011. Sample preparation methods for the determination of the antioxidative capacity of apple juices. *Croatica Chemica Acta*, 84, 3: 435-438
- Karaman Ş., Tütem E., Sözgen Başkan K., Apak R. 2010. Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC–CUPRAC assay. *Food Chemistry*, 120, 4: 1201-1209
- Kitzberger C.S.G., Scholz M.B.d.S., Benassi M.d.T. 2014. Bioactive compounds content in roasted coffee from traditional and modern *Coffea arabica* cultivars grown under the same edaphoclimatic conditions. *Food Research International*, 61: 61-66
- Kolniak-Ostek J., Oszmiański J., Wojdyło A. 2013. Effect of L-ascorbic acid addition on quality, polyphenolic compounds and antioxidant capacity of cloudy apple juices. *European Food Research and Technology*, 236, 5: 777-798
- Komes D., Horžić D., Belščak A., Ganić K.K., Vulić I. 2010. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. *Food Research International*, 43, 1: 167-176
- Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani: 249 str.
- Lachman J., Šulc M., Sus J., Pavlíková O. 2006. Polyphenol content and antiradical activity in different apple varieties. *Horticultural Science*, 33, 3: 95-102
- Leitao C., Marchioni E., Bergaentzle M., Zhao M., Didierjean L., Taidi B., Ennahar S. 2011. Effects of processing steps on the phenolic content and antioxidant activity of beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 4: 1249-1255
- Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4, 8: 118-126
- Lü J.-M., Lin P.H., Yao Q., Chen C. 2010. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14, 4: 840-860

- Lu L.-L., Li Y.-H., Lu X.-Y. 2009. Kinetic study of the complexation of gallic acid with Fe(II). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 74, 3: 829-834
- Ludwig I.A., Mena P., Calani L., Cid C., Del Rio D., Lean M.E.J., Crozier A. 2014. Variations in caffeine and chlorogenic acid contents of coffees: what are we drinking? *Food & Function*, 5, 8: 1718-1726
- Martínez R., Torres P., Meneses M.A., Figueroa J.G., Pérez-Álvarez J.A., Viuda-Martos M. 2012. Chemical, technological and *in vitro* antioxidant properties of mango, guava, pineapple and passion fruit dietary fibre concentrate. *Food Chemistry*, 135, 3: 1520-1526
- Miller N.J., Rice-Evans C.A. 1997. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chemistry*, 60, 3: 331-337
- Mitić S.S., Paunović D.Đ., Pavlović A.N., Tošić S.B., Stojković M.B., Mitić M.N. 2014. Phenolic profiles and total antioxidant capacity of marketed beers in Serbia. *International Journal of Food Properties*, 17, 4: 908-922
- Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 2: 211-219
- Musialik M., Litwinienko G. 2005. Scavenging of DPPH[•] radicals by vitamin E is accelerated by Its partial Ionization: the role of sequential proton loss electron transfer. *Organic Letters*, 7, 22: 4951-4954
- Nadarajah S., Mitov K., Kotz S. 2003. Local dependence functions for extreme value distributions. *Journal of Applied Statistics*, 30, 10: 1081-1100
- Namiesnik J., Vearasilp K., Kupska M., Ham K.-S., Kang S.-G., Park Y.-K., Barasch D., Nemirovski A., Gorinstein S. 2013. Antioxidant activities and bioactive components in some berries. *European Food Research and Technology*, 237, 5: 819-829
- Narita Y., Inouye K. 2011. Inhibitory effects of chlorogenic acids from green coffee beans and cinnamate derivatives on the activity of porcine pancreas α-amylase isozyme I. *Food Chemistry*, 127, 4: 1532-1539
- Narita Y., Inouye K. 2013. Degradation kinetics of chlorogenic acid at various pH values and effects of ascorbic acid and epigallocatechin gallate on its stability under alkaline conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 4: 966-972
- Nicoli M.C., Anese M., Manzocco L., Lerici C.R. 1997. Antioxidant properties of coffee brews in relation to the roasting degree. *LWT - Food Science and Technology*, 30, 3: 292-297
- Noipa T., Srijaranai S., Tuntulani T., Ngeontae W. 2011. New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. *Food Research International*, 44, 3: 798-806
- Noonan G.J. 2003. New brewing lager beer: the most comprehensive book for home and microbrewers, Brewers Publications. Colorado: 368 str.
- Nutritional supplement. 2015. V: Encyclopædia Britannica Online. London, Encyclopædia Britannica inc: 1 str.
<http://academic.eb.com/EBchecked/topic/422917/nutritional-supplement> (julij, 2015)
- Oszmiański J., Wojdyło A. 2007. Effects of various clarification treatments on phenolic compounds and color of apple juice. *European Food Research and Technology*, 224, 6: 755-762

- Ozgen M., Reese R.N., Tilio A.Z., Scheerens J.C., Miller A.R. 2006. Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4: 1151-1157
- Paixão N., Perestrelo R., Marques J.C., Câmara J.S. 2007. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chemistry*, 105, 1: 204-214
- Pascoe H.M., Ames J.M., Chandra S. 2003. Critical stages of the brewing process for changes in antioxidant activity and levels of phenolic compounds in ale. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 61, 4: 203-209
- Pérez-Hernández L.M., Chávez-Quiroz K., Medina-Juárez L.Á., Gámez Meza N. 2012. Phenolic characterization, melanoidins, and antioxidant activity of some commercial coffees from *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 56, 4: 430-435
- Perrone D., Farah A., Donangelo C.M. 2012. Influence of coffee roasting on the incorporation of phenolic compounds into melanoidins and their relationship with antioxidant activity of the brew. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 17: 4265-75
- Pilipczuk T., Kusznierewicz B., Zielińska D., Bartoszek A. 2015. The influence of roasting and additional processing on the content of bioactive components in special purpose coffees. *Journal of Food Science and Technology*: 5736-5744
- Plestenjak A., Golob T. 2003. Analiza kakovosti živil. 2. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 13-14
- Podsędek A. 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of *Brassica* vegetables: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 40, 1: 1-11
- Polak J., Bartoszek M., Stanimirova I. 2013. A study of the antioxidant properties of beers using electron paramagnetic resonance. *Food Chemistry*, 141, 3: 3042-3049
- Prevc T., Levart A., Kralj Cigić I., Salobir J., Poklar Ulrich N., Cigić B. 2015a. Rapid estimation of tocopherol content in linseed and sunflower oils-reactivity and assay. *Molecules*, 20, 8: 14777-14790
- Prevc T., Šegatin N., Kralj P., Poklar Ulrich N., Cigić B. 2015b. Influence of metal ions and phospholipids on electrical properties: A case study on pumpkin seed oil. *Food Control*, 54: 287-293
- Prevc T., Šegatin N., Poklar Ulrich N., Cigić B. 2013. DPPH assay of vegetable oils and model antioxidants in protic and aprotic solvents. *Talanta*, 109: 13-19
- Radical. 2015. V: *Encyclopædia Britannica Online*. London, Encyclopædia Britannica inc: 1 str.
<http://academic.eb.com/EBchecked/topic/488669/radical> (julij, 2015)
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 9–10: 1231-1237
- Roginsky V., Lissi E.A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92, 2: 235-254
- Rop O., Reznicek V., Valsikova M., Jurikova T., Mlcek J., Kramarova D. 2010. Antioxidant properties of European cranberrybush fruit (*Viburnum opulus* var. *edule*). *Molecules*, 15, 6: 4467-4477

- Sacchetti G., Di Mattia C., Pittia P., Mastrocola D. 2009. Effect of roasting degree, equivalent thermal effect and coffee type on the radical scavenging activity of coffee brews and their phenolic fraction. *Journal of Food Engineering*, 90, 1: 74-80
- Sang S.M., Lee M.J., Hou Z., Ho C.T., Yang C.S. 2005. Stability of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate and formation of dimers and epimers under common experimental conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 24: 9478-9484
- Saw A.K.-C., Yam W.-S., Wong K.-C., Lai C.-S. 2015. A comparative study of the volatile constituents of southeast asian *Coffea arabica*, *Coffea liberica* and *Coffea robusta* green beans and their antioxidant activities. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18, 1: 64-73
- Schroeder E.K., Kelsey N.A., Doyle J., Breed E., Bouchard R.J., Loucks F.A., Harbison R.A., Linseman D.A. 2009. Green tea epigallocatechin 3-gallate accumulates in mitochondria and displays a selective antiapoptotic effect against inducers of mitochondrial oxidative stress in neurons. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11, 3: 469-480
- Shahdadi F., Mirzaei H.O., Daraei Garmakhany A. 2015. Study of phenolic compound and antioxidant activity of date fruit as a function of ripening stages and drying process. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 3: 1814-1819
- Singh A.P., Wilson T., Kalk A.J., Cheong J., Vorsa N. 2009. Isolation of specific cranberry flavonoids for biological activity assessment. *Food Chemistry*, 116, 4: 963-968
- Spigno G., Tramelli L., De Faveri D.M. 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81, 1: 200-208
- Stalmach A., Mullen W., Nagai C., Crozier A. 2006. On-line HPLC analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18, 1: 253-262
- Strlic M., Radovic T., Kolar J., Pihlar B. 2002. Anti- and prooxidative properties of gallic acid in Fenton-type systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 22: 6313-6317
- Suárez-Jacobo Á., Rüfer C.E., Gervilla R., Guamis B., Roig-Sagués A.X., Saldo J. 2011. Influence of ultra-high pressure homogenisation on antioxidant capacity, polyphenol and vitamin content of clear apple juice. *Food Chemistry*, 127, 2: 447-454
- Tea production. 2015. V: Encyclopædia Britannica Online. London, Encyclopædia Britannica inc: 1 str.
<http://academic.eb.com/EBchecked/topic/585098/tea> (julij, 2015)
- Teow C.C., Truong V.-D., McFeeters R.F., Thompson R.L., Pecota K.V., Yencho G.C. 2007. Antioxidant activities, phenolic and β -carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. *Food Chemistry*, 103, 3: 829-838
- Terpinc P., Abramovič H. 2010. A kinetic approach for evaluation of the antioxidant activity of selected phenolic acids. *Food Chemistry*, 121, 2: 366-371
- Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L., Byrne D.H. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 6-7: 669-675
- Tong L. 2010. Chinese tea. Beijing, China Intercontinental Press: 138 str.

- Vaccinium macrocarpon* (American Cranberry). 2015. V: Online atlas of the British & Irish flora, Wallingford, Botanical Society of the British Isles and the Biological Records Centre (BRC): 1 str.
<https://www.brc.ac.uk/plantatlas/index.php?q=plant/vaccinium-macrocarpon> (julij, 2015)
- Vignoli J.A., Bassoli D.G., Benassi M.T. 2011. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry*, 124, 3: 863-868
- Vinson J.A., Mandarano M., Hirst M., Trevithick J.R., Bose P. 2003. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Beers and the effect of two types of beer on an animal model of atherosclerosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 18: 5528-5533
- Vitamin C. 2015. V: Encyclopædia Britannica Online. London, Encyclopædia Britannica inc: 1 str.
<http://academic.eb.com/EBchecked/topic/631079/vitamin-C> (julij, 2015)
- Wang Z.Y., Huang M.-T., Lou Y.-R., Xie J.-G., Reuhl K.R., Newmark H.L., Ho C.-T., Yang C.S., Conney A.H. 1994. Inhibitory effects of black tea, green tea, decaffeinated black tea, and decaffeinated green tea on ultraviolet B light-induced skin carcinogenesis in 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene-initiated SKH-1 Mice. *Cancer Research*, 54, 13: 3428-3435
- Welch R.W., Wang Y.H., Crossman A., Park J.B., Kirk K.L., Levine M. 1995. Accumulation of vitamin-C (ascorbate) and its oxidized metabolite dehydroascorbic acid occurs by separate mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 21: 12584-12592
- Wesolowski P., Gawalek J. 2008. Effect of the conditions of cereal instant coffee granulation on the product yield and quality. *Przemysł Chemiczny*, 87, 3: 311-314
- Willson K.C., Clifford M.N. 1992. Tea: Cultivation to consumption, Springer Science & Business Media. First edition. North Yorkshire: str. 768
- Xie J., Schaich K.M. 2014. Re-evaluation of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 19: 4251-4260
- Zhang G.Z., Ji B.P., Li B., Tian F., Chen G., Ji F.D., Zhang H.J., Yang Z.W., Zhao L. 2008. Effects of processing and storage condition on phenolic concentration and antioxidant activities of apple and apple juices. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 45, 4: 339-343
- Zhao H., Chen W., Lu J., Zhao M. 2010. Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. *Food Chemistry*, 119, 3: 1150-1158

ZAHVALA

Mentorju prof. dr. Blažu Cigić se iskreno zahvaljujem za interaktivno sodelovanje pri zasnovi raziskave, za neprecenljivo pomoč pri interpretaciji podatkov in nastajanju magistrske naloge. Hvala za prevzem mentorstva, moralno podporo in reševanju sprotnih nejasnosti.

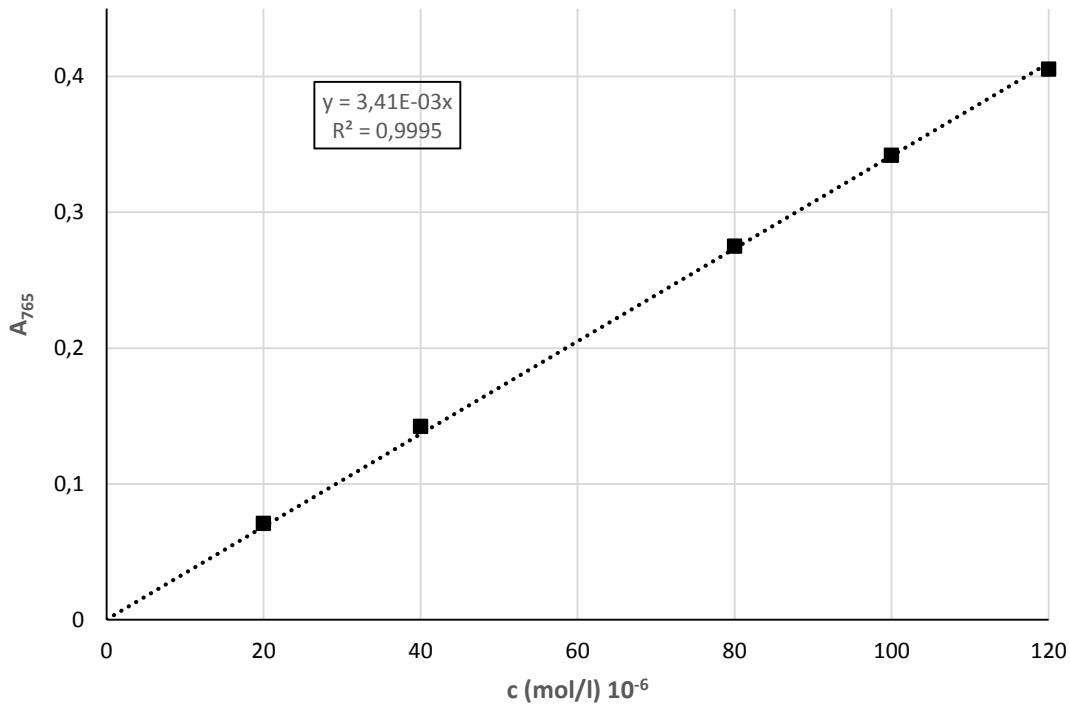
Za pregled naloge se iskrno zahvaljujem somentorici prof. dr. Heleni Abramovič in recenzentki prof. dr. Lei Demšar.

Zahvaljujem se vsem sodelavcem na Katedri za biokemijo in kemijo živil s katerimi sem se med opravljanjem dela srečeval. Hvala za lep sprejem v laboratorij, dobro vključitev v delovni proces in prijetno druženje.

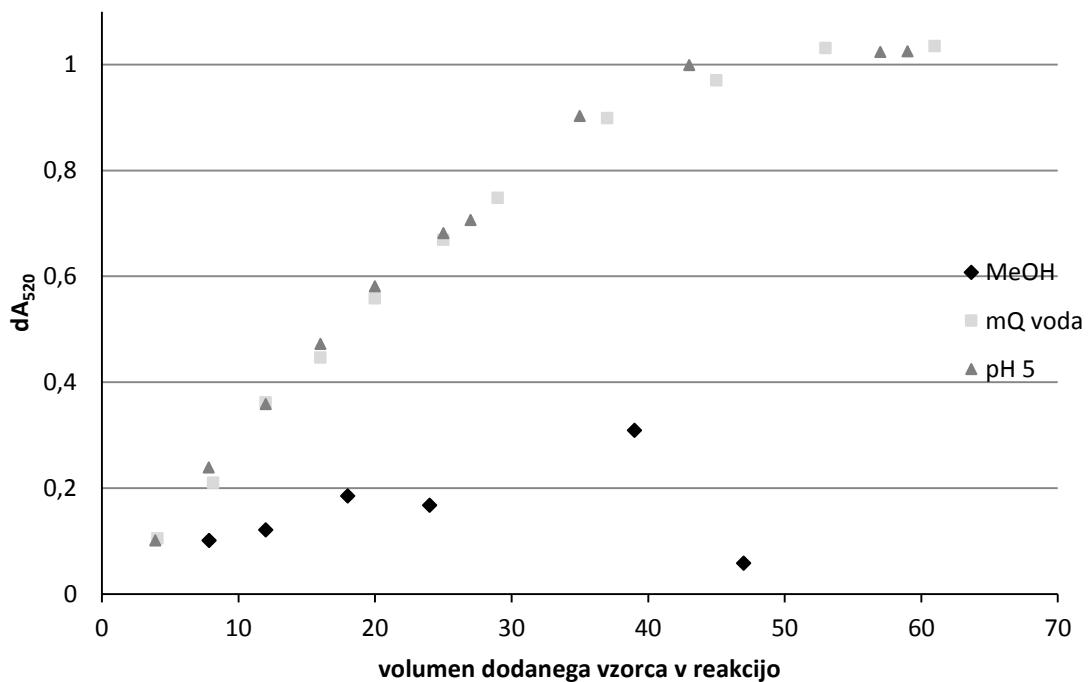
Zahvaljujem se vsem, ki so me tekom študija podpirali in mi stali ob strani.

Hvala!

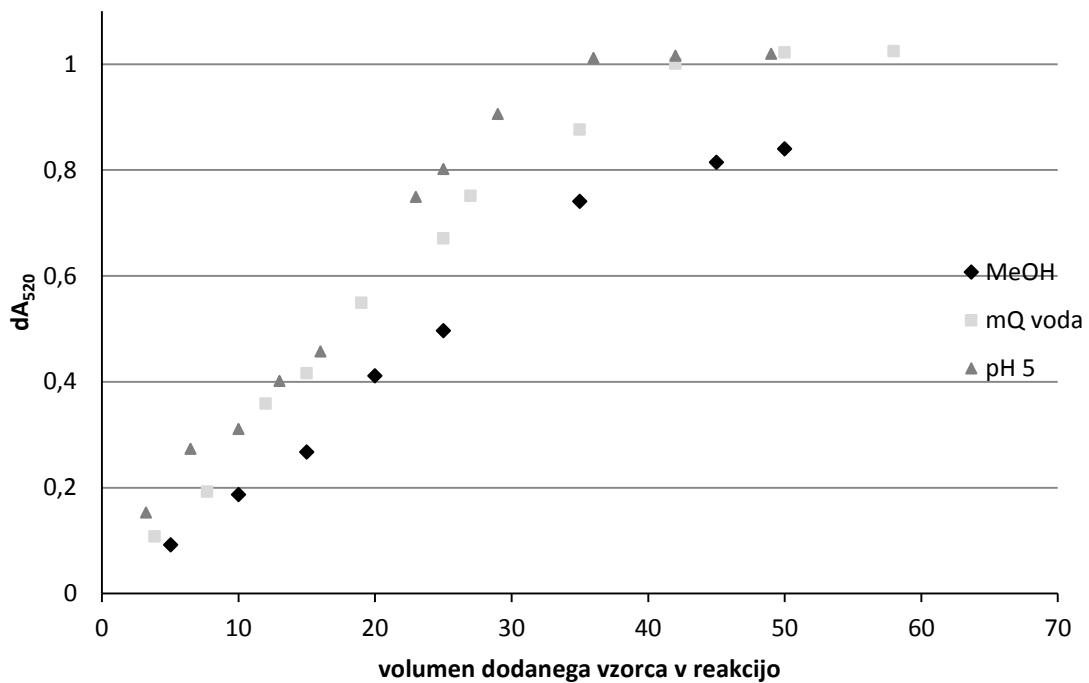
PRILOGE



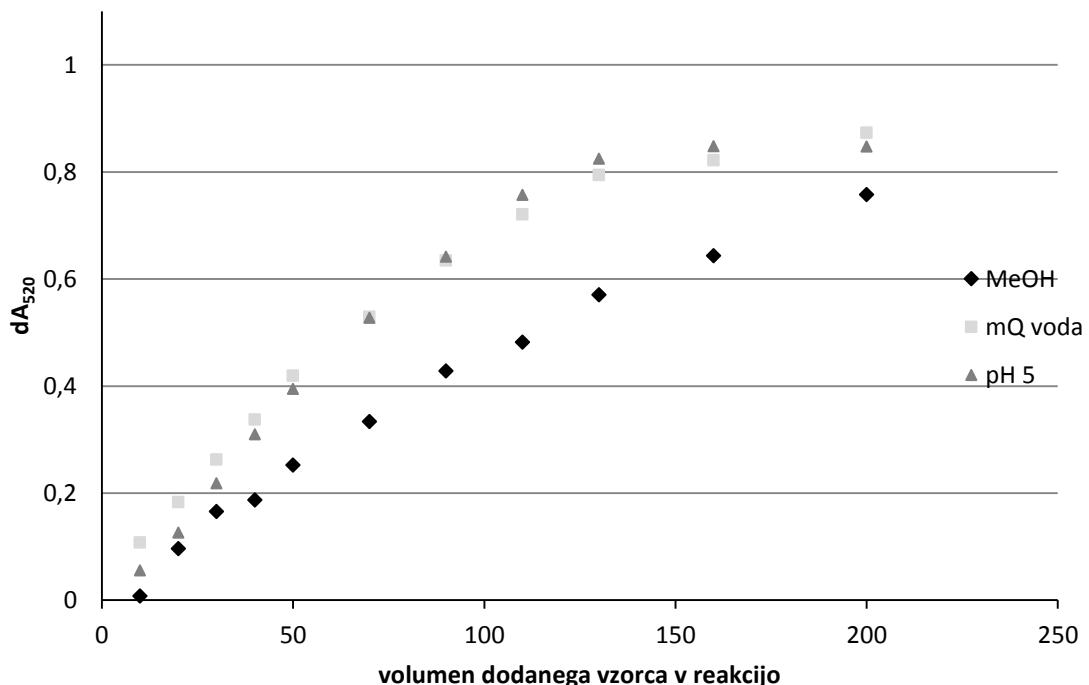
Priloga A: Grafični prikaz umeritvene krivulje železovega (II) sulfata hepta hidrata s FC metodo



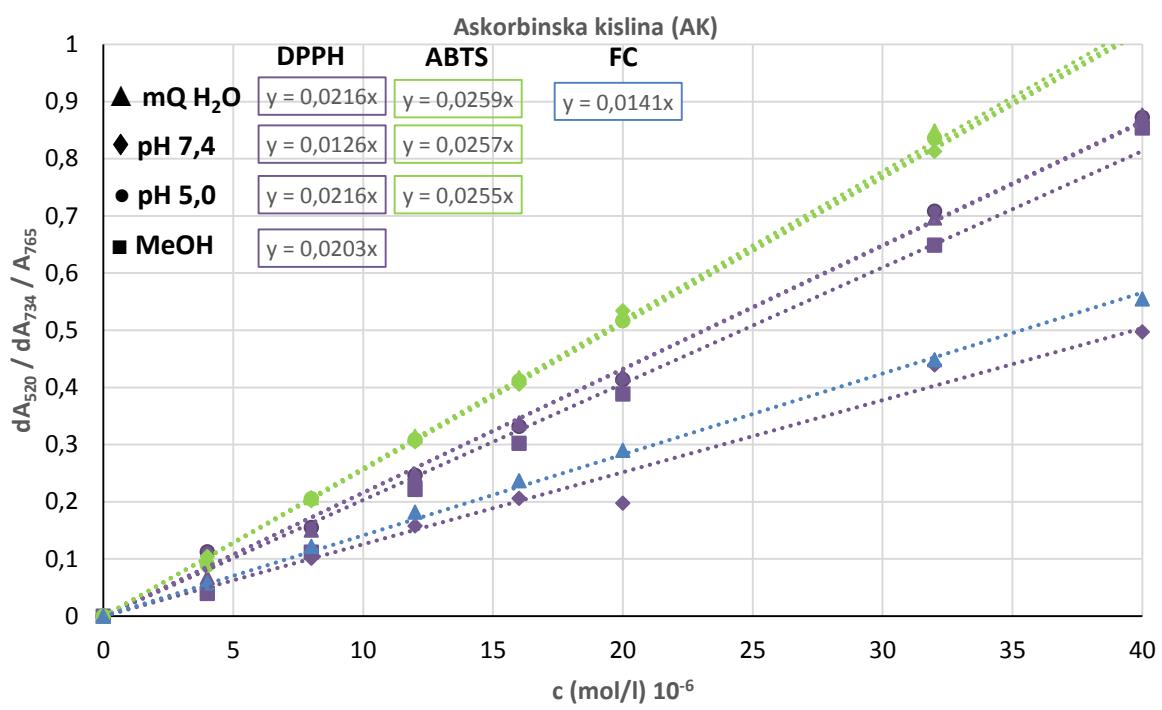
Priloga B: Grafični prikaz vpliva topila in volumna svetlega piva dodanega v reakcijsko zmes (1 ml) na redukcijo radikala DPPH



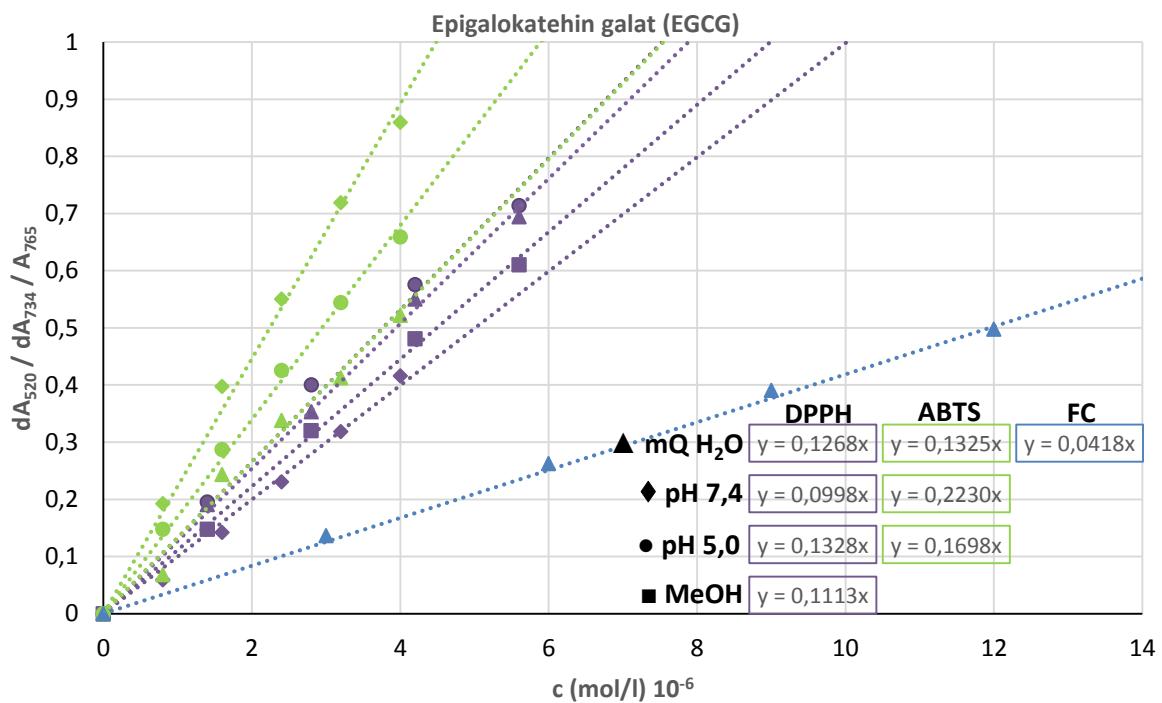
Priloga C: Grafični prikaz vpliva topila in volumna jabolčnega soka dodanega v reakcijsko zmes (1 ml) na redukcijo radikala DPPH



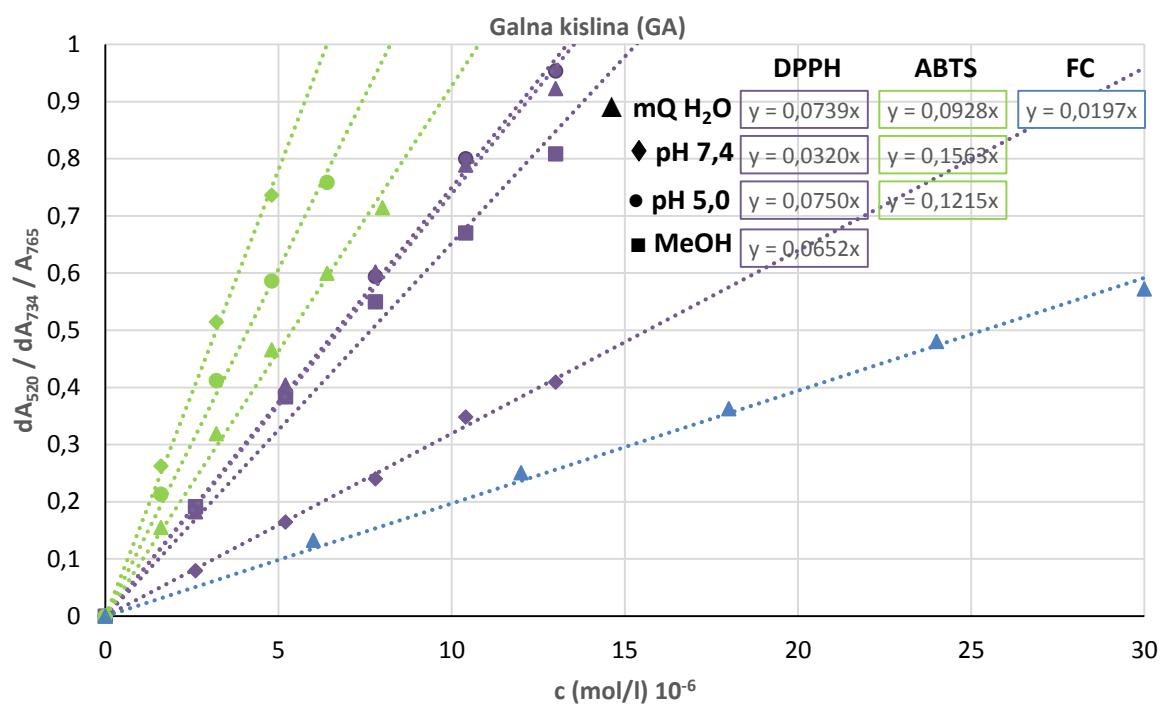
Priloga D: Grafični prikaz vpliva topila in volumna prehranskega dopolnila brez vit. C v reakcijsko zmes (1 ml) na redukcijo radikala DPPH



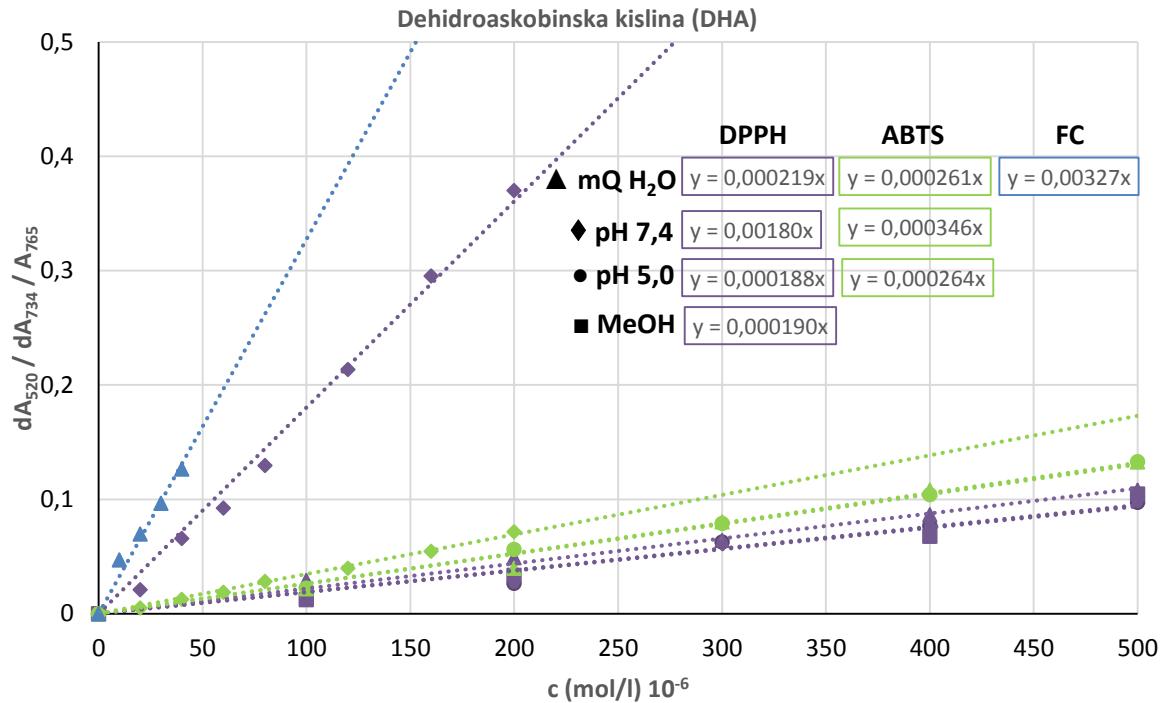
Priloga E: Grafični prikaz umeritvene krivulje za askorbinsko kislino po DPPH, ABTS in FC metodi



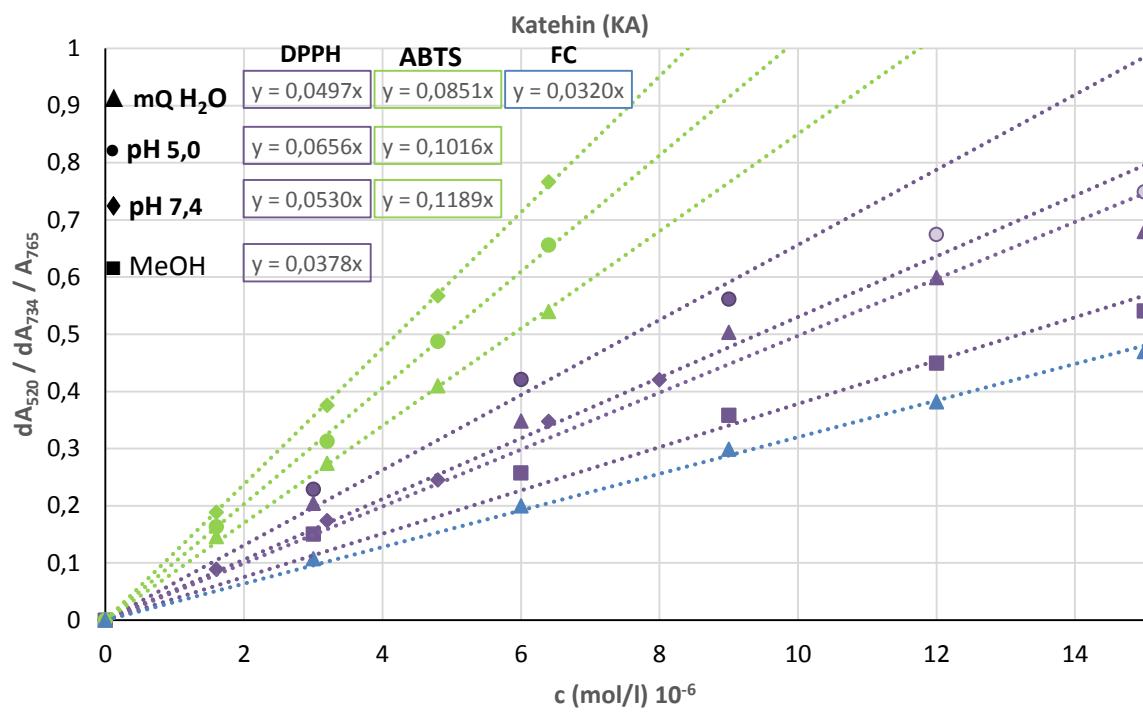
Priloga F: Grafični prikaz umeritvene krivulje za epigalokatehin galat po DPPH, ABTS in FC metodi



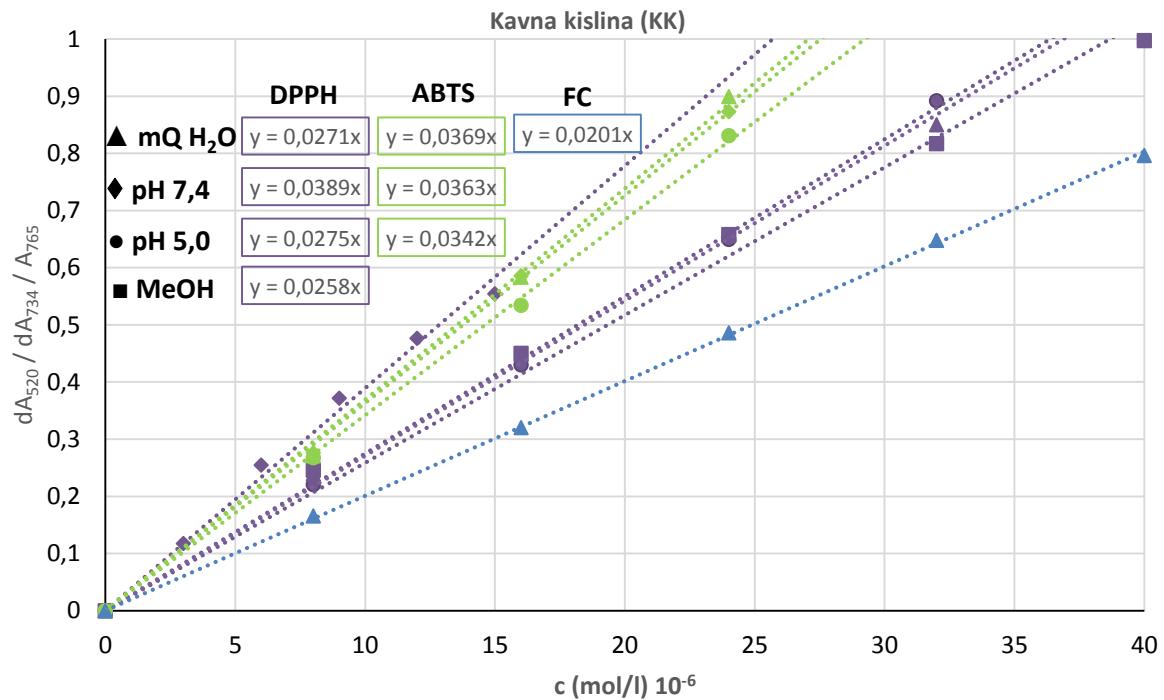
Priloga G: Grafični prikaz umeritvene krivulje za galno kislino po DPPH, ABTS in FC metodi



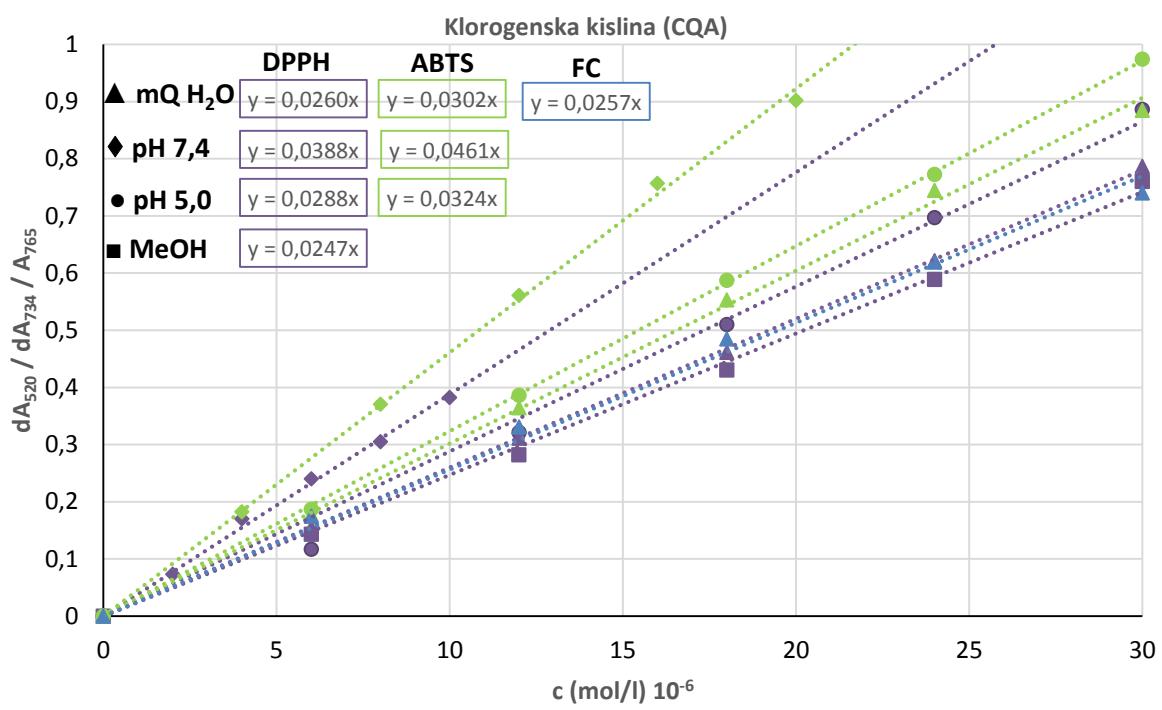
Priloga H: Grafični prikaz umeritvene krivulje za dehidroaskorbinsko kislino po DPPH, ABTS in FC metodi



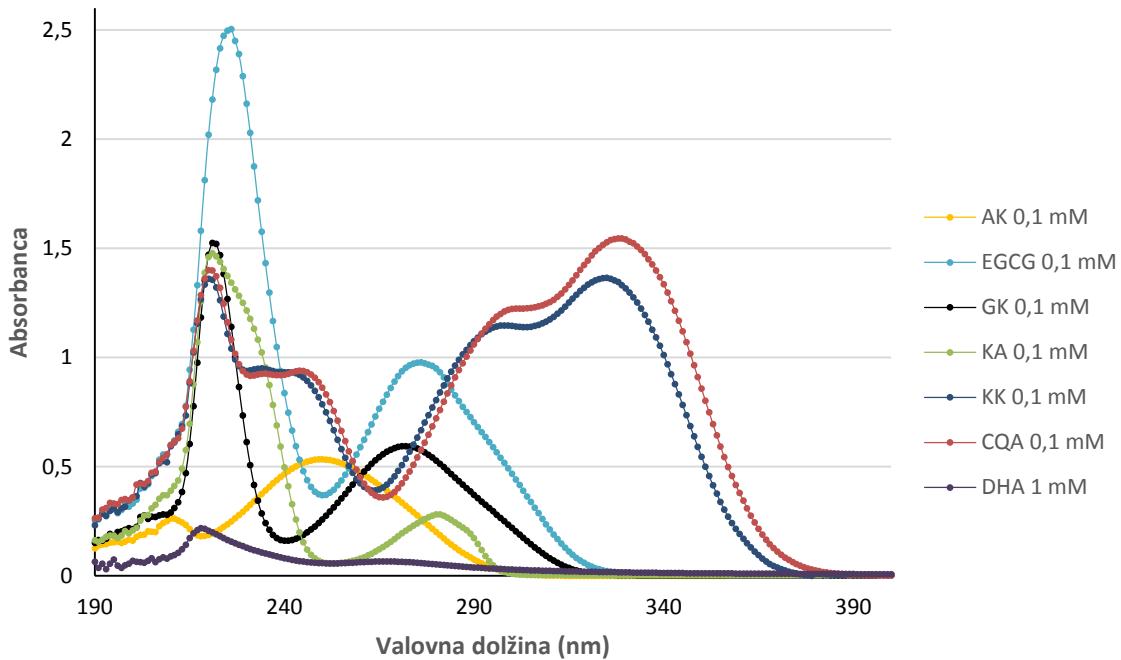
Priloga I: Grafični prikaz umeritvene krivulje za katehin po DPPH, ABTS in FC metodi



Priloga J: Grafični prikaz umeritvene krivulje za kavno kislino po DPPH, ABTS in FC metodi



Priloga K: Grafični prikaz umeritvene krivulje za klorogensko kislino po DPPH, ABTS in FC metodi



Priloga L: UV-VIS spektri modelnih antioksidantov