

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Tina KLEPAC

**UGOTAVLJANJE STABILNOSTI ANTOCIANOV MED
SIMULACIJO PREBAVE SOKA GRANATNEGA JABOLKA (*Punica
granatum* L.) *IN VITRO***

MAGISTRSKO DELO

**STABILITY OF ANTHOCYANINS DURING SIMULATED *IN VITRO*
DIGESTION OF POMEGRANATE JUICE (*Punica granatum* L.)**

M.Sc. THESIS

Ljubljana, 2016

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete z dne 15.12.2014 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za magistrski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje magisterija znanosti s področja živilstva. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Lea POGAČNIK.

Magistrsko delo je zaključek Podiplomskega študija bioloških in biotehniških znanosti s področja živilstva na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Analize so bile opravljene na Katedri za biokemijo in kemijo živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Mentorica: prof. dr. Lea POGAČNIK

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Blaž CIGIĆ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Rajko VIDRIH
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: doc. dr. Valentina USENIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora: 6.7.2016

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

Tina KLEPAC

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Md
DK	UDK 612.32/.33:634.64:547.973(043)=163.6
KG	fiziologija prehrane/simulacija prebave/prebavni trakt/antioksidanti/fenolne spojine/antociani/antioksidativna aktivnost/granatno jabolko/ <i>Punica granatum</i> L.
AV	KLEPAC, Tina, univ. dipl. inž. živ. tehnol.
SA	POGAČNIK, Lea (mentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje živilstva
LI	2016
IN	UGOTAVLJANJE STABILNOSTI ANTOCIANOV MED SIMULACIJO PREBAVE SOKA GRANATNEGA JABOLKA (<i>Punica granatum</i> L.) <i>IN VITRO</i>
TD	Magistrsko delo
OP	XII, 83 str., 7 pregl., 21 sl., 4 pril., 102 vir.
IJ	Sl
JI	sl/en
AI	V okviru magistrske naloge smo vpeljali metodo za simulacijo prebave <i>in vitro</i> in ovrednotili stabilnost antocianov soka granatnega jabolka med simulacijo prebave v želodcu in v tankem črevesu. Med eksperimentom smo mešanico v časovnih presledkih vzorčili in analizirali z metodo za določanje skupnih fenolnih spojin, luminescenčno metodo za določanje antioksidativne učinkovitosti (AOU), metodo za določanje skupnih antocianov in z metodo HPLC/DAD za določanje posameznih antocianov. Simulacijo prebave v želodcu smo izvajali pri pH 2,0, simulacijo prebave v tankem črevesu pa pri pH 7,5. Rezultati kažejo, da se vsebnost skupnih fenolnih spojin med prebavo soka granatnega jabolka <i>in vitro</i> bistveno ne spreminja, po drugi strani pa se AOU poveča kar za 78 %. Vsebnost skupnih antocianov se v kisli želodčni fazi spremeni zelo malo, znatno pa se zniža vsebnost skupnih antocianov (do 78 %) med simulacijo prebave v tankem črevesu. Aktivnost pepsina vpliva na koncentracijo skupnih antocianov na posameznih stopnjah prebave, višja kot je aktivnost pepsina, nižja je koncentracija skupnih antocianov in obratno. Vpliv koncentracije pankreatina na vsebnost antocianov je med simulacijo prebave v tankem črevesu zanemarljiv. Vsebnosti posameznih antocianov po prebavi <i>in vitro</i> v želodcu so od 84 % do 100 % začetne količine v soku granatnega jabolka, med simulacijo prebave v tankem črevesu pa se vsebnost večine antocianov zniža. Delfinidin-3-glukozid in delfinidin-3,5-diglukozid se po dveh urah simulacije prebave v tankem črevesu celo popolnoma razgradita. Med vsemi prisotnimi antociani le pelargonidin-3,5-diglukozid ostaja stabilen skozi celotno prebavo. Ugotovili smo tudi, da so razlike v vsebnosti posameznih antocianov med encimsko prebavo in simulacijo prebave brez encimov zanemarljive.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Md
 DC UDC 612.32/.33:634.64:547.973(043)=163.6
 CX nutrition physiology/simulated digestion/digestive system/antioxidants/phenolic compounds/anthocyanins/antioxidative activity/pomegranate/*Punica granatum* L.
 AU KLEPAC, Tina
 AA POGAČNIK, Lea (supervisor)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, field: Food Science and Technology
 PY 2016
 TI STABILITY OF ANTHOCYANINS DURING SIMULATED *IN VITRO* DIGESTION OF POMEGRANATE JUICE (*Punica granatum* L.)
 DT M. Sc. Thesis
 NO XII, 83 p., 7 tab., 21 fig., 4 ann., 102 ref.
 LA SI
 AL sl/en
 AB In the framework of master's thesis the simulation method of *in vitro* digestion was carried out. During simulated digestion we evaluated the stability of pomegranate juice anthocyanins. During the experiment the mixture was sampled every 15 minutes and analysed on the total phenolics, the total anthocyanins, the antioxidant activity (AOU) by luminescence method as well as the individual anthocyanins by HPLC/DAD method. The *in vitro* gastric phase was performed at pH 2.0, whereas the simulation of digestion in the small intestine was held at pH 7.5. We found out that the total phenolics were not lowered during *in vitro* digestive conditions in a simulated stomach and small intestine phase, regardless of pepsin activity. At the same time the AOU activity increased by almost 78%. Yet the total anthocyanins did not change during the acidic stomach phase, but degraded considerably (up to 78%) during the small intestine phase. Pepsin activity affected the concentration of anthocyanins during all digestive stages. The higher the activity of the pepsin the lower the content of anthocyanins. There was practically no influence of pancreatin on the total anthocyanins during the simulation of digestion in the small intestine in all time intervals. The anthocyanins were relatively stable and ranged from 84% up to 100% after the stomach digestive phase. Most of anthocyanins lowered significantly during the small intestine phase. Only pelargonidin-3,5-diglucoside remained intact during both phases of *in vitro* digestion, whereas delphinidin-3-glucoside and delphinidin-3,5-diglucoside degraded completely during 2-hours of simulated digestion in intestine. We also found out that anthocyanins remained stable in the absence of digestion enzymes.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 GRANATNO JABOLKO (<i>Punica granatum</i> L.)	3
2.1.1 Opis	3
2.1.2 Hranilne snovi in fitokemikalije	4
2.1.3 Zdravilni učinki	5
2.1.3.1 Tradicionalna uporaba granatnega jabolka	5
2.1.3.2 Zdravilne lastnosti granatnega jabolka	6
2.1.3.3 Antimikrobno delovanje	6
2.1.3.4 Boj proti raku	6
2.1.3.5 Artritis	7
2.1.3.6 Redčenje krvi	7
2.2 PREBAVA	7
2.2.1 Splošen opis prebavil	7
2.2.2 Splošne strukturne značilnosti gastrointestinalnega trakta	8
2.2.3 Gastrointestinalni trakt	8
2.2.4 Gibanje v prebavilih	10
2.2.5 Izločanje (sekrecija) v prebavilih	10
2.2.6 <i>In vitro</i> prebavni modeli	12
2.2.6.1 Oralna faza	14
2.2.6.2 Želodčna faza	14
2.2.6.3 Faza v tankem črevesu	15
2.3 ANTIOKSIDANTI	16

2.3.1	Prosti radikali	17
2.3.2	Oksidativni stres	18
2.3.3	Uravnavanje oksidativnega stresa	18
2.3.3.1	Vrste antioksidativnih sistemov	18
2.3.4	Izvor antioksidantov	19
2.3.4.1	Antioksidanti, ki niso encimi	19
2.3.5	Fenolne spojine	20
2.3.6	Antociani	22
2.3.6.1	Antociani v hrani	23
2.3.6.2	Vloga antocianov	23
2.3.6.3	Uporaba antocianov	24
2.3.6.4	Barve antocianov	25
2.3.6.5	Zdravilni učinek antocianov	25
2.3.6.6	Biološka razpoložljivost antocianov	26
2.3.6.7	Metabolizem antocianov	26
2.4	METODE ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDANTOV	27
2.4.1	Določanje skupnih fenolnih spojin	27
2.4.2	Določanje antioksidativne učinkovitosti z luminescenčno metodo	28
2.4.3	Metoda za določanje skupnih antocianov	29
2.4.4	Določanje posameznih antocianov s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti	30
3	MATERIALI IN METODE	32
3.1	MATERIALI	32
3.1.1	Sok granatnega jabolka	32
3.1.2	Reagenti	32
3.2	METODE DELA	32
3.2.1	Vpeljava metode za simulacijo prebave soka granatnega jabolka <i>in vitro</i>	32
3.2.1.1	Ugotavljanje vpliva trajanja posameznih stopenj prebave na raziskovane parametre	33
3.2.1.2	Določanje delovnega pH za obe stopnji prebave	33
3.2.1.3	Določanje delovne encimske aktivnosti	34
3.2.2	Postopek simulacije prebave <i>in vitro</i>	36
3.2.3	Določanje skupnih fenolnih spojin	37
3.2.3.1	Umeritvena krivulja za klorogensko kislino	38

3.2.3.2	Analiza vzorcev	38
3.2.4	Določanje antioksidativne učinkovitosti z luminescenčno metodo	38
3.2.4.1	Priprava reagentov	39
3.2.4.2	Umeritvena krivulja za troloks	39
3.2.4.3	Analiza vzorcev	40
3.2.5	Določanje skupnih antocianov	40
3.2.5.1	Analiza vzorcev	41
3.2.6	Določanje posameznih antocianov z metodo HPLC	41
3.2.6.1	Umeritvene krivulje za standardne raztopine antocianov	42
3.2.6.2	Analiza vzorcev	43
3.2.6.3	Analiza vzorcev brez dodanih prebavnih encimov	45
4	REZULTATI	46
4.1	VPELJAVA METODE ZA SIMULACIJO PREBAVE SOKA GRANATNEGA JABOLKA <i>IN VITRO</i>	46
4.1.1	Določanje delovnega pH za simulacijo prebave <i>in vitro</i>	46
4.1.2	Ugotavljanje vpliva trajanja posameznih stopenj prebave na vsebnost antocianov	46
4.1.3	Vpliv encimske aktivnosti na vsebnost antocianov med simulacijo prebave <i>in vitro</i>	48
4.1.3.1	Vpliv aktivnosti pepsina	48
4.1.3.2	Vpliv aktivnosti pankreatina	50
4.2	ANALIZE SOKA GRANATNEGA JABOLKA PRED IN MED PREBAVO <i>IN VITRO</i>	51
4.2.1	Skupne fenolne spojine	51
4.2.2	Antioksidativna učinkovitost	52
4.2.3	Skupni antociani	53
4.2.4	Posamezni antociani	54
4.2.5	Vpliv fizikalno-kemijskih pogojev na vsebnost antocianov	57
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	59
5.1	VPELJAVA METODE ZA SIMULACIJO PREBAVE SOKA GRANATNEGA JABOLKA V <i>IN VITRO</i> POGOJIH	59
5.1.1	Določanje delovnega pH za simulacijo prebave v želodcu in tankem črevesu	59
5.1.2	Vpliv trajanja posameznih stopenj prebave na raziskovalne parametre	60
5.1.3	Prebava <i>in vitro</i> in encimi	61

5.1.3.1	Vpliv aktivnosti pepsina	61
5.1.3.2	Vpliv aktivnosti pankreatina	61
5.2	ANALIZA SOKA GRANATNEGA JABOLKA MED PREBAVO <i>IN VITRO</i>	62
5.2.1	Skupne fenolne spojine	62
5.2.2	Antioksidativna učinkovitost	62
5.2.3	Skupni antociani	63
5.2.4	Posamezni antociani	63
5.3	SKLEPI	70
6	POVZETEK	72
6.1	POVZETEK	72
6.2	SUMMARY	73
7	VIRI	75

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Delitev fenolnih spojin po številu C atomov (Abram, 2000)	21
Preglednica 2: Volumen substrata v slepem vzorcu in testu	35
Preglednica 3: Volumni raztopine encima v slepem vzorcu in testu	35
Preglednica 4: Volumni raztopine TCA in raztopine encima v slepem vzorcu in testu	35
Preglednica 5: Priprava standardnih raztopin antocianov	43
Preglednica 6: Priprava raztopin za analizo z metodo standardnega dodatka	45
Preglednica 7: Retencijski časi posameznega standarda antociana	55

KAZALO SLIK

Slika 1: Granatno jabolko (<i>Punica granatum</i> L.) (Rast Istre..., 2014)	3
Slika 2: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Balasundram in sod., 2006)	20
Slika 3: Struktura flavonoidov (Dai in Mumper, 2010)	21
Slika 4: Kemična struktura glavnih antocianov (Hribar in Poklar Ulrih, 2014)	23
Slika 5: Vidna barvna paleta skupnih antocianidinov (Ananga in sod., 2013)	25
Slika 6: Reakcijski mehanizem luminescenčne metode (Pogačnik in Poklar Ulrih, 2012)	29
Slika 7: Vsebnost skupnih antocianov med simulacijo prebave soka granatnega jabolka v želodcu	47
Slika 8: Vsebnost skupnih antocianov med simulacijo prebave soka granatnega jabolka v tankem črevesu	48
Slika 9: Vsebnost skupnih antocianov v soku granatnega jabolka med prebavo <i>in vitro</i> glede na aktivnost pepsina po zaključku prve stopnje prebave (simulacije prebave v želodcu po 1 uri), druge stopnje prebave (simulacije prebave v tankem črevesu po 1 uri) in tretje stopnje prebave (simulacije prebave v tankem črevesu po 2 urah), merjena z metodo za določanje skupnih antocianov, izražena kot ekvivalent cianidin-3-glukozida	49
Slika 10: Vsebnost skupnih antocianov v soku granatnega jabolka po zaključku prve stopnje prebave (čas 0) in med simulacijo prebave <i>in vitro</i> v tankem črevesu glede na količino dodanega pankreatina. Aktivnost pepsina je bila 8400 U	50
Slika 11: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v soku granatnega jabolka (0) in po zaključku prve stopnje prebave (1) (simulacija prebave v želodcu po 1 uri), druge stopnje prebave (2) (simulacija prebave v tankem črevesu po 1 uri) in tretje stopnje prebave (3) (simulacije prebave v tankem črevesu po 2 urah), merjena s Folin–Ciocalteu metodo, izražena v mmol klorogenske kisline/L soka granatnega jabolka	51
Slika 12: Antioksidativna učinkovitost (AOU) soka granatnega jabolka (0) in po zaključku prve stopnje prebave (1) (simulacije prebave v želodcu po 1 uri), druge stopnje prebave (2) (simulacije prebave v tankem črevesu po 1 uri) in tretje stopnje prebave (3) (simulacije prebave v tankem črevesu po 2 urah), merjena z luminescenčno metodo za določanje AOU, izražena v mmol troloksa/L soka granatnega jabolka	52
Slika 13: Vsebnost skupnih antocianov v soku granatnega jabolka (0) in po zaključku prve stopnje prebave (1) (simulacije prebave v želodcu po 1 uri), druge stopnje prebave (2) (simulacije prebave v tankem črevesu po 1 uri) in tretje stopnje prebave (3) (simulacije prebave v tankem črevesu po 2 urah), merjena z metodo za določanje skupnih antocianov, izražena kot ekvivalent cianidin-3-glukozida	54
Slika 14: Koncentracije posameznih antocianov v soku granatnega jabolka, D3G - delfinidin-3-glukozid, D3,5G - delfinidin-3,5-diglukozid, C3G - cianidin-3-glukozid, C3,5G - cianidin-3,5-diglukozid, P3G - pelargonidin-3-glukozid in P3,5G - pelargonidin-3,5-diglukozid	55
Slika 15: Vsebnost posameznih antocianov (D3G - delfinidin-3-glukozid, D3,5G - delfinidin-3,5-diglukozid, C3G - cianidin-3-glukozid, C3,5G - cianidin-3,5-diglukozid,	

P3,5G - pelargonidin-3,5-diglukozid, P3G - pelargonidin-3-glukozid, C7A - cianidin-7-arabinozid) med simulacijo prebave soka granatnega jabolka *in vitro* po zaključku prve stopnje prebave (simulacije prebave v želodcu po 1 uri), druge stopnje prebave (simulacije prebave v tankem črevesu po 1 uri) in tretje stopnje prebave (simulacije prebave v tankem črevesu po 2 urah). 100 % vrednost predstavljajo vsebnosti antocianov v svežem soku granatnega jabolka 56

Slika 16: Vsebnost posameznih antocianov (D3G- delfinidin-3-glukozid, D3,5G- delfinidin-3,5-diglukozid, C3G- cianidin-3-glukozid, C3,5G- cianidin-3,5-diglukozid, P3,5G- pelargonidin-3,5-diglukozid, P3G- pelargonidin-3-glukozid, C7A- cianidin-7-arabinozid) med simulacijo prebave soka granatnega jabolka brez prisotnosti prebavnih encimov po zaključku prve stopnje prebave (simulacije prebave v želodcu po 1 uri), druge stopnje prebave (simulacije prebave v tankem črevesu po 1 uri) in tretje stopnje prebave (simulacije prebave v tankem črevesu po 2 urah). 100 % vrednost predstavljajo vsebnosti antocianov v svežem soku granatnega jabolka 57

Slika 17: Vsebnost posameznih antocianov (D3G - delfinidin-3-glukozid, D3,5G - delfinidin-3,5-diglukozid, C3G - cianidin-3-glukozid, C3,5G - cianidin-3,5-diglukozid, P3,5G - pelargonidin-3,5-diglukozid, P3G - pelargonidin-3-glukozid, C7A- cianidin-7-arabinozid) po prvi stopnji prebave soka granatnega jabolka *in vitro* v želodcu in po prebavi brez uporabe pepsina. 100 % vrednost predstavljajo vsebnosti antocianov v svežem soku granatnega jabolka 65

Slika 18: Vsebnost posameznih antocianov (D3G - delfinidin-3-glukozid, D3,5G - delfinidin-3,5-diglukozid, C3G - cianidin-3-glukozid, C3,5G - cianidin-3,5-diglukozid, P3,5G - pelargonidin-3,5-diglukozid, P3G - pelargonidin-3-glukozid, C7A- cianidin-7-arabinozid) v soku granatnega jabolka in po zaključku prve stopnje prebave (simulacije prebave v želodcu po 1 uri) brez pepsina 66

Slika 19: Vsebnost posameznih antocianov (D3G- delfinidin-3-glukozid, D3,5G- delfinidin-3,5-diglukozid, C3G- cianidin-3-glukozid, C3,5G- cianidin-3,5-diglukozid in P3,5G- pelargonidin-3,5-diglukozid, P3G- pelargonidin-3-glukozid, C7A- cianidin-7-arabinozid) po drugi stopnji prebave soka granatnega jabolka *in vitro* v tankem črevesu in po prebavi brez pepsina, pankreatina in žolčnih soli. 100 % vrednost predstavljajo vsebnosti antocianov v svežem soku granatnega jabolka 67

Slika 20: Vsebnost posameznih antocianov (D3G- delfinidin-3-glukozid, D3,5G- delfinidin-3,5-diglukozid, C3G- cianidin-3-glukozid, C3,5G- cianidin-3,5-diglukozid in P3,5G- pelargonidin-3,5-diglukozid, P3G- pelargonidin-3-glukozid, C7A- cianidin-7-arabinozid) po tretji stopnji prebave soka granatnega jabolka *in vitro* v tankem črevesu in po prebavi brez pepsina, pankreatina in žolčnih soli. 100 % vrednost predstavljajo vsebnosti antocianov v svežem soku granatnega jabolka glede na stopnjo prebave 68

KAZALO PRILOG

Priloga A: Umeritvena krivulja odvisnosti absorbanca od koncentracije klorogenske kisline ($\text{mol/L} \times 10^{-5}$)

Priloga B: Umeritvena krivulja odvisnosti časa inhibicije signala od koncentracije standardne raztopine troloksa ($\text{mol/L} \times 10^{-8}$)

Priloga C: Umeritvena krivulja odvisnosti površine kromatografskega vrha od koncentracije standardne raztopine delfinidin-3,5-diglukozida (mg/L)

Priloga D: Umeritvena krivulja odvisnosti površine kromatografskega vrha od koncentracije standardne raztopine cianidin-3,5-diglukozida (mg/L)

Priloga E: Umeritvena krivulja odvisnosti površine kromatografskega vrha od koncentracije standardne raztopine pelargonidin-3,5-diglukozida (mg/L)

Priloga F: Umeritvena krivulja odvisnosti površine kromatografskega vrha od koncentracije standardne raztopine delfinidin-3-glukozida (mg/L)

Priloga G: Umeritvena krivulja odvisnosti površine kromatografskega vrha od koncentracije standardne raztopine cianidin-3-glukozida (mg/L)

Priloga H: Umeritvena krivulja odvisnosti površine kromatografskega vrha od koncentracije standardne raztopine pelargonidin-3-glukozida (mg/L)

Priloga I: Kromatogram soka granatnega jabolka (D3G - delfinidin-3-glukozid, D3,5G - delfinidin-3,5-diglukozid, C3G - cianidin-3-glukozid, C3,5G - cianidin-3,5-diglukozid, P3G - pelargonidin-3-glukozid in P3,5G - pelargonidin-3,5-diglukozid in C7A - cianidin-7-arabinozid)

Priloga J: Kromatogram soka granatnega jabolka po prvi stopnji prebave *in vitro* (simulacije prebave v želodcu po 1 uri) (D3G - delfinidin-3-glukozid, D3,5G - delfinidin-3,5-diglukozid, C3G - cianidin-3-glukozid, C3,5G - cianidin-3,5-diglukozid, P3G - pelargonidin-3-glukozid in P3,5G - pelargonidin-3,5-diglukozid in C7A - cianidin-7-arabinozid)

Priloga K: Kromatogram soka granatnega jabolka po drugi stopnji prebave *in vitro* (simulacije prebave v tankem črevesu po 1 uri) (D3G - delfinidin-3-glukozid, D3,5G - delfinidin-3,5-diglukozid, C3G - cianidin-3-glukozid, C3,5G - cianidin-3,5-diglukozid, P3G - pelargonidin-3-glukozid in P3,5G - pelargonidin-3,5-diglukozid in C7A - cianidin-7-arabinozid)

Priloga L: Kromatogram soka granatnega jabolka po tretji stopnji prebave *in vitro* (simulacije prebave v tankem črevesu po 2 urah) (D3G - delfinidin-3-glukozid, D3,5G - delfinidin-3,5-diglukozid, C3G - cianidin-3-glukozid, C3,5G - cianidin-3,5-diglukozid, P3G - pelargonidin-3-glukozid in P3,5G - pelargonidin-3,5-diglukozid in C7A - cianidin-7-arabinozid)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AOU	antioksidativna učinkovitost
C3,5G	cianidin-3,5-diglukozid
C3G	cianidin-3-glukozid
C7A	cianidin-7-arabinozid
D3,5G	delfinidin-3,5-diglukozid
D3G	delfinidin-3-glukozid
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
F-C	Folin-Ciocalteu
GIT	gastrointestinalni trakt
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HPLC/DAD	HPLC v povezavi z detekcijo na niz fotodiod
HRP	hrenova peroksidaza
P3,5G	pelargonidin-3,5-diglukozid
P3G	pelargonidin-3-glukozid
RNS	reaktivne dušikove vrste
ROS	reaktivne kisikove vrste
PR	prosti radikal
PSA	prostatični specifični antigen

1 UVOD

Antociani so odgovorni za rdeče, vijolične in modre odtenke rastlinskih plodov, cvetov in listov. Dnevni vnos antocianov v telo, ki ga dosežemo predvsem z vnosom rdečega sadja, nekaterih vrst zelenjave in rdečega vina, lahko znaša do 200 mg/dan. Antociani imajo vrsto bioloških aktivnosti, ki imajo lahko pozitivne učinke na zdravje; na primer inhibicija poškodb deoksiribonukleinske kisline (DNA) pri rakavih celicah *in vitro*, inhibicija prebavnih encimov, indukcija proizvodnje inzulina iz izoliranih pankreatičnih celic, zmanjšanje vnetnih odzivov, zaščita pred s staranjem povezanim zmanjšanim delovanjem možganov. Prehrana, bogata s sadjem, ki vsebuje antociane, izvlečki ali čisti antociani, lahko preprečijo ali zavirajo bolezenska stanja. Peroralni vnos antocianov poveča vsebnost antioksidantov v serumu, vendar biološka razpoložljivost le-teh znaša le okoli 1 %. Nizka biološka razpoložljivost antocianov vzbuja dvom o njihovih pozitivnih učinkih na telo. V študijah s simulacijo človeške gastrointestinalne prebave je bilo ugotovljeno, da so antociani stabilni v kislih razmerah v želodcu in so manj stabilni pri višjih pH tankega črevesa (McDougall in sod., 2007).

Antociani so na splošno občutljivi na svetlobo in temperaturo ter so dovzetni za višje pH vrednosti, najbolj stabilni pa so pri pH 3. Pri reakciji s tanini se oborijo iz vodne raztopine, oksidanti pa jih razbarvajo. V vodni raztopini antociani obstajajo v ravnovesju štirih strukturnih oblik. Pri $\text{pH} \leq 3$ prevladuje osnovni flavilijev kation z rdečo barvo. Med pH 2 in pH 4 se vijolične kinoidal baze oblikujejo zaradi deprotonacije in pri pH 5 do pH 6 se pretvorijo v brezbarvno karbinol psevdobazo, ki lahko odpre obroč in tvori rumene retrokalkone. Pri pH 4 do pH 6 so prisotne vse te oblike, kjer pride do pretvorbe med kinoidal bazo in karabinol psevdobazo prek osnovnega flavilijevega kationa. Končna barva raztopine je odvisna od deležev različnih kemijskih struktur. Antociani niso stabilni v bazičnem okolju, kjer je njihova degradacija odvisna od substituentov na mestih 2, 5, 6, 8 in 9 (Hribar in Poklar Ulrih, 2014).

Da se doseže kakršenkoli biološki učinek v določenem tkivu ali organu, morajo biti antociani biološko razpoložljivi; tj., da se učinkovito absorbirajo iz gastrointestinalnega trakta (GIT) v krvni obtok in da so dostavljeni na ustrezno mesto v telesu (McDougall in sod., 2005).

1.1 NAMEN DELA

V okviru magistrskega dela smo ocenili stabilnost antocianov iz soka granatnega jabolka z uporabo simulacije prebave *in vitro*. Le-ta posnema fizikalno-kemijske in biokemijske razmere, s katerimi se srečujejo v prebavnem traktu. Simulacijo prebave v želodcu in tankem črevesu smo izvedli pri ustreznih vrednostih pH in z ustrezno dodanimi encimi (pepsin ali pankreatin in ekstrakt žolčnih soli). Ugotavljali smo vpliv različnih parametrov

(encimska aktivnost, dolžina posamezne faze) na potek simulacije prebave. V soku granatnega jabolka smo najprej ugotovili skupno količino antocianov in spremljali, kako se le-ta s časom spreminja med simulacijo prebave *in vitro* v želodcu in tankem črevesu. Primerjali smo rezultate antioksidativne učinkovitosti (AOU), določene z luminescenčno metodo, in skupnih fenolnih spojin, določenih z metodo Folin-Ciocalteu (F-C), na različnih stopnjah prebave. S HPLC metodo smo ugotovili, katere antociane vsebuje sok granatnega jabolka in ali se antociani razgradijo med simulacijo prebave *in vitro*. Želeli smo tudi ugotoviti vpliv eksperimentalnih pogojev (encimska aktivnost, čas posamezne faze prebave) na skupne antociane, skupne fenolne spojine in AOU.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Določili smo skupno količino antocianov, skupnih fenolov in AOU v soku granatnega jabolka in spremljali, kako se ti parametri spreminjajo med simulacijo prebave *in vitro* v želodcu in tankem črevesu z ustrezno dodanimi encimi (pepsin ali pankreatin in ekstrakt žolčnih soli).
- Predpostavljamo, da se skupna količina antocianov med simulacijo prebave *in vitro* v želodcu ne bo zmanjšala, v tankem črevesu pa pričakujemo precejšnje zmanjšanje le-teh. Predvidevamo, da se vsebnost skupnih fenolov in AOU medtem ne bosta spremenila.
- Z metodo HPLC smo identificirali in kvantificirali posamezne antociane v soku granatnega jabolka. Predvidevamo, da se bo njihova vsebnost med simulacijo prebave *in vitro* različno spreminjala.

2 PREGLED OBJAV

2.1 GRANATNO JABOLKO (*Punica granatum* L.)

2.1.1 Opis

Granatno jabolko pripada družini granatovk (Punicaceae), rod *Punica* pa vključuje le dve vrsti: *P. protopunica* Balf in *P. granatum* L. Druga vrsta *P. protopunica* Balf. f. obstaja kot manjša in bolj primitivna različica drevesa. Ta redka vrsta se pojavlja le na otoku Sokotra, ob obali Jemna. Izvorna dežela granatnega jabolka je Iran, habitat pa sega vse do Himalaje in severne Indije. Uspeva v polsuhem subtropskem klimatskem pasu s suhimi vročimi poletji in blagimi zimami, s temperaturami do najmanj -11 °C. Danes ga gojijo na širokem pasu suhega predela južne Azije, tropske Afrike, po celotnem sredozemskem pasu Evrope in v suhem delu Kalifornije ter Arizone v Združenih državah Amerike (Baldini in sod., 2015; Newman in sod., 2007).

Granatno jabolko lahko raste kot visok grm ali kot drevo, v višino od 2 do 5 m. Za dobro rodnost potrebuje srednje težka, propustna ali rahlo peščena tla, bogata z organskimi snovmi. Tla morajo zadrževati zadostno količino vode in morajo biti rahlo kisla. Dobro rodnost zagotavljajo sončne, odprte, a ne preveč vetrovne lege. Ker prenaša nižje temperature in v globoki zemlji uspeva tudi brez namakanja, je danes razširjeno po vseh celinah (Morton, 1987).



Slika 1: Granatno jabolko (*Punica granatum* L.) (Rast Istre..., 2014)

Figure 1: Pomegranate (*Punica granatum* L.) (Rast Istre..., 2014)

Granatno jabolko je samooplodna sadna vrsta, za opraševanje potrebuje žuželke (čebele, hrošči). V Sredozemlju cveti od maja do junija. Plodovi dozoriijo šest do sedem mesecev po cvetenju. Cveti z oranžno-rdečimi cvetovi v obliki velikih kelihov, ki spominjajo na nageljne. Cvetovi so enojni ali polnjeni, plodove pa razvijejo samo rastline z enojnimi cvetovi. Sadež (plod) granatnega jabolka je okrogle oblike, podobno jabolku. Plod granatnega jabolka ima gladko rdečkasto lupino. Znotraj sadeža je meso s sočnimi užitnimi zrnici - arili. Arili imajo obliko kapljice in so bele do temno rdeče barve. Posamezen aril vsebuje sočni užitni sloj, in eno seme. Arili so razdeljeni po prekatih, ki so med sabo ločeni s tanko membrano (Baldini in sod., 2015; Newman in sod., 2007).

Plodovi se najpogosteje uživajo sveži in se uporabljajo za pripravo soka, koncentratov in olja iz semen. Zaradi visoke vsebnosti flavonoidov, taninov in nenasičenih maščobnih kislin v semenih, predvsem prevladujoče konjugirane (omega-5) punične kisline, imajo zrna granatnega jabolka dokazane antioksidativne, protimikrobne in protivnetne lastnosti, zavira nekatera rakotvorna obolenja (rak prostate, dojk, debelega črevesa), vpliva na zmanjšanje ateroskleroze in znižuje krvni tlak ter krvni sladkor. Antociani, podskupina flavonoidov, so v vodi topni pigmenti in dajejo soku in lupini granatnega jabolka lepo rubinasto barvo (Baldini in sod., 2015; Newman in sod., 2007).

2.1.2 Hranilne snovi in fitokemikalije

55–60 % mase granatnega jabolka predstavlja užitni del sadeža (arili), odvisno od sorte, od tega je delež soka 75–85 %, delež semen pa 15–25 % (Ismail in sod., 2014). Arili vsebujejo velike količine sladkorjev, prevladujeta predvsem fruktoza (3,51–5,96 g/100 g) in glukoza (3,40–6,40 g/100 g). Užitni del je tudi vir pektina, vitaminov, polisaharidov, polifenolnih spojin in mineralov, predvsem kalija, natrija, kalcija, bakra, mangana, železa, cinka, svinca in kadmija (Gadže in sod., 2012). Arili so bogati z vitaminom C ter so vir polinenasičenih maščobnih kislin (linolenske, linolne ter punične) in vlaknin, vsebujejo pa tudi beljakovine. Energijska vrednost arilov je približno 72 kcal/301 kJ na 100 g (Viuda-Martos in sod., 2010; Teixeira da Silva in sod., 2013).

Fenolne spojine, ki jih najdemo v užitem delu granatnega jabolka, so flavanoli (epikatehin in katehin), hidroksibenzojske kisline (galna kislina) in antociani (delfinin, cianin in pelargonin) (Baldini in sod., 2015).

Antociani so snovi, ki dajejo granatnemu jabolku rdečo barvo, ter so hkrati največja in najpomembnejša skupina flavonoidov v sadežu. V užitem delu granatnega jabolka prevladujejo cianidin-3-glukozid, cianidin-3,5-diglukozid, delfinidin-3-glukozid, delfinidin-3,5-diglukozid, pelargonidin-3-glukozid in pelargonidin-3,5-diglukozid (Viuda-Martos in sod., 2010).

2.1.3 Zdravilni učinki

V različnih kulturah in civilizacijah so granatno jabolko več tisoč let uporabljali za zdravljenje številnih bolezni. Granatno jabolko ima visoko prehransko vrednost in številne koristi za zdravje. Granatno jabolko so uporabljali v naravni in holistični medicini za zdravljenje bolečega grla, kašlja, okužb sečil, prebavnih motenj, kožnih bolezni, artritisa in odpravljanje trakulje. Vendar pa sodobne raziskave ugotavljajo, da je granatno jabolko lahko koristno pri zdravljenju resnih bolezni, kot so rak prostate, kožni rak, osteoartritis in sladkorna bolezen. Klinične raziskave kažejo, da granatno jabolko, če je vključeno kot del zdrave prehrane, lahko pomaga pri preprečevanju bolezni srca, srčnih infarktov in kapi. To pa zato, ker ima granatno jabolko potencial za redčenje krvi, povečuje pretok krvi v srce, znižuje krvni tlak, zmanjšuje nalaganje oblog v arterijah in zmanjšuje delež slabega holesterola, medtem ko povečuje delež dobrega holesterola. Prevrotek iz semen se uporablja za zdravljenje sifilisa. Sok se uporablja za zdravljenje zlatenice in driske. Sok iz cvetov se uporablja za zdravljenje krvavitev iz nosu. Sadna pulpa in semena se uporabljajo za izboljšanje apetita in prebave. Posušeni, zdrobljeni cvetni brsti se uporabljajo kot zdravilo za bronhitis (Bhowmik in sod., 2013).

2.1.3.1 Tradicionalna uporaba granatnega jabolka

Težave s srcem

Pogosto uživanje soka granatnega jabolka lahko vzdržuje dober pretok krvi v telesu, ob tem pa zmanjša tudi tveganje za srčni infarkt in srčno kap.

Želodčne motnje

Lupina, lubje in listi granatnega jabolka se uporabljajo za umiritev motenj v želodcu ali umiritev diaree, povzročene zaradi kakršnihkoli prebavnih težav. Pitje čaja iz listov pomaga pri zdravljenju prebavnih težav. Sok granatnega jabolka se uporablja tudi pri težavah z grižo in kolero.

Zobna nega

Sok, granatnega jabolka zaradi antibakterijskih in protivirusnih lastnosti, pomaga zmanjšati posledice zobnih oblog.

Rak

Granatna jabolka vsebujejo visoko raven antioksidantov, imenovanih flavonoidi. Ti flavonoidi so učinkoviti pri lovljenju različnih radikalov, ki povzročajo raka. Posamezniki, ki se soočajo z velikim tveganjem za raka na prostati in dojkah, naj bi pili sok tega sadja, saj jim bo to pomagalo, da zmanjšajo dodatno tveganje za razvoj raka. Redno uživanje granatnih jabolk lahko zmanjša raven prostatičnega specifičnega antigena (PSA) v telesu in pomaga v boju proti obstoječim rakastim celicam v telesu.

Osteoartritis

Granatno jabolko lajša bolezen v različnih oblikah, kot sta ateroskleroza in osteoartritis.

Diabetes

Sladkorni bolnik, ki uživa sok granatnega jabolka lahko prepreči pojav koronarne bolezni.

Anemija

Zdrav krvni pretok se lahko vzdržuje z uživanjem granatnega jabolka v katerikoli obliki. Izvleček iz semen granatnega jabolka oskrbuje kri z železom in s tem prispeva k zmanjšanju anemičnih simptomov, vključno z utrujenostjo, omotičnostjo in slabostjo ter s poslabšanjem sluha (Bhowmik in sod., 2013).

2.1.3.2 Zdravilne lastnosti granatnega jabolka

Študije so pokazale, da je antioksidativna učinkovitost cvetov granatnega jabolka dva do trikrat višja kot antioksidativna učinkovitost pravega čaja ali rdečega vina. Aviram in sod. (2000) so ugotovili, da sok granatnega jabolka lahko ščiti srce, s tem da zmanjšuje dejavnike tveganja (kot je kopičenje holesterola, nastajanje penastih celic v makrofagih in oksidacija lipoproteinov nizke gostote (LDL), ne da bi to vplivalo na izvorni LDL. V drugi študiji so ugotovili, da ekstrakt granatnega jabolka znatno zmanjša raven specifičnega antigena prostate v serumu in inhibira širjenje agresivnih človeških rakastih celic prostate v atimičnih miših (Malik in sod., 2005). Ekstrakti granatnega jabolka delujejo antiproliferativno, antiestrogensko in proapoptotično na levkemične celice ter rakave celice dojke in prostate. Rezultati študij pri bolnikih s sladkorno boleznijo so pokazali, da ima dopolnilna prehrana s sokom granatnega jabolka pozitivne antioksidativne učinke na makrofage, kar pomeni, da bi lahko zmanjšali razvoj ateroskleroze (Zarfeshany in sod., 2014).

2.1.3.3 Antimikrobno delovanje

Dokazano je, da ima sok granatnega jabolka antimikrobne lastnosti proti škodljivim bakterijam v želodcu, kot sta *Escherichia coli* ali *Bacillus subtilis*, ki lahko povzročata boleče infekcije in resno stanje želodca (Howell in D'Souza, 2013).

2.1.3.4 Boj proti raku

Granatno jabolko vsebuje veliko koristnih antioksidantov, vključno s polifenoli, tanini in antociani. Antioksidanti ščitijo telo pred prostimi radikali, ki so stranski produkti oksidacije celic. Prosti radikali so povezani s tem, da povzročajo številne zdravstvene težave, vključno z rakom dojke, prostate in pljučnim rakom. Pitje soka granatnega jabolka dokazano krči tumorje na prostati pri miših, kar je lahko zaradi dejstva, da se antioksidanti v soku granatnega jabolka pomagajo boriti proti poškodbam prostih radikalov. To krepi tudi odpornost, kar pomaga znižati tveganje obolenosti za rakom (Malik in sod., 2005).

2.1.3.5 Artritis

Sok granatnega jabolka vsebuje inhibitor encima, ki preprečuje encimom, da bi poškodovali hrustance v telesu. To pomaga preprečiti nastanek ali celo simptome, povezane z osteoartritisom (Bhowmik in sod., 2013).

2.1.3.6 Redčenje krvi

Dokazano je, da pitje soka granatnega jabolka vpliva na naravno redčenje krvi. To pomaga povečati pretok krvi do srca, hkrati pa zmanjšuje arterijski obloge. Medtem ko sok granatnega jabolka ne deluje tako močno kot zdravilo za redčenje krvi pri srčnih bolnikih, ima lahko sok ugoden vpliv na srce (Cuccioloni in sod., 2009).

Granatno jabolko lahko smatramo kot funkcionalno živilo zaradi dragocenih spojin v užitem delu sadeža, ki kažejo funkcionalne in zdravilne učinke. Te spojine lahko delujejo kot antioksidanti, imajo antikarcinogene ali antihepatoksične učinke in lahko izboljšajo stanje srčno-žilnih bolezni. Opazili so, da ima granatno jabolko antibakterijske, protivnetne, protivirusne in protidiabetične lastnosti. Pomaga preprečevati Alzheimerjevo bolezen, izboljša kakovost sperme in zmanjša erektilno disfunkcijo pri moških bolnikih (Viuda-Martos in sod., 2010).

2.2 PREBAVA

Izraz prebava v širšem pomenu besede zajema vse prebavne procese, ki potekajo v prebavilih oziroma celotno funkcijo prebavil. Prebavila ali gastrointestinalni sistem tvorijo prebavna cev in pripadajoče eksokrine žleze. Izraz prebava v ožjem pomenu besede označuje pojem digestija v večini evropskih jezikov. V slovenščini ni ustrežnejšega izraza, oziroma za ta proces uporabljamo izraz prebava kot pojmovanje tistih katabolnih procesov, ki potekajo v prebavnem traktu in s katerimi se molekule hranil presnovijo v vmesne presnovke ali produkte prebave. Dokončna presnova (metabolizem) produktov prebave, ki so substrati za celično presnovo, poteka v vseh tkivnih celicah. Proces digestije ne bi bil možen brez ostalih prebavnih podprocesov; gibanja (motilitete), izločanja (sekrecije) snovi v prebavni trakt in vsrkavanja (absorpcije) presnovkov iz prebavil skozi prebavno steno v zunajcelično tekočino in nato v kri (Koren, 2004).

2.2.1 Splošen opis prebavil

Funkcija prebavil je fizična in kemična priprava organskih hranil za prenos hranilnih molekul in vode iz zunanjega okolja organizma v notranje okolje – tkiva. Prebavna cev, ki je tehnično gledano del zunanjega okolja človeka, čeprav v notranjosti organizma, je 4,5 m dolga cev od ust do zadnjika (Koren, 2004).

Večina hranil pride v prebavila z vnosom v obliki večjih delcev organskih snovi razmeroma velike molske mase (ogljikovih hidratov, beljakovin in maščob). Te snovi ne morejo prehajati skozi celične membrane enterocitov, to je celic, ki obdajajo notranjost (svetlino) tankega črevesa, zaradi velikosti molekul. Manjše molekule, ki lahko prehajajo skozi membrano z absorpcijo in nadaljujejo pot v kri ali limfo, nastanejo v katabolnih procesih prebave. Ta podproces – digestija je tesno povezan s podprocesom sekrecije prebavnih sokov (vode, elektrolitov in encimov) v svetlino (lumen) prebavne cevi in z encimsko razgradnjo na luminalni membrani epitelnih celic (enterocitov). Omenjeni podprocesi ne bi mogli potekati brez značilnega delovanja gladkih mišic, ki obdajajo GIT od začetka požiralnika do anusa. S kontrakcijami poganjajo kašasto vsebino ali himus vzdolž prebavne cevi. Ta podproces imenujemo gastrointestinalno gibanje (Singh in Gallier, 2014).

2.2.2 Splošne strukturne značilnosti gastrointestinalnega trakta

Svetlina (lumen) prebavne cevi je tehnično pravzaprav del zunanjega okolja organizma. To zunanje okolje je seveda močno spremenjeno v človeku. Značilnost je spreminjanje pH vzdolž prebavne cevi (nizek pH želodca, visok pH dvanajstnika, prisotnost koristnih in škodljivih bakterij v spodnjem delu prebavil (Koren, 2004).

2.2.3 Gastrointestinalni trakt

Prebavni trakt sestavljajo v zaporedje razvrščeni organi: ustna votlina, žrelo, požiralnik, želodec, tanko črevo in debelo črevo. Prebavna cev je pri človeku sistem organov, katerih skupna naloga je sprejem in prebava hrane do vodotopnih snovi, ki lahko prehajajo skozi steno cevi v kri, ter izločajo neuporabne ostanke. Hrana po prebavnem traktu potuje s pomočjo peristaltike. Prebavni sokovi žlez slinavk in žolča omogočajo kemično razgradnjo hrane. Ustne slinavke izločajo svoje izločke v ustno votlino, trebušna slinavka v tanko črevo, jetra pa izločajo žolč v tanko črevo (Singh in Gallier, 2014).

Človek hrano zaužije skozi usta ali ustno votlino. V ustih potekata mehanska in kemična prebava (Koren, 2004). Žleze slinavke v usta izločajo slino, ki hrano v ustih najprej zmehča. V ustih se hrana s pomočjo zob in jezika, zdrobi in temeljito premeša. V ustni votlini se hrana spremeni v poltekočo maso, ki po požiralniku potuje do želodca. Slina vsebuje encim amilazo, ki škrob spremeni do maltoze (Singh in Gallier, 2014; Kong in Singh, 2008).

Želodec je del prebavnega trakta in je pomemben organ pri prebavi hrane. Glavne naloge želodca so shranjevanje zaužite hrane, dokler se le-ta ne izloči v tanko črevo, razgradnja hrane na manjše dele, mešanje z želodčnim sokom in tvorba želodčne kaše. Celice sluznice

želodca izločajo encime in solno kislino, ki začenjajo prebavo beljakovin in uničijo večino bakterij, ki pridejo v želodec s hrano. Tudi v želodcu poteka mehanska in kemična prebava. Mehanska prebava poteka tako, da se želodec krči in razteza, pri čemer potiska hrano na dno želodca in naprej iz želodca. Pri kemični prebavi sodeluje želodčni sok. Izločanje želodčnega soka uravnava parasimpatikus, hormon gastrin, ki ga izločajo enteroendokrilne celice želodčne sluznice in hormoni, ki jih izloča črevesna sluznica. Želodčni sok je bistra brezbarvna tekočina, ki jo izloča sluznica želodca kot odziv na prisotnost hrane v želodcu. Dnevno se izloči več kot 1,5 L želodčnega soka. Sestavljen je iz HCl (za aktivacijo pepsinogena, baktericidno delovanje), sluzi, več encimov (pepsin, lipaze, siriščni encim), vsebuje tudi intrinzični dejavnik, ki se veže z vitaminom B₁₂ v kompleks, pomemben za tvorbo eritrocitov. Želodčni sok vsebuje encime za razgradnjo beljakovin in za zasirjenje mleka. Gibanje mišic želodčne stene pospešuje solna kislina v želodčnem soku. Hrana se v želodcu delno razgradi (Kong in Singh, 2008; Koren, 2004; Štiblar Martinčič in sod., 2007).

Delno prebavljeno hrano želodčne mišice potisnejo skozi odprtino, ki jo imenujemo želodčni vratar ali pilorusin. Želodčni vratar predstavlja mejo med želodcem in tankim črevesom. Tanko črevo delimo v tri dele: dvanajstnik ali *duodenum*, tešče črevo ali *jejunum* in vito črevo ali *ileum*. Dvanajstnik ali prvi del tankega črevesa (pH 5 - 7,5) obdaja trebušno slinavko. Tanko črevo od dvanajstnika dalje poteka vijugasto in se nadaljuje v tešče črevo (pH 6,5 – 8) in vito črevo. Običajno je tanko črevo pri odraslem človeku dolgo 6–7 m. Njegova notranja stena je pokrita s številnimi črevesnimi resicami, kar močno poveča površino tankega črevesa (na 1 cm je več kot 2000 resic). Vsrkavanje hranilnih snovi zelo olajša tako zgrajena sluznica, zaradi razlitja hranilne vsebine po zelo veliki površini. Črevesni sok v črevo izločajo številne žleze, ki se nahajajo v sluznici tankega črevesa. Mehansko prebavo hrane omogoča peristaltično gibanje črevesa. Prebava ogljikovih hidratov in beljakovin se v tankem črevesu nadaljuje in zaključi, začenja pa se prebava maščob. Tanko črevo vsrka skoraj vse prebavljene molekule hrane v kri in limfo. V dvanajstniku se hrana najprej sreča z žolčem, ki je edini prebavni sok, ki ne vsebuje nobenih encimov. Jetra izločajo žolč neprekinjeno. Shranjuje se v žolčniku, od tod pa med prebavo odteka v dvanajstnik. Dnevno se izloči 0,50 do 0,75 L žolča. Žolč je alkalna rumeno-zelenkasta tekočina. Poleg vode in anorganskih soli vsebuje soli žolčnih kislin, žolčno barvilo bilirubin, holesterol, lecitin, maščobne kisline in sluz. Soli žolčnih kislin pospešujejo delovanje prebavnih encimov v črevesu. Žolč je emulgator, potreben pri prebavi in absorpciji maščob. Sekrecijo žolča in praznjenje žolčnika uravnavajo avtonomno živčevje, črevesni hormoni in številne kemične snovi, ki delujejo na jetrne celice po tem, ko so se vsrkale v kri. Prebavljeni ogljikovi hidrati, maščobe in beljakovine ter elektroliti, vitamini in voda se absorbirajo v tankem črevesu, večinoma v dvanajstniku in jejunumu, v ileumu pa žolčne kisline ter kompleks vitamina B₁₂ in intrinzičnega dejavnika. Ostanek gre v debelo črevo, kjer ga izločimo (Singh in Gallier, 2014; Koren, 2004; Štiblar Martinčič in sod., 2007).

2.2.4 Gibanje v prebavilih

Peristaltika pomeni samodejno krčenje mišic prebavne cevi. Pri tem zaužito hrano potiskajo zaporedni valovi proti zadnjični odprtini (Singh in Gallier, 2014). Mehanska obdelava hrane v ustih – žvečenje in začetek požiranja – je pod hotenim nadzorom somatskega živčevja. Od začetka požiralnika do anusa gibanje nadzoruje avtonomno živčevje (kar pomeni, da ni odvisno od naše volje). Začetek požiranja je hoten, ko pa grižljaj doseže začetni del žrela, pritisk grižljaja na žrelo sproži refleks požiranja, ki ga hoteno ne moremo več ustaviti (Koren, 2004).

Kontrakcijski val, ki nastane v začetnem delu požiralnika, se prenese na želodec. V želodcu peristaltični valovi povzročijo mešanje želodčne vsebine in jih zato imenujemo gibi mešanja (Koren, 2004). Ko pride hrana v želodec, se pričnejo izločati želodčni prebavni sokovi in istočasno pride do peristaltičnih valov mešanja hrane. Valovi počasi mešajo hrano in jo potiskajo proti vratarju. Tako se hrana temeljito pregrnete in prepoji s prebavnimi sokovi (Kong in Singh, 2008).

V tankem črevesu so značilni tako segmentalni gibi kot peristaltika. Segmentacije so v bistvu izmenične kontrakcije in relaksacije sosednjih segmentov krožnega sloja mišic, ki povzročijo lokalno zažemanje črevesa (Hansen, 2003).

V debelem črevesu je le vzdolžni sloj mišic, razporejen v trakove, značilni sta le dve vrsti gibanja; haustracije in masovno gibanje. Peristaltike ni (Hansen, 2003).

2.2.5 Izločanje (sekrecija) v prebavilih

Izločanje v prebavilih je značilen prebavni podproces za celotno prebavno cev od ust do anusa. Izločanje mukusnih celic, ki izločajo sluz (mukus) v celotnem prebavnem traktu – od požiralnika do zadnjika – omogoča drsenje bolusa / himusa / fecesa skozi prebavno cev. Encimska sekrecija posebnih eksokrilnih žlez / celic v svetlino prebavil je nujen pogoj za normalen potek katabolnih procesov v svetlini in posledično podprocesov prebave in normalen potek podprocesa vsrkavanja presnovkov skozi prebavno steno v medenični prostor in nato kri (Koren, 2004).

Manjše žleze se nahajajo v sluznici ustne votline, velike pa sta obušesni, podjezični in podčeljustna slinavka (Singh in Gallier, 2014). To so žleze, ki svoj izloček izločijo v mešičke; izloček po izvodilih priteče v usta. V slinavkah se izloča slina, ki vsebuje 99 % vode in 1 % beljakovin - mucinov. Mucini z vodo tvorijo sluz, ki zaradi svoje viskoznosti omogoča drsenje grižljaja. Slina vsebuje tudi encim α -amilazo, aktivno v nevtralnem pH območju. Encim katalizira razgradnjo α -1,4-glukozidnih vezi škroba. Izločanje je v

največji meri uravnavano nevralno z avtonomnim živčevjem (Koren, 2004). Količino izločene sline uravnava živčevje in snovi, ki s krvjo krožijo po telesu, pobudo za njeno izločanje pa dobi živčevje iz sluznice prebavil in iz možganske skorje (Singh in Gallier, 2014).

Izločanje želodčnega soka je povezano s sekrecijskimi celicami gastričnega epitelijskega. Količina izločenega soka je okrog 2 L na dan. Razen vode želodčni sok vsebuje še HCl, ki nastaja v parietalnih celicah, ter encim pepsin, katerega izločajo encimske celice v neaktivni obliki kot encimski prekursor pepsinogen. Hrana, ki se pojavi v lumnu želodca, spodbudi glavne želodčne celice k izločanju pepsinogenov, ki so sestavljeni iz pepsinskega (encimskega) ter prekurzorskega (inhibitorskega) segmenta. Del prekurzorskega segmenta se poveže z aktivnim mestom pepsinskega segmenta in s tem inhibira njegovo delovanje. Kisel pH, nižji od 5 (v želodcu znaša okrog 2), povzroči prekinitev te povezave. Sproščeno katalitično mesto nato povzroči odcepitev prekurzorskega segmenta od pepsinskega dela. Temu procesu rečemo avtoaktivacija, rezultat reakcije pa je pepsin, tj. aktivna oblika pepsinogena. Že aktiven pepsin pa lahko aktivira tudi druge molekule pepsinogena - temu procesu rečemo avtokataliza. Zgornji del želodca izloča predvsem sluz, HCl in pepsinogen. Spodnji del želodca je obdan z razmeroma debelim slojem gladkomišičnih celic. Pepsin cepi denaturirane polipeptidne verige v krajše peptidne verige – peptide. Gastrično encimsko in kislinsko izločanje nevralno nadzirata notranji in zunanji živčni pletež enteričnega sistema (Koren, 2004; Kong in Singh, 2008; Moughan in Stevens, 2013).

S preходом želodčnega himusa v dvanajstnik nastopi faza spodbujanja pankreasne sekrecije s hormonoma sekretinom in holecistokininom (Koren, 2004).

Kisli himus (pH 2,5-5) iz želodca po prehodu v dvanajstnik nevtralizira bazični sok trebušne slinavke (pH med 8 in 9). Dnevna količina izločenega soka je v povprečju 1500 mL. Trebušna slinavka je žleza z zunanjim in notranjim izločanjem. To pomeni, da sekret trebušne slinavke odteka iz žleznih mešičkov po odvodu v dvanajstnik. Hormona inzulin in glukagon pa se izločata v kri. Po izvodu se sok izlije v del izvodila, kjer se priključi še žolčni sok iz žolčevoda. Pankreasni in žolčni sok po skupnem izvodu, ki ga obdaja še krožna mišica prehajata v dvanajstnik. Pankreasni sok je lahko bogat z encimi ali pa vsebuje manj encimov in več bikarbonata. Natrijev bikarbonat skupaj z žolčem nevtralizira solno kislino iz želodca, ki bi v črevesu nevtralizirala delovanje fermentov. Prihod peptidnega in/ali maščobnega himusa v dvanajstnik izzove izločanje hormona holecistokinina iz endokrinih celic v mukusnem sloju dvanajstnika, ki spodbudi izločanje acinusnega dela pankreasa. Acinusi izločajo encime za razgradnjo vseh treh tipov hranilnih makromolekul. Pankreasna amilaza nadaljuje razgradnjo škroba, ki je v ustih potekala z α -amilazo v slini in je bila v želodcu denaturirana zaradi nizkega pH. Beljakovinske presnovke, male peptide, razgradijo peptidaze; endopeptidaze (tripsin, himotrisin, elastaze)

in eksopeptidaze (karboksipeptidaza A in B). Proteolitični encimi se izločajo v neaktivni obliki kot tripsinogen, himotripsinogen, proelastaze, prokarboksipeptidaze, aktivacija pa poteka z encimom enterokinaza v svetlini membrani duodenalnih enterocitov. Maščobe razgradi encim pankreasna lipaza v dvanajstniku ob emulgaciji himusa z žolčem (Koren, 2004; Singh in Gallier, 2014).

Žolčni sok se izloča v dvanajstnik po skupnem izvodu s pankreasnim sokom. Nastane v jetrnih celicah, iz katerih se izloči v številne jetrne kanale in nato v izvodilo - žolčevod. Žolčni sok vsebuje glikoholne tavorholne konjugate primarnih žolčnih kislin, ki omogočajo emulgiranje maščob, pa tudi holesterol, lecitin in žolčne pigmente ter elektrolite (Singh in Gallier, 2014).

Tanko črevo izloča sluzen izloček, ki ga izločajo vrečaste celice, ki se nahajajo med epitelijskimi celicami. Sluz ščiti epitelij pred mehanskimi poškodbami in omogoča drsenje črevesnega himusa. Himus je v tankem črevesu nekoliko hipertoničen glede na telesne tekočine, kar ima za posledico difuzijo vode v svetlino tankega črevesa. Ta proces je pomemben zaradi prav tako pomembnega procesa – absorpcije vode in elektrolitov (Koren, 2004; Vander in sod., 2001).

Izločanje v debelem črevesu je v glavnem izločanje sluzi, himus se dokončno zgosti zaradi izoosmozne absorpcije vode. S tem se v padajočem delu kolona formira blato (Vander in sod., 2001).

2.2.6 *In vitro* prebavni modeli

Metode z *in vivo* hranjenjem živali ali človeka običajno zagotovijo najbolj natančne rezultate, vendar so zamudne in drage, zato je bilo veliko truda namenjenega razvoju *in vitro* postopkov (Boisen in Eggum, 1991). Načeloma *in vitro* prebavni modeli zagotavljajo uporabno alternativo človeškimi in živalskimi modelom. Idealna *in vitro* prebavna metoda naj bi zagotovila natančne rezultate v kratkem času. V praksi se vsaka *in vitro* metoda ne ujema z realnostjo, kar pa se lahko doseže z dejanskim preučevanjem usode hrane v *in vivo* razmerah. Zato je med natančnostjo in enostavnostjo uporabe katerega koli *in vitro* modela prebave potrebno najti kompromis (Hur in sod., 2011).

In vitro prebavni modeli se razlikujejo po svojem delovanju, večinoma pa jih lahko strnemo v naslednje tri točke:

- Različno število in vrsta korakov, vključenih v zaporedje prebave, na primer, usta, želodec, tanko črevo, debelo črevo.
- Različna sestava prebavnih sokov, ki se uporabljajo v vsakem koraku, na primer, encimi, soli, pufri, biološki polimeri in površinsko aktivne komponente.

- Stresanje in pretok tekočin, ki se uporablja pri vsaki stopnji prebave, na primer jakost stresanja, geometrija toka in profil pretoka (Hur in sod., 2011).

Poleg navedenega obstajajo precejšnje razlike tudi v vrsti izmerjenih parametrov. Ti vključujejo meritve kemijskih sprememb in strukturnih sprememb (Hur in sod., 2011). Najpogosteje uporabljeni encimi in druge biološke molekule, ki se uporabljajo v *in vitro* prebavnih modelih, so pepsin, pankreatin, tripsin, kimotripsin, peptidaze, α -amilaze, lipaze, žolčne soli in mucin. V študijah so uporabili človeške, živalske in rastlinske encime. Vrste encimov, ki so vključeni v *in vitro* prebavni model, običajno odražajo glavne sestavine hrane, ki se preiskujejo, npr. lipaze za prebavo lipidov, proteaze za prebavo beljakovin in amilaze za prebavo škroba. Študije o prebavi bolj kompleksnih večkomponentnih sistemov živil običajno uporabljajo širši spekter prebavnih encimov, kot ga imajo α -amilaze, mucin, pepsin, pankreatin in lipaze (Hur in sod., 2011). Različne encime običajno dodajamo postopoma, tako da simuliramo različne stopnje prebave. Encimsko sestavo določenih prebavnih sokov je mogoče simulirati z mešanjem ustreznih količin čistih encimov. Encimi pogosto zahtevajo dodatne komponente v prebavnih sokovih za učinkovito delovanje, na primer pankreatična lipaza zahteva prisotnost kalcijevih in žolčnih soli (Biosen in Eggum, 1991).

Vsi *in vitro* prebavni modeli imajo temperaturo prebave 37 °C. Dolžina inkubacijskega časa vzorcev v različnih simuliranih prebavnih sokovih bi morala posnemati znane čase prebave pri ljudeh. Pomemben dejavnik, ki vpliva na čas prebave, je vrsta vzorca, ki se testira. Znano je, da se veliki delci hrane premikajo skozi želodec počasneje kot majhni, saj morajo biti dovolj majhni, da gredo skozi želodčni vratar, ki ločuje želodec in tanko črevo. Zato je pri načrtovanju *in vitro* prebavnih modelov potrebno upoštevati čas prebave glede na velikost delcev. Koncentracija in sestava encimov so prav tako zelo pomembni dejavniki in jih je potrebno upoštevati pri načrtovanju *in vitro* prebavnih modelov. Značilno je, da višje koncentracije encimov pospešijo prebavo ali razgradnjo sestavin živila in zato je pomembno, da uporabimo fiziološko ustrezne vsebnosti (Hur in sod., 2011; Omar in sod., 2013).

In vitro metode, ki posnemajo presnovne procese, se pogosto uporablja za proučevanje obnašanja prebavnega trakta po zaužitju hrane ali farmacevtskih izdelkov. Čeprav veljajo prehranske študije na ljudeh še vedno za "zlati standard" za reševanje s prehrano povezanih vprašanj, imajo *in vitro* metode prednost v tem, da so hitrejše, cenejše, manj delovno intenzivne, in nimajo etičnih omejitev. To omogoča relativno veliko število paralelnih vzorcev za presejalne namene. Metode simulacije prebave običajno vključujejo fazo prebave v ustnih, želodcu in tankem črevesu in občasno fazo fermentacije v debelem črevesu. Te metode poskušajo posnemati fiziološke razmere *in vivo*, upoštevajoč prisotnost prebavnih encimov in njihove koncentracije, pH, čas prebave in koncentracije soli. Statični modeli prebave človeka se uporabljajo za proučevanje različnih znanstvenih vprašanj, kot

so prebavljivost in biološka razpoložljivost farmacevtskih izdelkov, mikotoksinov in makrohranilnih snovi, kot so beljakovine, ogljikovi hidrati in maščobe. Prebavni modeli so bili uporabljeni tudi za proučevanje sproščanja mikrohranil iz matriksa, kot so minerali in elementi v sledovih in sekundarne rastlinske spojine, vključno s karotenoidi in polifenoli (Minekus in sod., 2014).

2.2.6.1 Oralna faza

V ustni votlini se tekstura trdne hrane z žvečenjem in dodatkom sline bistveno spremeni. Žvečenje je kompleksen proces, ki je odvisen od številnih dejavnikov, kot so sestava hrane, volumen hrane, števila žvečnih ciklov, sile ugriza, stanja zob, stopnje lakote in navad. To vse vpliva na velikost, površino in obliko delcev hrane. Simulacija oralne faze naj bi potekla vsaj 2 minuti (kontaktni čas z encimom). Ta čas je nekoliko daljši kot v *in vivo*, vendar pa je natančnost in ponovljivost v laboratorijskih razmerah lahko ogrožena, z uporabo krajšega časa prebave v ustni votlini. V primeru tekoče hrane se lahko vključi simulacija prebave v ustni votlini, predvsem, če obrok vsebuje škrob. Vendar pa večina tekoče hrane ne zahteva simulacije prebave v ustni votlini, predvsem zaradi zelo kratkega časa, ko je v ustni votlini. Izločanje sline prav tako vpliva na parametre tekoče faze hrane, kot so pH vrednost, površinska napetost in viskoznost. Celotna količina sline, ki se proizvede na dan, je v razponu od 1 do 1,5 L. Slina se izloča različno hitro v stimuliranih in nestimuliranih stanjih. Pri simulaciji močenja in lubikacije trdne mase živila s slino se priporoča, da se vsaj 50 % (w/v) simulirane tekočine sline doda trdni masi živila pred postopkom homogenizacije. Količina simulirane tekočine sline mora biti dovolj velika, da se doseže konsistenco, ki je podobna paradižnikovi mezgi ali gorčici (Minekus in sod., 2014; Turgeon in Rioux, 2011).

2.2.6.2 Želodčna faza

Praznjenje želodca zahodnega tipa obroka v trdni obliki je običajno zaključeno med 3 in 4 urami. Homogenizacija trdnega obroka običajno vodi k skrajšanju trajanja želodčne prebave za eno uro. Presnova tekočega obroka pa poteka s hitrim nastopom praznjenja. Praznjenje 300 mL vode zahteva eno uro, medtem, ko so druge študije pokazale, da tekočine z nizko koncentracijo proteinov potrebujejo tudi krajši čas prehoda (0,5 h) skozi želodec. Dodajanje hranil (beljakovin, maščob in ogljikovih hidratov) v tekoči obrok vpliva tudi na tranzitni čas prehoda skozi želodec. Poleg tega inter- in celo individualne vsakodnevne spremembe v izločanju želodčnih sokov, vplivajo na pH in stopnjo praznjenja želodca. Poenostavljen statični model ne more reproducirati dinamično in prehodno naravo *in vivo* prebavnega procesa. pH je relativno nizek od začetka procesa prebave, brez začetnega puferskega učinka hrane. Pogoji protokola prebave morajo biti uporabni za širok spekter jedi, zato je priporočen čas za želodčno prebavo 2 uri. Svetuje se, da se uporabi en volumski delež simuliranega želodčnega soka na en volumski delež oralne vsebine ne

glede na fizikalno stanje obroka. Po vnosu hrane se pH v želodcu običajno dvigne do vrednosti 5, predvsem zaradi puferske kapacitete tipičnega zahodnega tipa obroka. Izločanje HCl v želodcu zniža pH na vrednosti, ki so potrebne za optimalno aktivnost encimov. Zato se pH počasi vrne nazaj na vrednost, ki je običajna za prazen želodec. Za optimalno želodčno lipazno aktivnost so potrebni rahlo kisli pogoji v območju pH od 4 do 6 za, medtem ko je pepsin v glavnem aktiven med pH 2 in 4. Priporočajo, da naj bi simulacija prebave v želodcu potekla 2 uri in zato tudi predlagajo pH statične vrednosti 3, ki naj bi predstavljal srednjo vrednost pH v obroku. Pepsin je edini proteolitični encim v želodcu človeka. Vsebnost pepsina je v želodcu odvisna od posameznika, v glavnem pa se poveča njegova koncentracija med prebavo od 0,26 mg/mL (30 min) do 0,58 mg/mL (180 min). V statičnih *in vitro* prebavnih modelih se uporablja pepsin prašičjega izvora. Na podlagi ocene vrednosti, navedene v literaturi, predlagajo, da se uporablja pepsin z aktivnostjo 2000 U/mL v končni zmesi za prebavo (Minekus in sod., 2014).

2.2.6.3 Faza v tankem črevesu

Ko gre živilo skozi simulirano želodčno fazo prebave, se prične simulacija prebave, ki poteka v tankem črevesu. Obstaja veliko spremenljivk, ki vplivajo na čas prehoda skozi tanko črevo, vendar Minekus in sod. (2014) priporočajo, da je čas simulacije prebave v tankem črevesu 2 uri. Po izpraznitvi želodca, se delno prebavljena hrana običajno nevtralizira z izločanjem karbonata. Posledično je pH v dvanajstniku okoli 6,5, odvisno od dejavnikov, kot je vrsta obroka in hitrost praznjenja želodca. pH se nato nekoliko dvigne preko prebave v tankem črevesu, vrednost v ileumu je okoli 7,5. Za simulacijo pH v celotnem prehodu skozi fazo tankega črevesa v statičnih pogojih, Minekus in sod. (2014) priporočajo uporabo povprečne vrednosti pH 7,0 z dodajanjem simulirane tekočine slin in natrijevega hidroksida. Najpomembnejši sestavini v simulirani prebavi tankega črevesa sta pankreatični encimi in žolč. Za encime priporočajo, da se uporabijo posamični encimi ali pankreatin prašičjega izvora in žolč, ki je lahko bodisi ekstrakt žolča ali zamrznjen žolč prašičjega izvora. Priporočajo uporabo 4×USP ali 8×USP pankreatina in njegovo aktivnost tripsina testiramo z uporabo p-toluen-sulfonil-L-arginin metil ester (TAME) testa. Količina dodanega pankreatina mora biti dodana na osnovi tripsinskega testa in mora biti zadostna, da zagotovi 100 TAME enot na mL vsebine v fazi v tankem črevesu. Pankreatin (4×USP) vsebuje encimske komponente, ki vključujejo tripsin, amilaze in lipaze, ribonukleazo in proteaze, ki jih proizvedejo eksokrine žleze trebušne slinavke prašičev. Ta kombinacija encimov omogoča, da se hidrolizirajo beljakovine, škrob in maščobe. Pankreatin 4×USP bo pretvoril ne manj kot 25-kratnik svoje mase krompirjevega škroba v topne ogljikove hidrate v 5 minutah v vodi pri 40 °C, bo prebavil ne manj kot 25-kratnik svoje mase kazeina v 60 minutah pri pH 7,5 in 40 °C ter bo iz oljčnega olja pri pH 9,0 in 37 °C sprostil ne manj kot mikro-ekvivalent kisline na minuto na mg pankreatina (Minekus in sod., 2014).

2.3 ANTIOKSIDANTI

Beseda antioksidant je v sodobni družbi vse bolj priljubljena. Pojem antioksidant je v slovarju (Webster's Third New International Dictionary, 1993) opredeljen precej enostavno, ampak s tradicionalnim pripisom: snovi, ki preprečujejo oksidacijo ali zavirajo reakcije s kisikom ali peroksidi. Mnoge od teh snovi (tokoferoli) se uporabljajo kot konzervansi v različnih proizvodih (v maščobah, oljih, živilih in milih za zaviranje razvoja žarkosti, v bencinu in drugih naftnih derivatih za preprečevanje neželenih sprememb in v gumah za zaviranje staranja). Bolj biološko pomembna definicija antioksidantov je, da so to sintetične ali naravne snovi, ki se dodajo v izdelke za preprečitev ali odložitev njihovega kvarjenja zaradi delovanja kisika v zraku. V biokemiji in medicini so antioksidanti encimi ali druge organske snovi, kot sta npr. vitamin E in β -karoten, ki preprečujejo škodljive učinke oksidacije v tkivih živali in rastlin. Glede na znanstvene discipline sta obseg in zaščita tarčnih snovi precej različna. Antioksidanti v prehrani so snovi v živilih, ki bistveno zmanjšajo negativne učinke reaktivnih elementov, kot so reaktivne kisikove (ROS) in dušikove vrste (RNS) na običajne fiziološke funkcije pri ljudeh. Tako kot druge definicije tudi ta definicija ne zagotavlja omejitev glede mehanizma(ov) antioksidativnega delovanja. Zato antioksidanti v prehrani lahko lovijo ROS in RNS ter s tem ustavijo radikalne verižne reakcije, ali pa inhibirajo reaktivne oksidante (preventivno). Antioksidanti v prehrani so na splošno inhibitorji verižnih radikalnih reakcij in kelatorji, inhibitorji oksidativnih encimov in kofaktorji antioksidantnih encimov. Do avtooksidacije snovi pride zaradi radikalne verižne reakcije, oksidacijo v bioloških sistemih primarno povzročajo redoks encimi. Kljub temu pa se še vedno lahko zgodi neencimska lipidna avtooksidacija z radikalno verižno reakcijo in povzroči oksidativni stres. Posledično biološki antioksidanti vključujejo encimske antioksidante (npr. superoksid dismutaza, katalaza in glutation peroksidaza) in neencimske antioksidante kot so inhibitorji oksidativnih encimov (npr. ciklooksigenaze), kofaktorje antioksidativnih encimov, lovilce ROS / RNS (Huang in sod., 2005).

Antioksidanti so sestavine, ki zavirajo proste radikale in njihove škodljive učinke. Če je proizvodnja prostih radikalov večja kot antioksidativno delovanje, se pojavi stanje oksidativnega stresa s celičnimi poškodbami (Finaud in sod., 2006).

V živih organizmih ni univerzalnega "najboljšega" antioksidanta; Potrebni so različni antioksidanti za zaščito različnih biomolekul *in vivo* (Halliwell, 2001).

2.3.1 Prosti radikali

V strukturi atomov in molekul so elektroni običajno povezani v parih, vsak par se giblje znotraj določenega območja prostora (atomska ali molekulska orbitala). Prosti radikal (PR) je vsaka vrsta, ki vsebuje eno ali več neparnih elektronov in je sposobna samostojnega obstoja. Atom vodika z enim protonom in enim elektronom je najenostavnejši PR (Halliwell, 2001). PR so reaktivne spojine, ki jih človeško telo naravno proizvaja. Ti imajo lahko pozitivne učinke (na primer na imunski sistem), ali negativne učinke (npr. lipidna, proteinska ali DNA oksidacija) (Finaud in sod., 2006). PR so intermediati pri redoks, fotokemičnih in radikalskih reakcijah, ki se pojavljajo pri vrsti biokemijskih procesov. Nastajajo tam, kjer prihaja do prenosa elektrona, predvsem pri redoks in encimskih reakcijah (Halliwell in Gutteridge, 2007), lahko pa jih povzročajo tudi različna sevanja, ki privedejo do homolitske cepitve kovalentne vezi (npr. radioliza vode) (Cigić in Rudan Tasič, 2006). Nekatere reaktivne zvrsti so pomemben del imunskega sistema, ki jih uporablja za uničevanje tujih in rakavih celic, srečamo jih v procesih presnove, so mediatorji in imajo pomembno vlogo pri številnih patofizioloških procesih in procesih staranja (Kreft in Pečar, 1998). Najpomembnejši kisikovi PR so superoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$), tripletni kisik (3O_2), singletni kisik (1O_2), hidroksilni radikal ($HO^{\cdot}$), vodikov peroksid (H_2O_2), radikal dušikovega oksida ($NO^{\cdot}$) in peroksilni radikal ($ROO^{\cdot}$) (Korošec, 2000). Vse te oblike kisika oz. njegove spojine so reaktivne kisikove spojine (ROS), ki so odgovorne za celične poškodbe, ki so lahko vzrok vnetnih reakcij, malignih transformacij ali smrti celice. Dejstvo, da so PR zelo reaktivni, pomeni, da imajo majhno kemijsko specifičnost, tj. da lahko reagirajo z večino molekul v svoji bližini, kar vključuje proteine, lipide, ogljikove hidrate in DNA. Kadar radikal reagira z neradikalom, nastane nov PR, ki reagira naprej v verižni radikalski reakciji (npr. lipidna peroksidacija), medtem ko prvotni izgubi radikalske lastnosti (Cigić in Rudan Tasič, 2006).

In vivo nastanejo PR in druge reaktivne kisikove in dušikove zvrsti, nekatere kemijsko po nesreči in druge zaradi koristnih presnovnih procesov. Njihove vsebnosti so kontrolirane z mrežo antioksidativnih obrambnih sistemov, ki jim pomagajo s sistemi za popravilo (Halliwell, 2001). Neravnotežje med produkcijo prostih radikalov in antioksidativno obrambo vodi v stanje oksidativnega stresa, ki je lahko vpleten v proces staranja in nekatere bolezni (npr. rak, Parkinsonova bolezen) (Finaud in sod., 2006).

Človeško telo samo proizvaja proste radikale. Ti lahko izvajajo pozitivne učinke (na primer na imunski sistem), ali negativne učinke (npr. lipidna, proteinska ali DNA oksidacija). Da bi omejili te škodljive učinke, organizem potrebuje kompleksno zaščito - antioksidativni sistem. Ta sistem vsebuje antioksidativne encime (katalaze, glutathion peroksidaze, superoksidna dismutaze) in ne-encimski antioksidante (npr. vitamin E, vitamin A, vitamin C, glutathion, sečna kislina) (Finaud in sod., 2006).

2.3.2 Oksidativni stres

Oksidativni stres je vrsta "kemičnega stresa", ki je prisoten v živih organizmih zaradi povečane količine potencialno škodljivih agensov, t.i. reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS). Po definiciji je oksidativni stres neposredna posledica škodljivega delovanja povečane količine teh visoko reaktivnih zvrsti na celice in tkiva v organizmu. Gre za patološko stanje, ki se pojavi zaradi prevelike tvorbe radikalov in/ali zmanjšane učinkovitosti antioksidativnih sistemov (Osredkar, 2012).

Oksidativni stres je odgovoren za zgodnje staranje ter za vrsto pomembnih bolezni, kot so npr. ateroskleroza, srčni infarkt, možganska kap, Alzheimerjeva bolezen, sladkorna bolezen, kronični bronhitis, siva mrena, nekatere vrste raka in druge. Pojav oksidativnega stresa je neobhodno povezan s prisotnostjo kisika v našem ozračju, ki pa je hkrati nujen za naš obstoj. Nesporno je kisik ena tistih anorganskih molekul, brez katerih naše življenje v obstoječi obliki ne bi bilo mogoče. Prav gotovo tudi v organizmu potekajo oksidacijski procesi; čeprav tega ne opazimo neposredno, to potrjujejo različni kisikovi presnovki. (Osredkar, 2012)

2.3.3 Uravnavanje oksidativnega stresa

2.3.3.1 Vrste antioksidativnih sistemov

Zdrav organizem je sposoben preprečiti škodljivo delovanje radikalov. V telesu namreč obstaja naravni obrambni sistem, ki ga sestavljajo različni encimski sistemi in ostale snovi pod skupnim imenom antioksidanti. Poznamo več obrambnih mehanizmov: primarni, sekundarni in terciarni. Pri primarnem obrambnem mehanizmu gre za preprečevanje nastanka radikalov. Sekundarni mehanizmi nevtralizirajo radikale, terciarni pa poskrbijo za popravilo morebitnih poškodb zaradi delovanja radikalov. V antioksidativni obrambni sistem prištevamo vse molekule in spojine, ki so sposobne nevtralizirati radikale, preprečiti njihov nastanek ali jih katalitično odstraniti. Sam sistem je običajno porazdeljen znotraj organizma na znotrajcelični ali zunajcelični ravni. V zunajceličnem prostoru in v krvni plazmi predstavljajo antioksidantno plazemsko pregrado vse snovi, ki imajo redukcijske sposobnosti za nasičenje elektronskega primanjkljaja. Sem spadajo glutation, tioli, albumini, bilirubin, sečna kislina, holesterol ter eksogene snovi, kot so askorbinska kislina, tokoferoli, polifenoli, bioflavonoidi. Znotraj celice je antioksidativni sistem dobro razporejen v številnih delih celice. Vendar pa glavnina radikalov nastane v lipidnih plasteh celic, zato so lipofilni antioksidanti v bioloških membranah prva obrambna črta pred delovanjem ROS. Kasnejšo obrambno črto pa zastopajo vodotopni vitamini, kot so vitamin C in nekateri vitamini skupine B (Osredkar, 2012; Panda, 2012).

2.3.4 Izvor antioksidantov

Glede na izvor ločimo endogene antioksidante, kot npr. encimske sisteme ter snovi, katere dodatno vnašamo v organizem z ustrezno prehrano, to pa so eksogeni antioksidanti (Osredkar, 2012). AOU sistema je odvisna od prehranskih vnosov (vitamini in mikrohranila) ter od endogene proizvodnje encimskih antioksidantov, ki se lahko spremeni s športno aktivnostjo, prehrano in staranjem (Finaud in sod., 2006).

Glede na kemijsko strukturo se antioksidanti delijo na encimske ter ne-encimske snovi ter glede na topnost na hidrofilne in hidrofobne. Hidrofilni reagirajo z oksidanti predvsem v citosolu in krvni plazmi, medtem ko hidrofobni preprečujejo lipidno peroksidacijo celičnih membran. Pomembni načini delovanja antioksidantov:

- katalitično odstranjevanje radikalov in drugih ROS (superoksidna dismutaza, katalaza, peroksidaza ...);
- glutathion, askorbinska kislina, β -karoten in podobne nizko molekularne snovi so t. i. lovilci radikalov, ki delujejo tako, da reagirajo z radikali, jih nevtralizirajo, sami pa pri tem pridobijo lastnosti radikalov;
- nekateri proteini (transferini, hemopeksini, haptoglobini) kompleksirajo s prooksidanti (železovi, bakrovi ioni, hem) in s tem zmanjšajo njihovo razpoložljivost ter tako preprečijo nastanek predvsem hidroksilnega radikala in razgradnjo ter nastanek lipidnih peroksidov (Osredkar, 2012).

2.3.4.1 Antioksidanti, ki niso encimi

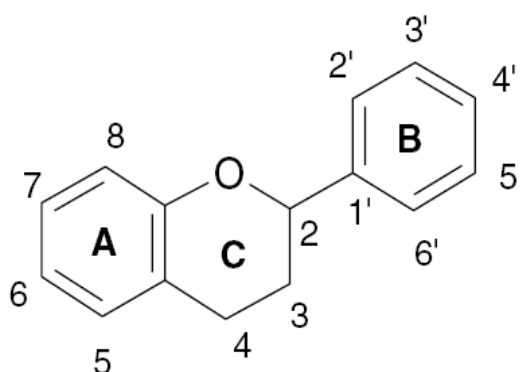
V to skupino antioksidantov prištevamo predvsem vitamine z antioksidativnim delovanjem, glutathion, ostale tiole ter nekatere druge biološke spojine, ki kažejo antioksidativno delovanje (askorbinska kislina, α -tokoferol, β -karoten, glutathion, transferin, feritin, laktoferin, ...) (Osredkar, 2012). Večina naravnih antioksidantov je pridobljenih iz sadja, zelenjave, začimb in zelišč (ginseng, kurkuma, ginko, rožmarin, zeleni čaj, grozdje, ingver, česen). Vsebujejo široko paleto antioksidantov, kot so fenoli (polifenoli), flavonoidi, karotenoidi, steroidi in tiolne spojine. Ti antioksidanti pomagajo ščititi celico pred oksidativnim stresom in s tem zmanjšujejo tveganje za kronične bolezni (Lü in sod., 2010).

Granatno jabolko je pomemben vir fenolnih spojin, kot so flavanoli (epikatehin in katehin), hidroksibenzojske kisline (galna kislina) in antociani (delfin, cianin in pelargonin) (Baldini in sod., 2015).

2.3.5 Fenolne spojine

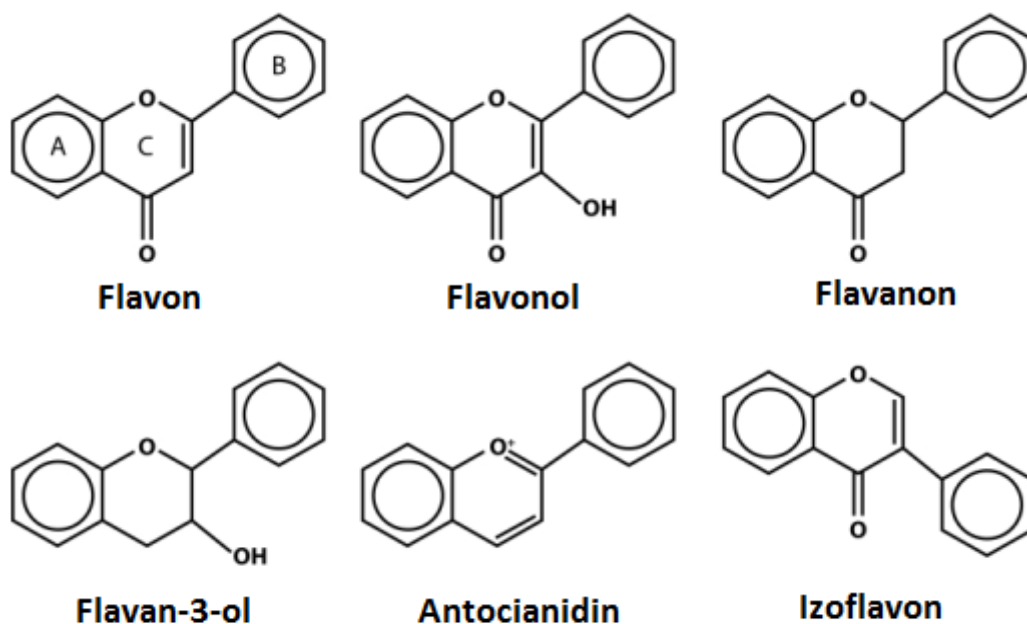
Fenolne spojine so spojine, ki imajo najmanj en aromatski obroč z eno ali več hidroksilno skupino (Dai in Mumper, 2010). V naravi so običajne spojine z več hidroksilnimi skupinami in zato se je zanje uveljavilo tudi drugo ime polifenoli (Abram in Simčič, 1997). Najdemo jih v rastlinskem kraljestvu in so najbolj množični sekundarni metaboliti rastlin z več kot 8.000 trenutno znanimi fenolnimi strukturami, od enostavnih molekul, kot so fenolne kisline do visoko polimeriziranih snovi, kot so tanini. Rastlinske fenolne spojine so običajno vključene v obrambni mehanizem pred ultravijoličnim sevanjem ali napadom patogenov, parazitov in plenilcev, prispevajo pa tudi k barvi rastlin. Polifenoli so prisotni v vseh rastlinskih organih in so zato sestavni del prehrane ljudi. Pogosto so sestavine v rastlinskih živilih (sadje, zelenjava, žita, olive, stročnice, čokolada, itd) in pijačah (čaj, kava, pivo, vino, itd) in so delno odgovorni za celotne organoleptične lastnosti rastlinskih živil. Na primer, fenolne spojine prispevajo h grenkobi in trpkosti sadja in sadnih sokov, zaradi interakcije med fenoli, predvsem procianidina in glikoproteina, v slini (Dai in Mumper, 2010).

Rastlinske fenolne spojine vključujejo fenolne kisline, flavonoide, tanine in manj pogoste stilbene in lignane. Flavonoidi so najbolj pogosti polifenoli v naši prehrani. Osnovna flavonoidna struktura je flavan iz 15 ogljikovih atomov, ki so razporejeni v tri obroče (C6-C3-C6) in so označeni kot A, B in C. Flavonoidi so razdeljeni v šest podskupin: flavoni, flavonoli, flavanoli, flavanoni, izoflavoni in antociani, glede na oksidacijsko stanje centralnega C obroča (Dai in Mumper, 2010). Strukture flavonoidov so si zelo podobne, ker imajo vsi flavonoidi enak biosintetski izvor. Med seboj se razlikujejo po stopnji oksidacije piranskega obroča, po razporeditvi hidroksilnih in metoksi skupin ter po vezanih sladkorjih (Bruneton, 1999).



Slika 2: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Balasundram in sod., 2006)

Figure 2: Generic structure of a flavonoid molecule (Balasundram et al., 2006)



Slika 3: Struktura flavonoidov (Dai in Mumper, 2010)

Figure 3: Structures of flavonoids (Dai and Mumper, 2010)

Preglednica 1: Delitev fenolnih spojin po številu C atomov (Abram, 2000)

Table 1: Main classes of phenolic compounds regarding to their carbon chain (Abram, 2000)

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

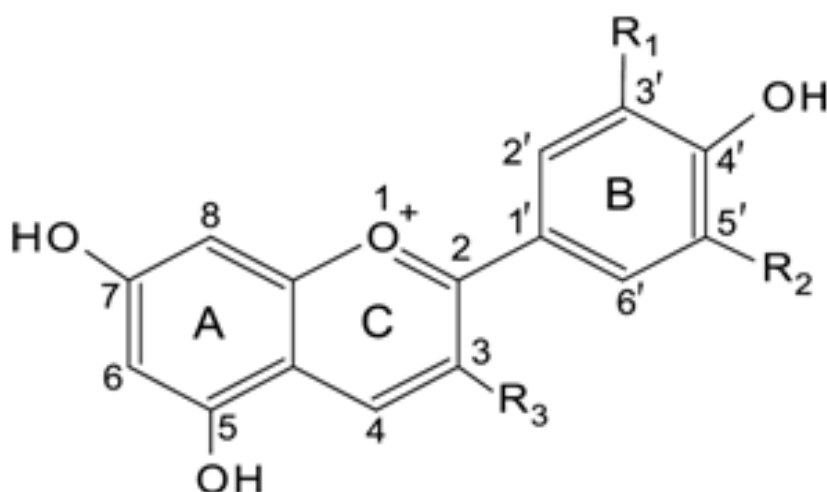
Fenolne snovi so zaradi pozitivnih učinkov na zdravje postale zanimive za nutricioniste šele v zadnjih letih. Zaradi močnih antioksidativnih lastnosti polifenolov se raziskovalci in

proizvajalci hrane bolj zanimajo za njih, njihovo prisotnost v prehrani in za njihove dokazane učinke pri preprečevanju različnih bolezni, povezanih z oksidativnim stresom (Dai in Mumper, 2010).

Na splošno velja, da so fenolne spojine podvržene metabolnim spremembam po zaužitju. V zgornjem delu prebavil polifenoli delujejo kot substrati za mnogo encimskih reakcij, ki vodijo do sprememb v absorpciji med njimi. Med prehodom v tanko črevo so predmet kemijskih sprememb hidrolize in oksidativnih encimov. Večina aglikonov, ki ubežijo reakcijam metabolizma v tankem črevesu, se prenesejo preko krvi do jeter, kjer so podvrženi razgradnji. Za preostale polifenole poskrbi intestinalna mikroflora, ki predstavlja velik katalitični potencial. Metaboliti se nato absorbirajo v sistemski obtok krvi iz debelega črevesa (Spencer in sod., 2008).

2.3.6 Antociani

Molekulska struktura flavonoidov temelji na petnajstih ogljikovih atomih. Ogljikovi atomi sestavljajo dva aromatska (fenilna) obroča (A in B obroč), ki se povezujeta z mostom treh ogljikovih atomov. Ta most običajno tvori še tretji, tako imenovani C obroč. Flavonoidi se med seboj razlikujejo po stopnji oksidacije C obroča in sicer se delijo v šest podskupin, to so flavoni, flavonoli, flavanoli, flavanoni, izoflavoni in antociani (Schwinn in Davies, 2004; Taiz in Zeiger, 2006). Pojem antocian vključuje antociane in antocianidine (Slika 4). Antocianidini so aglikoni antocianov, predstavljajo osnovno strukturo antociana brez vezanih sladkornih enot. So zelo nestabilne spojine, v vodi netopne, v naravi jih praktično ni (Macheix in sod., 1990; Taiz in Zeiger, 2006). Večina antocianov je izpeljanih iz treh osnovnih antocianidinskih tipov: pelargonidina, cianidina in delfinidina. Antociani se med seboj razlikujejo glede na število vezanih hidroksilnih skupin na B obroč (Schwinn in Davies, 2004). Do sedaj je bilo odkritih več kot 500 različnih oblik antocianov in 23 antocianidinov. V živilih najpogostejši antocianidini so pelargonidin, peonidin, cianidin, malvidin, petunidin in delfinidin, medtem ko je najbolj razširjen antocian cianidin-3-glukozid (Manach in sod., 2004; Szajdek in Borowska, 2008; Castañeda - Ovando in sod., 2009). Antociani so najbolj razširjena in najpogostejša skupina flavonoidnih barvil in so odgovorni za rdeče, vijolične in modre odtenke prisotne v številnih vrstah sadja, zelenjave, žit in cvetja (Schwinn in Davies, 2004; Taiz in Zeiger, 2006). Zaradi spremembe barve pri različnih vrednostih pH, so antociani pri pH 3,5 obarvani rdeče, z naraščanjem pH barva prehaja v modro (Lee in sod., 2002). Dnevni vnos antocianov v telo, ki ga dosežemo predvsem z vnosom rdečega sadja, nekatere zelenjave in rdečega vina, lahko znaša do 200 mg/dan (McDougall in sod., 2007).



Aglikon	R ₁	R ₂	R ₃
Delfinidin	OH	OH	OH
Cianidin	OH	H	OH
Petunidin	OCH ₃	OH	OH
Peonidin	OCH ₃	H	OH
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃	OH
Pelargonidin	H	H	OH

Slika 4: Kemična struktura glavnih antocianov (Hribar in Poklar Ulrih, 2014)

Figure 4: Chemical structures of main anthocyanidins (Hribar and Poklar Ulrih, 2014)

2.3.6.1 Antociani v hrani

Antociani so pomembna skupina vodotopnih pigmentov in imajo kot antioksidanti in protivnetna sredstva velik blagodejni učinek na zdravje ljudi. So ena večjih skupin fenolnih spojin zastopana v človeški prehrani. Njihove antioksidativne aktivnosti nakazujejo pomen pri ohranjanju zdravja in zmanjševanju tveganja za kronične bolezni (Ibrahim in sod., 2011).

Antociani se pojavljajo v skoraj vseh družinah rastlin in zato so tudi v mnogih užitnih rastlinah. V prehrani je jagodičje (robide, grozdje, borovnice itd.) glavni vir antocianov. Antociane vsebujejo tudi nekatere vrste zelenjave, kot so jajčevci in redkev. Drugi viri navajajo pomaranče, črni bezeg, oljke, rdečo čebulo, fige, sladki krompir, mango in škrlatno koruzo (Wrilstad, 2000; Delgado-Vargas in Paredes-López, 2003; Jackman in Smith, 1996).

2.3.6.2 Vloga antocianov

Glavne vloge antocianov v naravi so privabljanje žuželk za namen opraševanja, odganjanje določenih živalskih vrst in zaščita fotosistemskega sistema pred premočno svetlobo.

Posledica prisotnosti antocianov v rastlinah je obarvanost plodov in cvetov. Struktura antocianov, koncentracija in vrsta dodatnih pigmentov, koncentracija in vrsta kovinskih ionov, pH v vakuoli določajo obarvanost cvetov in plodov, hkrati pa je pomembno tudi, kje v rastlini se celice z antociani nahajajo ter oblika površinskih celic (Tanaka in sod., 2009).

Vloga antioksidantov v rastlinah je enaka kot pri ljudeh. Rastline sintetizirajo antociane za uravnavanje oksidativnega stresa, fiziološkega stresa ter stresa zaradi okoljskih vplivov. Tvorba PR v rastlinah je pogojena s fotosintezo. Takrat, ko rastlina nima možnosti prilagoditve na stres, se tvorijo PR v preveliki količini, kar povzroči oksidativni stres. Stres, se odrazi v bledenju pigmentov in lipidni peroksidaciji. Povečana količina PR lahko nastane tudi zaradi onesnaženja zraka in žveplovega dioksida, ultravijolične svetlobe B (290–320 nm) ter temperaturnega šoka. Rastlina lahko PR sintetizira tudi sama za obrambo pred mikroorganizmi ter v mehanizmu celične smrti (Langebartels in sod., 2002; Teramura in Sullivan, 1994).

2.3.6.3 Uporaba antocianov

Antociani se kot vodotopna močna barvila uporabljajo v hrani že zelo dolgo. Ekstrakti jagodičja se uporabljajo kot barvila v pijačah, pecivih in drugih živilih. Obstajajo pa nekatere pomanjkljivosti pri uporabi antocianov v hrani. Antociani so topni v vodi, kar omejuje uporabo in so odvisni od pH. Ko se spremeni pH, se spremeni tudi njihova barva. Barva antocianov je tudi občutljiva na temperaturo, kisik, UV-svetlobo in različne kofaktorje. Temperatura lahko povzroči razpad flavilijevega iona in s tem povzroči izgubo barve. Temperatura pospeši Maillardove reakcije, v katerih lahko sodelujejo sladkorni ostanki antocianov. Toplotna obdelava živil vključuje segrevanje od 50 °C do 150 °C, odvisno od pH proizvoda in zelenega roka uporabnosti. Glavni poudarek mnogih nedavnih študij je kemijska stabilnost antocianov zaradi njihove razširjene uporabe, njihovih koristnih učinkov na zdravje in njihovo uporabo kot alternativo umetnim barvilom v živilih. Stabilnost antocianov ni odvisna le od končne temperature med predelavo, vendar nanje vplivajo tudi pH, temperatura skladiščenja, kemična struktura in koncentracija prisotnih antocianov, svetlobe, kisika, prisotnost encimov, proteinov in kovinskih ionov. Svetloba ima lahko podoben učinek na stabilnost antocianov. Kisik lahko uniči antociane, tako kot tudi druge oksidante, kot so peroksidi in vitamin C. Mnoge druge sestavine v rastlinah in živilih lahko medsebojno vplivajo z antociani in bodisi uničijo, spremenijo ali naredijo barvo bolj intenzivno. Vsi ti dejavniki omejujejo uporabo antocianov v živilih. Vsaka izguba barve med skladiščenjem se lahko prepreči s shranjevanjem pri nizkih temperaturah v temnih posodah ali v embalaži brez kisika. V praksi je popolne barve živil zelo težko pridobiti in najbolj pogosto se uporabljajo surovi ekstrakti kot barvila za živila. Antociani, ki se uporabljajo kot barvila v živilih, niso toksični in ne presegajo ravni, ki jo dosežemo z zaužitjem jagodičja ali drugega sadja, ki vsebuje antociane (Wrilstad, 2000; Delgado-Vargas in Paredes-López, 2003; Jackman in Smith, 1996; Patrasa in sod., 2010).

Antociani pridobljeni iz rastlin, se kot barvila lahko dodajajo različnim živilom, lahko pa se uporabljajo tudi kot antioksidativni funkcionalni dodatek, kar je s pravilniki dovoljeno povsod po Evropi (Känhkönen in Heinonen, 2003).

2.3.6.4 Barve antocianov

Barva antocianidinov se razlikuje glede na število hidroksilnih skupin, vezanih na B obroč. Več kot je vezanih hidroksilnih skupin na B obroč, bolj se vidna barva celotne molekule premika od oranžne v vijolično (Slika 5). Glikozilacija antocianidinov povzroči bolj intenzivno rdečo barvo antocianov, medtem ko prisotnost alifatskih ali aromatskih acilnih skupin ne povzroča spremembe barve ali samo rahlo spremembo v bolj modro barvo in ima pomemben vpliv na njihovo stabilnost in topnost. Sprememba pH lahko povzroči tudi reverzibilne strukturne spremembe v molekuli antocianov in ima izrazit vpliv na njihovo barvo (Ananga in sod., 2013). Cianidin povezujemo z magenta barvo, pelargonidin z rožnatimi in oranžnimi toni, malvidin pa daje svetlo vijolične do škrlatne barve. Delfinidin je najpogostejši antocianidin v modrih cvetovih (Harborne in Williams, 2000).



Slika 5: Vidna barvna paleta skupnih antocianidinov (Ananga in sod., 2013)

Figure 5: Visible color range of common anthocyanidins (Ananga et al., 2013)

2.3.6.5 Zdravilni učinek antocianov

Antociani imajo vrsto bioloških aktivnosti, ki imajo lahko pozitivne učinke na zdravje; na primer inhibicija poškodb DNA pri rakavih celicah *in vitro*, inhibicija prebavnih encimov, indukcija proizvodnje insulina iz izoliranih pankreatičnih celic, zmanjšanje vnetnih odzivov, zaščita pred s staranjem povezanim zmanjšanim delovanjem možganov (McDougall in sod., 2007).

2.3.6.6 Biološka razpoložljivost antocianov

Da se doseže kakršenkoli biološki učinek v določenem tkivu ali organu, morajo biti antociani biološko razpoložljivi; tj., da se učinkovito absorbirajo iz GIT v krvni obtok in da so dostavljeni na ustrezno mesto v telesu. Biološka razpoložljivost antocianov je vprašljiva. Peroralna uporaba živil, ki so bogata z antociani, ekstraktov ali čistih antocianov se je izkazala, da ima koristne učinke na preprečevanje ali odpravljanje bolezenskih stanj *in vivo*. Študije peroralne uporabe antocianov so potrdile povečano antioksidativno stanje v serumu, vendar to običajno spremlja tudi zelo majhno stopnjo koriščenja antocianov v serumu (<1 % odmerka) in ustrezno nizko stopnjo izločanja z urinom v nepoškodovanih ali konjugiranih oblikah. Očitna nizka biološka razpoložljivost antocianov, vzbudi dvom o njihovi sposobnosti, da imajo pozitivne učinke na zdravje ljudi. Vendar pa je presoja prave biorazpoložljivosti, kateregakoli razreda fitokemikalij zahteva vse podatke v zvezi z njihovo absorpcijo, metabolizmom, porazdelitvijo v tkivih in organih ter izločanjem. Študije, ki se izvajajo na živalih ali ljudeh, so zapletene, drage in dolgotrajne (McDougall in sod., 2005).

Zelo malo je znanega o usodi bioaktivnih spojin (vitamina C in fenolnih spojin) soka granatnega jabolka v procesu prebave, ali se bioaktivne spojine sprostijo iz matriksa živil pod fiziološkimi pogoji, ki se pojavljajo *in vivo* in kakšen je učinek teh razmer na stabilnosti teh spojin (Pérez-Vicente in sod., 2002). Pérez-Vicente in sod. (2002) so v raziskavi ugotovili, da antociani, druge fenolne spojine in vitamin C v granatnem jabolku kažejo AOU, so po prebavi biološko razpoložljivi in lahko prispevajo k zaščiti pred različnimi boleznimi pri ljudeh. Vendar pa bo potrebno narediti dodatne raziskave za določitev biološke razpoložljivosti antocianov in drugih fenolnih spojin v soku granatnega jabolka in njihovega varovalnega učinka na zdravje ljudi, ker sprostitve spojine med prebavo ne pomeni nujno tudi antioksidativne aktivnosti *in vivo*.

2.3.6.7 Metabolizem antocianov

Dokazano je, da je manj kot 1 % zaužitih antocianov zaznanih v urinu ali plazmi. Woodward in sod. (2011) so ugotovili, da so bili antociani stabilni med prebavo v želodcu, vendar pa so bili razgrajeni med prebavo v črevesu. Razgradnja antocianov je bila podobna v prisotnosti kot tudi odsotnosti prebavnih encimov, kar je v skladu s predhodnimi ugotovitvami glede razgradnje antocianov pod simuliranimi fiziološkimi razmerami. To kaže na to, da je prišlo do razgradnje antocianov med prebavo spontano pod fiziološkimi pogoji (Woodward in sod., 2011).

Tako kot preostali polifenoli, se antociani vežejo na serumske proteine. Ta povezava jim lahko prepreči razgradnjo, kar omogoča, da ostanejo nepoškodovani. Dodajanje metilnih ali glikozilnih skupin močno vpliva na konstanto ravnotežja antocian - protein. V plazmi je

ravnotežje vzpostavljeno med prostimi antociani in tistimi, ki so vezani na proteine (Hribar in Poklar Ulrih, 2014).

Zanimivi so tudi rezultati raziskave McDougall in sod. (2005), ki so ugotavljali potencialno biološko razpoložljivost antocianov malin z uporabo *in vitro* prebavnega sistema. V raziskavi so simulacijo prebave v tankem črevesu izvedli z dializno cevko. Po končani simulaciji prebave v tankem črevesu so rezultate ovrednotili tako, da raztopina zunaj dializne cevke predstavlja snovi, ki ostanejo v gastrointestinalnem traktu (GIT) in da raztopina, ki je vstopila v dializno cevko predstavlja snovi, ki vstopijo v serum. Zapisali so, da so po simulaciji prebave *in vitro* v tankem črevesu v raztopini, ki je predstavljala serum, našli zelo majhno količino (<1 % odmerka) antocianov. *In vitro* postopka prebave niso primerjali s podatki *in vivo* o biološki razpoložljivosti polifenolov, vendar se tudi za ta model predvideva nizke serumske vrednosti biološko razpoložljivih antocianov, hkrati pa se predvideva, da večina polifenolov ostane v črevesu.

2.4 METODE ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDANTOV

2.4.1 Določanje skupnih fenolnih spojin

Vsebnost skupnih fenolnih spojin v vzorcih hrane in zdravilnih rastlinah določamo z Folin-Ciocalteujevim (F-C) reagentom (Singleton in Rossi, 1965). Reakcijo med fenolnimi spojinami in F-C reagentom izvajamo le v bazičnih pogojih. Ta spektrofotometrična metoda se zaradi relativne enostavnosti zelo pogosto uporablja. Pri tej metodi pride do disociacije fenolnega protona, pri čemer nastane fenolatni ion, ki vodi do redukcije F-C reagenta. Reducirane komponente F-C reagenta se obarvajo modro pri absorpcijskem maksimumu okoli 750 nm. Izmerjena absorbanca je premosorazmerna koncentraciji fenolnih spojin oziroma reduciranega F-C reagenta (Huang in sod., 2005; Abdel - Hameed, 2009). Posamezne fenolne snovi se na to metodo različno odzovejo. Signal je proporcionalen številu hidroksilnih skupin na aromatskem obroču. Če sta dve hidroksilni skupini v *orto*- ali *para*-položaju je redukcijska sposobnost boljša (Katalinić in sod., 2004). Koncentracijo skupnih fenolov v vzorcu, lahko izračunamo s pomočjo umeritvene krivulje, ki jo naredimo z določeno komercialno dostopno fenolno spojino (Huang in sod., 2005; Abdel - Hameed, 2009).

F-C metoda je bila sprva namenjena za določanje skupnih fenolnih spojin v vinu, sedaj pa se uporablja tudi za analize fenolnih spojin v sadju, zelenjavi, olju in čajih. F-C ni specifičen, zato lahko visoka vsebnost fruktoze, sulfitev in AA lahko ovira analizo (Scott, 2006). Ugotovili so, da poleg polifenolov s F-C reagentom reagirajo tudi drugi antioksidanti (Wechtersbach, 2005), kar je potrebno upoštevati, predvsem v vzorcih, ki vsebujejo mešanico različnih antioksidantov.

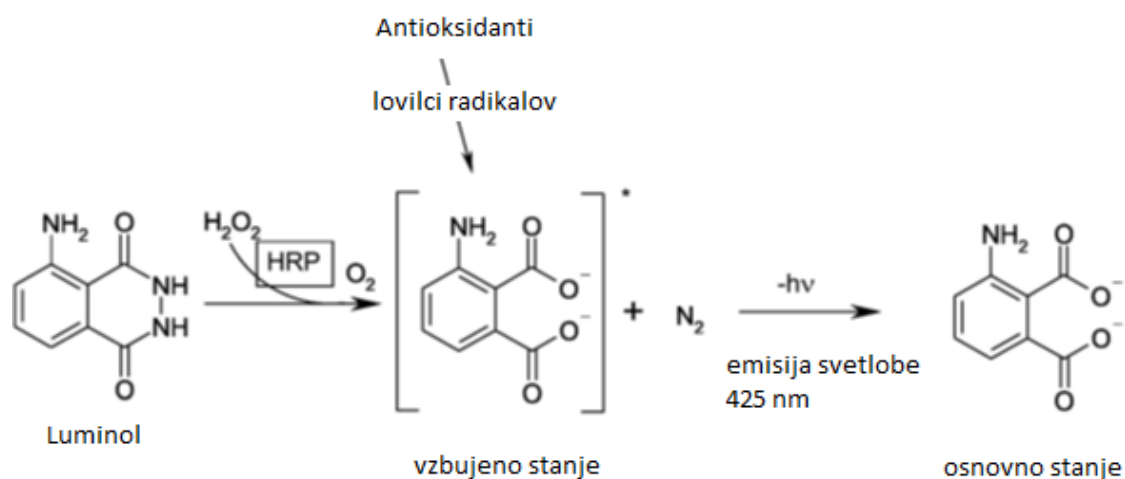
2.4.2 Določanje antioksidativne učinkovitosti z luminescenčno metodo

Prednosti luminescence so nizka meja detekcije, širok linearni dinamični razpon in hiter odziv. Luminol in lucigenin se pogosto uporabljata za določanje reaktivnih kisikovih zvrsti v različnih bioloških sistemih in se uporabljata posredno za ocenitev AOU. Luminescenčne reakcije zagotavljajo hitrejši pristop pri merjenju AOU v primerjavi s standardnimi metodami (Pogačnik in Poklar Ulrih, 2012).

Luminescenca je fizikalni pojav, pri katerem snov, ki ni močno segreti, seva elektromagnetno valovanje. Snov torej luminescira. Natančneje povedano, del prejete energije (preden se porazgubi po snovi v obliki toplote) se preoblikuje v obliki svetlobe, ki jo snov oddaja. To omogočajo t.i. luminescenčni oz. optični centri (aktivatorji), ki povzročajo dodatna, izrazito ločena energijska stanja (izolacijski nivoji), ki se vzbudijo z absorpcijo energije in se nato z emisijo svetlobe ponovno vrnejo v osnovna energijska stanja. Ti aktivatorji so lahko kemične snovi, električno polje, fotoni, točkasti defekti ali dislokacije v kristalih ali mehansko obdelovanje (Schulman in sod., 2001).

Luminescenca zaznavamo s pomočjo luminometra, ki zaznava emisijo celotnega spektra svetlobe. Lahko pa za ta namen uporabimo tudi fluorimeter, kjer zaznavamo emisijo pri točno določeni valovni dolžini. Le-to izberemo blizu emisijskega maksimuma emitirane svetlobe (Navas in Jimenez, 2007).

V literaturi je opisanih več luminescenčnih metod za določanje antioksidantov (Krasowska in sod., 2001; Navas in Jimenez, 2007; Di Mambro in sod., 2003; Georgetti in sod., 2003; Pogačnik in Poklar Ulrih, 2012). Luminescenca z luminolom temelji na oksidacijski reakciji luminola, ki je katalizirana s peroksidazo. Oksidacija luminola nastane v alkalnem okolju, z oksidanti, kot so H_2O_2 v prisotnosti peroksidaze kot proteinskega katalizatorja. Splošno znano je, da oksidacija luminola poteka s kompleksom med oksidantom in peroksidazo, tako nastanejo radikali luminola. Ti radikali reagirajo v nadaljnjih reakcijah, kar privede do endoperoksida, ki se nato razgradi v elektronsko vzbujeni dianona 3-aminoftalat, ki oddaja svetlobo, ko se vrača v prvotno stanje (Pogačnik in Poklar Ulrih, 2012). Ker je pojav posledica kemične reakcije, govorimo o luminescenci (Georgetti in sod., 2003). Reakcija je inhibirana, dokler so antioksidanti na voljo. Ko se le-ti porabijo, ponovno poteka oksidacija luminola, kar povrne intenziteto luminescence na prvotno vrednost. AOU je povezan s časom zakasnitve luminescence in na ta način lahko posredno ugotavljamo AOU vzorca (Pogačnik in Poklar Ulrih, 2012).



Slika 6: Reakcijski mehanizem luminescenčne metode (Pogačnik in Poklar Ulrih, 2012)

Figure 6: Reaction mechanism of the luminescence assay (Pogačnik and Poklar Ulrih, 2012)

2.4.3 Metoda za določanje skupnih antocianov

Antociani kot pigmenti so pomembni za kakovost hrane zaradi njihovega prispevka k barvi in videzu. Povečuje pa se tudi zanimanje za antociane v živilih in farmacevtskih dodatkih zaradi morebitnih ugodnih vplivov na zdravje. Antociani kot pigmenti lahko predstavljajo tudi uporaben kriterij pri nadzoru kakovosti in nabavnih specifikacij sadnih sokov, farmacevtskih dodatkov in naravnih barvil (Lee in sod., 2005).

pH diferencialno metodo v veliki meri uporabljajo živilski tehnologi in agronomi, da ocenijo kakovost svežega in predelanega sadja ter zelenjave. Metoda se lahko uporablja za določanje vsebnosti skupnih monomernih antocianov, temelji pa na strukturni spremembi kromoforja antociana med vrednostjo pH 1,0 in 4,5. Metoda se uporablja v raziskovalne namene in za kontrolo kakovosti sadnih sokov, vina, naravnih barvil in drugih pijač, ki vsebujejo antociane (Lee in sod., 2005).

Koncept določanja količine antocianov, prisotnih v vzorcih, z merjenjem spremembe absorbance pri dveh različnih vrednostih pH (3,4 in 2,0) sta prvič predstavila Sondheimer in Kertesza leta 1948. Od takrat naprej raziskovalci predlagajo uporabo pH vrednosti 1,0 in 4,5. Monomerni antociani so podvrženi reverzibilnemu strukturnemu preoblikovanju v odvisnosti od pH. Tako je razlika absorbance pigmenta pri valovni dolžini 520 nm proporcionalna koncentraciji pigmenta. Razgrajeni antociani v polimerni obliki ne spremenijo barve s spremembo vrednosti pH. Zato polimeriziranih antocianov ne merimo po tej metodi, saj absorbirajo tako pri pH 4,5 kot pri pH 1,0 (Lee in sod., 2005).

Absorbanco je potrebno meriti pri valovni dolžini z absorpcijskim maksimumom pigmenta, vsebnost pigmenta se izračuna z uporabo molekularne mase in molarnega ekstrakcijskega koeficienta glavnega antociana v matriksu. Vendar naravni matriksi običajno vsebujejo mešanico antocianov in deleži teh antocianov se razlikujejo. Analitiki predlagajo merjenje vseh raztopin pri valovni dolžini 520 nm, rezultate pa izrazimo kot ekvivalent cianidin-3-glukozida, ki je v naravi najpogostejši antocian (Lee in sod., 2005).

2.4.4 Določanje posameznih antocianov s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti

HPLC ali tekočinska kromatografija visoke ločljivosti je ena izmed najpogostejše uporabljenih kromatografskih tehnik (Martin- Hernandez in Juarez, 1993). Pri tovrstni kromatografiji komponente raztopimo v mobilni fazi in jih nato pod visokim tlakom, do 400 barov, potiskamo skozi kolono (stacionarna faza) s pomočjo mobilne faze. S HPLC ločujemo komponente na osnovi adsorpcije, porazdelitve, ionske izmenjave, velikosti in biološke afinitete (Kregar, 1996). Kromatografska separacija je posledica razlik v hitrosti potovanja posameznih komponent pod vplivom mobilne faze, zaradi selektivnega zadrževanja (retencije) komponent na stacionarni fazi. Pri metodi HPLC ločitev poteka tako, da vzorec skupaj s topilom nanese na začetek kromatografske kolone, topilo stalno potuje skozi kolono in topi komponente vzorca. Komponente zmesi se porazdelijo med topilom (mobilno fazo) in nosilcem (stacionarno fazo). Porazdelitev komponent se ponavlja vzdolž kolone in končno se komponente ločeno eluirajo iz kolone. Tam jih zaznamo z detektorji. Pri adsorpcijski in reverzni kromatografiji se stacionarna in mobilna faza ločita v polarnosti, pri ionski izmenjalni kromatografiji pa se ločita na osnovi njunega električnega naboja. Pri tem pride do različne porazdelitve določenih komponent med obe fazi, zaradi česar različne komponente vzorca različno dolgo potujejo skozi kolono. Retencijski čas je definiran kot čas, ko se komponenta zadržuje v koloni (Žorž, 1991). Ta je značilen za vsako spojino, torej ga lahko uporabimo za njeno identifikacijo. Komponente se ločeno eluirajo iz kolone, tam jih detektor kontinuirano zaznava po prehodu skozi kolono, signali pa so podani kot kromatografski vrhovi, ki jih zapisuje rekorder (Martin-Hernandez in Juarez, 1993). Rezultat kromatografskega eksperimenta je kromatogram, ki nam daje informacijo o: sestavi vzorca (število vrhov), kvalitativni sestavi vzorca (položaj vrhov), količini posamezne komponente v vzorcu (površina vrhov) in kvaliteti kolone (število teoretskih podov) (Prošek in Golc Wondra, 1997).

Za določanje posameznih antioksidantov, kot so polifenoli (antocianidini, flavonoli,...), tokoferoli, karotenoidi, vitamini se med drugim uporablja tudi HPLC tehnika. Reverzna fazna kromatografija z diodnim detektorjem se uporablja za določanje posameznih polifenolov pri različnih valovnih dolžinah, ki so specifične za določene polifenole. HPLC

splošno predstavlja najbolj razširjeno in zanesljivo tehniko za analizo fenolnih spojin (Tasioula- Margari in Okogeri, 2001).

Reverzno fazna HPLC v povezavi z detekcijo na niz fotodiod (DAD) je najbolj pogosto uporabljeno orodje za identifikacijo in kvantifikacijo antocianov (Lee in sod., 2008). DAD zazna absorpcijo v celotnem UV – VIS spektru. Medtem ko detektor UV-VIS meri pri samo eni valovni dolžini, ima DAD več nizov fotodiod za pridobivanje informacij v širokem razponu valovnih dolžin naenkrat. Spektri se merijo v intervalih 1 sekunde ali manj med separacijo s HPLC z neprekinjeno dobavo eluata. DAD se razlikujejo od UV-VIS detektorjev v tem, da svetloba iz žarnic sveti neposredno na pretočno celico, svetloba, ki prehaja skozi pretočno celico, razprši uklonska mrežica in količina razpršene svetlobe se oceni pri vsaki valovni dolžini v nizu fotodiod (Hitachi High-Tech: Diode array detector, 2014).

Posamezni antociani se ločijo po svoji polarnosti, kar povzroči, da se izločijo ob različnih časih. Antociane lahko kvantificiramo z zunanjim standardom (cianidin-3-glukozidom ali očiščenim standardom antociana). HPLC lahko povzroči prenizko oceno količine antociana, prisotnega v vzorcih, ki vsebujejo različne antocianidinske glukozide, pri uporabi samo enega standarda za kvantifikacijo. Običajno je cianidin-3-glukozid izbran kot zunanji standard. Vsota površine vrha pri določeni valovni dolžini (npr. 520 nm) se uporablja pri količinskem določanju antocianov s HPLC, ki je običajno blizu najvišji valovni dolžini ($\lambda_{\max}$) posameznih antocianov. Številne študije so pokazale, da se najvišja valovna dolžina premika ter je rahlo odvisna od antocianskih kromoforov (Lee in sod., 2008).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Sok granatnega jabolka

Za analize smo uporabljali sok granatnega jabolka turškega porekla, ročno stisnjenega iz velikega števila sadežev aprila 2014. Shranjevali smo ga v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.1.2 Reagenti

Pri delu smo uporabljali analitsko čiste reagente in kemikalije. Kemikalije, ki smo jih uporabljali pri posameznih eksperimentih, so navedene v opisu različnih eksperimentalnih metod.

3.2 METODE DELA

3.2.1 Vpeljava metode za simulacijo prebave soka granatnega jabolka *in vitro*

Ker se v literaturi pojavlja mnogo različnih metod za simulacijo prebave *in vitro*, smo morali metodo najprej vpeljati in optimizirati. S pomočjo literature in različnih poskusov smo ugotovili optimalne koncentracije pepsina, pankreatina in žolča ter optimalne pogoje analize, kot so: pH in količina vzorca.

Natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO_3), klorovodikovo kislino (HCl) in natrijev hidroksid (NaOH) smo do analize hranili v hladilniku. Encim pepsin in pankreatin ter žolč smo pripravljali vsak dan sproti. *In vitro* prebavni model smo vedno izvajali pri temperaturi 37 °C.

Reagenti:

- natrijev hidrogenkarbonat (Merck, Nemčija),
- klorovodikova kislina 37 % (Merck, Nemčija),
- natrijev hidroksid (Merck, Nemčija),
- pepsin (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- pankreatin (4×USP) (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- ekstrakt žolča (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- goveji hemoglobin (Merck, Nemčija),
- triklorocetna kislina (Merck, Nemčija).

Aparature:

- vodna kopel (Kambič, Slovenija),
- tehtnica (Exacta 2200 EB, Tehtnica, Železniki, Slovenija),
- pH meter (HI 221, Hanna Instruments, Italija),
- vodna vakuumaska črpalka.

3.2.1.1 Ugotavljanje vpliva trajanja posameznih stopenj prebave na raziskovane parametre

Pomemben dejavnik, ki vpliva na čas prebave, je vrsta raziskovanega vzorca (Hur in sod., 2011). Praznjenje želodca zahodnega tipa obroka v trdni obliki je običajno zaključeno med 3 in 4 urami. Homogenizacija trdnega obroka običajno vodi k zmanjšanju dolžine želodčne prebave za eno uro. Presnova tekočega obroka pa poteka s hitrim nastopom praznjenja. Praznjenje 300 mL vode zahteva eno uro, medtem, ko so druge študije pokazale, da tekočine z nizko koncentracijo proteinov potrebujejo tudi krajši čas prehoda (0,5 h) skozi želodec (Minekus in sod., 2014).

V literaturi je najpogostejši čas trajanja simulacije prebave v želodcu eno do dve uri in čas trajanja simulacije prebave v tankem črevesu dve do štiri ure (Green in sod., 2007; Pérez-Vicente in sod., 2002). Za lažje določanje časa trajanja posameznih stopenj prebave smo izvedli simulacijo prebave v želodcu, ki je trajala dve uri in pri tem vsakih 15 minut spremljali skupno vrednost antocianov. Enako smo naredili tudi s simulacijo v tankem črevesu, kjer smo proces spremljali štiri ure.

3.2.1.2 Določanje delovnega pH za obe stopnji prebave

Prva faza prebave (želodec)

Med poskusi v *in vitro* prebavnih modelih pri simulaciji prebave v želodcu smo uporabljali pH 2,0. Tako vrednost pH navaja tudi večina virov (Garrett in sod., 1999; Ryan in sod., 2008; Green in sod., 2007; Pérez-Vicente in sod., 2002). 1 M HCl smo pripravili tako, da smo odpipetirali 8,3 mL HCl v merilno bučko in z vodo dopolnili do 100 mL. S tako pripravljenim HCl smo vzorec vedno nakisali, da je bil pH vzorca približno 2,2. Na osnovi predposkusov smo ugotovili, kakšen volumen HCl moramo dodati vzorcu, da dobimo želeno pH vrednost. Vzorec smo nakisali na vrednost pH 2,2, saj se pH vrednost zniža na vrednost 2,0, ko v vzorec dodamo še raztopino pepsina.

Druga faza prebave (tanko črevo)

V večini dostopne literature (Garrett in sod., 1999; Ryan in sod., 2008; Green in sod., 2007; Pérez-Vicente in sod., 2002) je opisan postopek, ki smo ga pri svojem delu povzeli tudi sami. Po končani simulaciji prebave v želodcu smo dvignili pH na 5,3 s 4 M NaOH. 4 M NaOH smo pripravili tako, da smo v čašo odtehtali 16,0 g NaOH, ga raztopili v vodi in

dopolnili do 100 mL. Tudi v tem primeru smo s pomočjo predposkusov ugotovili, koliko NaOH moramo dodati mešanici po končani prvi fazi prebave, da dobimo ustrezno pH vrednost (5,3). Nato smo dodali ustrezno količino pankreatina in žolčnega ekstrakta ter dvignili pH na 7,5 z 1 M NaOH in 0,9 M NaHCO₃ (0,9 M NaHCO₃ smo pripravili iz 7,56 g NaHCO₃ in z vodo dopolnili do oznake 100 mL).

3.2.1.3 Določanje delovne encimske aktivnosti

Prva faza prebave (želodec)

Ugotavljali smo, kako aktivnost pepsina vpliva na stabilnost antocianov med *in vitro* prebavo v želodcu. Na voljo smo imeli dva pepsina, in sicer pepsin A, ki je bil odprt in v uporabi že nekaj let, in pepsin B, ki je bil popolnoma nov. Najprej smo želeli ugotoviti, kakšna je dejanska aktivnost obeh encimov, kako to vpliva na stabilnost antocianov in šele nato smo se odločili za ustrezno delovno encimsko aktivnost za naš eksperiment. Aktivnost encima smo določili z metodo za določanje encimske aktivnosti pepsina po Sigma-Aldrich. Ta metoda se uporablja za določanje aktivnosti pepsina z uporabo hemoglobina kot substrata. Za pripravo reagentov smo uporabili vodo miliQ. Pripravili smo 10 mM HCl in osnovno raztopino hemoglobina 2,5 % (w/v). Osnovno raztopino hemoglobina smo pripravili tako, da smo v elermajerico odtehtali 2,5 g hemoglobina in dopolnili z miliQ vodo do oznake 100 mL in vse skupaj dali v vodno kopel pri 37 °C za najmanj 10 minut. Nato smo osnovno raztopino hemoglobina filtrirali s pomočjo vodne vakuumske črpalke skozi filter 90 µm. Substrat smo pripravili tako, da smo 80 mL osnovne raztopine hemoglobina prenesli v ustrezno elermajerico in s pomočjo 5 M HCl znižali pH na 2,0 ter dopolnili z miliQ vodo do oznake 100 mL. 5 % (w/v) raztopino trikloroacetne kisline (TCA) smo pripravili tako, da smo v čašo odtehtali 5 g TCA in z miliQ vodo dopolnili do oznake 100 mL. Pripravili smo osnovno raztopino pepsina 1 mg/mL, in sicer tako, da smo odtehtali 1 mg pepsina in ga razredčili z 1 mL mrzlim (2- 8 °C) 10 mM HCl. Ker so bile prisotne netopne snovi, smo pustili osnovno raztopino počivati na ledu 1 uro, oziroma dokler se pepsin ni raztopil. Iz tako pripravljene raztopine smo v centrifugirke odpipetirali po 80 µL, 100 µL in 150 µL in jih z ohlajeno (2- 8 °C) 10 mM HCl dopolnili do 1 mL, da smo dobili raztopine encima s koncentracijo 0,08 mg/mL, 0,1 mg/mL in 0,15 mg/mL.

Postopek:

1. Substrat smo odpipetirali v primerne steklene centrifugirke, kot kaže preglednica 2.

Preglednica 2: Volumen substrata v slepem vzorcu in testu

Table 2: Volume of the substrate in the blank and test sample

Reagent	Slepi vzorec (mL)	Test (mL)
Substrat	5,00	5,00

2. Steklene centrifugirke smo dali v vodno kopel in jih inkubirali 10 minut pri 37 °C, nato smo dodali raztopine encima, kot kaže preglednica 3.

Preglednica 3: Volumni raztopine encima v slepem vzorcu in testu

Table 3: Volume of the enzyme solution in the blank and test sample

Reagent	Slepi vzorec (mL)	Test (mL)
Raztopina encima	/	1,00

3. Ob stalnem stresanju smo pri 37 °C inkubirali natanko 10 minut, nato smo dodali raztopino TCA in raztopino encima, kot kaže preglednica 4.

Preglednica 4: Volumni raztopine TCA in raztopine encima v slepem vzorcu in testu

Table 4: Volumes of the TCA solution and enzyme solution the blank and test sample

Reagent	Slepi vzorec (mL)	Test (mL)
Raztopina TCA	10,0	10,0
Raztopina encima	1,00	/

4. Ob stalnem stresanju smo inkubirali pri 37 °C nadaljnjih 5 minut.
5. Slepi vzorec in test smo nato filtrirali skozi 0,45 µm filter za brizgo. Merili smo absorbanco vsake filtrirane raztopine pri valovni dolžini 280 nm v primerjavi z zrakom (slepi vzorec). Vse meritve smo izvedli v dveh paralelkah.

Aktivnost pepsina smo izračunali po enačbi:

$$U/g\ encima = \frac{(A_{280\ test} - A_{280\ slepi\ vzorec})(df)}{(10)(1,0)(0,001) \times m} \dots(1)$$

df = redčitveni faktor

10 = inkubacijski čas v minutah

1,0 = volumen dodane raztopine encima

0,001 = ΔA_{280} na enoto pepsina na definicijo enote

m = masa pepsina v 1 mL raztopine encima

Pri našem delu smo ugotavljali, kako aktivnost pepsina vpliva na stabilnost antocianov med simulacijo prebave *in vitro* v želodcu. Zato smo pripravili tri različne raztopine encima, raztopino A1 smo pripravili tako, da smo odtehtali 20 mg pepsina A, za pripravo raztopine A2 smo odtehtali 50 mg pepsina A, za pripravo raztopine B pa smo zatehtali 20 mg pepsina B. Vse smo raztopili v 1 mL 0,1 M HCl. Za pripravo 0,1 M HCl smo v bučko odpipetirali 830 μ L HCl in dopolnili z vodo do oznake 100 mL.

Druga faza prebave (tanko črevo)

Ugotavljali smo, kako koncentracija pankreatina vpliva na stabilnost antocianov med prebavo *in vitro* v tankem črevesu. V literaturi je največkrat navedena koncentracija pankreatina 2 mg/mL (v 100 mM NaHCO₃) in žolčnega ekstrakta 12 mg/mL (v 100 mM NaHCO₃) (Garrett in sod., 1999; Green in sod., 2007; Alexandropoulou in sod., 2006). Da smo dobili raztopine z ustreznimi koncentracijami, smo odtehtali 2,5 mg pankreatina in 15 mg žolčnega ekstrakta ter ju raztopili v 2 mL 100 mM NaHCO₃, ki smo ga pripravili tako, da smo v čašo odtehtali 840 mg NaHCO₃ in z vodo dopolnili do oznake 100 mL.

3.2.2 Postopek simulacije prebave *in vitro*

Reagenti:

- natrijev hidrogenkarbonat (Merck, Nemčija),
- klorovodikova kislina 37 % (Merck, Nemčija),
- natrijev hidroksid (Merck, Nemčija),
- pepsin (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- pankreatin (4×USP) (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- ekstrakt žolča (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- goveji hemoglobin (Merck, Nemčija),
- triklorocetna kislina (Merck, Nemčija).

Aparature:

- vodna kopel (Kambič, Slovenija),
- tehtnica (Exacta 2200 EB, Tehtnica, Železniki, Slovenija),
- pH meter (HI 221, Hanna Instruments, Italija).

Kot vzorec smo uporabili sveže odmrznjen sok granatnega jabolka (5 mL), ki smo ga nakisali na pH 2,0 s 310 μ L 1 M HCl in mu dodali 1 mL raztopine pepsina z aktivnostjo 8400 U. Preden smo tako pripravljen encim dodali v vzorec, smo ga za 5 minut postavili v vodno kopel na 37 °C. Takoj po dodatku encima v sok granatnega jabolka smo za analize odvzeli prvi vzorec (1 mL). Tako pripravljeno mešanico smo ob stalnem stresanju (140 rpm) inkubirali 1 h pri 37 °C in na ta način simulirali prvo fazo prebave v želodcu. Po končani inkubaciji smo dvignili pH na 5,3 z 230 μ L 1 M NaOH in odvzeli 1 mL vzorca za nadaljnje analize. Nato smo dodali 2 mL raztopine pankreatina in žolčnih soli (odtehtali smo 2,5 mg pankreatina in 15 mg žolčnega ekstrakta ter ju raztopili v 2 mL 100 mM NaHCO₃), ponovno odvzeli 1 mL vzorca ter dvignili pH na 7,5 z dodatkom 50 μ L 1 M NaOH in 435 μ L 0,9 M NaHCO₃. Raztopino smo ob stalnem stresanju inkubirali 2 h pri 37 °C in na ta način simulirali drugo (inkubacija 1 uro) in tretjo fazo (inkubacija 2 uri) prebave v tankem črevesu. Med postopkom simulacije prebave *in vitro* smo mešanico v določenih časovnih presledkih vzorčili (vsako uro ali na 15 minut) ter analizirali z metodo za določanje skupnih fenolnih spojin, luminescenčno metodo za določanje AOU, metodo za določanje skupnih antocianov in metodo s HPLC/DAD za določanje posameznih antocianov. Simulacijo prebave in vse analize smo opravili v treh neodvisnih ponovitvah. Vse koncentracije smo preračunali na osnovni vzorec soka granatnega jabolka (5 mL).

Hkrati smo pripravili tudi slepi vzorec tako, da smo namesto soka granatnega jabolka uporabili destilirano vodo in izpeljali postopek simulacije prebave *in vitro* enako, kot je opisano zgoraj s sokom granatnega jabolka.

3.2.3 Določanje skupnih fenolnih spojin

Določitev skupnih fenolnih spojin po metodi Singleton in Rossi (Prior in sod., 2005) je relativno enostavna, saj vzorec ne zahteva posebne priprave. V alkalni raztopini se fenolne spojine oksidirajo s Folin-Ciocalteu (F-C) (fosfomolibdenska-fosfovolframova kislina) reagentom v modro obarvane spojine z absorpcijskim maksimumom pri 746 nm.

Reagenti:

- Folin-Ciocalteu reagent (Fluka, Nemčija),
- 20 % raztopina Na₂CO₃ (Merck, Nemčija),
- klorogenska kislina (Sigma-Aldrich, Nemčija).

Aparature:

- centrifuga (Tehtnica, Železniki, Slovenija),
- spektrofotometer (Hewlett- Packard, model HP-8453, ZDA),
- tehtnica- model Exacta 2200 EB (Tehtnica, Železniki, Slovenija).

3.2.3.1 Umeritvena krivulja za klorogensko kislino

Za pripravo 0,1 M fosfatnega pufru (pH = 7,4) smo v čašo zatehtali 3,55 g Na_2HPO_4 ter raztopili v destilirani vodi do skupnega volumna 1 L. pH smo naravnali z dodatkom očetne kisline ali natrijevega hidroksida in s pomočjo pH-metra.

Pripravili smo standardno raztopino s koncentracijo 0,099 mM, in sicer tako, da smo 3,6 mg klorogenske kisline raztopili v 100 mL fosfatnega pufru (pH 7,4). V centrifugirke smo nato odpipetirali od 25 do 425 μL standardne raztopine. Vsem standardnim raztopinam smo nato dodali pufer do končnega volumna 725 μL , dobro premešali in dodali 125 μL F-C reagenta, predhodno razredčenega z vodo v volumskem razmerju 1:2 ter točno po petih minutah dodali še 125 μL 20 % raztopine Na_2CO_3 . Raztopine smo premešali in po eni uri inkubacije na sobni temperaturi smo vsebino centrifugirk prenesli v 2,5 mL PS kivete in izmerili absorbanco raztopin proti slepemu vzorcu pri valovni dolžini 746 nm. Slepi vzorec smo pripravili tako, da smo namesto standarde raztopine odpipetirali 725 μL fosfatnega pufru in jo pripravili tako kot ostale vzorce. Vse meritve za umeritvene krivulje smo izvedli v dveh paralelkah.

3.2.3.2 Analiza vzorcev

Simulacijo prebave soka granatnega jabolka *in vitro* smo razdelili na tri stopnje. Prva stopnja je potekala z encimom pepsinom eno uro, druga stopnja z encimom pankreatinom eno uro in tretja stopnja z encimom pankreatinom dve uri. Z dodatkom reagenta F-C smo spektrofotometrično določili vsebnost skupnih fenolnih spojin v soku granatnega jabolka med prebavo *in vitro* na različnih stopnjah prebave in z različnimi aktivnostmi pepsina. Na osnovi predposkusov smo ugotovili, kakšno količino vzorca moramo odpipetirati, da signali padejo v območje umeritvene krivulje. Po prvi stopnji prebave smo tako v centrifugirke odpipetirali po 5 μL vzorca, po drugi in tretji stopnji pa po 8 μL vzorca. Vse vzorce smo dopolnili do končnega volumna 725 μL s fosfatnim pufrom in dodali 125 μL razredčenega (1:2) F-C reagenta ter dobro premešali. Po petih minutah smo dodali 125 μL 20 % raztopine Na_2CO_3 ter še enkrat premešali. Po eni uri inkubacije na sobni temperaturi smo reakcijski zmesi izmerili absorbanco pri valovni dolžini 746 nm. S pomočjo enačbe premice umeritvene krivulje s klorogensko kislino smo izračunali koncentracijo skupnih fenolnih spojin v vzorcih in jo izrazili kot ekvivalent klorogenske kisline (mmol/L). Vse vzorce smo analizirali v dveh paralelkah.

3.2.4 Določanje antioksidativne učinkovitosti z luminescenčno metodo

V okviru našega dela smo uporabili metodo z luminol- H_2O_2 -peroksidazo.

S fluorimetrom smo merili emisijo svetlobe pri 420 nm. Koncentracije standardov in vzorcev smo pripravili tako, da časi analiz niso bili krajši od 5 minut in ne daljši od 20 minut.

Reagenti:

- Na_2HPO_4 (Merck, Nemčija),
- luminol (Fluka, Nemčija),
- dimetilsulfoksid (DMSO) (Merck, Nemčija),
- vodikov peroksid (H_2O_2) (Merck, Nemčija),
- hrenova peroksidaza (HRP) (250-300 U/mg) (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- troloks (Sigma-Aldrich, Nemčija).

Aparature:

- fluorimeter (Cary Eclipse, Varian, Avstrija),
- tehtnica- model Exacta 2200 EB (Tehtnica, Železniki, Slovenija),
- ultrazvočna kopel (Bandelin, Nemčija),
- pH-meter (MA 5705, Iskra, Slovenija).

3.2.4.1 Priprava reagentov

Pripravili smo 0,1 M fosfatni pufer (pH = 7,4), kot je opisano v poglavju 3.2.3.1. Osnovno raztopino luminola smo pripravili tako, da smo v 1,5 mL DMSO raztopili 50 mg luminola, dobro premešali, zaščitili s folijo in shranjevali v hladilniku. Iz osnovne raztopine smo vsak dan sproti pripravljali delovno raztopino. Odpipetirali smo 500 μL osnovne raztopine, dopolnili s fosfatnim pufrom do skupnega volumna 50 mL ter zaščitili s folijo in postavili v ultrazvočno kopel za približno 3 minute, da je raztopina postala homogena. Koncentracija tako pripravljene standardne raztopine je bila 1,88 mM. Pripravili smo encim HRP v fosfatnem pufru z aktivnostjo v povprečju 30 U/mL, in sicer tako, da smo zatehtali 0,2 mg HRP (250-300 U/mg) in dodali 1,8 mL fosfatnega pufra. 80 μL H_2O_2 smo razredčili s fosfatnim pufrom do skupnega volumna 10 mL, koncentracija raztopine je bila 80 mM.

3.2.4.2 Umeritvena krivulja za troloks

Pripravili smo standardno raztopino trolokso. Koncentracija standardne raztopine trolokso je bila 5 mM. Pripravili smo jo tako, da smo zatehtali 2,5 mg trolokso, ga raztopili v 1 mL fosfatnega pufra in tako dobili 10 mM standardno raztopino. 5 mM raztopino smo pripravili tako, da smo odpipetirali 250 μL 10 mM trolokso in dodali 250 μL fosfatnega pufra. Za vse razredčitve smo uporabljali 0,1 M fosfatni pufer (pH = 7,4).

Reakcijsko mešanico smo pripravili tako, da smo odpipetirali 22,5 mL 1,88 mM raztopine luminola in dodali 2,5 mL 80 mM H₂O₂ ter dobro premešali. 2 mL reakcijske mešanice smo odpipetirali v kiveto, dodali 70 µL pufru in 5 µL encima HRP (30 U/mL) ter takoj pričeli z analizo. Koncentracija encima je bila takšna, da je bil začetni signal luminescence vedno približno 800 a.u. Po dveh minutah smo dodali standardne raztopine troloksa (2,5, 5, 7,5, 10, 12,5 µL). Ob dodatku standardnih raztopin je bil signal inhibiran in se je po določenem času vrnil v prvotno stanje. Merili smo čas od dodatka standarda do prvotnega stanja signala. Vse meritve za umeritvene krivulje smo izvedli v dveh paralelkah. Za vsako analizo smo pripravili svežo mešanico reagentov. Izračunane koncentracije standardov se nanašajo na končno koncentracijo v kivetu.

3.2.4.3 Analiza vzorcev

Koncentracijo encima smo prilagodili, da je bil začetni signal luminescence vedno približno 800 a.u. S pomočjo predposkusov smo ugotovili, koliko vzorca moramo odpipetirati, da signali padejo v območje umeritvene krivulje. Pri analizi smo v reakcijsko mešanico dodali po 3 µL vzorca. Postopek priprave raztopin in analize vzorcev je potekal enako kot pri umeritveni krivulji, le da smo namesto standarda v kiveto odpipetirali vzorce. S pomočjo enačbe premice umeritvene krivulje s troloksom smo določili AOOU v vzorcih in jo izrazili kot ekvivalent troloksa (mmol/L). Za vsak vzorec smo naredili po dve paralelki.

3.2.5 Določanje skupnih antocianov

Reagenti:

- KCl (Merck, Nemčija),
- CH₃COONa (Sigma-Aldrich, Nemčija).

Aparature:

- centrifuga (Tehtnica, Železniki, Slovenija),
- spektrofotometer (Hewlett- Packard, model HP-8453, ZDA),
- pH meter HI 221 (Hanna Instruments, Italija),
- centrifuga (Tehtnica, Železniki, Slovenija).

Pufer pH 1

Zatehtali smo 0,466 g KCl in ga raztopili v destilirani vodi in dopolnili do 250 mL. Koncentracija tako pripravljene raztopine je bila 0,025 M. pH smo naravnali z dodatkom HCl in s pomočjo pH metra.

Pufer pH 4,5

V 250 mL destilirane vode smo raztopili 8,2 g CH₃COONa, koncentracija raztopine je bila 0,40 M. pH smo naravnali z dodatkom HCl in s pomočjo pH metra.

3.2.5.1 Analiza vzorcev

V centrifugirke smo odpipetirali 0,1 mL vzorca po prvi stopnji prebave in 0,17 mL vzorca po drugi in tretji stopnji prebave ter dopolnili do skupnega volumna 1 mL enkrat s pufrom pH 1 in drugič s pufrom pH 4,5. Raztopine smo dobro premešali. Preden smo raztopinam pomerili absorbanco, smo jih centrifugirali 5 min pri 14000 rpm. Po 20 do 50 minutah smo izmerili absorbanco obarvanih raztopin pri različnih pH pri valovni dolžini 520 nm in 700 nm. Slepí vzorec smo pripravili tako, da smo namesto vzorca odpipetirali destilirano vodo. Vzorce smo analizirali v dveh paralelkah.

Skupne antociane smo izračunali po naslednji enačbi:

$$\text{Antocianinski pigment (cianidin-3-glikozid, ekvivalenti, mg/L)} = \frac{A \times MW \times DF \times 10^3}{\epsilon \times l} \quad \dots(2)$$

$A = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})$ pH 1.0 – $(A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})$ pH 4,5,

MW (molekulska masa cianidin-3-glukozid) = 449,2 g/mol,

DF = redčitveni faktor,

l = dolžina poti v cm (kiveta za enkratno uporabo; 1 cm dolžina poti),

ϵ = 26 900 molarni absorpcijski koeficient v L $\times$ mol⁻¹ $\times$ cm⁻¹ za cianidin-3-glukozid,

10³ = faktor za preračun iz g v mg.

3.2.6 Določanje posameznih antocianov z metodo HPLC

S sistemom HPLC v povezavi z detekcijo na niz fotodiod (DAD) smo v vzorcih soka granatnega jabolka določali vsebnost posameznih antocianov, saj je ta metoda hitra, enostavna in natančna. Čas, ki je potreben, da spojina pripotuje skozi kolono in jo zapusti, imenujemo retencijski čas. DAD zazna absorpcijo v celotnem UV–VIS spektru. Posamezni antociani se ločijo po svoji polarnosti, kar povzroči, da se izločijo ob različnih časih. Antociane lahko kvantificiramo z zunanjim standardom. Vsota površine vrha pri določeni valovni dolžini (npr. 520 nm) se uporablja pri količinskem določanju antocianov s HPLC, ki je običajno blizu najvišji valovni dolžini (λ_{max}) posameznih antocianov (Lee in sod., 2008).

Reagenti:

- HCOOH (Merck, Nemčija),
- metanol (Sigma-Aldrich, Nemčija),

- acetonitril (Riedel-de-Haën, Nemčija),
- cianidin-3-glukozid (Extrasynthese, Francija),
- cianidin-3,5-diglukozid (Extrasynthese, Francija),
- delfinidin-3-glukozid (Extrasynthese, Francija),
- delfinidin-3,5-diglukozid (Extrasynthese, Francija),
- pelargonidin-3,5-diglukozid (Extrasynthese, Francija).

Aparature:

- HPLC sistem (Agilent 1260, ZDA),
- centrifuga (Tehtnica, Železniki, Slovenija).

Kromatografski pogoji:

- predkolona: XDB-C18 4,6 mm × 12,5 mm, 5 µm, Agilent,
- kolona: Zorbax Eclipse Plus C18 4,6 mm × 150 mm, 3,5 µm, Agilent,
- volumen injiciranega vzorca: 40 µL,
- detektor: DAD,
- mobilna faza A: 3 % (v/v) HCOOH,
- mobilna faza B: acetonitril:metanol (85:15) (v/v),
- pretok mobilne faze: 0,8 mL/min,
- valovna dolžina detekcije: 520 nm,
- temperatura kolone: 4 °C,
- temperatura vzorca: 4 °C,
- čas analize: 55 min.

Gradient:

- 0-13 min, 5-8% B,
- 13-25 min, 8-9% B,
- 25-45 min, 9-13% B,
- 45-46 min, 13-100% B,
- 46-48 min, 100% B,
- 48-49 min, 100-5% B,
- 49-55 min, 5% B.

3.2.6.1 Umeritvene krivulje za standardne raztopine antocianov

Uporabili smo koncentrirane standardne raztopine (stock) cianidin-3-glukozida (C3G), cianidin-3,5-diglukozida (C3,5G), delfinidin-3-glukozida (D3G), delfinidin-3,5-diglukozida (D3,5G), pelargonidin-3,5-diglukozida (P3,5G) in pelargonidin-3-glukozida

(P3G) s koncentracijo 5 mg/L v metanolu. Iz teh, že pripravljenih koncentriranih standardnih raztopin (stock), smo pripravili standardne raztopine s koncentracijo 100 mg/L, razredčene z mobilno fazo, razen C3G, ki smo ga pripravili s koncentracijo 200 mg/L. Iz tako pripravljenih standardnih raztopin smo v steklene vialje odpipetirali od 15 µL do 300 µL standardne raztopine in jih dopolnili z mobilno fazo do končnega volumna 300 µL ter dobro premešali. Končne koncentracije standardov v steklenih vialah so bile od 5 mg/L do 100 mg/L (Preglednica 5). Vialje smo dali v avtomatski vzorčevalnik in pričeli z analizo. Eluirane komponente smo spektrofotometrično detektirali z UV-VIS detektorjem pri 520 nm. Vse meritve za umeritveno krivuljo smo izvedli v dveh paralelkah.

Preglednica 5: Priprava standardnih raztopin antocianov

Table 5: Preparation of standard solutions of anthocyanins

Koncentracija standardnih raztopin v viali (mg/L)	Volumen začetne standardne raztopine (µL)	Volumen mobilne faze (µL)	Skupni volumen (µL)
0,5	1,5	298,5	300
0,6	1,8	298,2	300
1,0	3,0	297,0	300
1,2	3,6	296,4	300
4,8	14,4	285,6	300
5,0	15,0	285,0	300
10,0	30,0	270,0	300
15,0	45,0	255,0	300
20,0	60,0	240,0	300
25,2	75,6	224,4	300
40,0	120,0	180,0	300
50,0	150,0	150,0	300
65,0	195,0	105,0	300
100,0	300,0	0	300

3.2.6.2 Analiza vzorcev

Analizirali smo vzorec soka granatnega jabolka ter vzorce po prvi, drugi in tretji stopnji prebave. V vialje smo odpipetirali po 300 µL vzorca, ki smo ga predhodno centrifugirali 10 minut pri 14000 rpm. Tako pripravljene vzorce smo takoj analizirali na sistemu HPLC. Identifikacija posameznih antocianov je potekala s primerjavo retencijskih časov standardnih raztopin. Koncentracijo posameznih antocianov smo določili po metodi standardnega dodatka, s katero smo skušali zmanjšati napake in se prepričati, da je vrh, ki smo ga dobili, res proučevani antocian. Da lahko izračunamo koncentracijo posameznih antocianov v vzorcih, ki smo jih analizirali z metodo standardnega dodatka, najprej posnamemo kromatogram samega vzorca in izmerimo odziv vrhov posameznih antocianov v kromatogramu. Nato dodamo v isti vzorec še določeno količino posameznih antocianov in zopet posnamemo kromatogram. Odziv vrha preiskovane substance je sedaj večji zaradi

dotatka standardov antocianov. V posamezni viali smo pripravili mešanico standardnih raztopin C3G, C3,5G, D3G, D3,5G, P3,5G in P3G v mobilni fazi ali soku granatnega jabolka. V prvo vialo smo standardne raztopine v mobilni fazi pripravili tako, da smo odpipetirali take volumne posameznih standardov, kot je prikazano v preglednici 5, in dopolnili z mobilno fazo do končnega volumna 300 μ L (razen v primeru P3G, ko je bil skupni volumen 200 μ L). V drugo vialo pa smo standardne raztopine v soku granatnega jabolka pripravili tako, da smo odpipetirali 150 μ L soka granatnega jabolka, dodali take volumne posameznih standardov, kot je prikazano v preglednici 6, in dopolnili z mobilno fazo do končnega volumna 300 μ L (razen v primeru P3G, ko je bil skupni volumen 200 μ L). Dodane količine posameznega standarda smo prilagodili tako, da je bil posamezen signal ob dodatku standarda približno enak kot signal ob analizi čistega soka granatnega jabolka. Pri tem smo si pomagali z umeritvenimi krivuljami, pripravljenimi v mobilni fazi.

Koncentracijo posameznega antociana izračunamo:

$$P_{SD} = P_{sok+SD} - (P_{sok}/2) \quad \dots(3)$$

$$k = P_{SD}/C_{stand} \quad \dots(4)$$

$$C_{v\ soku} = P_{sok}/k \quad \dots(5)$$

- P_{SD} je površina vrha v kromatogramu zaradi standardnega dodatka antociana v vzorec
- P_{sok+SD} je površina vrha v kromatogramu vzorca s standardnim dodatkom antocianov
- P_{sok} je površina vrha v kromatogramu določenega antociana pri analizi vzorca brez standardnega dodatka
- k je naklon umeritvene krivulje
- C_{stand} je koncentracija standardnega dodatka posameznega antociana v viali
- $C_{v\ soku}$ je koncentracija posameznega antociana v soku granatnega jabolka

Z metodo standardnega dodatka smo dobili potrditev, da je vrh, ki smo ga dobili, iskani antocian. S pomočjo metode standardnega dodatka smo izračunali koncentracijo posameznih antocianov, saj smo na ta način upoštevali vpliv matriksa na signale posameznih antocianov. Najprej smo z analizo HPLC analizirali vzorec soka granatnega jabolka, nato smo v isti vzorec dodali še določeno koncentracijo posameznih antocianov (D3G, D3,5G, C3G, C3,5G, P3,5G, P3G), da je bila koncentracija antocianov taka, kot je navedeno v preglednici 6. Koncentracijo posameznega antociana smo izračunali po enačbi 3.

Preglednica 6: Priprava raztopin za analizo z metodo standardnega dodatka

Table 6: Preparation of the solution for analysis with standard addition method

	Koncentracija standardnih raztopin v viali (mg/L)	Volumen začetne standardne raztopine (μ L)	Koncentracija začetne standardne raztopine (mg/L)	Skupni volumen (μ L)
cianidin-3-glukozid	16,7	25	200	300
cianidin-3,5-diglukozid	10,0	30	100	300
delfinidin-3-glukozid	3,3	10	100	300
delfinidin-3,5-diglukozid	6,7	20	100	300
pelargonidin-3,5-diglukozid	1,0	3	100	300
pelargonidin-3-glukozid	5,0	10	100	200

Rezultate koncentracij posameznih antocianov, ki smo jih dobili iz umeritvene krivulje, smo primerjali z rezultati z metodo standardnega dodatka. Ugotovili smo, da ima matriks (sok granatnega jabolka z dodanimi prebavnimi encimi) pomemben vpliv na HPLC signale, zato smo se odločili, da bomo pri vseh analizah za preračunavanje koncentracij posameznih antocianov uporabili metodo standardnega dodatka in s tem dobili bolj točne rezultate.

3.2.6.3 Analiza vzorcev brez dodanih prebavnih encimov

Da bi lahko primerjali vpliv dodanih encimov na simulacijo prebave soka granatnega jabolka *in vitro*, smo po enakem postopku, kot smo analizirali vzorce soka granatnega jabolka z dodatkom encimov, analizirali tudi vzorce soka granatnega jabolka brez dodatka encimov. Postopek analize vzorcev je opisan v poglavju 3.2.6.2., postopek simulacije prebave *in vitro* pa v poglavju 3.2.2, s to razliko, da nismo dodali encimov, dodali pa smo vse reagente v enakih količinah.

4 REZULTATI

4.1 VPOLJAVA METODE ZA SIMULACIJO PREBAVE SOKA GRANATNEGA JABOLKA *IN VITRO*

4.1.1 Določanje delovnega pH za simulacijo prebave *in vitro*

Pri izvajanju poskusov simulacije prebave je zelo pomembno, da vzorec hitro prehaja iz ene faze prebave v drugo, tako kot se to zgodi v našem telesu. Zato je bilo pred samo izvedbo eksperimenta potrebno določiti točne količine dodanih kislin/baz.

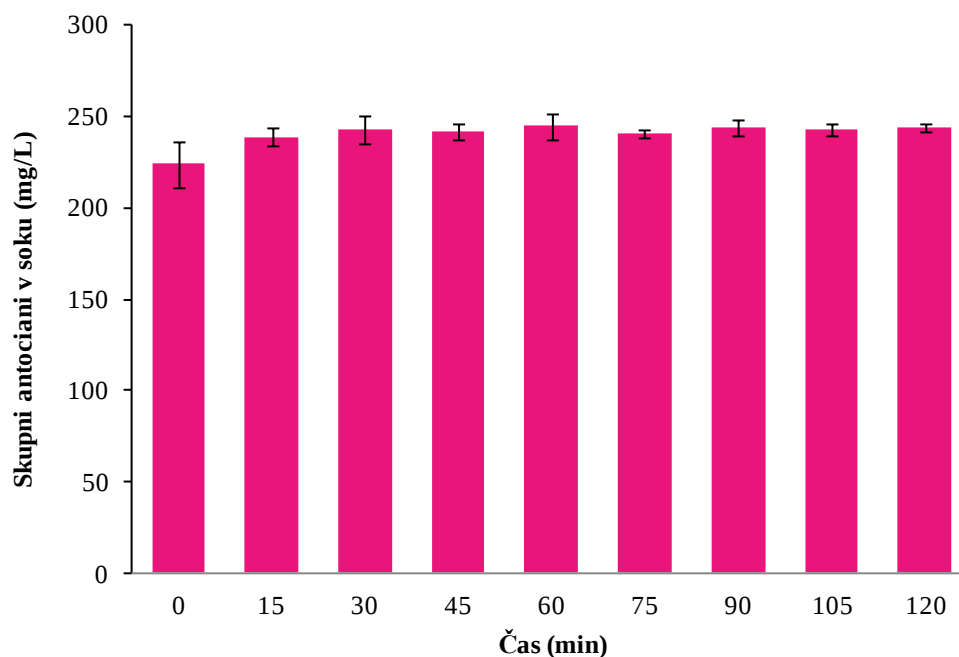
Želodčna kislina ustvari ustrezen pH (1,5–4), da pepsin lahko deluje, zato smo morali pripraviti primeren pH našega vzorca.

Z merjenjem pH vrednosti ob dodatku 1 M HCl smo tako ugotovili, da moramo 5 mL vzorca soka granatnega jabolka dodati točno 310 μ L 1 M raztopine HCl, da dosežemo želeno pH vrednost (2,2), ki se ob dodatku raztopine 1 mL raztopine pepsina zniža na vrednost 2,0, kjer izvajamo simulacijo prebave v želodcu.

Po končani simulaciji prebave v želodcu smo pH dvignili na 5,3 z 1 M NaOH. Eksperimenti so pokazali, da moramo zato v mešanico odpipetirali točno 230 μ L 1 M NaOH. Nato smo dodali 2 mL pankreatina in žolčnega ekstrakta, raztopljenega v 100 mM NaHCO₃, ter z 1 M NaOH in 0,9 M NaHCO₃ dvignili pH na vrednost 7,5. Ugotovili smo, da je ravno pravšnji volumen dodatka 50 μ L 1 M NaOH in 435 μ L 0,9 M NaHCO₃.

4.1.2 Ugotavljanje vpliva trajanja posameznih stopenj prebave na vsebnost antocianov

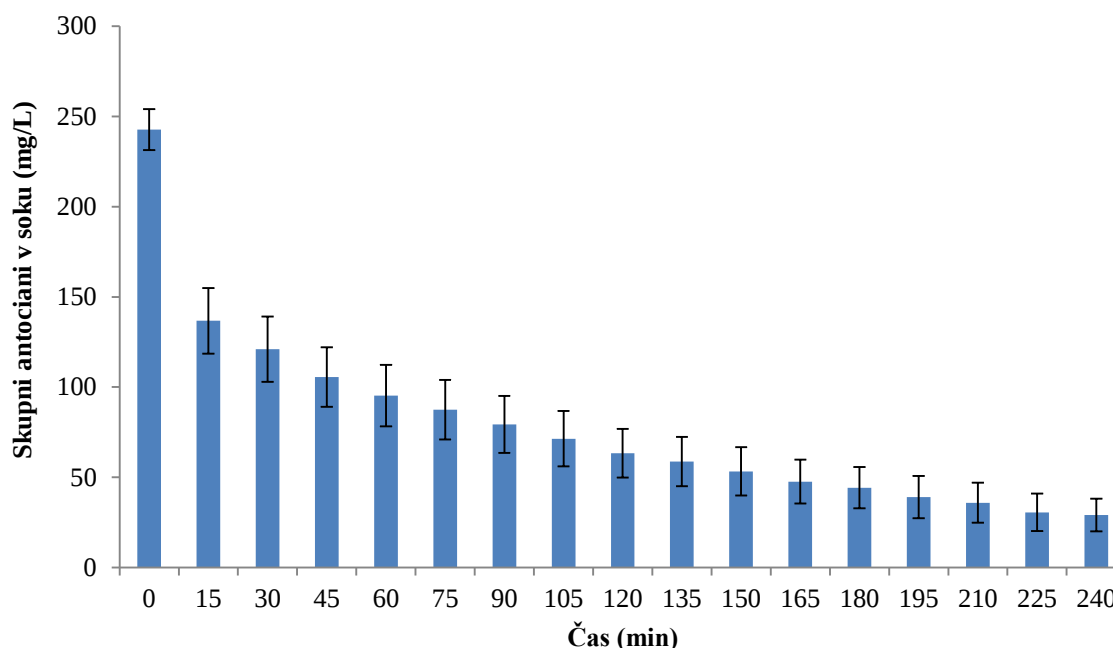
Želeli smo ugotoviti vpliv časa trajanja simulacije prebave *in vitro* v želodcu in v tankem črevesu na vsebnost antocianov v soku granatnega jabolka. Zato smo najprej določili začetno vrednost skupnih antocianov v soku granatnega jabolka (čas 0), potem pa ponovili analizo vsakih 15 minut do skupno 2 ur. Začetna vsebnost antocianov v soku granatnega jabolka je bila 225 mg/L, pH soka granatnega jabolka pa 3,6. Na sliki 7 lahko vidimo, da se vsebnost antocianov prvih 15 minut simulacije prebave *in vitro* v želodcu rahlo poveča (za približno 24 mg/L), medtem ko se koncentracija v nadaljnjih 105 minutah bistveno ne spremeni.



Slika 7: Vsebnost skupnih antocianov med simulacijo prebave soka granatnega jabolka v želodcu

Figure 7: The content of anthocyanins during simulated digestion of pomegranate juice in the stomach

Podoben eksperiment smo izvedli tudi med simulacijo prebave soka granatnega jabolka *in vitro* v tankem črevesu. Najprej smo izvedli simulacijo prebave soka granatnega jabolka *in vitro* v želodcu (čas 0). Tudi tukaj smo vzorce analizirali vsakih 15 minut, le da smo končni čas podaljšali na 4 ure. Iz slike 8 je razvidno, da se vsebnost skupnih antocianov med simulacijo prebave v tankem črevesu zmanjšuje. Največji padec (za skoraj polovico) se zgodi že v prvih 15 minutah oz. takoj, ko zvišamo pH na 7,5. Vrednost skupnih antocianov se tako iz začetnih 242,6 mg/L takoj zniža na 136,7 mg/L. Po štirih urah je vrednost skupnih antocianov med simulacijo prebave soka granatnega jabolka 29,1 mg/L, kar je le še 12 % začetne vrednosti. Na podlagi naših rezultatov in glede na to, da naš vzorec ni sestavljen obrok, ampak tekoča hrana in so delci vzorca majhni, smo se odločili, da je najprimernejši čas trajanja simulacije prebave v želodcu ena ura (prva stopnja prebave) in čas trajanja simulacije prebave v tankem črevesu dve uri. Ker pa se očitno več sprememb dogaja med fazo prebave v tankem črevesu, smo le-to razdelili na dva dela, prvič smo vzorce analizirali po 1 uri (druga stopnja prebave) in drugič po dveh urah (tretja stopnja prebave).



Slika 8: Vsebnost skupnih antocianov med simulacijo prebave soka granatnega jabolka v tankem črevesu

Figure 8: The content of anthocyanins during simulated digestion of pomegranate juice in the small intestine

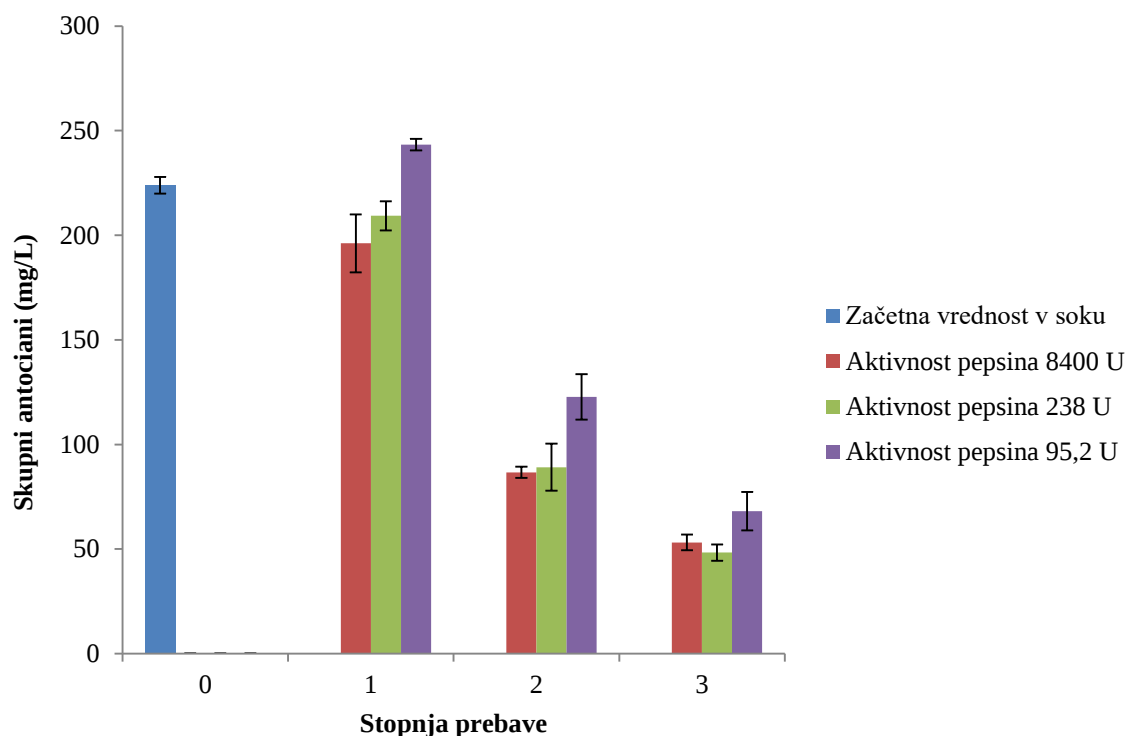
4.1.3 Vpliv encimske aktivnosti na vsebnost antocianov med simulacijo prebave *in vitro*

4.1.3.1 Vpliv aktivnosti pepsina

Določanje encimske aktivnosti pepsina

Z metodo za določanje encimske aktivnosti pepsina smo ugotovili, da ima encim A, ki je bil odprt in v uporabi že nekaj let, 88-krat manjšo encimsko aktivnost kot drugi, popolnoma nov pepsin, encim B. Aktivnost pepsina A, ki smo jo izračunali po enačbi 1, je bila 4.760 U/g in aktivnost pepsina B je bila 420.000 U/g.

Zanimalo nas je, kako encimska aktivnost pepsina vpliva na stabilnost antocianov med prebavo *in vitro*, zato smo soku dodali tri različne količine encima, in sicer pepsin z aktivnostjo 95,2 U (encim A1), 238 U (encim A2), 8400 U (encim B). Vpliv aktivnosti pepsina na vsebnost skupnih antocianov v soku granatnega jabolka med prebavo *in vitro* je prikazan na sliki 9.



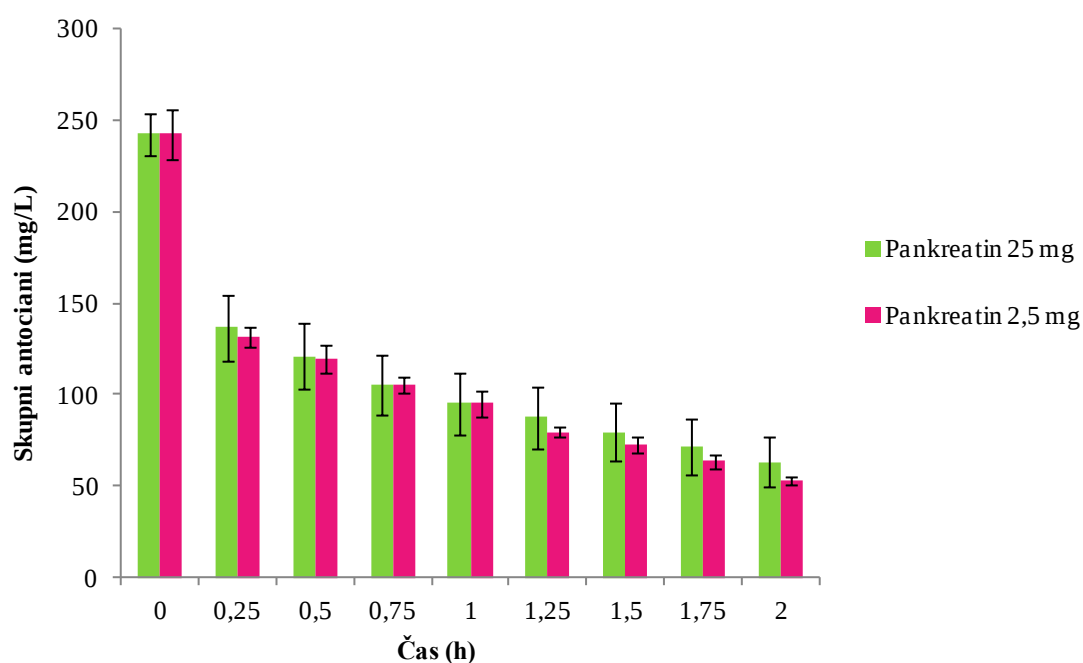
Slika 9: Vsebnost skupnih antocianov v soku granatnega jabolka med prebavo *in vitro* glede na aktivnost pepsina po zaključku prve stopnje prebave (simulacije prebave v želodcu po 1 uri), druge stopnje prebave (simulacije prebave v tankem črevesu po 1 uri) in tretje stopnje prebave (simulacije prebave v tankem črevesu po 2 urah), merjena z metodo za določanje skupnih antocianov, izražena kot ekvivalent cianidin-3-glukozida

Figure 9: The content of anthocyanins in pomegranate juice during *in vitro* digestion depending on the pepsin activity after the completion of the first stage of digestion (simulating the digestion in the stomach after 1 hour), the second stage of digestion (simulating the digestion in the small intestine after 1 hour) and the third stage of digestion (simulating the digestion in the small intestine after 2 hours), measured by the method for the determination of total anthocyanins, expressed as the equivalent of cyanidin-3-glucoside

Na sliki 9 vidimo, da se z višanjem aktivnosti pepsina v mešanici zmanjšuje tudi vsebnost skupnih antocianov. Predvsem je zelo opazna razlika v vsebnosti skupnih antocianov na prvi stopnji prebave soka granatnega jabolka *in vitro* pri aktivnosti pepsina v vzorcu 95,2 U (encim A1), medtem ko je veliko manjša razlika pri aktivnosti pepsina 238 U (encim A2) in 8400 U (encim B). Na tretji stopnji prebave soka granatnega jabolka *in vitro* pa aktivnost pepsina nima več velikega vpliva na vsebnost skupnih antocianov, saj so razlike znotraj eksperimentalne napake. Ker nas je zanimalo, kako encimska aktivnost pepsina vpliva na stabilnost antocianov med prebavo *in vitro*, lahko na podlagi slike 9 razberemo, da ima aktivnost pepsina vpliv na stabilnost antocianov na prvi stopnji prebave, medtem ko predvsem po končani tretji stopnji prebave razlike postanejo zanemarljive, oziroma so znotraj eksperimentalne napake.

4.1.3.2 Vpliv aktivnosti pankreatina

Ugotavljali smo, kako koncentracija pankreatina vpliva na stabilnost antocianov v soku granatnega jabolka med simulacijo prebave *in vitro* v tankem črevesu. Primerjali smo dodatek 2,5 mg (4×USP) pankreatina in desetkrat večjo količino pankreatina (25 mg) v 5 mL vzorca granatnega jabolka po zaključeni želodčni fazi našega prebavnega modela z uporabo pepsina B z aktivnostjo 8400 U. Na sliki 10 vidimo, da je vpliv različnih koncentracij pankreatina na vsebnost antocianov zelo majhen v vseh časovnih intervalih med simulacijo prebave soka granatnega jabolka v tankem črevesu, kar kaže, da količina pankreatina praktično nima vpliva na skupno vsebnost antocianov. Glede na naše rezultate smo se odločili, da bomo pri naših poskusih uporabljali manjšo količino pankreatina (2,5 mg).



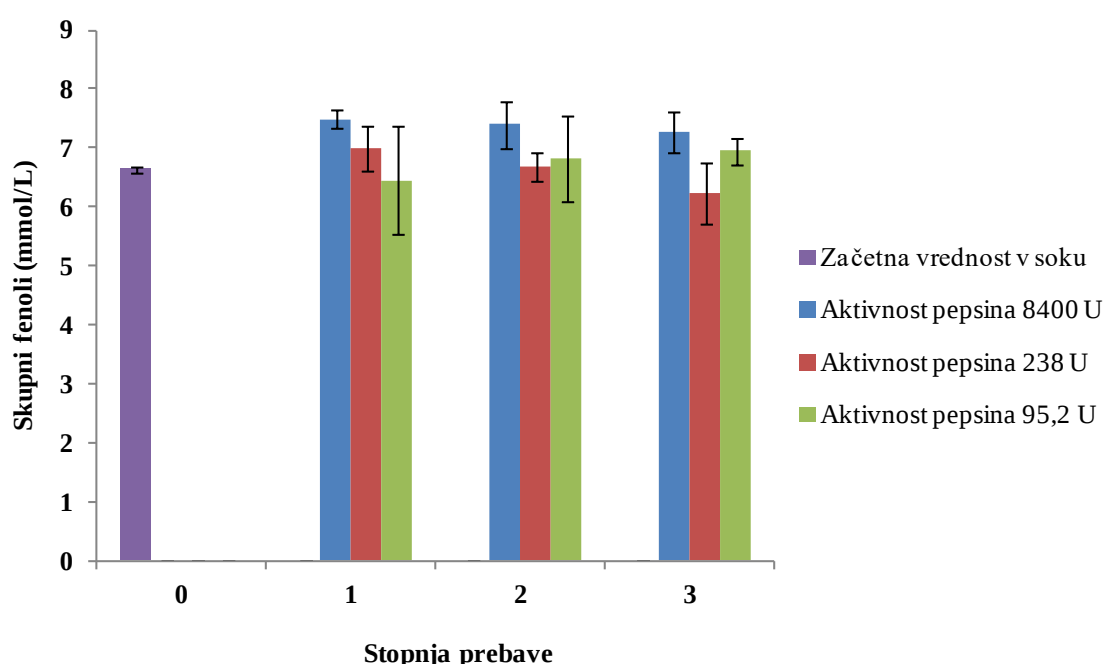
Slika 10: Vsebnost skupnih antocianov v soku granatnega jabolka po zaključku prve stopnje prebave (čas 0) in med simulacijo prebave *in vitro* v tankem črevesu glede na količino dodanega pankreatina. Aktivnost pepsina je bila 8400 U

Figure 10: Content of anthocyanins in pomegranate juice after the completion of the first stage of digestion (time 0) and during simulation *in vitro* digestion in the small intestine in relation to the quantity of added pancreatin. Pepsin activity was 8400 U

4.2 ANALIZE SOKA GRANATNEGA JABOLKA PRED IN MED PREBAVO *IN VITRO*

4.2.1 Skupne fenolne spojine

Vsebnost skupnih fenolnih spojin v vzorcih smo določali s Folin-Ciocalteu (F-C) reagentom in merili absorbanco pri valovni dolžini 746 nm.



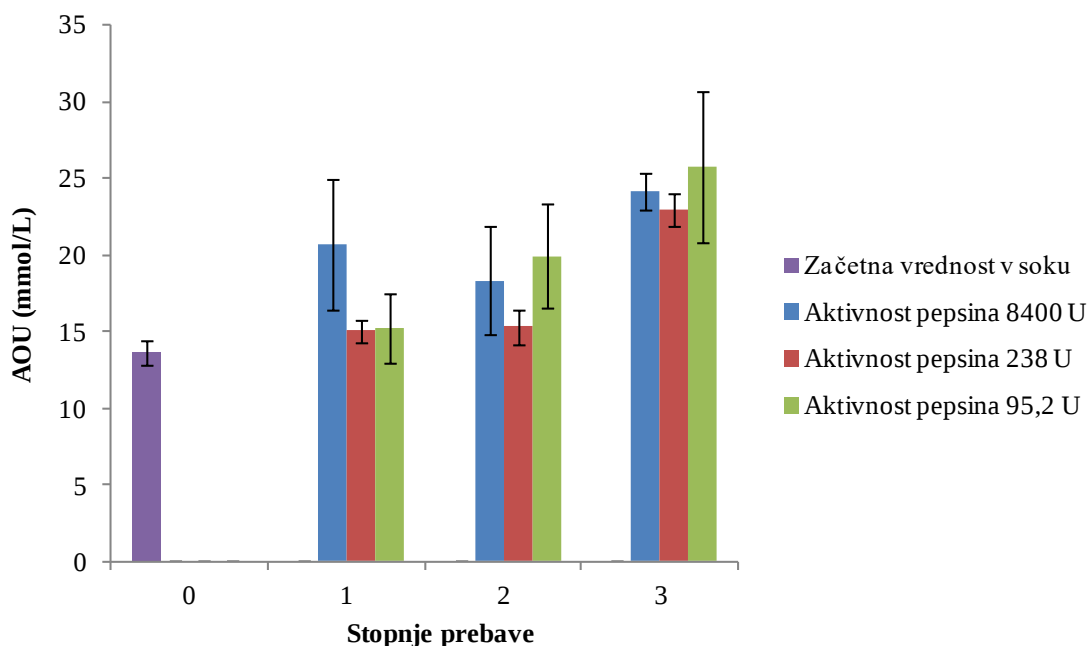
Slika 11: Vsebnost skupnih fenolnih spojin v soku granatnega jabolka (0) in po zaključku prve stopnje prebave (1) (simulacija prebave v želodcu po 1 uri), druge stopnje prebave (2) (simulacija prebave v tankem črevesu po 1 uri) in tretje stopnje prebave (3) (simulacije prebave v tankem črevesu po 2 urah), merjena s Folin–Ciocalteu metodo, izražena v mmol klorogenske kisline/L soka granatnega jabolka

Figure 11: The content of total phenolic compounds in pomegranate juice (0) and after the completion of the first stage of digestion (1) (simulating the digestion in the stomach after 1 hour), the second stage of digestion (2) (simulating the digestion in the small intestine after 1 hour) and the third stage of digestion (3) (simulating the digestion in the small intestine after 2 hours), measured by the Folin–Ciocalteu method, expressed as chlorogenic acid mmol/L pomegranate juice

Na sliki 11 je razvidno, da se koncentracija skupnih fenolnih spojin med prebavo soka granatnega jabolka *in vitro* rahlo poveča, še posebej pri najvišji aktivnosti pepsina. Da bi preverili vpliv dodanih prebavnih encimov in žolčnih soli, smo odvzeli vzorec takoj po dodatku pepsina (8400 U) in takoj po dodatku pankreatina (2,5 mg). Dobili smo vrednosti, ki so primerljive z vsebnostjo skupnih fenolnih spojin po končani prvi in drugi stopnji

prebave, zato nas je zanimalo, ali k rezultatu skupnih fenolnih spojin prispevajo tudi samo dodani encimi in žolčne soli in ne samo fenolne spojine, prisotne v soku. Zato smo izvedli eksperiment s slepim vzorcem, tako da smo namesto soka uporabili vodo, pepsin z aktivnostjo 8400 U in 2,5 mg pankreatina. Ugotovili smo, da je prispevek dodanih reagentov po zaključku prve stopnje prebave 0,39 mmol/L (simulacije prebave v želodcu po 1 uri), druge stopnje prebave 0,62 mmol/L (simulacije prebave v tankem črevesu po 1 uri) in tretje stopnje prebave 0,68 mmol/L (simulacije prebave v tankem črevesu po 2 urah). Če te vrednosti odštejemo od vrednosti skupnih fenolnih spojin po posamezni stopnji prebave, vidimo, da se dejanska vsebnost skupnih fenolnih spojin v soku granatnega jabolka med prebavo ne spremeni. Rahlo povečanje signalov (do 10 %) lahko tako pripišemo prisotnosti dodanih encimov in žolčnih soli.

4.2.2 Antioksidativna učinkovitost



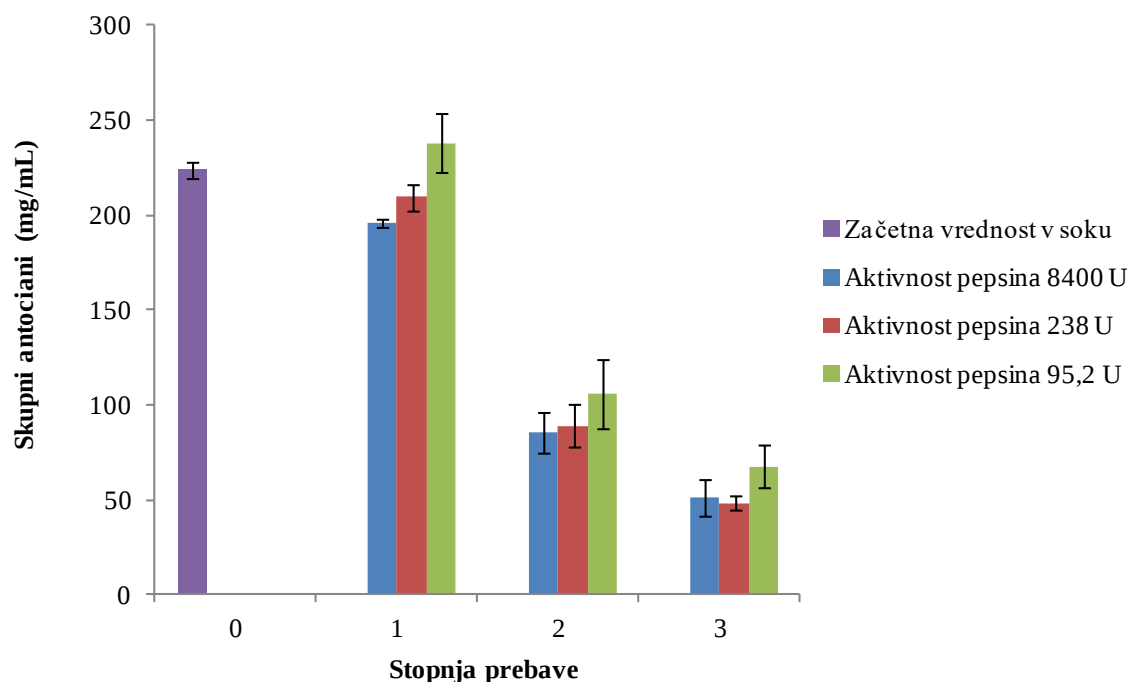
Slika 12: Antioksidativna učinkovitost (AOU) soka granatnega jabolka (0) in po zaključku prve stopnje prebave (1) (simulacije prebave v želodcu po 1 uri), druge stopnje prebave (2) (simulacije prebave v tankem črevesu po 1 uri) in tretje stopnje prebave (3) (simulacije prebave v tankem črevesu po 2 urah), merjena z luminescenčno metodo za določanje AOU, izražena v mmol troloksa/L soka granatnega jabolka

Figure 12: Antioxidant activity (AOU) of pomegranate juice (0) and after the completion of the first stage of digestion (1) (simulating the digestion in the stomach after 1 hour), the second stage of digestion (2) (simulating the digestion in the small intestine after 1 hour) and the third stage of digestion (3) (simulating the digestion in the small intestine after 2 hours), measured by luminescent method for determining the AOU, expressed as mmol trolox/L pomegranate juice

Enako kot pri metodi za določanje skupnih fenolnih spojin, smo tudi pri luminescenčni metodi za določanje antioksidativne učinkovitosti določili vrednost AOU v soku granatnega jabolka med prebavo *in vitro* na različnih stopnjah prebave in z različnimi stopnjami aktivnosti pepsina. Na sliki 12 lahko vidimo, da se AOU med simulacijo prebave *in vitro* povečuje. Pri aktivnosti pepsina 8400 U po prvi stopnji prebave se AOU poveča kar za 52 %, po tretji stopnji prebave pa se AOU poveča kar za 77 %.. Pri eksperimentu z aktivnostjo pepsina 238 U se AOU po prvi in drugi stopnji prebave praktično ne spremeni, do povišanja pa pride po tretji stopnji prebave, in sicer kar za 68 %. Pri aktivnosti pepsina 95,2 U pa pride do povišanja AOU tako po drugi (za 46 %) kot tretji stopnji prebave (za 88 %). Kljub vsemu pa o vplivu različnih encimskih aktivnosti na AOU ne moremo govoriti, saj so rezultati na posameznih stopnjah prebave pri vseh treh encimskih aktivnostih znotraj eksperimentalne napake. Da bi preverili prispevek dodatka prebavnih encimov in žolčnih soli, smo izvedli tudi eksperiment s slepim vzorcem (brez prisotnosti soka) in ugotovili, da dodani encimi in žolčne soli ne vplivajo na izmerjene vrednosti AOU, saj v nobenem vzorcu nismo izmerili nobenega signala z luminescenčno metodo.

4.2.3 Skupni antociani

Na sliki 13 lahko vidimo, da koncentracija skupnih antocianov med prebavo soka granatnega jabolka *in vitro* močno pade. Na prvi stopnji prebave se količina skupnih antocianov glede na začetno vrednost skorajda ne spremeni. Pri aktivnosti pepsina 238 U se vrednost skupnih antocianov zniža za 10 mg/L (6,5 %), pri aktivnosti pepsina 95,2 U pa se vrednost skupnih antocianov celo poviša, in sicer za 10 mg/L (6 %). Do največje spremembe vsebnosti skupnih antocianov pride pri najvišji aktivnosti pepsina (8400 U), saj se le-ta zmanjša kar za 28 mg/L (12,5 %) že po prvi stopnji prebave. Po drugi stopnji prebave je količina skupnih antocianov za približno 60 % nižja v primerjavi z začetno vrednostjo antocianov v soku granatnega jabolka, po tretji stopnji pa je v vzorcu le še 25 % antocianov glede na začetno vrednost antocianov. Iz slike 13 lahko razberemo tudi, da aktivnost pepsina vpliva na koncentracijo skupnih antocianov na posameznih stopnjah prebave. Na prvi stopnji prebave, kjer je encim pepsin aktiven, lahko vidimo, da višja kot je aktivnost pepsina, nižja je koncentracija skupnih antocianov in obratno. Po drugi in tretji stopnji prebave pa aktivnost pepsina bistveno manj vpliva na vsebnost skupnih antocianov, saj v tej stopnji pepsin ni več aktiven zaradi visoke pH vrednosti.



Slika 13: Vsebnost skupnih antocianov v soku granatnega jabolka (0) in po zaključku prve stopnje prebave (1) (simulacije prebave v želodcu po 1 uri), druge stopnje prebave (2) (simulacije prebave v tankem črevesu po 1 uri) in tretje stopnje prebave (3) (simulacije prebave v tankem črevesu po 2 urah), merjena z metodo za določanje skupnih antocianov, izražena kot ekvivalent cianidin-3-glukozida

Figure 13: The content of anthocyanins in the juice of pomegranate (0) and after the completion of the first stage of digestion (1) (simulating the digestion in the stomach after 1 hour), the second stage of digestion (2) (simulating the digestion in the small intestine after 1 hour) and the third stage of digestion (3) (simulating the digestion in the small intestine after 2 hours), measured by the method for the determination of total anthocyanins, expressed as the equivalent of cyanidin-3-glucoside

4.2.4 Posamezni antocijani

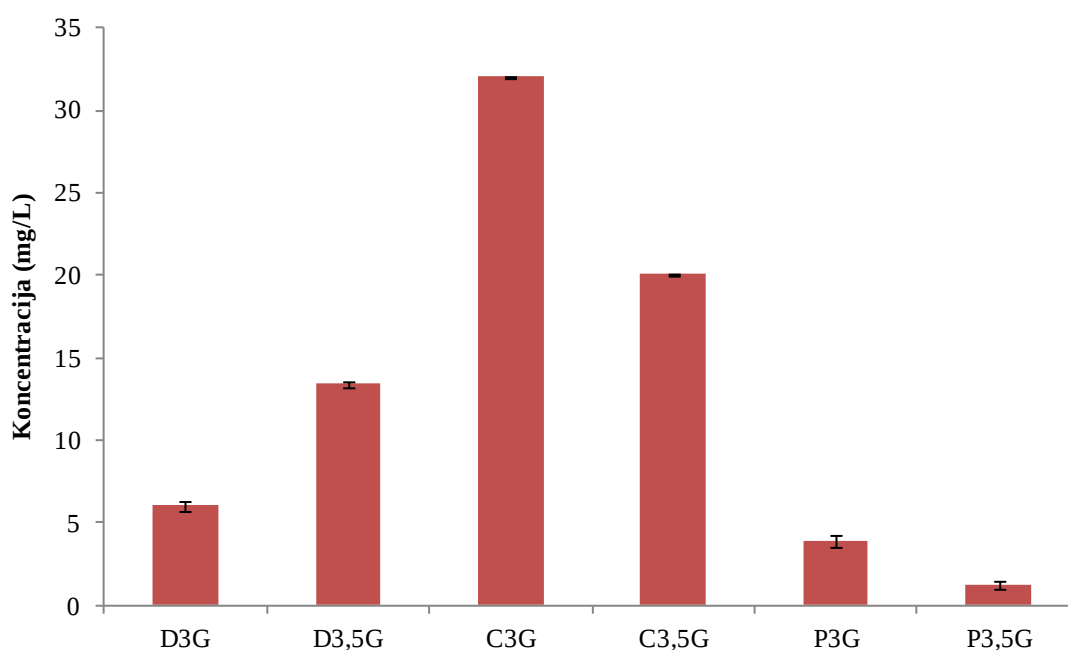
Identifikacija posameznih antocianov je temeljila na ujemanju retencijskih časov komercialno dostopnih standardov (Preglednica 7). Dobili smo kromatograme, iz katerih smo izračunali koncentracije posameznih antocianov (Slika 14).

Iz rezultatov HPLC analize (Slika 14) lahko razberemo, da sok granatnega jabolka vsebuje največ C3G, in sicer 32,01 mg/L. Sledijo mu C3,5G s 20,07 mg/L, D3,5G s 13,41 mg/L, D3G s 6,04 mg/L, P3G s 3,87 mg/L in P3,5G z 1,24 mg/L.

Preglednica 7: Retencijski časi posameznega standarda antociana

Table 7: Retention time of selected anthocyanins

Standardne spojine	Retencijski čas standarda (min)
delfinidin-3,5-diglukozid (D3,5G)	12,0
cianidin-3,5-diglukozid (C3,5G)	16,5
delfinidin-3-glukozid (D3G)	20,0
pelargonidin-3,5-diglukozid (P3,5G)	21,5
cianidin-3-glukozid (C3G)	27,0
pelargonidin-3-glukozid (P3G)	35,0
cianidin-7-arabinozid (C7A)	44,0

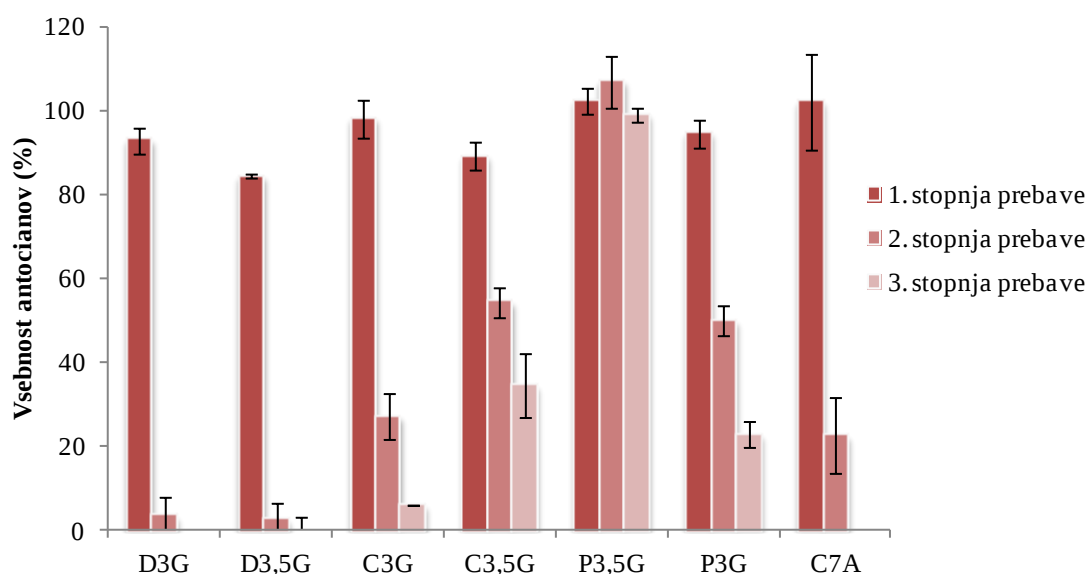


Slika 14: Koncentracije posameznih antocianov v soku granatnega jabolka, D3G - delfinidin-3-glukozid, D3,5G - delfinidin-3,5-diglukozid, C3G - cianidin-3-glukozid, C3,5G - cianidin-3,5-diglukozid, P3G - pelargonidin-3-glukozid in P3,5G - pelargonidin-3,5-diglukozid

Figure 14: Concentrations of selected anthocyanins in pomegranate juice, D3G - delphinidin-3-glucoside, D3,5G - delphinidin 3,5-diglucoside, C3G - cyanidin-3-glucoside, C3,5G - cyanidin-3,5-diglucoside, P3G - pelargonidin-3-glucoside and P3, 5G - pelargonidin-3,5-diglucoside

Podobno smo analizirali vzorce po vsaki stopnji simulacije prebave *in vitro*, saj so nam predhodne določitve skupnih antocianov pokazale, da se vsebnosti predvsem med drugo in tretjo stopnjo prebave močno znižajo (Slika 13). Zato nas je zanimalo, ali gre za razgradnjo vseh v soku granatnega jabolka prisotnih antocianov, ali so med njimi kakšne razlike. V vseh primerih smo uporabili pepsin B (aktivnost 8400 U) in 2,5 g pankreatina. Iz slike 15 lahko razberemo, da se vsebnost posameznih antocianov med encimsko prebavo soka

granatnega jabolka *in vitro* različno znižuje, tako glede na stopnjo prebave kot glede na začetne količine v soku. Vsebnosti posameznih antocianov po prvi stopnji encimske prebave *in vitro* so od 84 % do 100 % glede na začetno količino soka granatnega jabolka, kar je v skladu z določitvami skupnih antocianov, ki se med simulacijo prebave v želodcu praktično niso spremenili. Vsebnost C3G, P3,5G in C7A se na prvi stopnji prebave ne spremeni, največje zmanjšanje vsebnosti opazimo pri D3,5G, in sicer se le-ta zniža na 84 % začetne količine.



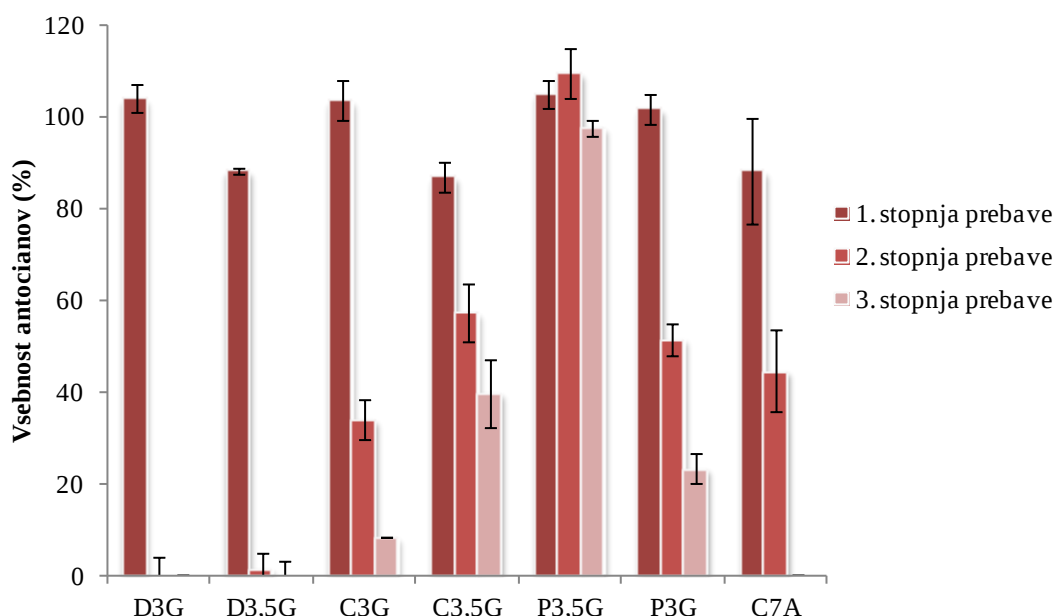
Slika 15: Vsebnost posameznih antocianov (D3G - delphinidin-3-glukozid, D3,5G - delphinidin-3,5-diglukozid, C3G - cianidin-3-glukozid, C3,5G - cianidin-3,5-diglukozid, P3,5G - pelargonidin-3,5-diglukozid, P3G - pelargonidin-3-glukozid, C7A - cianidin-7-arabinozid) med simulacijo prebave soka granatnega jabolka *in vitro* po zaključku prve stopnje prebave (simulacije prebave v želodcu po 1 uri), druge stopnje prebave (simulacije prebave v tankem črevesu po 1 uri) in tretje stopnje prebave (simulacije prebave v tankem črevesu po 2 urah). 100 % vrednost predstavlja vsebnosti antocianov v svežem soku granatnega jabolka

Figure 15: The concentration of selected anthocyanins (D3G - delphinidin-3-glucoside, D3,5G - delphinidin 3,5-diglucoside, C3G - cyanidin-3-glucoside, C3,5G - cyanidin-3,5-diglucoside and P3,5G - pelargonidin-3,5-diglucoside, P3G - pelargonidin-3-glucoside, C7A - cyanidin-7-arabinoside) during enzymatic *in vitro* digestion pomegranate juice after the completion of the first stage of digestion (simulating the digestion in the stomach after 1 hour), the second stage of digestion (simulating the digestion in the small intestine after 1 hour) and the third stage of digestion (simulating the digestion in the small intestine after 2 hours). 100% represents the content of anthocyanins in the fresh pomegranate juice

Po drugi stopnji prebave so vsebnosti antocianov zelo različne, in sicer med 3 % in 100 % začetne količine v soku granatnega jabolka. Med vsemi analiziranimi antociani je najbolj stabilen P3,5G, saj se njegova vsebnost praktično ne spremeni, po drugi strani pa se med drugo stopnjo prebave najbolj zmanjša vsebnost D3G in D3,5G, in sicer le-ta pade na približno 3 % začetne količine v soku. Vsebnosti C3,5G in P3G padeta za približno 50 %, vsebnost C3G in C7A pa na 25 % začetne količine v soku.

Še večje razlike opazimo po tretji stopnji prebave, saj je koncentracija antocianov med 0 % in 99 % začetne količine v soku granatnega jabolka. Povsem razpadejo D3G, D3,5G in C7A, le 6 % pa ostane C3G. P3,5G je enako kot na drugi stopnji najbolj stabilen, njegova vsebnost je 99 % začetne količine v soku. Vsebnost C3,5G se zniža na 34 %, vsebnost P3G pa na 22 % začetne količine v soku.

4.2.5 Vpliv fizikalno-kemijskih pogojev na vsebnost antocianov



Slika 16: Vsebnost posameznih antocianov (D3G- delphinidin-3-glukozid, D3,5G- delphinidin-3,5-diglukozid, C3G- cianidin-3-glukozid, C3,5G- cianidin-3,5-diglukozid, P3,5G- pelargonidin-3,5-diglukozid, P3G- pelargonidin-3-glukozid, C7A- cianidin-7-arabinozid) med simulacijo prebave soka granatnega jabolka brez prisotnosti prebavnih encimov po zaključku prve stopnje prebave (simulacije prebave v želodcu po 1 uri), druge stopnje prebave (simulacije prebave v tankem črevesu po 1 uri) in tretje stopnje prebave (simulacije prebave v tankem črevesu po 2 urah). 100 % vrednost predstavljajo vsebnosti antocianov v svežem soku granatnega jabolka

Figure 16: The concentration of selected anthocyanins (D3G - delphinidin-3-glucoside, D3,5G - delphinidin 3,5-diglucoside, C3G - cyanidin-3-glucoside, C3,5G - cyanidin-3,5-diglucoside and P3,5G - pelargonidin-3,5-diglucoside, P3G - pelargonidin-3-glucoside, C7A - cyanidin-7-arabinoside) during digestion of pomegranate juice without digestion enzymes depending on the stage of digestion after the completion of the first stage of digestion (simulating the digestion in the stomach after 1 hour), the second stage of digestion (simulating the digestion in the small intestine after 1 hour) and the third stage of digestion (simulating the digestion in the small intestine after 2 hours). 100% represents the content of anthocyanins in the fresh pomegranate juice

Da bi preverili vpliv dodanih prebavnih encimov (pepsin in pankreatin) in žolčnih kislin na vsebnost posameznih antocianov med prebavo *in vitro*, smo izvedli eksperiment, kjer smo

dodali vse reagente, razen encimov. Na sliki 16 vidimo, da so vsebnosti posameznih antocianov po prvi stopnji med 87 % in 100 % začetne količine soka granatnega jabolka, na drugi stopnji od 0 % do 100 % začetne količine v soku granatnega jabolka in na tretji stopnji od 0 % do 97 % začetne količine v soku granatnega jabolka. Na prvi stopnji se vsebnost D3G, C3G, P3,5G, P3G ne spremeni, pri D3,5G, C3,5G in C7A pa vsebnost pade na približno 85 % začetne količine v soku. Med drugo stopnjo se vsebnost P3,5G celo nekoliko poveča, medtem ko se najbolj zmanjšata vsebnosti D3G in D3,5G, saj se D3G popolnoma razgradi, vsebnost D3,5G pa se zmanjša na 1,5 % začetne količine v soku. Na tretji stopnji se popolnoma razgradita še D3,5G in C7A, vsebnost P3,5G pa se praktično ne spremeni.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V sklopu magistrskega dela smo najprej vpeljali metodo za simulacijo prebave *in vitro* na primeru soka granatnega jabolka turškega porekla. Nato smo v soku granatnega jabolka ugotavljali skupno količino antocianov in spremljali, kako se le-ta s časom spreminja med simulacijo prebave *in vitro* v želodcu in tankem črevesu. Istočasno smo spremljali tudi spreminjanje antioksidativne učinkovitosti (AOU) in skupnih fenolnih spojin na različnih stopnjah prebave. Z metodo HPLC smo nazadnje določili, katere antociane vsebuje sok granatnega jabolka in kako se vsebnost le-teh spreminja med simulacijo prebave *in vitro* ter kako vplivajo fizikalno-kemijski pogoji (pH, temperatura) nanje.

5.1 VPELJAVA METODE ZA SIMULACIJO PREBAVE SOKA GRANATNEGA JABOLKA V *IN VITRO* POGOJIH

Vpeljava metode za simulacijo prebave soka granatnega jabolka *in vitro* je potekala predvsem s pomočjo literature in na osnovi predposkusov.

5.1.1 Določanje delovnega pH za simulacijo prebave v želodcu in tankem črevesu

Po vnosu hrane se pH v želodcu običajno dvigne do vrednosti 5 predvsem zaradi pufrske kapacitete tipičnega zahodnega-tipa prehrane. Izločanje HCl v želodcu zniža pH na vrednosti, ki so potrebne za optimalno aktivnost encimov. Zato se pH počasi vrne nazaj na vrednost, ki je običajna za prazen želodec. Za optimalno želodčno lipazno aktivnost so potrebni rahlo kisli pogoji v območju pH od 4 do 6, medtem ko je pepsin v glavnem aktiven med pH 2 in 4. Minekus in sod. (2014) priporočajo, da naj bi simulacija prebave v želodcu potekla 2 uri in zato tudi predlagajo pH statične vrednosti 3, ki naj bi predstavljal srednjo vrednost pH v obroku. Mi smo se glede na to, da za poskuse nismo uporabljali sestavljenega obroka, ampak sok granatnega jabolka, ki je imel pH okrog 3,3, odločili, da bo naš delovni pH za prvo fazo prebave (želodec) pH 2,0, tako kot navaja tudi večina ostale literatura (Garrett in sod., 1999; Ryan in sod., 2008; Green in sod., 2007; Pérez-Vicente in sod., 2002).

Pri nakisanju vzorca z 1 M HCl je potrebno paziti, da je pH približno 2,2, saj se njegova vrednost ob dodatku encima, raztopljenega v 0,1 M HCl še nekoliko zniža. Pomembno je, da se sprememba pH vrednosti zgodi hitro, saj le tako lahko simuliramo dejanske pogoje.

Več avtorjev (Garrett in sod., 1999; Ryan in sod., 2008; Green in sod., 2007; Pérez-Vicente in sod., 2002) je opisalo postopek, ki smo ga uporabili tudi pri našem delu. Navedli so, da so s kombinacijo 100 mM NaHCO₃ in 1 M NaOH po zaključeni simulaciji prebave v želodcu dvignili pH najprej na 5,3, nato dodali ustrezno količino pankreatina in žolčnih soli ter s 100 mM NaHCO₃ dvignili pH na vrednost med 7,2 do 7,5. Tako smo tudi pri

našem eksperimentu na drugi fazi prebave najprej pH dvignili na 5,3, nato dodali raztopljen pankreatin in žolčne soli ter še enkrat dvignili pH na 7,5. Ker je zelo pomembno, da proučevano živilo čim hitreje prehaja iz želodčne stopnje prebave na stopnjo prebave v tankem črevesu, smo s pomočjo predposkusov določili, kakšni so pravšnji volumni dodanih kislin in baz za znižanje ali zvišanje pH med posameznimi stopnjami prebave soka granatnega jabolka. Vse nadaljnje poskuse smo potem izvajali s povsem enakimi dodatki kislin in baz in s tem zagotovili ponovljivost naših rezultatov.

5.1.2 Vpliv trajanja posameznih stopenj prebave na raziskovalne parametre

Hur in sod., 2011 navajajo, da je bila pri vseh raziskavah, ki so jih povzeli v okviru preglednega članka o *in vitro* prebavnih modelih, delovna temperatura 37 °C. Poudarjajo tudi, da mora inkubacija vzorcev v različnih simuliranih prebavnih tekočinah posnemati čas prebave pri ljudeh. Pri načrtovanju *in vitro* prebavnih modelov je potrebno upoštevati čas prebave glede na velikost delcev. Pomemben dejavnik, ki vpliva na čas prebave, je vrsta vzorca. Praznjenje želodca zahodnega tipa obroka v trdni obliki je običajno zaključeno med 3 in 4 urami. Presnova tekočega obroka pa poteka s hitrim nastopom praznjenja. Praznjenje 300 mL vode zahteva eno uro, medtem, ko so druge študije pokazale, da tekočine z nizko koncentracijo proteinov potrebujejo tudi krajši čas prehoda (0,5 h) skozi želodec (Minekus in sod., 2014).

Čas trajanja simulacije prebave v želodcu, ki smo jo mi označili kot prvo stopnjo prebave, v literaturi največkrat zasledimo, da traja eno do dve uri in čas trajanja simulacije prebave v tankem črevesu, ki smo jo označili kot druga in tretja stopnja prebave, dve do štiri ure (Green in sod., 2007; Pérez-Vicente in sod., 2002).

V našem eksperimentu smo simulacijo prebave *in vitro* razdelili na tri stopnje, kot je že opisano zgoraj. Naš vzorec je bil sok granatnega jabolka, zato ni potreboval mehanske obdelave, delci pri prebavi so majhni, zato smo ga smatrali kot lažje prebavljivega. Za lažje določanje časa trajanja posameznih stopenj prebave smo izvedli simulacijo prebave v želodcu, ki je trajala 2 h in pri tem vsakih 15 minut spremljali vsebnost skupnih antocianov. Le-ta se je v prvih 15 minutah rahlo povečala (za približno 10 %), v nadaljnjih dveh urah pa se koncentracija antocianov v soku granatnega jabolka med simulacijo prebave v želodcu ni bistveno spremenila (Slika 7). Glede na podatke iz literature in na podlagi naših poskusov smo se odločili, da bomo vse nadaljnje eksperimente opravljali z enourno simulacijo prebave v želodcu.

Vsebnost skupnih antocianov smo spremljali tudi pri simulaciji prebave v tankem črevesu (Slika 8), in sicer v 15-minutnih intervalih do končnih štirih ur. Največji padec vsebnosti skupnih antocianov se je zgodil takoj, ko smo zvišali pH iz vrednosti 2,0 (želodčna faza) na 7,5, kasneje pa se koncentracija antocianov znižuje in je po štirih urah le še 29,1 mg/L,

kar je komaj 12 % začetne vsebnosti (242,6 mg/L). Odločili smo se, da bomo eksperimente simulacije prebave v tankem črevesu opravljali dve uri, ker naš vzorec ni bil sestavljen obrok, ampak enostaven in zato tudi lažje prebavljiv. Ker so predposkusi pokazali, da se v tem času vsebnost antocianov hitro spreminja, smo fazo simulacije prebave v tankem črevesu razdelili na dve stopnji, vsaka stopnja je trajala po eno uro, po vsaki končani stopnji pa smo odvzeli vzorec in ga analizirali z vsemi opisanimi metodami.

5.1.3 Prebava *in vitro* in encimi

5.1.3.1 Vpliv aktivnosti pepsina

Da bi ugotovili vpliv aktivnosti pepsina na vsebnost antocianov, smo izvedli eksperiment s tremi različnimi aktivnostmi encima 8400 U, 238 U in 95,2 U. Vedno smo uporabili 5 mL soka granatnega jabolka. Ugotovili smo, da ima aktivnost pepsina precejšen vpliv na koncentracijo antocianov na prvi stopnji prebave, razlike pa se zmanjšajo pri drugi in tretji stopnji prebave. To lahko pripišemo dejstvu, da po prvi stopnji prebave pH vrednost takoj dvignemo iz 2,0 na 7,5 in s tem deaktiviramo pepsin. Opazna je bila predvsem razlika v vsebnosti skupnih antocianov pri najnižji aktivnosti pepsina v vzorcu (95,2 U, encim A1), kjer se vsebnost antocianov v želodčni fazi rahlo poveča (za okoli 8 % glede na začetno vrednost v soku), medtem ko se je vsebnost skupnih antocianov pri aktivnosti pepsina 238 U (encim A2) zmanjšala za 7 %, pri aktivnosti pepsina 8400 U (encim B) pa za 12 %. Manjše razlike je bilo opaziti tudi po drugi in tretji stopnji prebave, pri čemer je manjša aktivnost pepsina pripeljala do manjšega znižanja vsebnosti skupnih antocianov in obratno. Po tretji stopnji prebave so bile razlike med različnimi aktivnostmi pepsina skoraj zanemarljive. Da bi se čim bolj približali fiziološkemu pogojem (Minekus in sod., 2014) in da bi se izognili morebitnim nepravilnostim zaradi prenizke aktivnosti pepsina, smo se odločili, da večino eksperimentov opravimo z najvišjo preiskušeno aktivnostjo pepsina (8400 U).

5.1.3.2 Vpliv aktivnosti pankreatina

Ravno tako smo želeli ugotoviti, kako koncentracija pankreatina vpliva na stabilnost antocianov. Ugotovili smo, da je odstopanje med različnima koncentracijama pankreatina zelo majhno, uporabili smo 2,5 mg (4×USP) pankreatina in desetkrat večjo količino pankreatina (25 mg). Iz rezultatov smo sklepali, da količina pankreatina nima vpliva na vsebnost skupnih antocianov. Med prvo uro delovanja pankreatina so bila odstopanja minimalna oziroma jih ni bilo, po drugi uri delovanja pankreatina smo sicer opazili malo večja odstopanja, vendar v povprečju le za okoli 3 %, kar pa je znotraj eksperimentalne napake. Zaradi minimalnega odstopanja smo v naših poskusih vedno uporabljali manjšo koncentracijo pankreatina.

5.2 ANALIZA SOKA GRANATNEGA JABOLKA MED PREBAVO *IN VITRO*

5.2.1 Skupne fenolne spojine

Ugotovili smo, da se vsebnost skupnih fenolnih spojin med pogoji prebave soka granatnega jabolka *in vitro* bistveno ne spreminja. Povprečna vsebnost skupnih fenolnih spojin med prebavo soka granatnega jabolka *in vitro* je bila 6,9 mmol/L, izraženo kot ekvivalent klorogenske kisline. Naši rezultati so pokazali, da je najvišja aktivnost pepsina (8400 U) na vseh stopnjah prebave prispevala k nekoliko višji izmerjeni vsebnosti skupnih fenolnih spojin (Slika 11). S pomočjo eksperimenta s slepim vzorcem (brez prisotnosti soka granatnega jabolka) smo potrdili, da dejansko lahko 10 % vrednosti skupnih fenolnih spojin pripišemo prisotnosti prebavnih encimov in žolčnih soli. Torej se v samem vzorcu granatnega jabolka vsebnost skupnih fenolnih spojin med simulacijo prebave *in vitro* ne spremeni.

Do podobnih zaključkov so prišli tudi Pérez-Vicente in sod. (2002), saj prav tako niso našli nobene razlike v vsebnosti skupnih fenolnih spojin pred in po prebavi soka granatnega jabolka s pepsinom. V literaturi pa ni podatkov o vplivu drugih prisotnih snovi (prebavnih encimov in žolčnih soli) na vsebnost skupnih fenolnih spojin.

5.2.2 Antioksidativna učinkovitost

Ugotovili smo, da se AOU med simulacijo prebave soka granatnega jabolka *in vitro* zvišuje, razlike pri uporabi različnih aktivnosti pepsina pa so zanemarljive. Naši rezultati so tudi pokazali, da dodani prebavni encimi in žolčne soli nimajo vpliva na izmerjene vrednosti AOU na nobeni izmed stopenj prebave.

Če primerjamo rezultate AOU z rezultati skupnih fenolnih spojin, lahko rečemo, da so rezultati po prvi stopnji prebave podobni, saj se nobena izmed izmerjenih količin praktično ni spremenila, razen pri najvišji aktivnosti pepsina (8400 U), kjer se je AOU že močno povečala, medtem ko se je vsebnost skupnih fenolnih spojin povečala le na račun prisotnosti prebavnega encima pepsina. Rezultati AOU in skupnih fenolnih spojin pa so se po drugi in tretji stopnji prebave precej razlikovali, saj je prišlo do precejšnjega povečanja AOU, pri čemer se vsebnost skupnih fenolnih spojin skorajda ni spremenila. Rezultati tako kažejo, da med simulacijo prebave *in vitro* nastajajo produkti, ki imajo večjo AOU kot snovi, ki so naravno prisotne v soku granatnega jabolka. Teh produktov v okviru magistrskega dela nismo identificirali. Tagliazucchi in sod. (2010) so ugotovili, da je aktivnost lovilcev radikalov polifenolov močno odvisna od vrednosti pH, z višjimi pH vrednostmi se aktivnost bistveno poveča. To pripisujejo deprotonaciji hidroksilnih skupin, prisotnih na aromatskih obročih fenolnih spojin. Prehod snovi iz kislega okolja želodca v

nevtravno črevesno okolje lahko povzroči strukturne spremembe fenolnih molekul, predvsem ionizaciji hidroksilnih skupin in posledično višji antioksidativni učinkovitosti.

5.2.3 Skupni antociani

Ugotovili smo, da se vsebnost skupnih antocianov v kisli želodčni fazi praktično ne spremeni, znatno pa se zniža vsebnost skupnih antocianov med simulacijo prebave v tankem črevesu. Po eni uri simulacije prebave v tankem črevesu se je količina skupnih antocianov znižala na približno 40 % začetne vrednosti, po dveh urah pa se je vsebnost antocianov zmanjša le na 22 % začetne vrednosti. Do podobnih rezultatov so prišli tudi Pérez-Vicente in sod. (2002). Ugotovili so, da se koncentracija antocianov med simulacijo prebave soka granatnega jabolka *in vitro* v želodcu rahlo poveča (za 10 %). Precejšen padec koncentracije antocianov pa so opazili po simulaciji prebave v tankem črevesu, in sicer na 15,3 % začetne vrednosti v soku. McDougall in sod. (2007) so v raziskavi ugotavljali stabilnost antocianov rdečega zelja med simulacijo gastrointestinalne prebave. Navajajo, da so antociani stabilni med simulacijo prebave v želodcu, po simulaciji prebave v tankem črevesu pa je njihova vsebnost 27 % začetne vrednosti. Podobno so Gil-Izquierdo in sod. (2002) ugotovili občutno zmanjšanje vsebnosti antocianinov v vzorcu jagod med simulacijo prebave *in vitro* v tankem črevesu, in sicer je le-ta iz začetnih 620 mg/kg sadja padla na 180 mg/kg sadja (kar je približno 30 % začetne vrednosti). McDougall in sod., 2005 so opravili podobno študijo na malinah in ugotovili, da so antociani nestabilni v pogojih simulacije zgornjega prebavnega trakta (požiralnik, želodec, dvanajstnik). Ugotovili so, da izpostavljenost različnim pH vrednostim, kisiku in temperaturi znatno zmanjša razpoložljivost antocianov v serumu, po drugi strani pa uživanje labilnih antocianov skupaj z drugimi živili lahko pomaga zaščititi le-te in se zato raven serumskih biološko razpoložljivih polifenolov bistveno ne zmanjša.

Da bi še dodatno preverili vpliv količine dodanih prebavnih encimov, smo simulacijo prebave granatnega jabolka *in vitro* izvedli z različnimi količinami pepsina in pankreatina, česar v literaturi nismo zasledili. Ugotovili smo, da je vpliv aktivnosti pankreatina na količino skupnih antocianov zanemarljiv. Aktivnost pepsina pa vpliva na koncentracijo antocianov na vseh stopnjah prebave soka granatnega jabolka *in vitro*; večja kot je aktivnost pepsina, nižja je koncentracija antocianov in obratno. Razlike so pričakovano večje po prvi stopnji prebave, saj na drugi stopnji prebave pH dvignemo in s tem pepsin denaturiramo.

5.2.4 Posamezni antociani

HPLC-DAD analiza soka granatnega jabolka je pokazala, da sok granatnega jabolka turškega porekla, ki smo ga uporabljali v naših eksperimentih, vsebuje največ C3G, in sicer 32,01 mg/L. Sledijo mu C3,5G s 20,07 mg/L, D3,5G s 13,41 mg/L, D3G s 6,04 mg/L, P3G

s 3,87 mg/L in P3,5G z 1,24 mg/L. Podobno analizo so opravili tudi Pérez-Vicente in sod. (2002) in ugotovili prisotnost šestih antocianov, to so P3,5G (4,79 mg/L), D3,5G (25,66 mg/L), D3G (7,19 mg/L), C3G (38,21 mg/L), P3G (7,05 mg/L), C3,5G in (57,81 mg/L). Vsebnost posameznih antocianov je bila izračunana iz vsebnosti skupnih antocianov, ki je pri njihovem eksperimentu znašala 141 mg/L svežega soka (izraženo kot ekvivalent C3G). Če primerjamo naše in njihove rezultate, lahko opazimo, da je v našem vzorcu največ C3G, v njihovem vzorcu pa najvišjo vsebnost doseže C3,5G.. Drugi najbolj zastopan antocian v našem vzorcu je C3,5G, v raziskavi Pérez-Vicente in sod. (2002) pa C3G, če naprej primerjamo ostale posamezne antociane, njihova vsebnost pada po količini enako kot v našem vzorcu. Različna je tudi vsebnost skupnih antocianov, saj v našem primeru leta znaša 242 mg/L in je skoraj dvakrat večja kot v soku, ki so ga uporabljali Pérez-Vicente in sod. (2002). Razliko lahko pripišemo različnemu izvoru sadežev, saj le-ti lahko vsebujejo različne količine posameznih antocianov, še posebej arili, ki dajejo soku barvo in so različnih barv od bele do temno rdeče. Drugačen je bil tudi način določanja vsebnosti posameznega antociana, saj Pérez-Vicente in sod. (2002) niso upoštevali možnosti prisotnosti antocianov, ki jih sicer s svojo HPLC-DAD analizo niso zaznali, a so lahko kljub temu prisotni v vzorcu. Poleg tega za posamezne antociane niso uporabili ustreznih standardov, ampak so vse preračunali iz površine vrha za C3G, ostale pa preračunali glede na vsebnost skupnih antocianov.

Naše raziskave so tudi pokazale, da se vsebnosti posameznih antocianov v soku granatnega jabolka med prebavo *in vitro* glede na stopnjo prebave in na začetne količine v soku različno znižujejo. Na prvi stopnji prebave *in vitro* so bile vsebnosti posameznih antocianov od 84 % do 100 %, po drugi stopnji od 3 % do 100 %, po tretji stopnji pa od 0 % do 99 % začetne količine v soku granatnega jabolka.

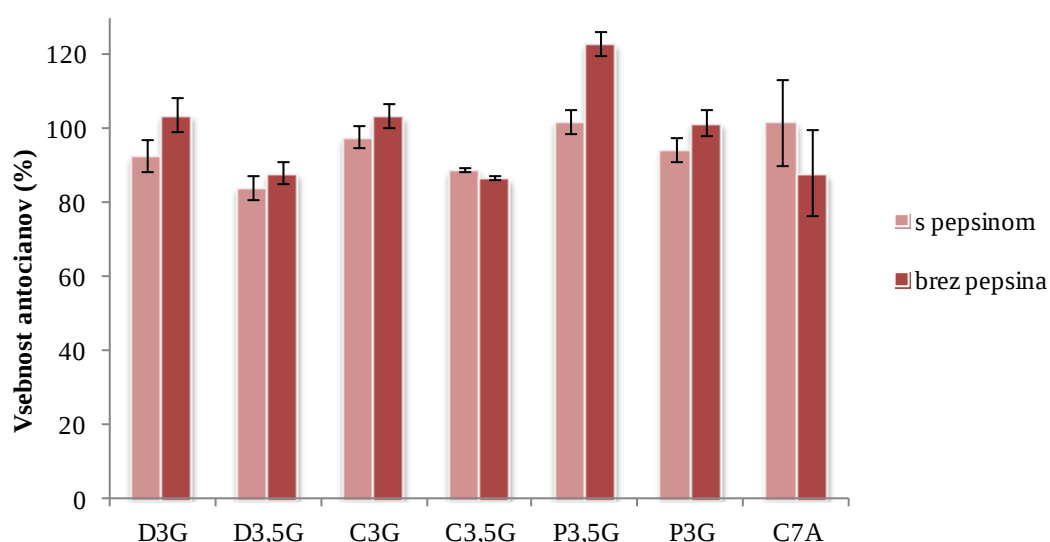
Največji padec vsebnosti po prvi stopnji prebave *in vitro* smo opazili pri D3,5G, in sicer za 14 % začetne vsebnosti v soku granatnega jabolka. Drugi največji padec vsebnosti smo zaznali pri C3,5G, in sicer za 11 % začetne vsebnosti v soku. Vsebnosti P3,5G in C7A na prvi stopnji prebave sta ostali nespremenjeni, vsebnost C3G pa se je zmanjšala samo za 2 % začetne vsebnosti. Za nekaj odstotkov se je znižala tudi vsebnost P3G in D3G, in sicer vsebnost P3G pade za 5,5 % ter D3G za 7 % začetne vsebnosti.

Po drugi stopnji prebave *in vitro* se je najbolj zmanjšala vsebnost D3G in D3,5G, in sicer na okoli 3 % začetne količine v soku. Vsebnost C7A je znašala 23 % in vsebnost C3G 27 % začetne vrednosti v soku. Vsebnost P3G (50 %) in C3,5G (54 %) sta se zmanjšali za približno polovico začetne vrednosti v soku. Količina P3,5G pa se na drugi stopnji simulacije prebave ni spremenila.

Po tretji stopnji prebave se povsem razgradijo D3G, D3,5G in C7A. V analiziranem vzorcu je ostalo le še 6 % C3G glede na začetno vsebnost v soku. Močno sta se znižali tudi vsebnosti P3G in C3,5G, v vzorcu je ostalo le še 23 % P3G in 35 % C3,5G glede na

začetno količino v soku. Vsebnost P3,5G pa se tudi na tej stopnji ni spremenila, saj ga je v analiziranem vzorcu ostalo še vedno 99 % začetne količine v soku.

Ugotavljali smo tudi vpliv eksperimentalnih pogojev (prevsem vpliv pH in temperature) na vsebnost posameznih antocianov in rezultate primerjali z rezultati simulacije prebave *in vitro* (Slike 17, 19 in 20). S slike 17 lahko razberemo, da so bile vsebnosti večine antocianov (D3G, D3,5G, C3G, P3,5G, P3G) po prvi stopnji encimske prebave *in vitro* nekoliko nižje (v povprečju za približno 9 %) kot vsebnosti posameznih antocianov, če smo sok granatnega jabolka izpostavili enakim eksperimentalnim pogojem (pH in temperatura), le da nismo dodali pepsina. Edini izjemi sta C3,5G in C7A, saj sta bili njuni vsebnosti po eksperimentu brez prisotnosti pepsina nekoliko nižji kot pri eksperimentu ob prisotnosti pepsina. Pri večini antocianov pa so bile razlike med obema eksperimentoma znotraj eksperimentalne napake.

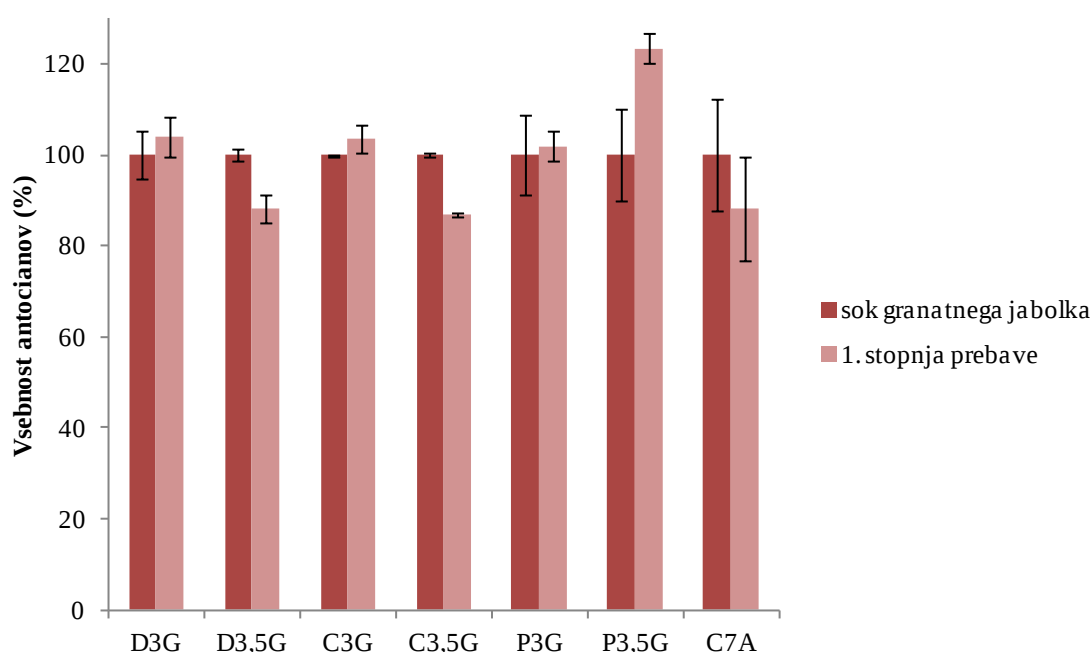


Slika 17: Vsebnost posameznih antocianov (D3G - delphinidin-3-glukozid, D3,5G - delphinidin-3,5-diglukozid, C3G - cianidin-3-glukozid, C3,5G - cianidin-3,5-diglukozid, P3,5G - pelargonidin-3,5-diglukozid, P3G - pelargonidin-3-glukozid, C7A - cianidin-7-arabinozid) po prvi stopnji prebave soka granatnega jabolka *in vitro* v želodcu in po prebavi brez uporabe pepsina. 100 % vrednost predstavljajo vsebnosti antocianov v svežem soku granatnega jabolka

Figure 17: The concentration of selected anthocyanins (D3G - delphinidin-3-glucoside, D3,5G - delphinidin 3,5-diglucoside, C3G - cyanidin-3-glucoside, C3,5G - cyanidin-3,5-diglucoside and P3,5G - pelargonidin-3,5-diglucoside, P3G - pelargonidin-3-glucoside, C7A - cyanidin-7-arabinoside) after the first stage of *in vitro* digestion of pomegranate juice and during digestion without pepsin. 100% of the value represents the content of anthocyanins in the fresh pomegranate juice.

Na prvi stopnji prebave se je sicer v obeh primerih (ob prisotnosti pepsina in brez njega) najbolj zmanjšala vsebnost D3,5G in C3,5G, medtem ko se vsebnost C7A pri simulaciji prve stopnje prebave z uporabo pepsina ni spremenila, pri eksperimentu brez pepsina pa je njegova vsebnost padla za 12 % začetne količine v soku. Vsebnost C3G je v obeh eksperimentih ostala nespremenjena, medtem ko je vsebnost P3G in D3G ostala nespremenjena po prvi stopnji prebave brez pepsina, pri simulaciji prebave s pepsinom pa se je zmanjšala za 6 % začetne vrednosti v soku.

Iz slike 18 lahko razberemo, da se na prvi stopnji prebave brez encimov najbolj zmanjšajo vsebnosti D3,5G, C3,5G in C7A, in sicer na približno 88 % začetne vsebnosti v soku. Količine ostalih analiziranih antocianov ostanejo praktično nespremenjene.

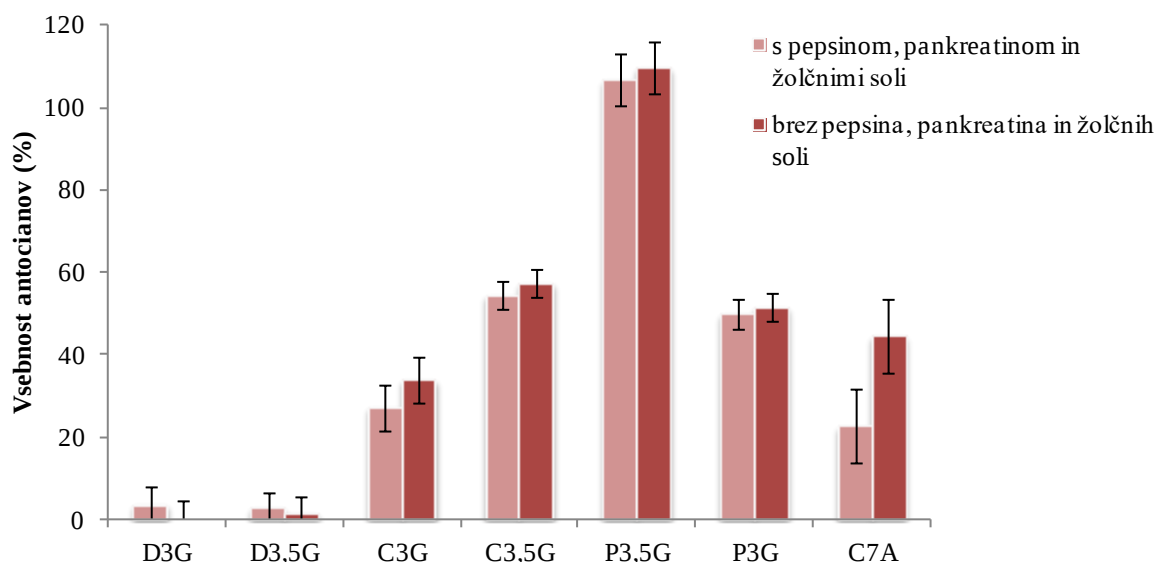


Slika 18: Vsebnost posameznih antocianov (D3G - delphinidin-3-glukozid, D3,5G - delphinidin-3,5-diglukozid, C3G - cianidin-3-glukozid, C3,5G - cianidin-3,5-diglukozid, P3,5G - pelargonidin-3,5-diglukozid, P3G - pelargonidin-3-glukozid, C7A - cianidin-7-arabinozid) v soku granatnega jabolka in po zaključku prve stopnje prebave (simulacije prebave v želodcu po 1 uri) brez pepsina

Figure 18: The concentration of selected anthocyanins (D3G - delphinidin-3-glucoside, D3,5G - delphinidin 3,5-diglucoside, C3G - cyanidin-3-glucoside, C3,5G - cyanidin-3,5-diglucoside and P3,5G - pelargonidin-3,5-diglucoside, P3G - pelargonidin-3-glucoside, C7A - cyanidin-7-arabinoside) in pomengranate juice and after the completion of the first stage of digestion (simulating the digestion in the stomach after 1 hour) without pepsin

Vsebnosti večine antocianov (C3G, C3,5G, P3,5G, P3G, C7A) so bile po drugi stopnji encimske prebave *in vitro* nekoliko nižje kot vsebnosti le-teh po tem, ko smo sok granatnega jabolka izpostavili enakim eksperimentalnim pogojem brez prisotnosti pepsina,

pankreatina in žolčnih soli (Slika 19). Edini izjemi sta bili D3G in D3,5G, ki pa sta bila po drugi stopnji prebave prisotna v zelo nizkih količinah blizu meje detekcije (D3G 3,6 % in D3,5G 2,7 % začetnih količin v soku granatnega jabolka), antociana D3G pa po enourni inkubaciji pri pH 7,5 brez prisotnosti prebavnih encimov sploh nismo več zaznali. Opazna je še razlika pri vsebnosti C7A, saj je bila le-ta v analiziranem vzorcu po eksperimentu brez prisotnosti encimov veliko višja (45 %) kot pri encimski prebavi, kjer je znašala 23 % začetne vsebnosti v soku. Nekoliko manjše odstopanje smo opazili pri C3G, saj je vsebnost le-tega po encimski prebavi znašala 27 %, pri eksperimentu brez prebavnih encimov pa 34 % začetne količine v soku. Vsebnosti C3,5G, P3,5G in P3G pa so bile neodvisne od prisotnosti/odsotnosti prebavnih encimov, saj so bile vrednosti znotraj eksperimentalne napake.

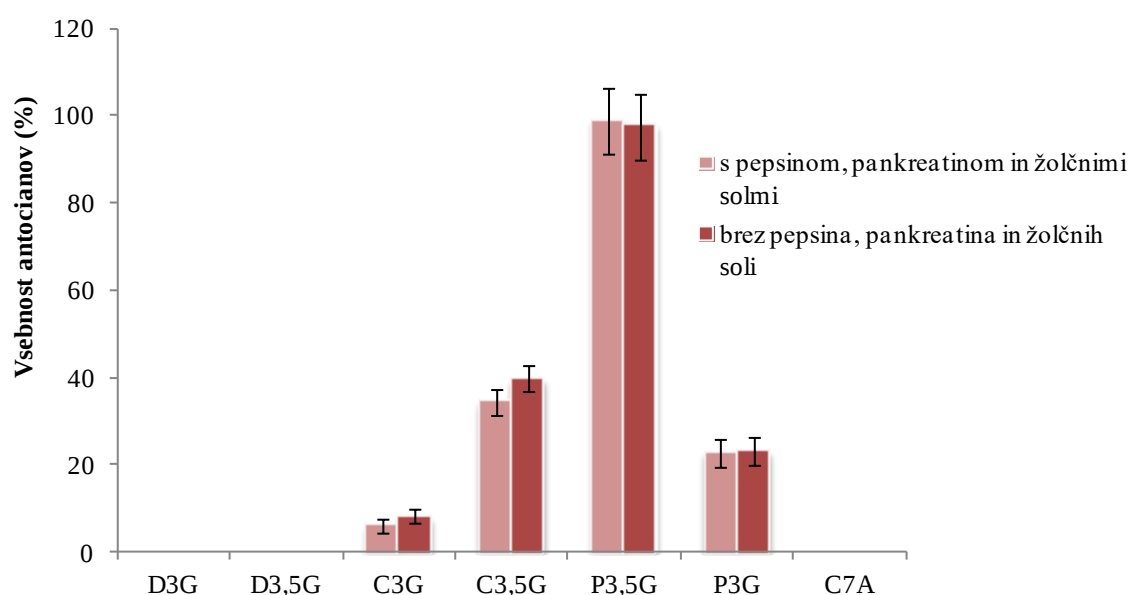


Slika 19: Vsebnost posameznih antocianov (D3G- delphinidin-3-glukozid, D3,5G- delphinidin-3,5-diglukozid, C3G- cianidin-3-glukozid, C3,5G- cianidin-3,5-diglukozid in P3,5G- pelargonidin-3,5-diglukozid, P3G- pelargonidin-3-glukozid, C7A- cianidin-7-arabinozid) po drugi stopnji prebave soka granatnega jabolka *in vitro* v tankem črevesu in po prebavi brez pepsina, pankreatina in žolčnih soli. 100 % vrednost predstavljajo vsebnosti antocianov v svežem soku granatnega jabolka

Figure 19: The concentration of selected anthocyanins (D3G - delphinidin-3-glucoside, D3,5G - delphinidin 3,5-diglucoside, C3G - cyanidin-3-glucoside, C3,5G - cyanidin-3,5-diglucoside and P3,5G - pelargonidin-3,5-diglucoside, P3G - pelargonidin-3-glucoside, C7A - cyanidin-7-arabinoside) after the second stage of *in vitro* digestion of pomegranate juice and during digestion without pepsin, pancreatin and bile salts. 100% of the value represents the content of anthocyanins in the fresh pomegranate juice

Po tretji stopnji prebave so vsebnosti C3G, C3,5G, P3G in P3,5G praktično neodvisne od prisotnosti prebavnih encimov, ostali antociani (D3G, D3,5G, C7A) pa so se v obeh primerih popolnoma razgradili in so njihove vsebnosti pod našo mejo detekcije (Slika 20).

Od vseh antocianov je le P3,5G ostal stabilen med celotno simulacijo prebave *in vitro*, ne glede na to, ali smo jo izvajali v prisotnosti prebavnih encimov ali brez njih. Po drugi strani pa so se antociani D3G, D3,5G in C7A na zadnji stopnji prebave popolnoma razgradili v obeh prebavnih modelih (ob prisotnosti encimov in brez njih). Vsebnosti ostalih analiziranih antocianov C3G, C3,5G, P3,5G in P3G pa so bile neodvisne od prisotnosti encimov.



Slika 20: Vsebnost posameznih antocianov (D3G- delphinidin-3-glukozid, D3,5G- delphinidin-3,5-diglukozid, C3G- cianidin-3-glukozid, C3,5G- cianidin-3,5-diglukozid in P3,5G- pelargonidin-3,5-diglukozid, P3G- pelargonidin-3-glukozid, C7A- cianidin-7-arabinozid) po tretji stopnji prebave soka granatnega jabolka *in vitro* v tankem črevesu in po prebavi brez pepsina, pankreatina in žolčnih soli. 100 % vrednost predstavljajo vsebnosti antocianov v svežem soku granatnega jabolka glede na stopnjo prebave

Figure 19: The concentration of selected anthocyanins (D3G - delphinidin-3-glucoside, D3,5G - delphinidin 3,5-diglucoside, C3G - cyanidin-3-glucoside, C3,5G - cyanidin-3,5-diglucoside and P3,5G - pelargonidin-3,5-diglucoside, P3G - pelargonidin-3-glucoside, C7A - cyanidin-7-arabinoside) after the third stage of *in vitro* digestion of pomegranate juice and during digestion without pepsin, pancreatin and bile salts. 100% of the value represents the content of anthocyanins in the fresh pomegranate juice

Podobno kot Pérez-Vicente in sod., 2002 ugotavljamo, da so najverjetnejši razlogi za visoko izgubo antocianov pretvorbe le-teh v nekatere neobarvane oblike, predvsem oksidacija in razgradnja v druge kemijske spojine, ki se lahko izognejo detekciji pod danimi pogoji, po drugi strani pa produkti ravno tako ohranjajo antioksidativne lastnosti, saj se med simulacijo prebave *in vitro* AOU ne zmanjšuje, kar so pokazali naši predhodni rezultati.

Ti rezultati so tudi v skladu z zaključki večih *in vivo* raziskav, ki so zbrane v preglednem članku Manach in sod. (2005). Ugotavljajo namreč, da je v urinu in plazmi prostovoljcev prisotnih manj kot 1 % zaužitih antocianov, ne glede na to, v kakšni obliki so jih le-ti zaužili (rastliski ekstrakti, sok, vino ali sadeži), kar kaže na to, da antociani med prebavo, absorpcijo in metabolizmom tvorijo vmesne ali končne razgradne produkte. Zanimivi sta študiji, izvedeni na podganah (Ichiyanagi in sod., 2004; Tsuda in sod., 1999), kjer so po zaužitju posameznih antocianov (D3G in C3G) v njihovi plazmi identificirali razgradna produkta, protokatehulno kislino in 4-hidrobenzojsko kislino. Glavni produkt razgradnje cianidinov, protokatehulno kislino, so določili tudi Vitaglione in sod. (2007). Podatki iz te študije razložijo tudi nizko prisotnost antocianov v krvni plazmi in urinu ljudi, saj se skoraj 73 % zaužitih cianidinov metabolizira do protokatehajske kisline. Ti rezultati kažejo, da so zaužiti antociani v krvnem obtoku na voljo predvsem kot derivati fenolnih kislin. Vendar pa ostaja usoda teh derivatov neznana. Trenutno prevladuje mnenje, da se antociani najverjetneje presnavljajo v njihove komponente fenolnih kislin.

Pomembna je tudi študija Woodward in sod. (2011), kjer so spremljali usodo izbranih antocianov (P3G, C3G, pelargonidina in cianidina) med simulacijo prebave *in vitro*. Ugotovili so, da so izbrani antociani med prebavo *in vitro* v želodcu stabilni, vendar pa se razgradijo med prebavo *in vitro* v črevesu. Poročajo tudi, da razgradnja izbranih antocianov ni povzročila nastanka njihovih značilnih razgradnih produktov fenolnih kislin. Do podobnih zaključkov smo z našo študijo prišli tudi sami, saj so bili vsi antociani, ki smo jih spremljali med simulacijo prebave granatnega jabolka *in vitro* v želodcu, dokaj stabilni. Po drugi strani pa se rezultati naše raziskave od njihovih nekoliko bolj razlikujejo med prebavo v tankem črevesu. Woodward in sod. (2011) tako navajajo zmanjšanje vsebnosti C3G za 30 % med simulirano prebavo v dvanajstniku po 2 h. V naši raziskavi je bilo zmanjšanje vsebnosti C3G po dveurni simulaciji prebave v tankem črevesu veliko večje, in sicer kar za 94 % začetne vsebnosti v soku. V isti raziskavi so ovrednotili tudi razgradnjo P3G. Ugotovili so, da se njegova vsebnost po 2 h simulacije prebave v dvanajstniku zmanjša za 15 %. V naši raziskavi pa se je vsebnost le-tega po simulaciji prebave *in vitro* v tankem črevesu znižala kar za 77 %. Med omenjenima raiskavama je potrebno poudariti pomembno razliko, in sicer so Woodward in sod. (2011) simulacijo prebave v dvanajstniku izvajali pri pH 6,7, mi pa smo simulacijo prebave v tankem črevesu izvajali pri pH 7,5, kar je bolj običajen pristop pri izvajanju prebavnih modelov *in vitro*. Ker so antociani bolj stabilni v kislem okolju in smo iz naših eksperimentov ugotovili, da ima ključni vpliv na spremembo vsebnosti posameznih antocianov ravno sprememba vrednosti pH, lahko sklepamo, da je razlika v stabilnosti C3G in P3G posledica izvajanja eksperimentov pri različnih vrednostih pH.

Po drugi strani pa smo prišli do podobnih zaključkov kot Woodward in sod. (2011), ko so ugotavljali vpliv prebavnih encimov na stabilnost antocianov. Ugotovili so namreč, da je bila razgradnja antocianov v obeh prebavnih modelih z ali brez encimov podobna, kar je v

skladu z našimi rezultati in kaže na to, da je prišlo do spontane razgradnje antocianov med prebavo. V kolikšni meri so antociani hidrolizirani s človeškimi prebavnimi encimi *in vivo* pa je potrebno še ugotoviti.

Če povzamemo, se vsebnosti posameznih antocianov med prebavo soka granatnega jabolka *in vitro* glede na stopnjo prebave in na začetne količine v soku različno znižujejo. Vsebnost skupnih antocianov se med simulacijo prebave v tankem črevesu zniža, koncentracija skupnih fenolnih snovi ostaja skoraj enaka, AOU pa se med simulacijo prebave močno poveča (predvsem v fazi simulacije prebave v tankem črevesu). Iz rezultatov lahko sklepamo, da se antociani v soku granatnega jabolka med prebavo *in vitro* pretvorijo v druge antioksidante, ki vplivajo na povišanje AOU. Ugotovili smo tudi, da na vsebnost posameznih antocianov najbolj vpliva sprememba vrednosti pH in ne prisotnost prebavnih encimov.

V sklopu magistrskega dela smo potrdili večino zastavljenih delovnih hipotez, saj se količina skupnih antocianov med simulacijo prebave v želodcu praktično ni spremenila, medtem ko se je njihova vsebnost med simulacijo prebave v tankem črevesu močno zmanjšala. Potrdili smo, da na rezultate vpliva tako čas simulacije prebave kot v manjši meri tudi aktivnost pepsina. Aktivnost pankreatina po drugi strani ni imela bistvenega vpliva na vsebnost skupnih antocianov. Potrdili smo tudi hipotezo, da se bo vsebnost posameznih antocianov med simulacijo prebave različno spreminjala. Tudi rezultati določanja skupnih fenolnih spojin so v skladu s postavljenimi hipotezami, saj se njihova količina med simulacijo prebave praktično ni spremenila. Po drugi strani pa moramo ovreči hipotezo glede spreminjanja AOU, saj se je le-ta predvsem med simulacijo prebave v tankem črevesu močno povečala, česar v naših hipotezah nismo predvideli.

5.3 SKLEPI

Na podlagi rezultatov lahko oblikujemo naslednje sklepe:

- Ustrezen čas trajanja simulacije prebave soka granatnega jabolka *in vitro* v želodcu je 1 ura (prva stopnja prebave).
- Ustrezen čas trajanja simulacije prebave soka granatnega jabolka *in vitro* v tankem črevesu je 2 uri, razdelili smo ga na drugo in tretjo stopnjo prebave, vsaka stopnja traja po 1 uro.
- Primerna aktivnost pepsina v 5 mL soka granatnega jabolka je 8400 U.

- Primerna količina pankreatina v 5 mL soka granatnega jabolka je 2,5 mg skupaj s 15 mg žolčnega ekstrakta v 2 mL 100 mM NaHCO₃.
- AOU se med simulacijo prebave močno poveča, še posebej v fazi simulacije prebave v tankem črevesu.
- Vsebnost skupnih antocianov se v kisli želodčni fazi ne spremeni, znatno pa se zniža vsebnost skupnih antocianov (do 78 %) med simulacijo prebave v tankem črevesu.
- Aktivnost pepsina vpliva na koncentracijo skupnih antocianov na posameznih stopnjah prebave, višja kot je aktivnost pepsina, nižja je koncentracija skupnih antocianov in obratno.
- Vpliv aktivnosti pankreatina je na koncentracijo skupnih antocianov zanemarljiva.
- Vsebnost posameznih antocianov, določenih s HPLC/DAD metodo, je ostala nespremenjena med prebavo *in vitro* v želodcu.
- Med simulacijo prebave soka granatnega jabolka *in vitro* samo vsebnost P3,5G v vseh stopnjah ostane nespremenjena, medtem ko se D3G in D3,5G po dveh urah simulacije prebave v tankem črevesu popolnoma razgradita.
- Razlike med encimsko prebavo in prebavo brez encimov so zanemarljive.

6 POVZETEK

6.1 POVZETEK

V okviru magistrskega dela smo ocenili stabilnost antocianov iz soka granatnega jabolka z uporabo simulacije prebave *in vitro*. Le-ta posnema fizikalno-kemijske in biokemijske razmere, s katerimi se snovi srečujejo v prebavnem traktu. Glavni cilj tega dela je bil ocena stabilnosti antocianov med prebavo *in vitro* v želodcu in tankem črevesu z ustrezno dodanimi encimi (pepsin ali pankreatin in ekstrakt žolčnih soli).

Pri našem delu smo kot vzorec uporabili sok granatnega jabolka, ki smo ga nakisali na pH 2,0 in mu dodali ustrezno količino pepsina. Tako pripravljeno mešanico smo ob stalnem stresanju inkubirali 1 h pri 37 °C in na ta način simulirali prvo fazo prebave v želodcu. Po končani inkubaciji smo dvignili pH na 5,3 ter dodali ustrezno količino pankreatina in žolčnih soli ter ponovno dvignili pH na 7,5. Raztopino smo nadalje ob stalnem stresanju inkubirali 2 h pri 37 °C in na ta način simulirali drugo fazo prebave v tankem črevesu. Med postopkom simulacije prebave *in vitro* smo mešanico v določenih časovnih presledkih vzorčili ter analizirali z metodo za določanje skupnih fenolnih spojin, luminescenčno metodo za določanje antioksidativne učinkovitosti (AOU), metodo za določanje skupnih antocianov in z metodo HPLC/DAD za določanje posameznih antocianov.

Simulacijo prebave *in vitro* smo razdelili na tri stopnje. Prva stopnja je bila simulacija prebave v želodcu, ki je trajala 1 h, druga stopnja je bila simulacija prebave v tankem črevesu po 1 h in tretja stopnja prebave je bila simulacija prebave v tankem črevesu po 2 h. Z metodo za določanje skupnih antocianov smo ugotovili, da se vsebnost antocianov na prvi stopnji ni bistveno spremenila. Največji padec koncentracije antocianov se zgodi med drugo stopnjo, takoj ko zvišamo pH na vrednost 7,5, kasneje pa se koncentracija antocianov znižuje do 22 % začetne vsebnosti v soku granatnega jabolka. Ugotovili smo še, da aktivnost pepsina predvsem na prvi stopnji prebave vpliva na stabilnost antocianov, višja kot jenjegova aktivnost, nižja je koncentracija skupnih antocianov in obratno, razlike pa na drugi in tretji stopnji prebave pričakovano postanejo zanemarljive. Po drugi strani pa so naše analize pokazale, da količina pankreatina nima vpliva na vsebnost skupnih antocianov.

Vsebnost skupnih fenolnih spojin se med pogoji prebave soka granatnega jabolka *in vitro* ne spremeni, ne glede na aktivnost pepsina, rahlo povečanje signala lahko pripišemo prisotnosti prebavnih encimov. Po drugi strani pa se AOU med simulacijo prebave *in vitro* zvišuje, še posebej med drugo in tretjo stopnjo prebave (simulacija prebave v tankem črevesu).

Vsebnost antocianov smo med simulacijo prebave soka granatnega jabolka *in vitro* spremljali še s HPLC analizo. Iz naših rezultatov lahko razberemo, da sok granatnega jabolka vsebuje največ cianidin-3-glukozid (C3G), sledijo mu cianidin-3,5-diglukozid (C3,5G), delphinidin-3,5-diglukozid (D3,5G), delphinidin-3-glukozid (D3G), pelargonidin-3-glukozid (P3G) in pelargonidin-3,5-diglukozid (P3,5G). Na prvi stopnji simulacije prebave *in vitro* so vsebnosti posameznih antocianov ostale nespremenjene, po drugi in tretji stopnji simulacije prebave pa so se vsebnosti večine antocianov znižale. Edina izjema je bil antocian P3,5G, saj je njegova vsebnost med simulacijo prebave soka *in vitro* v vseh stopnjah ostala nespremenjena. Po drugi strani pa sta se D3G in D3,5G po dveh urah simulacije prebave v tankem črevesu popolnoma razgradila.

Ugotavljali smo tudi vpliv fizikalno-kemijskih pogojev (pH in temperatura) na stabilnost posameznih antocianov. Eksperiment smo izvajali pri enakih pogojih kot simulacijo prebave *in vitro*, le da v sok nismo dodali prebavnih encimov (pepsin in pankreatin) ter žolčnih soli. Prišli smo do podobnih rezultatov kot pri simulaciji prebave z uporabo prebavnih encimov, torej lahko sklepamo, da ima vpliv na spremembo vsebnosti posameznih antocianov predvsem sprememba vrednosti pH.

6.2 SUMMARY

In the master thesis we evaluated the stability of anthocyanins from pomegranate juice during *in vitro* digestion. We provided the physico-chemical and biochemical conditions which are similar to that in the gastrointestinal tract. The main objective of this work was to evaluate the stability of anthocyanins during *in vitro* digestion in the stomach and small intestine by using appropriate addition of enzymes (pepsin or pancreatin and bile salt extract).

In our work, we used pomegranate juice as a sample that was acidified to pH 2.0 and provided with the appropriate amount of pepsin. The mixture was then incubated at 37 °C in a covered shaking water bath for 1 hour. This was the first phase of simulated digestion in stomach. After finishing the incubation, we adjusted the pH to 5.3 by adding an appropriate amount of pancreatin and bile salts and again adjusted the pH to 7.5. The solution was further incubated at 37 °C in a covered shaking water bath for 2 hours. This was the second phase of simulated digestion in the small intestine. During the experiment, the mixture was examined every 15 minutes and analysed on the total phenolics, antioxidant activity (AOU) by means of luminescence method, total anthocyanins and individual anthocyanins (HPLC/DAD method).

In vitro digestion was divided into three stages. The first stage was simulation of digestion in the stomach, which lasted for one hour, the second stage was simulation of digestion in the small intestine for 1 hour, and the third stage of digestion was the simulation of

digestion in the small intestine for 2 hours. The total anthocyanins didn't change at all during the first stage. The largest decline in the concentration of anthocyanins occurred during the second stage, once the pH was adjusted to 7.5. Later the concentration of anthocyanins decreased exponentially to 22 % of initial value in pomegranate juice. Pepsin activity affected the concentration of anthocyanins during all digestion stages, the higher the activity of the pepsin, the lower was the concentration of anthocyanins, although the differences were very small. On the other hand, the influence of pancreatin activity on total anthocyanins was negligible.

Total phenolics were not lowered during *in vitro* digestion conditions in a simulated stomach and small intestine phase, regardless of the pepsin activity, a slight increase in signal can be attributed to the presence of digestive enzymes. AOU increased during the simulated *in vitro* digestion especially during second and third phase digestion in small intestine.

The *in vitro* digestion of the most abundantly present anthocyanins was followed by HPLC analytic technique. Results show that cyanidin-3-gluikozid (C3G) is the main pigment in pomegranate juice, followed by cyanidin-3,5-diglucoside (C3,5G), delphinidin 3,5-diglucoside (D3,5G), delphinidin-3-gluikozid (D3G), pelargonidin-3-glucoside (P3G) and pelargonidin-3,5-diglucoside (P3,5G). The amount of all selected anthocyanins was not changed during the stomach digestion phase. Most of determined anthocyanins were significantly lowered during the small intestine phase with enzymes. Only P3,5G remained intact during both phases of *in vitro* digestion with enzymes, whereas D3G and D3,5G were completely decomposed during 2-hours of intestine phase.

We also determined the effect of the physico-chemical conditions (pH and temperature) on the stability of individual anthocyanins. Experiments were performed under the same conditions as the simulation of *in vitro* digestion except that the juice was not provided with the digestive enzymes (pepsin and pancreatin) and bile salts. We have come to similar conclusions as in the simulation of digestion using digestive enzymes. It can be concluded that the main influence on the change of all selected anthocyanins can be mainly attributed to the change in pH.

7 VIRI

- Abdel – Hameed E.S.S. 2009. Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chemistry*, 114: 1271-1277
- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-31
- Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. *Farmacevtski vestnik*, 48: 573-589
- Alexandropoulou I., Komaitis M., Kapsokefalou M. 2006. Effects of iron, ascorbate, meat and casein on the antioxidant capacity of green tea under conditions of *in vitro* digestion. *Food Chemistry*, 94: 359-365
- Ananga A., Georgiev V., Ochieng J., Phills B., Tsolova V. 2013. Production of anthocyanins in grape cell cultures: a potential source of raw material for pharmaceutical, food, and cosmetic industries. V: The mediterranean genetic code-grapevine and olive. Poljuha D., Sladonja B. (eds.). Rijeka, InTech: 247-287
- Aviram M., Dornfeld L., Rosenblat M., Volkova N., Kaplan M., Coleman R., Hayek T., Presser D., Fuhrman B. 2000. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71: 1062–1076
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99: 191-203
- Baldini M., Ban D., Bandelj D., Arbeiter A., Bučar-Miklavčič M., Butinar B., Cigić B., Ferenac M., Godena S., Gunde-Cimerman N., Hladnik M., Krapac M., Lukić M., Miklavčič A., Nečemer M., Ota A., Pikel V., Poklar Ulrih N., Prgomet Ž., Skrt M., Smole Možina S., Ulrih V., Valenčič V., Zgrablić B. 2015. Granatno jabolko (*Punica granatum* L.), žižola (*Ziziphus jujuba* Mill.), mandelj (*Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb), navadna jagodičnica (*Arbutus unedo* L.) in navadni koprivovec (*Celtis australis* L.) v Istri. Koper, Univerzitetna založba Annales: 138 str.

- Bhowmik D., Gopinath H., Pragati Kumar B., Duraivel S., Aravind. G., Sampath Kumar K. P. 2013. Medicinal uses of *Punica granatum* and its health benefits. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 1, 5: 28-35
- Boisen S., Eggum B.O., 1991. Critical evaluation of *in vitro* methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. Nutrition Research Reviews, 4, 1: 141-162
- Bruneton J. 1999. Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. 2nd ed. Paris, Lavoisier: 310-331, 370-389
- Castañeda – Ovando A., Pacheco – Hernández M. L., Páez – Hernández M. E., Rodríguez J. A., Gálan – Vidal C.A. 2009. Chemical studies of anthocyanins: a review. Food Chemistry, 113: 859-871
- Cigić B., Rudan Tasić D. 2006. Antioksidanti in prooksidanti. V: Karcinogene in antikarcinogene komponente v živilih. 24. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana, 9.-10. november 2006. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 103-116
- Cuccioloni M., Mozzicafreddo M., Sparapani L., Spina M., Eleuteri A.M., Fioretti E., Angeletti M. 2009. Pomegranate fruit components modulate human thrombin. Fitoterapia, 80: 301–305
- Dai J., Mumper R. J. 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules, 15: 7313-7352
- Delgado-Vargas F., Paredes-López O. 2003. Natural colorants for food and nutraceutical uses. 1st ed. Boca Raton, CRC Press: 327 str.
- Di Mambro V. M., Azzolini A. E. C. S., Valim Y. M. L., Fonseca M. J. V. 2003. Comparison of antioxidant activities of tocopherols alone and in pharmaceutical formulations. International Journal of Pharmaceutics, 262: 93-99
- Finaud J., Lac G., Filaire E. 2006. Oxidative stress: relationship with exercise and training. Sports Medicine, 36, 4: 327-358
- Gadže J., Voća S., Čmelik Z., Mustač I., Ercisli S., Radunić M. 2012. Physico-chemical characteristics of main pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivares grown in dalmatia region of Croatia. Journal of Applied Botany and Food Quality, 85: 202–206

- Garrett D.A., Failla M.L., Sarama R.J. 1999. Development of an *in vitro* digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 4301-4309
- Georgetti S.R., Casagrande R., Di Mambro V.M., Azzolini A.E.C.S., Fonseca M.J.V. 2003. Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. *AAPS Pharmacology Science*, 5, 2: 1-5
- Gil-Izquierdo A., Zafrilla P., Tomás-Barberán F. A. 2002. An *in vitro* method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract. *European Food Research and Technology*, 214: 155–159
- Green R.J., Murphy A.S., Schulz B., Watkins B.A., Ferruzzi M.G. 2007. Common tea formulations modulate *in vitro* digestive recovery of green tea catechins. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51: 1152-1162
- Halliwell B. 2001. Free radicals and other reactive species in disease. V: *Encyclopedia of life sciences*. Online ed. Hoboken, John Wiley & Sons, Inc.: 7 str.
http://healtheron.publishpath.com/Websites/healtheron/images/Oxidative_stress.pdf (15.9.2015)
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 2007. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. Oxford, Clarendon Press: 30-78
- Hansen M. B. 2003. Neurohumoral control of gastrointestinal motility. *Physiological Research*, 52: 1-30
- Harborne J. B., Williams C. A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55: 481-504
- Hitachi High-Tech: Diode array detector. 2014. Tokio, Hitachi High-Technologies Corporation: 1 str.
http://www.hitachi-hitec.com/global/science/lc/lc_basic_7.html (5. jul. 2014)
- Howell A. B., D'Souza D. H. 2013. The pomegranate: effects on bacteria and viruses that influence human health. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, doi: 10.1155/2013/606212: 11 str.
- Hribar U., Poklar Ulrih N. 2014. The metabolism of anthocyanins. *Current Drug Metabolism*, 15: 3-13

- Huang D., Ou B., Prior R. L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6: 1841–1856
- Hur S. J., Lim B. O., Decker E. A., McClements D. J. 2011. *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125: 1-12
- Ibrahim M.H., Jaafar H.Z.E., Rahmat A., Rahman Z.A. 2011. Involvement of nitrogen on flavonoids, glutathione, anthocyanin, ascorbic acid and antioxidant activities of Malaysian medicinal plant *Labisia pumila* Blume (Kacip Fatimah). *International Journals of Molecular Sciences*, 13: 393-408
- Ichiyanagi T., Rahman M.M., Kashiwada Y., Ikeshiro Y., Shida Y., Hatano Y., Matsumoto H., Hirayama M., Tsuda T., Konishi T. 2004. Absorption and metabolism of delphinidin 3-O-beta-D-glucopyranoside in rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 36,7: 930-937
- Ismail T., Akhtara S., Riaz M., Ismail A. 2014. Effect of pomegranate peel supplementation on nutritional, organoleptic and stability properties of cookies. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65, 6: 661-666
- Jackman R. L., Smith J. L. 1996. Anthocyanins and betalains. V: Natural food colorants. 2nd ed. Hendry G.A.F., Houghton J.D. (eds.). Glasgow, Blackie Academic Press: 244-309
- Känhkönen M.P., Heinonen M. 2003. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3: 628–633
- Katalinić V., Milos M., Modun D., Musić I., Boban M. 2004. Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+) catechin. *Food Chemistry*, 86: 593-600
- Klepac T., Poklar Ulrih N., Pogačnik L. 2010. Optimization of chemiluminescence assay for determination of antioxidant capacity of food extracts. V: Analytical and nanoanalytical methods for biomedical and environmental sciences : proceedings of IC-ANMBES 2010. Brasov, June 18th-20th, 2010. Florescu M. (ed.). Brasov, Transilvania University Press: 88-99
- Kong F., Singh R. P. 2008. Disintegration of solid foods in human stomach. *Journal of Food Science*, 73, 5: 1267-1280
- Koren A. 2004. Presnova, termoregulacija in prebava. Skripta. 2. izd. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 155 str.

- Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26.-27. okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-21
- Krasowska A., Rosiak D., Szkapiak K., Oswiecimska M., Witek S., Lukaszewicz M. 2001. The antioxidant activity of BHT and new phenolic compounds PYA and PPA measured by chemiluminescence. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 6: 71-81
- Kreft S., Pečar S. 1998. Vloga radikalov pri obolenjih. *Farmacevtski vestnik*, 49: 469-481
- Kregar I. 1996. Kromatografske metode. V: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 609-632
- Langebartels C., Schraudner M., Heller W., Sandermann H. 2002. Oxidative stress and defense reactions in plants to air pollutants and UV-B radiation V: Oxidative stress in plants. Inze D., Montagu M.V. (eds.). London, Taylor & Francis Group: 129-169
- Lee J., Durst R.W., Wrolstad R.E. 2002. Impact of juice processing on blueberry anthocyanins and polyphenolics: comparison of two pretreatments. *Journal of Food Science*, 67, 5: 1660-1667
- Lee J., Durst R.W., Wrolstad R.E. 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88: 1269-1278
- Lee J., Rennakera C., Wrolstad R.E. 2008. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, 110: 782-786
- 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 Molecular Medicine*, 14, 4: 840-860
- Macheix J.J., Fleuriet A., Billot J. 1990. Fruit phenolics. Boca Raton, CRC Press: 392 str.
- Malik A., Afaq F., Sarfaraz S., Adhami V. M., Syed D. N., Mukhtar H., 2005, Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 41: 14813-14818

- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79: 727-447
- Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Rémésy C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81,1: 230-242
- Martin-Hernandez M.C., Juarez M. 1993. Chromatography. V: *Encyclopedia of food science, food technology and nutrition*. Vol. 2. Macrae R., Robinson R.K., Sadler M.J. (eds.). London, Academic Press: 954-972
- McDougall G.J., Dobson P., Smith P., Blake A., Stewart D. 2005. Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an *in vitro* digestion system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 5896-5904
- McDougall G.J., Fyffe S., Dobson P., Stewart D. 2007. Anthocyanins from red cabbage – stability to simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, 68: 1285-1294
- Minekus M., Alminger M., Alvito P., Balance S., Bohn T., Bourlieu C., Carrière F., Boutrou R., Corredig M., Dupont D., Dufour C., Egger L., Golding M., Karakaya S., Kirkhus B., Le Feunteun S., Lesmes U., Macierzanka A., Mackie A., Marze S., McClements D. J., Ménard O., Recio I., Santos C. N., Singh R. P., Vegarud G. E., Wickham M. S. J., Weitschiesaa W., Brodkorb A. 2014. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*, 5: 1113-1124
- Morton J. F. 1987. *Fruits of warm climates*. Miami, Florida Flair Books: 352-355
- Moughan P.J., Stevens B.R. 2013. Digestion and absorption of protein. V: *Biochemical, physiological, and molecular aspects of human nutrition*. 3rd ed. Stipanuk M. H., Caudill M. A. (eds.). St. Louis, Elsevier Saunders: 162-175
- Navas M.J., Jiménez A.M. 2007. Chemiluminescent methods in olive oil analysis. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84: 405-411
- Newman R. A., Ephraim L. P., Lynn Block M. 2007. *Pomegranate: the most medicinal fruit*. Laguna Beach, Basic Health Publications: 120 str.
- Omar N. A., Praveena S. M., Aris A. Z., Hashim Z. 2013. Bioavailability of heavy metal in rice using *in vitro* digestion model. *International Food Research Journal*, 20: 2979-2985

- Osredkar J. 2012. Oksidativni stres. Zdravstveni vestnik, 81: 393–406
- Panda S. K. 2012. Assay guided comparison for enzymatic and non-enzymatic antioxidant activities with special reference to medicinal plants. V: Antioxidant enzyme. El-Missiry M. A. (ed.). Rijeka, InTech: 381-400
- Patrasa A., Bruntona N. P., O'Donnellb C., Tiwari B.K. 2010. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. Trends in Food Science & Technology, 21: 3-11
- Pérez-Vicente A., Gil-Izquierdo A., García-Viguera C. 2002. *In vitro* gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 2308-2312
- Pogačnik L., Poklar Ulrih N. 2012. Application of optimized chemiluminescence assay for determination of the antioxidant capacity of herbal extracts. Luminescence, 27: 505-510
- Prior R.L., Wu X., Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 4290-4302
- Prošek M., Golc Wondra A. 1997. Validacija analiznih metod v tenkoplastni in tekočinski kromatografiji. Ljubljana, Kemijski inštitut: 173-214
- Rast Istre. 2014. Granatno jabolko (*Punica granatum*). Projekt Rast Istre: 1 str.
<http://www.rast-istre.eu/sl/stare-sadne-vrste/granatno-jabolko-punica-granatum>
(12.jun.2015)
- Ryan L., O'Connell O., O'Sullivan L., Aherne S.A., O'Brien N.M. 2008. Micellarisation of carotenoids from raw and cooked vegetables. Plant Foods for Human Nutrition, 63: 127-133
- Schulman S. G., Schulman J. M., Rakicioglu Y. 2001. The nature of chemiluminescent reactions. V: Chemiluminescence in analytical chemistry. Garcia-Campana A.M., Baeyens W.R.G. (eds.). New York, CRC Press: 67-82
- Schwinn K. E., Davies K. M. 2004. Flavonoids. V: Plant pigments and their manipulation. Davies K.M. (ed.). Oxford, Blackwell Publishing (Annual Plant Reviews, 14): 92-149

- Scott J. 2006 Adaption of the Folin-Ciocalteu method to measure polyphenols via the Astoria Pacific Analyzer 2. Pittsburgh, Fisher Scientific: 1 str.
http://www.fishersci.com/wps/portal/CMSTATIC?href=Scientific/researchAnalytical/ProductsServices/Food_Diagnostics/sc_rea_AdaptionoftheFolinC_080706_1053.jsp&store=Scientific&segment=researchAnalytical (1. Jun. 2008)
- Singh H., Gallier S. 2014. Processing of food structures in the gastrointestinal tract and physiological responses. V: Food structures, digestion and health. Boland M., Golding M., Singh H. (eds.). London, Academic press: 51-58
- Singleton V.L., Rossi J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16,3: 144-158.
- Spencer J. P. E., Abd El Mohsen M. M., Minihiene A., Mathers J. C. 2008. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. British Journal of Nutrition, 99: 12-22
- Szajdek A., Borowska E. J. 2008. Bioactive compounds and health – promoting properties of berry fruits: a review. Plant Foods for Human Nutrition, 63: 147-156
- Štiblar-Martinčič D., Cör A., Cvetko E., Marš T. 2007. Anatomija, histologija in fiziologija. Ljubljana, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani: 119-135
- Tagliazucchi D., Verzelloni E., Bertolini D., Conte A. 2010. *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. Food Chemistry, 120: 599–606
- Taiz L., Zaiger E. 2006. Plant physiology. 4th ed. Sunderland (Massachusetts), Sinauer Associates: 690 str.
- Talavéra S., Felgines C., Texier O., Besson C., Gil-izquierdo A., Lamaison J., Rémésy C. 2005. Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive tract, kidney, and brain. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 10: 3902–3908
- Tanaka Y., Brugliera F., Chandler S. 2009. Recent progress of flower colour modification by biotechnology. International Journal of Molecular Sciences, 10: 5353-5369
- Tasioula-Margari M., Okogeri O. 2001. Simultaneous determination of phenolic compounds and tocopherols in virgin olive oil using HPLC and UV detection. Food Chemistry, 74: 377-383

- Teixeira da Silva J.A., Rana T.S., Narzary D., Verma N., Meshram D.T., Ranade S.A. 2013. Pomegranate biology and biotechnology: A review. *Scientia Horticulturae*, 160: 87-107
- Teramura A.H., Sullivan J.H. 1994. Effects of UV-B radiation on photosynthesis and growth of terrestrial plants. *Photosynthesis Research*, 39, 3: 463–473
- Tsuda T., Horio F., Osawa T. 1999. Absorption and metabolism of cyanidin 3-O-beta-D-glucoside in rats. *FEBS Letters*, 449: 179-182
- Turgeon S. L., Rioux L. 2011. Food matrix impact on macronutrients nutritional properties. *Food Hydrocolloids*, 25: 1915-1924
- Vander A. J., Luciano D., Sherman J. 2001. The digestion and absorption of food. V: Human physiology: the mechanisms of body function. Vander A. J., Luciano D., Sherman J. (eds.). Boston, McGraw-Hill Higher Education: 553-591
- Vitaglione P., Donnarumma G., Napolitano A., Galvano F., Gallo A., Scalfi L., Fogliano V. 2007. Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *Journal of Nutrition*, 137,9: 2043-2048
- Viuda-Martos M., Fernandez-Lopez J., Perez-Alvarez J.A. 2010. Pomegranate and its many functional components as related to human health: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 6: 637-654
- Webster's third new international dictionary. 1993. 3rd ed. Chicago, Encyclopaedia Britannica: 2662 str.
- Wechtersbach L. 2005. Stabilnost polarnih in nepolarnih antioksidantov v kompleksnem matriksu. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 59 str.
- Woodward G.M., Needs P.W., Kay C.D. 2011. Anthocyanin-derived phenolic acids form glucuronides following simulated gastrointestinal digestion and microsomal glucuronidation. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55: 378-386
- Wrilstad R. E. 2000. Anthocyanins. V: Natural food colours: science and technology. Lauro G.J., Francis F.J. (eds.). New York, Marcel Dekker, Inc: 237-252

Zarfeshany A., Asgary S., Javanmard S. H. 2014. Potent health effects of pomegranate.
Advanced Biomedical Research, 3, 100: 1-8

Žorž M. 1991. HPLC. Ljubljana, samozaložba: 118 str.

ZAHVALA

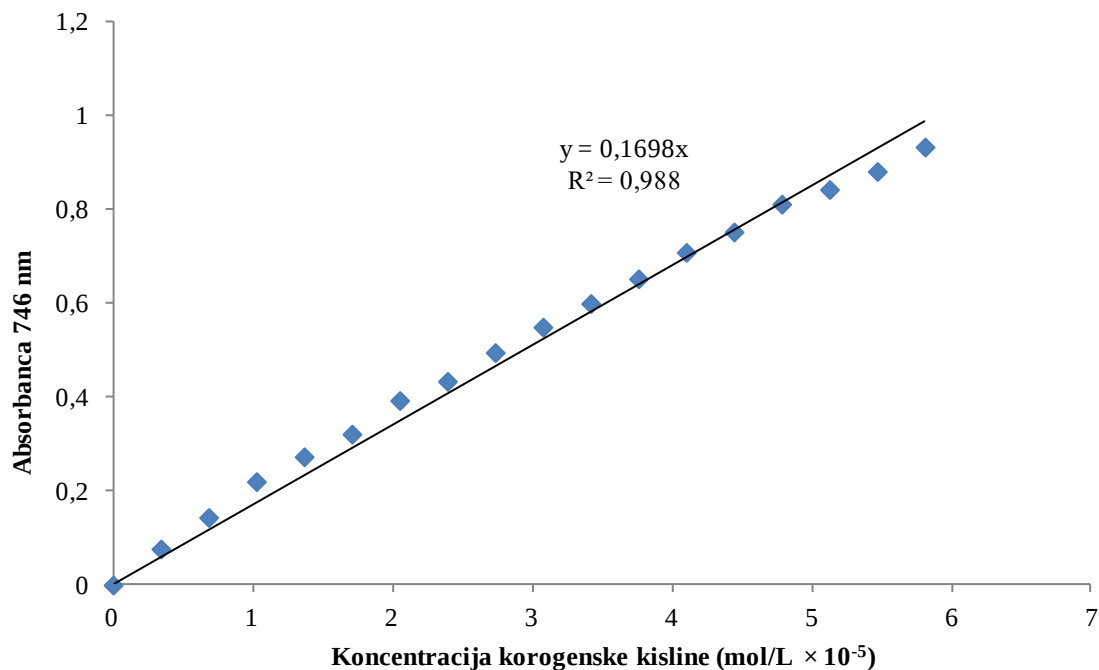
Mentorici prof. dr. Lei Pogačnik se iskreno zahvaljujem za vse nasvete, pomoč in skrben pregled magistrske naloge.

Zahvala velja predsedniku komisije prof. dr. Blažu Cigiću in članoma komisije prof. dr. Rajku Vidrihu in doc. dr. Valentini Usenik za koristne nasvete pri pisanju in oblikovanju magistrske naloge.

Hvala tudi dr. Mihaeli Skrt za pomoč pri delu v laboratoriju.

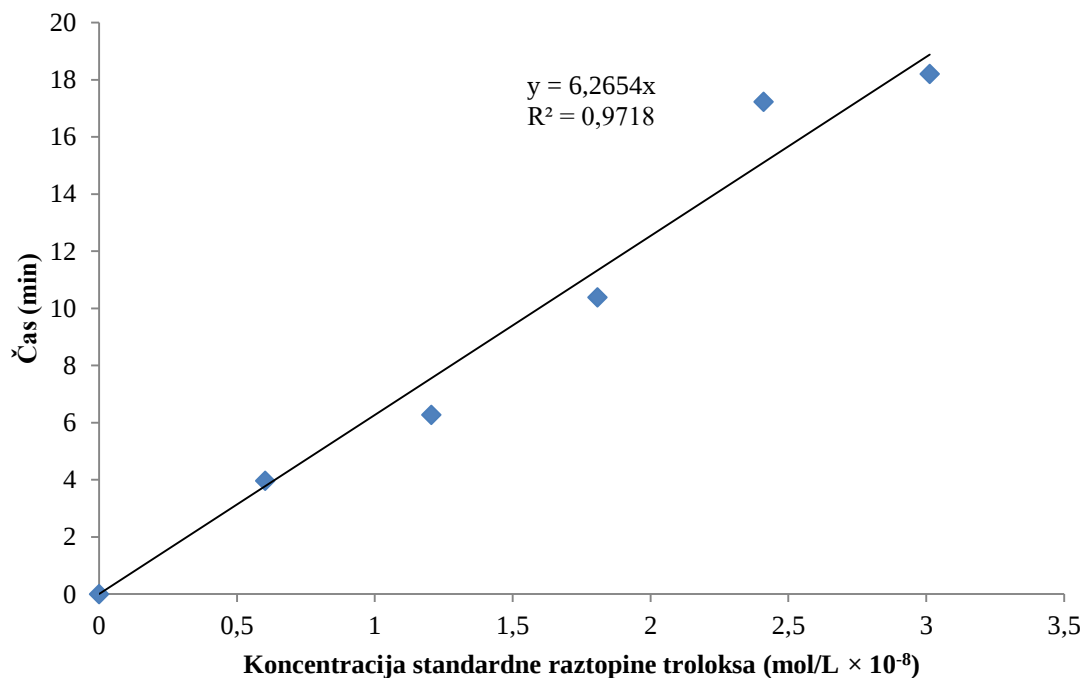
Posebno zahvalo dolgujem svojim najbližjim, ki so mi v času študija stali ob strani. Hvala za njihovo potrpežljivost in pomoč.

PRILOGE



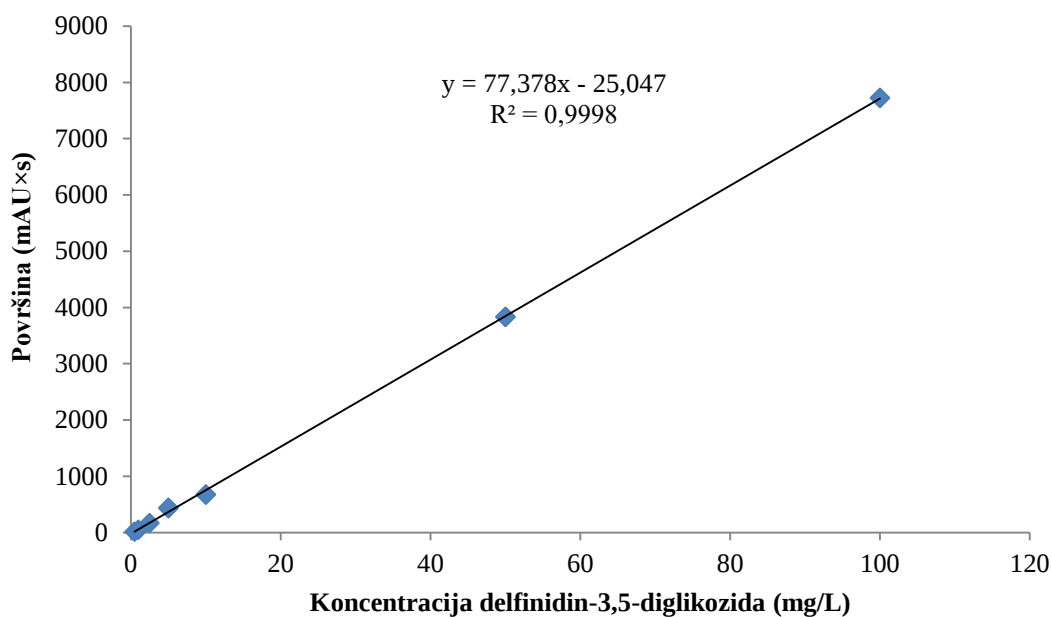
Priloga A: Umeritvena krivulja odvisnosti absorbanca od koncentracije klorogenske kisline (mol/L×10⁻⁵)

Annex A: The calibration curve of absorbance depending on the concentration of chlorogenic acid mol/L×10⁻⁵)



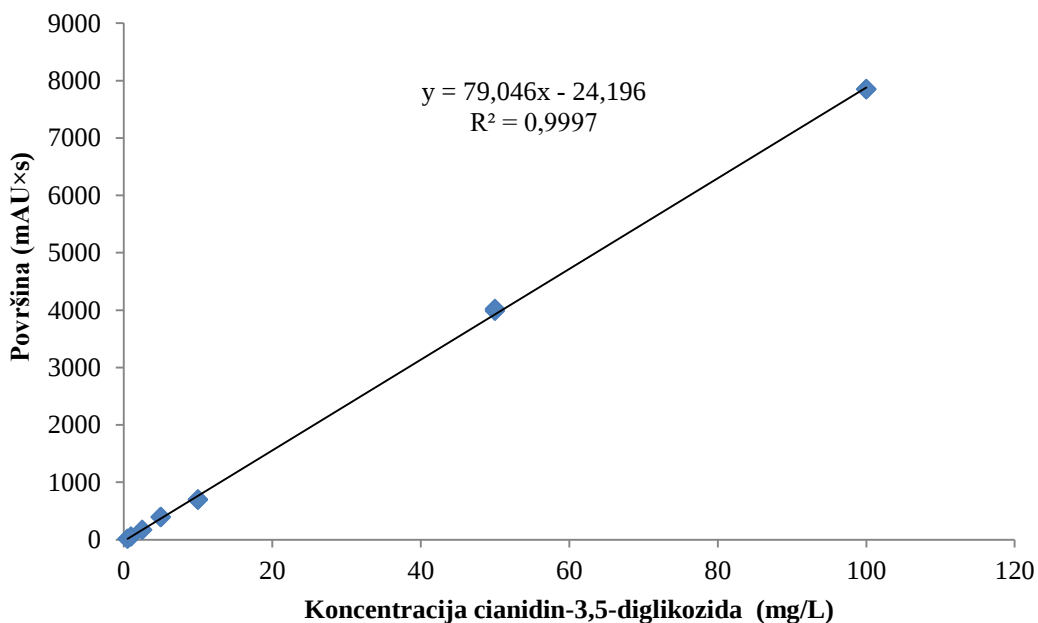
Priloga B: Umeritvena krivulja odvisnosti časa inhibicije signala od koncentracije standardne raztopine troloksa (mol/L×10⁻⁸)

Annex B: Calibration curve representing the correlation between the time of signal inhibition and the concentration of the standard solution of trolox (mol/L×10⁻⁸)



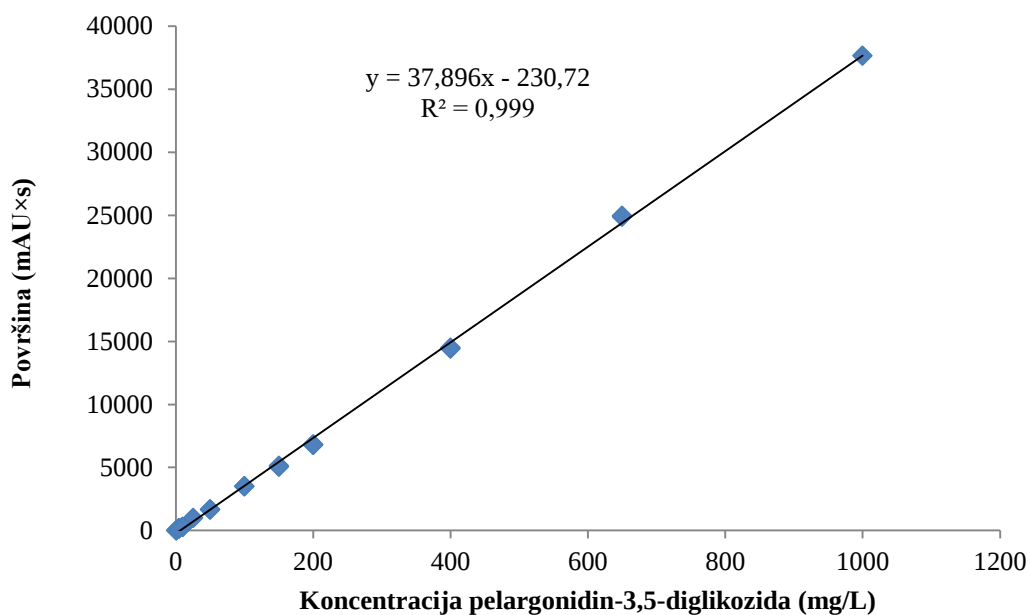
Priloga C: Umeritvena krivulja odvisnosti površine kromatografskega vrha od koncentracije standardne raztopine delfinidin-3,5-diglukozida (mg/L)

Annex C: Calibration curve representing the correlation between the peak area and the concentration of the standard solution of delphinidin-3,5-diglucoside (mg/L)



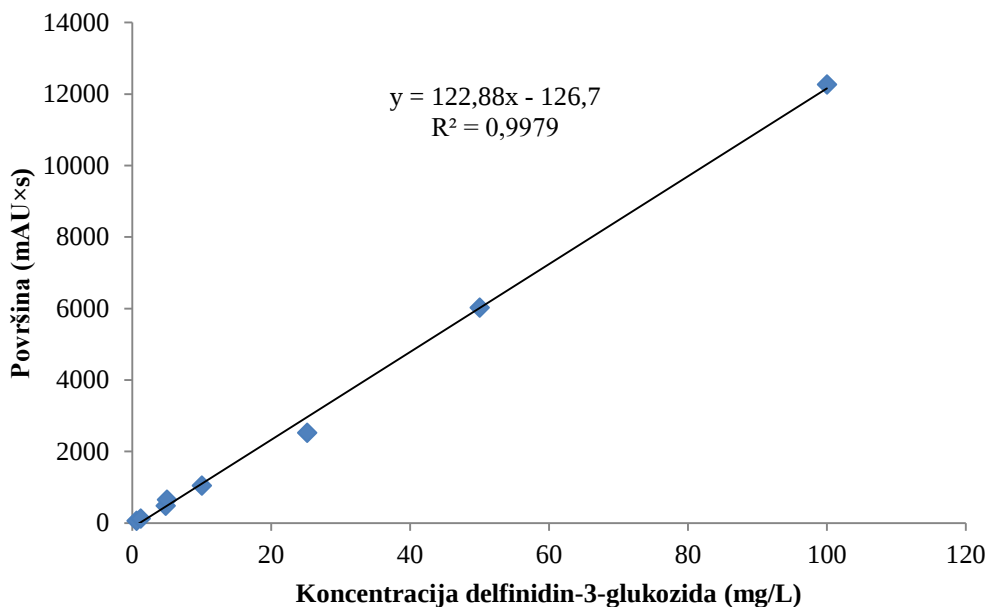
Priloga D: Umeritvena krivulja odvisnosti površine kromatografskega vrha od koncentracije standardne raztopine cianidin-3,5-diglukozida (mg/L)

Annex D: Calibration curve representing the correlation between the peak area and the concentration of the standard solution of cyanidin-3,5-diglucoside (mg/L)



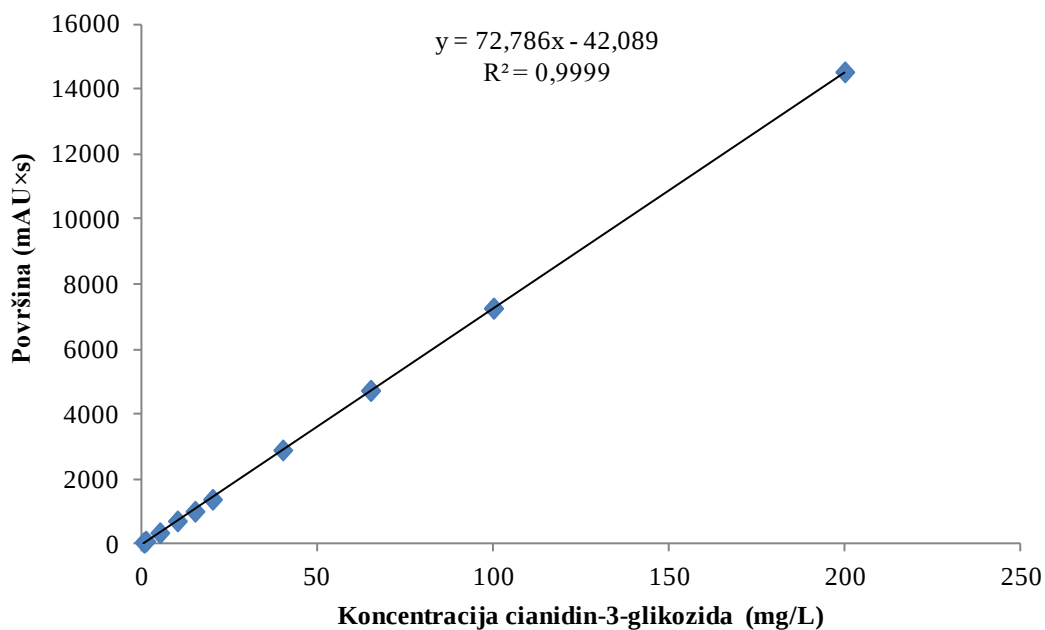
Priloga E: Umeritvena krivulja odvisnosti površine kromatografskega vrha od koncentracije standardne raztopine pelargonidin-3,5-diglukozida (mg/L)

Annex E: Calibration curve representing the correlation between the peak area and the concentration of the standard solution of pelargonidin-3,5-diglucoside (mg/L)



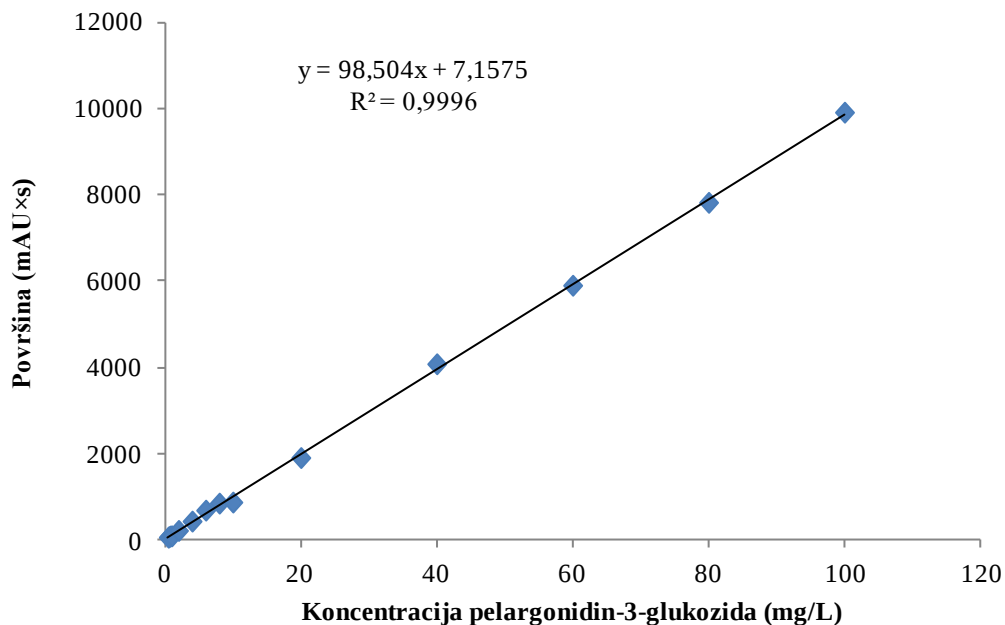
Priloga F: Umeritvena krivulja odvisnosti površine kromatografskega vrha od koncentracije standardne raztopine delphinidin-3-glukozida (mg/L)

Annex F: Calibration curve representing the correlation between the peak area and the concentration of the standard solution of delphinidin-3-glucoside (mg/L)



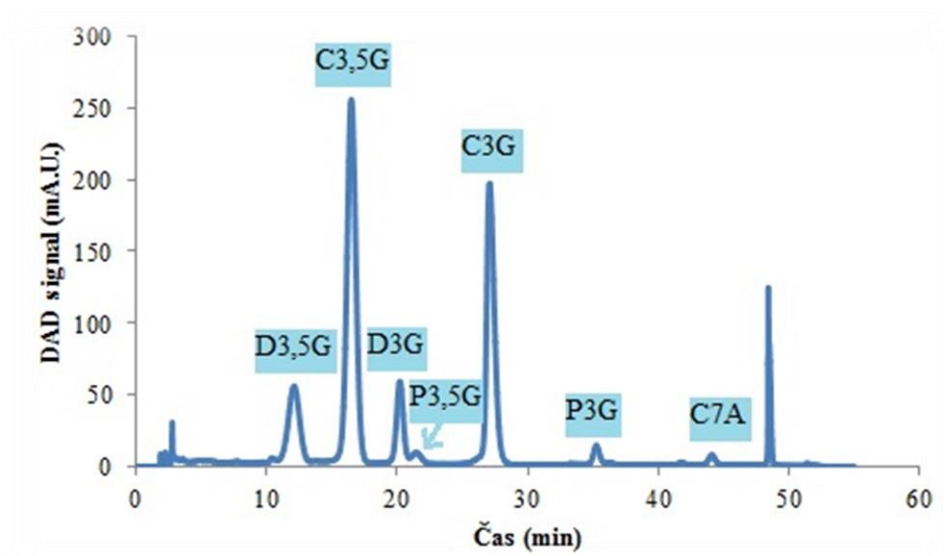
Priloga G: Umeritvena krivulja odvisnosti površine kromatografskega vrha od koncentracije standardne raztopine cianidin-3-glukozida (mg/L)

Annex G: Calibration curve representing the correlation between the peak area and the concentration of the standard solution of cyanidin-3-glucoside (mg/L)



Priloga H: Umeritvena krivulja odvisnosti površine kromatografskega vrha od koncentracije standardne raztopine pelargonidin-3-glukozida (mg/L)

Annex H: Calibration curve representing the correlation between the peak area and the concentration of the standard solution of pelargonidin -3-glucoside (mg/L)



Priloga I: Kromatogram soka granatnega jabolka (D3G - delphinidin-3-glukozid, D3,5G - delphinidin-3,5-duglukozid, C3G - cianidin-3-glukozid, C3,5G - cianidin-3,5-diglukozid, P3G - pelargonidin-3-glukozid in P3,5G - pelargonidin-3,5-diglukozid in C7A - cianidin-7-arabinozid)

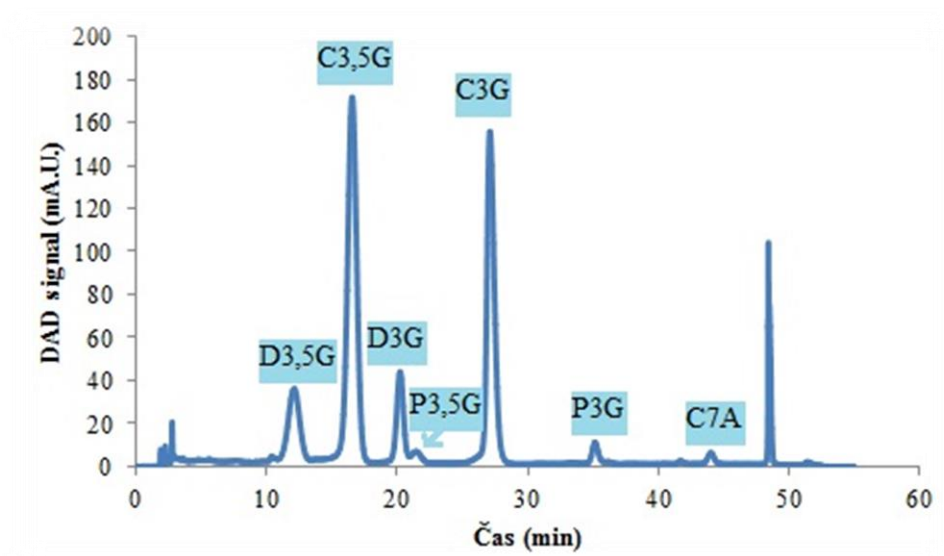
Annex I: Chromatogram of pomegranate juice (D3G - delphinidin-3-glucoside, D3,5G - delphinidin 3,5-diglucoside, C3G - cyanidin-3-glucoside, C3,5G - cyanidin-3,5-diglucoside and P3,5G - pelargonidin- 3,5-diglucoside, P3G - pelargonidin-3-glucoside, C7A - cyanidin-7-arabinoside)

Kromatografski pogoji:

- predkolona: XDB-C18 4,6 mm × 12,5 mm, 5 µm Agilent,
- kolona: Zorbax Eclipse Plus C18 4,6 mm × 150 mm, 3,5 µm Agilent,
- volumen injiciranega vzorca: 40 µL,
- detektor: DAD,
- mobilna faza A: 3 % (v/v) HCOOH,
- mobilna faza B: acetonitril:metanol (85:15) (v/v),
- pretok mobilne faze: 0,8 mL/min,
- valovna dolžina detekcije: 520 nm,
- temperatura kolone: 4 °C,
- temperatura vzorca: 4 °C,
- čas analize: 55 min.

Gradient:

- 0-13 min, 5-8% B,
- 13-25 min, 8-9% B,
- 25-45 min, 9-13% B,
- 45-46 min, 13-100% B,
- 46-48 min, 100% B,
- 48-49 min, 100-5% B,
- 49-55 min, 5% B.



Priloga J: Kromatogram soka granatnega jabolka po prvi stopnji prebave *in vitro* (simulacije prebave v želodcu po 1 uri) (D3G - delphinidin-3-glukozid, D3,5G - delphinidin-3,5-duglukozid, C3G - cianidin-3-glukozid, C3,5G - cianidin-3,5-diglukozid, P3G - pelargonidin-3-glukozid in P3,5G - pelargonidin-3,5-diglukozid in C7A - cianidin-7-arabinozid)

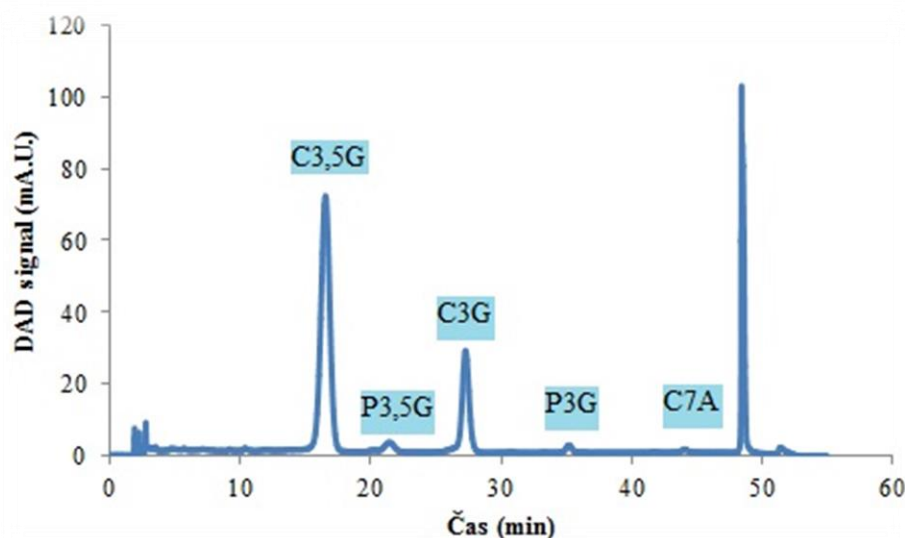
Annex J: Chromatogram of pomegranate juice after the first stage *in vitro* digestion (simulating the digestion in the stomach after 1 hour) (D3G - delphinidin-3-glucoside, D3,5G - delphinidin 3,5-diglucoside, C3G - cyanidin-3-glucoside, C3,5G - cyanidin-3,5-diglucoside and P3,5G - pelargonidin- 3,5-diglucoside, P3G - pelargonidin-3-glucoside, C7A - cyanidin-7-arabinoside)

Kromatografski pogoji:

- predkolona: XDB-C18 4,6 mm × 12,5 mm, 5 µm Agilent,
- kolona: Zorbax Eclipse Plus C18 4,6 mm × 150 mm, 3,5 µm Agilent,
- volumen injiciranega vzorca: 40 µL,
- detektor: DAD,
- mobilna faza A: 3 % (v/v) HCOOH,
- mobilna faza B: acetonitril:metanol (85:15) (v/v),
- pretok mobilne faze: 0,8 mL/min,
- valovna dolžina detekcije: 520 nm,
- temperatura kolone: 4 °C,
- temperatura vzorca: 4 °C,
- čas analize: 55 min.

Gradient:

- 0-13 min, 5-8% B,
- 13-25 min, 8-9% B,
- 25-45 min, 9-13% B,
- 45-46 min, 13-100% B,
- 46-48 min, 100% B,
- 48-49 min, 100-5% B,
- 49-55 min, 5% B.



Priloga K: Kromatogram soka granatnega jabolka po drugi stopnji prebave *in vitro* (simulacije prebave v tankem črevesu po 1 uri) (D3G - delfinidin-3-glukozid, D3,5G - delfinidin-3,5-diglukozid, C3G - cianidin-3-glukozid, C3,5G - cianidin-3,5-diglukozid, P3G - pelargonidin-3-glukozid in P3,5G - pelargonidin-3,5-diglukozid in C7A - cianidin-7-arabinozid)

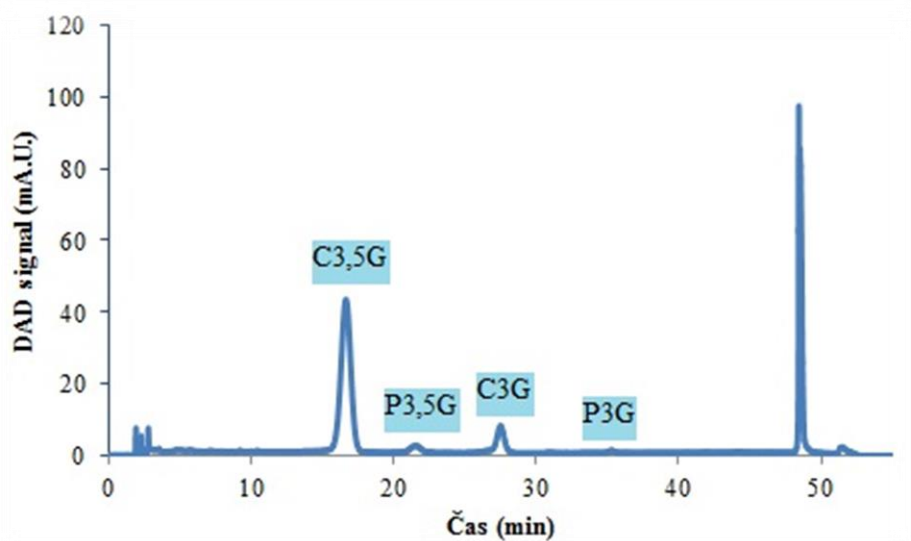
Annex K: Chromatogram of pomegranate juice after the second stage *in vitro* digestion (simulating the digestion in the small intestine after 1 hour) (D3G - delphinidin-3-glucoside, D3,5G - delphinidin 3,5-diglucoside, C3G - cyanidin-3-glucoside, C3,5G - cyanidin-3,5-diglucoside and P3,5G - pelargonidin-3,5-diglucoside, P3G - pelargonidin-3-glucoside, C7A - cyanidin-7-arabinoside)

Kromatografski pogoji:

- predkolona: XDB-C18 4,6 mm × 12,5 mm, 5 µm Agilent,
- kolona: Zorbax Eclipse Plus C18 4,6 mm × 150 mm, 3,5 µm Agilent,
- volumen injiciranega vzorca: 40 µL,
- detektor: DAD,
- mobilna faza A: 3 % (v/v) HCOOH,
- mobilna faza B: acetonitril:metanol (85:15) (v/v),
- pretok mobilne faze: 0,8 mL/min,
- valovna dolžina detekcije: 520 nm,
- temperatura kolone: 4 °C,
- temperatura vzorca: 4 °C,
- čas analize: 55 min.

Gradient:

- 0-13 min, 5-8% B,
- 13-25 min, 8-9% B,
- 25-45 min, 9-13% B,
- 45-46 min, 13-100% B,
- 46-48 min, 100% B,
- 48-49 min, 100-5% B,
- 49-55 min, 5% B.



Priloga L: Kromatogram soka granatnega jabolka po tretji stopnji prebave *in vitro* (simulacije prebave v tankem črevesu po 2 urah) (D3G - delphinidin-3-glukozid, D3,5G - delphinidin-3,5-diglukozid, C3G - cianidin-3-glukozid, C3,5G - cianidin-3,5-diglukozid, P3G - pelargonidin-3-glukozid in P3,5G - pelargonidin-3,5-diglukozid in C7A - cianidin-7-arabinozid)

Annex L: Chromatogram of pomegranate juice after the third stage *in vitro* digestion (simulating the digestion in the small intestine after 2 hours) (D3G - delphinidin-3-glucoside, D3,5G - delphinidin 3,5-diglucoside, C3G - cyanidin-3-glucoside, C3,5G - cyanidin-3,5-diglucoside and P3,5G - pelargonidin-3,5-diglucoside, P3G - pelargonidin-3-glucoside, C7A - cyanidin-7-arabinoside)

Kromatografski pogoji:

- predkolona: XDB-C18 4,6 mm × 12,5 mm, 5 μm Agilent,
- kolona: Zorbax Eclipse Plus C18 4,6 mm × 150 mm, 3,5 μm Agilent,
- volumen injiciranega vzorca: 40 μL,
- detektor: DAD,
- mobilna faza A: 3 % (v/v) HCOOH,
- mobilna faza B: acetonitril:metanol (85:15) (v/v),
- pretok mobilne faze: 0,8 mL/min,
- valovna dolžina detekcije: 520 nm,
- temperatura kolone: 4 °C,
- temperatura vzorca: 4 °C,
- čas analize: 55 min.

Gradient:

- 0-13 min, 5-8% B,
- 13-25 min, 8-9% B,
- 25-45 min, 9-13% B,
- 45-46 min, 13-100% B,
- 46-48 min, 100% B,
- 48-49 min, 100-5% B,
- 49-55 min, 5% B.