

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Tina KLEPAC

**OPTIMIZACIJA LUMINISCENČNE METODE ZA DOLOČANJE
ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI V RASTLINSKIH EKSTRAKTIH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**OPTIMISATION OF LUMINESCENT METHOD FOR DETECTION OF
ANTIOXIDATIVE ACTIVITY IN PLANT EXTRACTS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za kemijo Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Leo Pogačnik in za recenzentko prof. dr. Terezijo Golob.

Mentorica: doc. dr. Lea Pogačnik

Recenzentka: prof. dr. Terezija Golob

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tina Klepac

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 543.42-41+577.1:633.8(043)=163.6
KG	luminiscenčne metode/antioksidativna aktivnost/rastlinski ekstrakti/šipek / <i>Rosa canina</i>
AV	KLEPAC, Tina
SA	POGAČNIK, Lea (mentorica) /GOLOB, Terezija (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2008
IN	OPTIMIZACIJA LUMINISCENČNE METODE ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI V RASTLINSKIH EKSTRAKTIH
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 65 str., 5 pregl., 31 sl., 80 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V diplomski nalogi smo optimizirali luminescenčno metodo za določanje antioksidativne aktivnosti (AOP). Določili smo optimalne koncentracije reagentov (luminola, H ₂ O ₂ , peroksidaze) ter ugotovili optimalne pogoje analize (valovna dolžina, pH, temperatura, količina vzorca). Izbrana valovna dolžina meritev luminescence je 420 nm, kjer ima oksidirana oblika luminola emisijski maksimum. Optimalna koncentracija luminola v kivetu je 1,6 mM, koncentracija H ₂ O ₂ 7,5 mM in encimska aktivnost 0,14 U/mL. Analize potekajo najboljše v fosfatnem pufru (pH 7,4) pri sobni temperaturi. Z optimizirano luminescenčno metodo smo določili AOP ekstraktov šipka, lapuha, trpotca in materine dušice ter rezultate primerjali z vrednostmi, izmerjenimi z drugimi klasičnimi metodami za določanje AOP. Najboljšo korelacijo luminiscenčne metode smo dobili s Folin-Ciocalteaujevo (F-C) metodo pri vzorcih, ekstrahiranih z 2 % metafosforno kislino (MFK), saj je Pearsonov korelacijski koeficient (r) 0,94. Sledi F-C metoda pri vzorcih, ekstrahiranih z metanolom (r = 0,93), potem metoda za določanje AOP z radikalom DPPH [•] pri vzorcih, ekstrahiranih z metanolom (r = 0,91) in metoda za določanje AOP z radikalom DPPH [•] pri vzorcih, ekstrahiranih z 2 % MFK (r = 0,90). Med AOP in koncentracijo askorbinske kisline (AA) v ekstraktih šipka ni korelacije, saj je delež, ki ga AA prispeva k AOP signalu kljub drugačnim pričakovanjem nizek (manjši od 25 %). Optimizirana luminescenčna metoda je enostavna, hitra in zanesljiva alternativa klasičnim metodam (F-C, DPPH [•]) za določanje AOP v rastlinskih ekstraktih.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 543.42-41+577.1:633.8(043)=163.6
CX luminiscent methods/antioxidative activity/plant extracts/dog rose/*Rosa canina*
AU KLEPAC, Tina
AA POGAČNIK, Lea (supervisor)/GOLOB, Terezija (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and
Tehnology
PY 2008
TI OPTIMISATION OF LUMINESCENT METHOD FOR DETECTION OF
ANTIOXIDATIVE ACTIVITY IN PLANT EXTRACTS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 65 p., 5 tab., 31 fig., 80 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The chemiluminescence assay for determination of antioxidant activity (AOP) was optimised. The optimal reagents concentration (luminol, H₂O₂, peroxidase) as well as optimal reaction conditions (wavelength, pH, temperature, volume of sample) were determined. The emission spectrum of oxydised form of luminol has its maximum at 420 nm, for that reason this wavelength was chosen for all measurements. The optimal concentration of luminol is 1,6 mM, H₂O₂ was added to a final concentration of 7,5 mM, enzyme activity in reaction mixture was 0,14 U/mL. Analyses were carried out in phosphate buffer (pH 7,4) at room temperature. With optimised luminescent method antioxidative potential (AOP) of dog rose extracts, coltsfoot extracts, plantain extracts and thyme extracts were determined and results were compared to the ones obtained by other classical methods for determination of AOP. The best correlation of luminescence assay was obtained with Folin-Ciocalteaujevo (F-C) assay in samples extracted with 2 % metaphosphoric acid (MFK), Pearson correlation coefficient (r) was 0,94. The second best correlation was achieved with F-C assay in samples extracted with methanol (r = 0,93), next one was DPPH[•] assay in samples extracted with methanol (r = 0,91) and DPPH[•] assay in samples extracted with 2 % MFK (r = 0,90). No correlation was found between AOP and concentration of ascorbic acid (AA), due to low contribution of AA to total AOP signal in dog rose extracts (less then 25 %). The optimised chemiluminescence assay is simple, rapid and reliable and represents a good alternative to classical methods (F-C, DPPH[•]) for determination of AOP in vegetal extracts.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA.....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ANTIOKSIDANTI.....	3
2.1.1 Prosti radikali	3
2.1.2 Oksidativni stres	3
2.1.3 Delitev antioksidantov.....	4
2.1.4 Splošne značilnosti antioksidantov	5
2.1.5 Viri antioksidantov	6
2.1.5.1 Polifenoli	7
2.1.5.2 Tokoferoli	8
2.1.5.3 Karotenoidi in vitamin A.....	8
2.1.5.4 Vitamin C	9
2.2 METODE ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDANTOV	10
2.2.1 Določanje skupnih fenolnih spojin.....	10
2.2.2 Določanje skupne antioksidativne aktivnosti.....	11
2.2.2.1 Metoda z radikalom DPPH [•]	11
2.2.2.2 Luminescenčne metode	12
2.2.3 Določanje posameznih antioksidantov	15

2.2.3.1	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti.....	16
2.2.3.2	GC-MS	18
2.3	RASTLINSKI EKSTRAKTI.....	19
2.3.1	Šipek (<i>Rosa Canina L.</i>).....	20
2.3.2	Lapuh, navadni (<i>Tussilago farfara</i>).....	22
2.3.3	Trpotec, ozkolistni (<i>Plantago lanceolata L.</i>).....	23
2.3.4	Materina dušica (<i>Thymus vulgaris</i>).....	24
3	MATERIALI IN METODE	25
3.1	MATERIALI	25
3.1.1	Šipek.....	25
3.1.2	Lapuh, trpotec in materina dušica.....	25
3.1.3	Reagenti	25
3.2	METODE DELA.....	25
3.2.1	Ekstrakcija	26
3.2.1.1	Ekstrakcija z 2 % metafosforno kislino.....	26
3.2.1.2	Ekstakcija z metanolom.....	26
3.2.2	Določanje skupnih fenolnih spojin.....	26
3.2.3	Določanje antioksidacijskega potenciala z radikalom DPPH [•]	28
3.2.4	Določanje vsebnosti askorbinske kisline na sistemu HPLC	29
3.2.5	Optimizacija luminescenčne metode.....	30
3.2.5.1	Določanje optimalne valovne dolžine	31
3.2.5.2	Določanje optimalne koncentracije luminola	31
3.2.5.3	Določanje optimalne koncentracije vodikovega peroksida.....	32
3.2.5.4	Določanje optimalne koncentracije hrenove peroksidaze	32
3.2.5.5	Določanje optimalnega pH.....	33
3.2.5.6	Določanje optimalne temperature.....	33
3.2.5.7	Ponovljivost luminescenčne metode	33
3.2.6	Določanje antioksidativne aktivnosti z optimizirano luminescenčno metodo ...	34
4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	36
4.1	OPTIMIZACIJA LUMINESCENČNE METODE	36
4.1.1	Določanje optimalne valovne dolžine detekcije	36
4.1.2	Merjenje časa inhibicije luminescence	37
4.1.3	Določanje optimalne koncentracije luminola	38
4.1.4	Določanje optimalne koncentracije vodikovega peroksida	40
4.1.5	Določanje optimalne aktivnosti hrenove peroksidaze.....	41
4.1.6	Določanje optimalnega pH.....	42
4.1.7	Določanje optimalne temperature.....	43

4.1.8	Ponovljivost luminescenčne metode.....	44
4.2	ANALIZE STANDARDNIH RAZTOPIN	44
4.2.1	Metoda za določanje skupnih fenolnih spojin.....	44
4.2.2	Metoda za določanje skupne antioksidativne aktivnosti z radikalom DPPH [•] ..	45
4.2.3	Luminescenčna metoda.....	46
4.3	ANALIZA RASTLINSKIH EKSTRAKTOV	47
4.3.1	Vrednosti antioksidativne aktivnosti v rastlinskih ekstraktih	47
4.3.2	Korelacija luminescenčne metode z drugimi metodami	49
4.3.2.1	Vzorci, ekstrahirani z 2 % metafosforno kislino	49
4.3.2.2	Vzorci, ekstrahirani z metanolom.....	51
4.3.3	Delež, ki ga k antioksidativni aktivnosti prispeva askorbinska kislina.....	52
5	SKLEPI	55
6	POVZETEK.....	57
7	VIRI	59

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Koncentracija luminola in koncentracijsko območje askorbinske kisline v kivetih	32
Preglednica 2: Volumni dodanega 800 mM H ₂ O ₂ in njegova koncentracija v kivetih	32
Preglednica 3: Volumni dodanega encima hrenove peroksidaze (3 U/mL) in njegova koncentracija v kivetih	33
Preglednica 4: Koncentracije in volumni dodanih standardnih raztopin antioksidantov ter območje koncentracij le-teh v kivetih	35
Preglednica 5: Standardna deviacija časa inhibicije luminescence	44
Preglednica 6: Antioksidativna aktivnost v rastlinskih ekstraktih	48

KAZALO SLIK

Slika 1: Osnovna struktura flavonoidov (Gordon, 2003).....	7
Slika 2: α -tokoferol (Gordon, 2003)	8
Slika 3: β -karoten (Gordon, 2003).....	9
Slika 4: Askorbinska kislina (Gordon, 2003).....	10
Slika 5: Luminol (Garcia-Campana in Baeyens, 2001)	13
Slika 6: Oksidacija luminola (Garcia-Campana in Baeyens, 2001).....	14
Slika 7: Kemoluminescenčna reakcija luminola (Garcia-Campana in Baeyens, 2001).....	14
Slika 9: Plodovi šipka (Cortese, 2001).....	21
Slika 10: Lapuh (Špringer, 2003 a).....	22
Slika 11: Trpotec (Špringer, 2003 d)	23
Slika 12: Materina dušica (Špringer, 2003 b)	24
Slika 13: Emisijski spekter reakcijske mešanice.....	36
Slika 14: Prikaz merjenja inhibicije luminescence	37
Slika 15: Čas inhibicije luminescence v odvisnosti od koncentracije askorbinske kisline.....	38
Slika 16: Naklon umeritvenih krivulj za določanje askorbinske kisline v odvisnosti od koncentracije luminola	39
Slika 17: Čas inhibicije luminescence v odvisnosti od koncentracije vodikovega peroksida ..	40
Slika 18: Čas inhibicije luminescence v odvisnosti od encimske aktivnosti	41
Slika 19: Čas inhibicije luminescence v odvisnosti od pH	42
Slika 20: Čas inhibicije luminescence v odvisnosti od temperature.....	43
Slika 21: Umeritvene krivulje askorbinske kisline, klorogenske kisline in troloxa s F-C metodo	45
Slika 22: Umeritvene krivulje askorbinske kisline, klorogenske kisline in troloxa z metodo z radikalom DPPH [•]	46
Slika 23: Umeritvene krivulje askorbinske kisline, klorogenske kisline in troloxa z luminescenčno metodo	47
Slika 24: Zveza med antioksidativno aktivnostjo, izmerjeno z luminiscenčno metodo (AOP _{luminol}), in antioksidativno aktivnostjo, izmerjeno z metodo z radikalom DPPH [•] (AOP _{DPPH}).....	49
Slika 25: Zveza med antioksidativno aktivnostjo, izmerjeno z luminiscenčno metodo (AOP _{luminol}), in antioksidativno aktivnostjo, izmerjeno z F-C metodo (AOP _{F-C reagent})	50
Slika 26: Zveza med antioksidativno aktivnostjo, izmerjeno z luminiscenčno metodo (AOP _{luminol}), in koncentracijo askorbinske kisline, izmerjene na HPLC sistemu.....	50
Slika 27: Zveza med antioksidativno aktivnostjo, izmerjeno z luminiscenčno metodo (AOP _{luminol}), in antioksidativno aktivnostjo, izmerjeno z metodo z radikalom DPPH [•] (AOP _{DPPH}), v metanolnih ekstraktih	51
Slika 28: Zveza med antioksidativno aktivnostjo, izmerjeno z luminiscenčno metodo (AOP _{luminol}), in antioksidativno aktivnostjo, izmerjeno z F-C metodo (AOP _{F-C reagent}) v metanolnih ekstraktih	52

Slika 29: Delež askorbinske kisline v šipku k skupnemu signalu za antioksidativno aktivnost, merjenem s F-C metodo	53
Slika 30: Delež askorbinske kisline v šipku k skupnemu signalu za antioksidativno aktivnost, merjenem z metodo za določanje antioksidativne aktivnosti z radikalom DPPH [•]	53
Slika 31: Delež askorbinske kisline v šipku k skupnemu signalu za antioksidativno aktivnost, merjenem z luminescenčno metodo	54

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AA	askorbinska kislina
AAPH	2,2'-azobis 2-amidinopropan dihidroklorid
ABTS ^{•+}	2,2-azinobis (3-etilbenzotiozolin-6-sulfonat)
AOP	antioksidativna aktivnost
BHA	3-terciarni butil-4-hidroksi anizol
BHT	6-diterciarni butil-p-hidroksi toluen
DMSO	dimetilsulfoksid
DPPH [•]	2,2-difenil-1-pikril-hidrazil
F-C	Folin-Ciocalteu
GC-MS	plinska kromatografija-masna spektroskopija
HRP	hrenova peroksidaza
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
MFK	metafosforna kislina
PG	propil galat
TBHQ	2-terciarni butil-hidrokinon

1 UVOD

Za ugotavljanje skupnih fenolov in antioksidativne aktivnosti obstaja več metod, tako relativno enostavne spektrofotometrične in kolorimetrične metode, kot bolj zapletene, na primer plinska kromatografija, tekočinska kromatografija visoke ločljivosti in elektronska paramagnetna resonančna spektroskopija (Antonovich in sod., 2002).

Na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete se za določanje skupnih fenolov uporablja metoda s Folin-Ciocalteaujevim (F-C) reagentom, za določanje antioksidativne aktivnosti (AOP) pa metoda s prostim radikalom DPPH[•].

Mnogo novejših metod, ki se vse bolj uveljavljajo, za določanje AOP uporablja luminol, ki v svoji oksidirani obliki oddaja svetlobo. Oksidacijo lahko dosežemo posredno pri reakciji med oksidantom (H_2O_2) in encimom peroksidazo. Ob prisotnosti antioksidantov je reakcija med kisikom, ki nastaja ob encimski razgradnji H_2O_2 , in luminolom inhibirana, dokler so antioksidanti v vzorcu na voljo. Ko se le-ti porabijo, ponovno poteka oksidacija luminola, kar povrne intenziteto luminescence na prvotno vrednost. Na ta način posredno lahko ugotavljamo AOP vzorca, saj je le-ta povezana s časom zakasnitve luminescence. V literaturi se pojavlja mnogo različnih načinov analize, zato obstaja potreba po sistematični optimizaciji metode (Girotti in sod., 2002; Georgetti in sod., 2003).

1.1 NAMEN DELA

- optimizirati luminescenčno metodo za določanje antioksidativne aktivnosti,
- določiti optimalne koncentracije reagentov (luminola, H_2O_2 , peroksidaze),
- ugotoviti optimalne pogoje analize (pH, temperatura, količina vzorca),
- primerjati občutljivost različnih metod (luminescenčna, DPPH[•], F-C) za določanje AOP različnih standardnih raztopin (trolox, askorbinska kislina, klorogenska kislina),
- ugotoviti antioksidativno aktivnost ekstraktov šipka, lapuha, trpotca in materine dušice,
- primerjati rezultate AOP, določene z različnimi metodami (luminescenčna, DPPH[•], F-C),
- ugotoviti povezavo med vsebnostjo askorbinske kisline (AA), določeno s sistemom HPLC, in AOP, določeno z luminescenčno metodo,
- ugotoviti primernost luminiscenčne metode za določanje AOP različnih rastlinskih ekstraktov.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- ugotovili bomo optimalne pogoje metode za določanje antioksidativne aktivnosti z uporabo luminiscenčne metode,
- optimizirana metoda bo enostavna in bo ponudila alternativo metodam, ki se za določanje AOP uporabljajo v laboratoriju na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete,
- metoda bo primerna za določanje AOP v različnih rastlinskih ekstraktih,
- občutljivost metode bomo prilagodili vsebnosti antioksidantov v rastlinskih ekstraktih s spreminjanjem koncentracij reagentov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ANTIOKSIDANTI

2.1.1 Prosti radikali

Prosti radikali ali radikali so atomi, molekule ali ioni z vsaj enim nesparjenim elektronom. So zelo reaktivne kemijske zvrsti, ki lahko poškodujejo celične strukture. So rezultat normalne celične presnove (dihanje) in posledica dejavnikov okolja: UV in gama žarkov, toplote, kajenja, onesnaževanja okolja, itd. Tudi nekatere snovi in zdravila (aflatoksini, alkohol, analgetiki, anestetiki,...) povzročajo nastajanje prostih radikalov (Korošec, 2000).

Prosti radikali delujejo znotraj ali zunaj celice. Reagirajo z lipidi (peroksidacija maščobnih kislin, spremenjena prepustnost membrane), beljakovinami (oksidacija –SH skupin, aktivacija encimov (kolagenaze), inaktivacija encimov (α_1 -antitripsina)) in DNA (cepljenje verige, povečana poraba NAD^+ , motena sinteza ATP). Prosti radikali na kaskadni način tvorijo nove proste radikale, ki dodatno poškodujejo celične strukture (Korošec, 2000).

2.1.2 Oksidativni stres

V normalnih razmerah v celicah so prosti radikali v stalnem ravnotežju z antioksidanti, ki jih z različnimi mehanizmi sproti odstranjujejo. Porušeno ravnotežje imenujemo oksidativni stres, ta pa je vpleten v patologijo raka ter arteroskleroze. Pomembno vlogo lahko odigra pri neurodegenerativnih boleznih in procesu staranja (Moure in sod., 2001).

Oksidativni stres je večkrat povezan ali pa vodi v nastanek reaktivnih zvrsti kisika, med katerimi so posebno zanimivi prosti radikali. Kisik je močan oksidant in pri respiraciji izjemen akceptor elektronov. V osnovnem stanju je v obliki kisikovega tripleta ($^3\text{O}_2$). Ena najbolj toksičnih oblik tega elementa pa je singlet kisika ($^1\text{O}_2$), energijsko bogatejša oblika, kjer lahko elektroni zunanje lupine postanejo zelo reaktivni in v notranjosti celice zakrivijo vrsto spontan in nezaželenih oksidacij. Kisikov singlet lahko nastane fotokemijsko, lahko pa tudi biokemijsko ob sodelovanju različnih peroksidaznih encimov (Madigan in sod., 2003).

Najpomembnejši kisikovi prosti radikali so še hiperoksidni anion (O_2^-), hidroksilni radikal (OH^\cdot), hidroperoksidni radikal (OOH^\cdot), peroksidni radikal (OOR^\cdot) ter vodikov peroksid (H_2O_2) (Korošec, 2000).

Organizmi so pred reaktivnimi kisikovimi zvrstmi razvili učinkovit sistem obrambe. Med najbolj znanimi encimi v tej kategoriji je katalaza, ki katalizira razpad H_2O_2 ; naslednji takšen je peroksidaza, ki se od katalaze razlikuje po tem, da za svoje delovanje potrebuje reducent, pri čemer kot produkt nastane voda. Hiperoksidni radikal se uniči s pomočjo encima superoksid-dismutaza (Madigan in sod., 2003).

Antioksidanti, ki varujejo telo pred učinki prostih radikalov, so torej encimi (superoksid-dismutaza, katalaza, glutation-peroksidaza, metioninsulfoksid-reduktaza, DNA popravljalni encimi), vitamini (A,E,C), betakaroteni, bioflavonoidi, katehini ter mikrorudnine (selen, cink, baker, mangan). Nekatere antioksidante telo sintetizira samo (glutation, sečno kislino, ubikinon), druge pa dobimo s hrano (Korošec, 2000).

2.1.3 Delitev antioksidantov

Antioksidante lahko delimo v tri skupine:

- Primarni antioksidanti

Nastajajo v organizmu, ali pa jih tvorijo mikroorganizmi, predvsem encimi. Njihova vloga je preprečevanje tvorbe prostih radikalov. Med primarne antioksidante prištevamo snovi, ki lahko reaktivne radikale spremenijo v bolj stabilne produkte in s tem prekinejo verižno reakcijo avtooksidacije.

- Sekundarni antioksidanti

Nevtralizirajo novonastale proste radikale in preprečujejo, da bi vstopali v verižne reakcije in tvorili nove proste radikale. To so snovi, ki zavirajo avtooksidacijo brez direktnega vključevanja v verižno reakcijo.

Delujejo lahko kot:

- Odjemalci kisika: z reakcijo odvzemanja kisika preprečijo neželjeno oksidacijo živil. Te spojine reagirajo s prostim kisikom in ga kot takšnega odstranijo iz reakcije. Prosti kisik reagira z odjemalci kisika, ki jih tudi oksidira. Med najpogostejše odjemalce kisika spadajo: askorbinska kislina, flavonoidi, karotenoidi, polifenoli, sulfiti.
- Odjemalci radikalov: te snovi preprečujejo prostim radikalom reagiranje pri verižnih reakcijah s tem, da preprečijo tvorbo hidroperoksidov. Med najpogostejše lovilce radikalov spadajo: flavonoidi, polifenoli, karotenoidi, tokoferoli.
- Sinergisti: so snovi, ki o načinu delovanja niso antioksidanti, vendar znatno povečajo njihovo delovanje. Tako je citronska kislina aktivna s primarnimi antioksidanti in odjemalci kisika. Glavni princip reakcije je v tem, da elektronski

par v strukturi sinergista pospešuje tvorbo kelatov. S tem se tvorijo stabilne oblike s kovinskimi ioni, kot sta železo in baker. Med najpogostejše sinergiste spadajo: estri citronske kisline, citronska kislina, lecitin, polifosfati, vinska kislina.

- Terciarni antioksidanti

So snovi, ki popravljajo poškodbe, ki jih povzročajo prosti radikali v strukturi celice. Največkrat so to encimi, ki popravljajo poškodbe DNA (Raspor in sod., 2000).

2.1.4 Splošne značilnosti antioksidantov

Antioksidanti preprečujejo oksidativni stres z lovljenjem prostih radikalov, z lovljenjem lipidnih peroksidnih radikalov, s keliranjem kovinskih ionov, z odstranjevanjem in/ali popravljenjem oksidativno poškodovanih biomolekul (Abram, 2000).

Funkcija antioksidantov je, da prestrežejo proste radikale in z njimi reagirajo pred substratom. Antioksidanti lahko pri oksidaciji odigrajo preventivno vlogo na dva načina (Abram, 2000).

- Prvi način:

Najpogosteje antioksidant poseže v reakcijo avtooksidacije tako, da hitro odda vodikov atom radikal, ki bi sicer povzročil tvorbo prostih radikalov hidroperoksidov.



V to skupino uvrščamo fenole in njihove derivate (Raspor in sod., 2000).

- Drugi način:

Prenos elektronov je drugi mehanizem, s katerim lahko antioksidant onesposobi prosti radikal. Najprej nastane kation radikala, čemur sledi hitra in reverzibilna deprotonizacija, kot je prikazano spodaj



Oba mehanizma, prenos vodikovega atoma in prenos posameznega elektrona, morata vedno nastopiti paralelno, a z različno hitrostjo (Wright in sod., 2001).

Najpomembnejši parametri antioksidativne učinkovitosti neke spojine so naslednji: konstanta hitrosti razpada in konstanta hitrosti pobiranja radikalov, redoks potencial in pK vrednost

fenolnih –OH skupin. Prav tako pa je pomembna tudi polarnost in nepolarnost same spojine in iz tega izvirajoča porazdelitev antioksidantov med polarnim in nepolarnim medijem ter kako dobro se določen antioksidant absorbira v organizem (Abram, 2000).

2.1.5 Viri antioksidantov

Glavni viri antioksidantov so: alge, citrusi, drugo sadje in zelenjava, razne trave, produkti mikroorganizmov, ovsena moka, oljna semena, olive, hidrolizati proteinov, razne smole in soja ter sojini produkti.

Različni deli rastlin vsebujejo antioksidante, tako naj bi listi rastlin (avokado, murva, zeleni ječmen, različne vrbe) in celo korenine, pluta, lubje in brst vsebovali antioksidante. Antioksidativni potencial naj bi imelo tudi seme, strok, luščina (ajda, fižol, arašidi) (Moure in sod., 2001).

Med najbolj znanimi antioksidanti so ekstrakti rastlin (rožmarina, zelenega čaja, žajblja). Ekstrakti naravnih antioksidantov so lahko topni v maščobah ali vodi.

Antioksidanti so naravnega ali sintetičnega izvora

- Naravni antioksidanti so: askorbinska kislina in citronska kislina ter njune soli, tokoferoli, flavonoidi, karotenoidi, fenolne spojine, aminokislina,...
- Sintetični antioksidanti so: BHA (3-terciarni butil-4-hidroksi anizol), BHT (2,6-diterciarni butil-p-hidroksi toluen), PG (propil galat) in TBHQ (2-terciarni butil-hidrokinon) (Gelb, 2005; Rajalakshmi in Narasimhan, 1995)

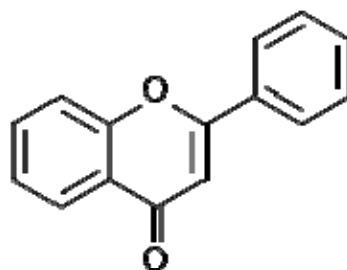
Sintetični antioksidanti so mnogo cenejši, vendar je zaradi toksičnosti nekaterih pri uporabi potrebna pazljivost. BHT in BHA sta močna sintetična antioksidanta, vendar obstaja sum, da vsebujeta določene substance, ki povzročajo raka (Skvarča, 2000).

V današnjem času prihajajo v ospredje naravni antioksidanti predvsem zaradi zdravstvene oporečnosti in toksičnosti nekaterih sintetičnih antioksidantov.

Naravni antioksidanti so predvsem fenolne spojine, ki so lahko praktično v vseh delih rastline. V rastlinskem svetu so zelo razširjene, prispevajo zlasti k barvi, okusu in trpkosti sadja. Fenolne spojine pogosto smatramo kot sekundarne metabolite rastlinskega metabolizma (Swanson, 2003).

2.1.5.1 Polifenoli

So sekundarni metaboliti rastlin. Ime polifenoli vključuje več skupin, vsem spojinam pa je skupna osnovna fenolna struktura (Abdalla, 2003). Flavonoidi so najpomembnejša in zelo razširjena skupina vodotopnih fenolnih spojin, ki se ločijo po stopnji oksidacije obroča C. Od teh je največ antocianov, katehinov, procianidinov, flavonov in flavonolov. V naravi najdemo flavonoide običajno kot vodotopne 3-O-glikozide, kar pomeni, da so na C-3 atomu vezani različni sladkorji (glukoza, arabinoza, ramnoza, ksiloza, manoza, glukuronska ali galakuronska kislina). V rastlinah so flavonoidi rdeči, beli, rumeni pigmenti cvetov, sadežev, lubja in korenin. Zaradi svojega grenkega okusa odganjajo parazite in, ker lahko absorbirajo UV svetlobo, delujejo kot zaščita rastline pred UV žarki (Abram, 2000).



Slika 1: Osnovna struktura flavonoidov (Gordon, 2003)

Antocianidini

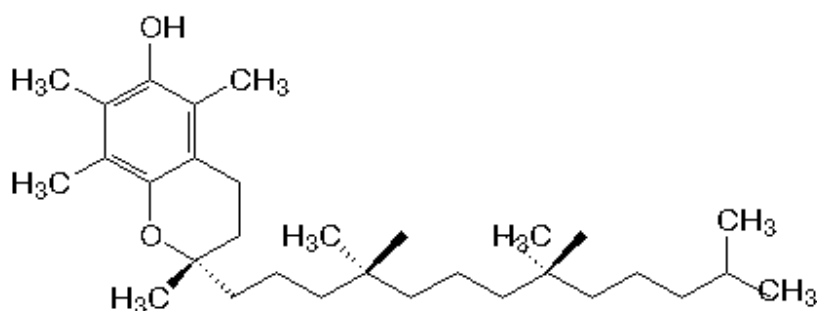
Antocianidinov poznamo 23 vrst, od teh so najbolj pogosti: delfinidin, pelargonidin in cianidin. Posamezni glavni tipi antocianidinov se ločijo le po številu –OH skupin na aromatskem obroču B. Antocianidini preidejo z vezavo sladkorjev na mestu 3 v antocianine. V naravi so skoraj vsi antocianidini glikozilirani (Abram in Simčič, 1997). Antocianini so ena izmed najbolj razširjenih skupin med flavonoidi, so najbolj pomembni vodotopni pigmenti v rastlinah. Dajejo modro, rdečo in škrlatno bravo. Z njimi je bogato jagodičevje, grozdje, češnje, rozine, ribez, brusnice, pa tudi ostale rastline, kot so rdeče zelje, rdeča čebula in jajčna lupina. K dnevni vnosu antocianinov znatno prispevajo tudi sokovi, vino, marmelada in razna naravna barvila, ki jih najdemo v živilih (Kähkönen in sod., 2003).

Flavonoli

Za flavonole je značilen nasičen obroč C s hidroksilnimi skupinami. Sem spadajo flavan-3,4-diol, flavan-3-ol (Shahidi in Naczki, 1995). Štirje glavni flavan-3-oli, ki so jih našli v rastlinah so (+)-katehin, (-)-epikatehin, (+)-galokatehin in (-)-epigalokatehin (Murkovic, 2003). Katehini so v zelenem čaju, najdemo pa jih tudi v grozdju, grozdnem soku, rdečem vinu, aroniji, borovnicah in v bezgovih sadežih (Wright in sod., 2001).

2.1.5.2 Tokoferoli

Poznamo α -, β -, γ -, δ - tokoferole in α -, β -, γ -, δ - tokotrienole. Razlikujejo se v številu in poziciji metilnih substituentov na fenolnem obroču (Gelb, 2005). Antioksidacijsko učinkovitost jim omogoča sposobnost, da lipidnim prostim radikalom prepustijo vodikove atome (Abdalla, 2003). Vitamin E je genetično ime za najmanj osem naravnih spojin, ki kažejo biološko aktivnost α -tokoferola. Je skoraj netopen v vodi, topen v alkoholu, zelo dobro topen v dehidriranem alkoholu, etru, acetonu, rastlinskih oljih (Gleb, 2005). Poleg tega, da vitamin E preprečuje oksidativno poškodbo celičnih membran, pomaga tudi pri zaščiti drugih aktivnih komponent (vitamina A, ubikinona, hormonov, encimov,...) pred oksidacijo. Najpogostejši viri vitamina E so rastlinska olja, sojina moka, koruza, bombaževo seme, žitni kalčki, orehi, nekoliko manj ga je v zelenolistni zelenjavi ter ribah in sadju. Antioksidacijsko delovanje tokoferolov je odvisno od strukture in se spreminja takole $\delta > \beta > \gamma > \alpha$ (Belitz in Grosch, 1999).



Slika 2: α -tokoferol (Gordon, 2003)

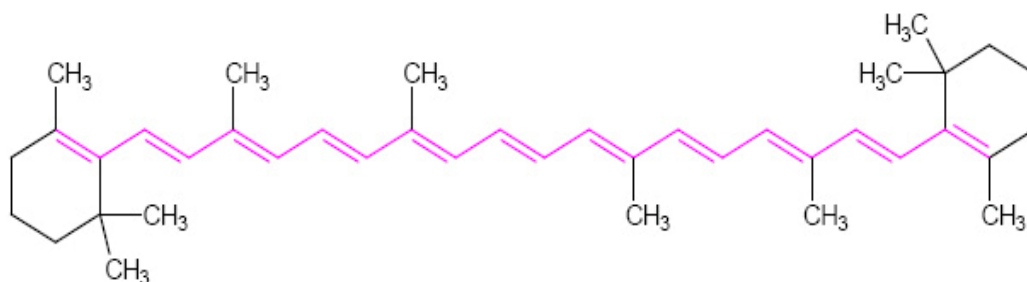
2.1.5.3 Karotenoidi in vitamin A

Karotenoidi so pigmenti, ki jih najdemo le v rastlinah in mikroorganizmih. Poznanih je že več kot šeststo različnih karotenoidov. Tako je njihov vir za človeka in živali zlasti rumeno, oranžno in rdeče obarvano sadje in zelenjava. Karotenoidi niso topni v vodi, dobro pa so topni v maščobah in nepolarnih topilih. Ločimo dva glavna razreda: karotene in ksantofile (Belitz in Grosch, 1999). Za nas sta pomembna predvsem α -karoten in β -karoten, ki sta prekurzorja vitamina A ter likopen, lutein in β -kriptoksantin (Abdalla, 2003). Karotenoidi lahko pri majhnem parcialnem tlaku kisika delujejo kot antioksidanti – lovijo proste radikale ali med fotosintezo odstranjujejo singlet kisika ter preprečujejo fotooksidativne poškodbe (Gordon, 2003).

Vitamin A so vse spojine, ki imajo biološko aktivnost retinola. Poznamo tri oblike retinoidov: alkohole (retinol), aldehide (retinal) in kisline (retinojska kislina). Tisti karotenoidi, ki se pretvorijo v retinol, so provitamini A. Najaktivnejši med njimi je betakaroten. Beta-karoten je

zelo močan antioksidant, ima antikarcinogene učinke in povečuje število limfocitov v krvi ter nas varuje pred infekcijami. Veliko ga najdemo v brokoliju, korenju, paradižniku, posušenih marelicah, zeleni solati.

Naravni viri vitamina A so še živila, kot so jetra, maslo, sir, polnomastno mleko, rumenjaki in ribe. Veliko ga je tudi v ribjem olju (Gelb, 2005).

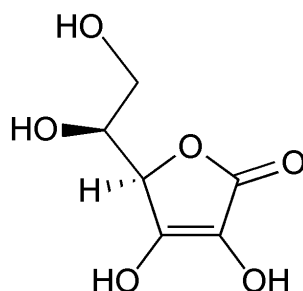


Slika 3: β -karoten (Gordon, 2003)

2.1.5.4 Vitamin C

Mnoge živali lahko vitamin C sintetizirajo same, človek pa ga mora v telo vnesti s hrano. Vitamin C ali askorbinska kislina (AA) je esencialna spojina za človeka, ki omogoča normalen potek metaboličnih funkcij. Lahko se topi v vodi in alkoholu. Priporočen dnevni vnos je 45-80 mg. Dobro je zastopan v svežem sadju, zlasti v citrusih in jagodičevju ter v sveži zelenjavi, predvsem v zelju, krompirju in zeleni papriki (Belitz, 1999). Pomanjkanje AA vodi v skorbut, njegovo uživanje pa pomaga pri celjenju ran in zlomov, ohranja prožnost kože, krepi telesno odpornost in varuje pred stresom (Gordon, 2003). AA lovi reaktivne zvrsti kisika in dušika, kot so radikali hiperoksida, hidroksila, dušikovega oksida in vodikovega peroksida, singlet kisika, ozon, peroksinitrit, dušikov dioksid itd. Glavni lastnosti, ki AA omogočata, da je le-ta močan antioksidant sta:

- nizek eno-elektronski redukcijski potencial, tako askorbata kot njegovega eno-elektronskega oksidacijskega produkta, askorbilnega radikala, ki obema oblikama omogoča, da reagirajo in reducirajo praktično vse fiziološko pomembne oksidante;
- stabilnost in majhna reaktivnost askorbinskega radikala (Abdalla, 2003).



Slika 4: Askorbinska kislina (Gordon, 2003)

2.2 METODE ZA DOLOČANJE ANTIOKSIDANTOV

Večina kemijskih metod je osnovana na sposobnosti lovljenja prostih radikalov, vendar pa je antioksidativno aktivnost moč zaznati tudi s pomočjo UV absorpcije. Za določanje sposobnosti lovljenja prostih radikalov se uporabljajo različni izzivalci, kot so hiperoksidni in hidroksilni radikal, radikal dušikovega oksida, ABTS^{•+}, radikal (2,2-azinobis(3-etilbenzotiozolin-6-sulfonat)), DPPH[•] radikal, itd. (Moure in sod., 2001).

2.2.1 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-jevim (F-C) (fosfomolibdenska-fosfovolframova kislina) reagentom v modro obarvane spojine z absorpcijskim maksimumom pri 746 nm. Absorbanco pri tej valovni dolžini merimo spektrofotometrično in je premosorazmerna količini skupnih fenolov v vzorcu.

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, čajih. Visoke vsebnosti fruktoze, sulfitov in AA lahko ovirajo analizo (Scott, 2006). Ugotovljeno pa je bilo tudi, da poleg polifenolov s F-C reagentom reagirajo tudi drugi antioksidanti (Wechtersbach, 2005), kar je pri analizah vzorcev, ki vsebujejo mešanico različnih antioksidantov, potrebno upoštevati.

2.2.2 Določanje skupne antioksidativne aktivnosti

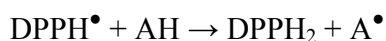
2.2.2.1 Metoda z radikalom DPPH[•]

Metoda s prostim radikalom DPPH[•] (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) je ena izmed najstarejših indirektnih metod za določanje antioksidativne aktivnosti. Metoda temelji na reakciji med stabilnim prostim radikalom DPPH[•] in donorji vodika (npr. fenoli) (Brand – Williams in sod., 1995), posledično se zmanjša absorbanca vzorca (Vidrih in Kač, 2000).

Molyneux (2004) je karakteriziral radikal DPPH[•] kot stabilen prosti radikal, saj zaradi delokalizacije prostega elektrona molekule ne tvorijo dimer. Ta delokalizacija elektronov tudi povzroča močno vijolično barvo raztopine DPPH[•] v etanolu oziroma metanolu. Ko zmešamo raztopino DPPH[•] s snovjo, ki lahko odda vodikov atom, se tvori difenilpikrilhidrazin, ki je reducirana oblika molekule. Raztopina zato izgublja vijolično barvo (ostane pa blede svetlo rumena barva zaradi prisotnosti pikrilne kisline). Zmanjšanje absorbance je tako proporcionalno koncentraciji antioksidantov v vzorcu.

Interakcija potencialnega antioksidanta z DPPH[•] je odvisna od njegove strukture. Nekatere komponente reagirajo z DPPH[•] zelo hitro, vzajemno s številom prostih hidroksilnih skupin zmanjšajo število DPPH[•]; medtem ko je za večino sestavin mehanizem delovanja kompleksnejši (Brand – Williams in sod., 1995).

Če molekula DPPH[•] reagira samo z eno molekulo antioksidanta, potem je stehiometrija reakcije 1:1. V spodnji enačbi je prikazan primer reakcije antioksidanta z DPPH[•]:



Ker ima DPPH[•] velik molarni ekstinkcijski koeficient v vidnem delu spektra, lahko koncentracijo radikala DPPH[•] določamo spektrofotometrično. Za merjenje absorbance DPPH[•] so v literaturi podane različne valovne dolžine od 515 nm do 520 nm (Szabo in sod., 2007; Miliauskas in sod., 2004; Marxen in sod., 2007), vse pa so v območju absorpcijskega maksimuma DPPH[•]. Za razliko od nekaterih drugih prostih radikalov (npr. ABTS^{•+}), DPPH[•] ne reagira z nekaterimi flavonoidi in aromatskimi kislinami, ki ne vsebujejo –OH skupin na obroču B oziroma imajo samo eno –OH skupino (Roginsky in Lissi, 2005).

Ne glede na to, ali DPPH[•] raztopimo v etanolu ali metanolu, je metoda enako učinkovita, ker ne povzročata interferenc. Osnovni opis metode je priporočal, da se reakcijo izvaja v območju pH med 5,0 in 6,5, vendar so kasnejše raziskave pokazale, da pH nima posebne vloge pri reakciji. Koncentracijo DPPH[•] izberemo v območju med 50 in 100 μM , zato da so absorbance referenčne raztopine manjše od 1,0. Reakcijski čas metode je običajno 30 minut, vendar so nekateri avtorji uporabljali tudi krajši čas (Molyneux, 2004).

2.2.2.2 Luminescenčne metode

Luminescenca je fizikalni pojav, pri katerem snov, ki ni močno segreti, seva elektromagnetno valovanje. Snov torej luminescira. Natančneje povedano se del prejete energije (preden se porazgubi po snovi v obliki toplote) 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 vzpodbudijo 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 (Garcia-Campana in Baeyens, 2001).

Luminescence razdelimo med seboj glede na vrsto dovedene energije. Poznamo:

- elektroluminescenco,
- fotoluminescenco,
- kemoluminescenco,
- kristaloluminescenco,
- mehanoluminescenco,
- radioluminescenco,
- sonoluminescenco,
- termoluminescenco

(Garcia-Campana in Baeyens, 2001).

Ker smo pri naših eksperimentih merili kemoluminescenco, jo bom bolj natančno opisala.

O kemoluminescenci lahko govorimo, kadar eksoterna reakcija proizvaja molekule v elektronsko vzbujenem stanju. Ko se te molekule vračajo v osnovno stanje, sprostitjo fotone. Kemoluminescenčne reakcije proizvajajo svetlobo brez kakršnekoli prejšnje absorpcije svetlobe oziroma sevanja (Jeran, 2008).

Delovanje kemoluminescence je odvisno od naslednjih dejavnikov:

- reakcija mora zagotavljati zadostno energijo za nastanek elektronskega vzbujenega stanja,
- reakcija mora proizvesti intermediate, ki so sposobni prenesti elektronsko vzbujeno stanje,
- reakcija mora potekati po določenem mehanizmu, da pomaga proizvesti to vzbujeno stanje preko usmerjanja tvorbe osnovnega stanja,
- reakcijska zmes mora vsebovati molekule, ki se vrnejo v osnovno stanje iz elektronsko vzbujenega stanja pri emisiji fotonov.

Za snov, ki proizvaja vidno svetlobo, je nujno, da sprejme vzbujeno energijo, ki nastane pri reakciji. Edini način za kemijsko energijo, ki je spremenjena v elektronsko energijo, je postopek skozi natančno določene intermediate, ki vsebujejo in usmerjajo reakcijski mehanizem. Ti intermediati morajo biti ustvarjeni v vzbujenem stanju in v ta namen morajo

imeti elektronsko vzbujeno stanje z energijo zelo blizu koraka, pri katerem ga tvorijo. Po tem koraku se kemična energija spremeni v elektronsko, imenuje pa se kemoelektronski korak (Jeran, 2008).

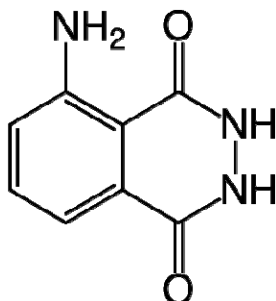
Da lahko vzbujeno stanje sploh začne proizvajati svetlobo, morajo biti poti za deaktivacijo vzbujenega stanja kinetično enake (ali boljše) z drugimi deaktivacijskimi smermi. Ta potreba se mora izpolniti pri molekulah z zelo prostornimi vibracijskimi energijskimi stopnjami. Takšne molekule nimajo svojega mehanizma za zamenjavo elektronske energije v vibracijsko energijo (toplota). Te molekule so ali zelo majhne s samo nekaj vibracijskimi stopnjami, ali pa imajo v svoji zgradbi aromatični obročni sistem. Ko je vzbujeno stanje molekule pridobljeno iz neposrednega reakcijskega mehanizma, imenujemo nastalo luminescenca neposredna luminescenca. Do luminescence lahko pride tudi preko akceptorske molekule, ki sprejme vzbujeno energijo neposredno od proizvedenega vzbujenega stanja, posledica pa je sprostitvev fotonov oziroma svetlobe. Če želimo luminescenca sploh opaziti, mora biti kinetika reakcije zadostno učinkovita, da proizvede tok fotonov, ki jih lahko vidimo. Količina emitiranih fotonov je odvisna od več reakcijskih dejavnikov (Jeran, 2008).

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.

Analitične metode, ki temeljijo na kemoluminescenci postajajo ene vodilnih analitičnih tehnik zaradi dobrih lastnosti, kot so občutljivost, selektivnost in v mnogih primerih široko linearno območje detekcije (Navas in Jimenez, 2007).

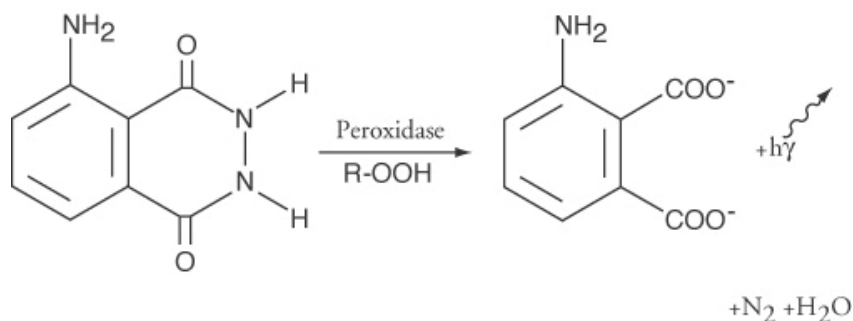
V literaturi je opisanih več luminescenčnih metod za določanje antioksidantov (Krasowska in sod. 2001; Navas in Jimenez, 2007; Di Mambro in sod., 2003; Georgetti in sod., 2003;). Pri tem različni avtorji uporabljajo različne reagente, ki ob prisotnosti prostih radikalov preidejo v vzbujeno stanje, kar povzroči emisijo svetlobe (slika 6 in 7). Med najbolj pogostimi reagenti so lucigenin, izoluminol in luminol (Krasowska in sod. 2001).

Luminol je po svoji zgradbi 5-amino-2,3-dihidroftalazin-1,4-dion ali 3-aminoftalhidrazid (slika 5).



Slika 5: Luminol (Garcia-Campana in Baeyens, 2001)

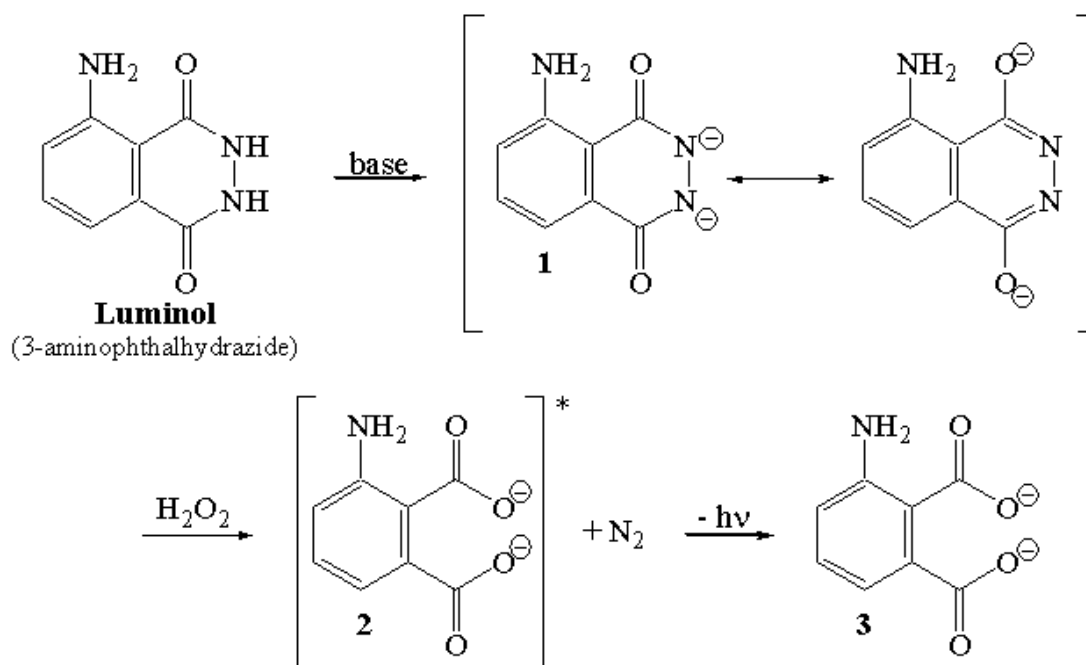
Vse luminolove reakcije so oksidacije, kot jih predstavlja enačba:



Slika 6: Oksidacija luminola (Garcia-Campana in Baeyens, 2001)

Reakcija lahko poteka v različnih medijih, vključno s protoliznimi topili, kot sta voda in alkohol, in v ne-protoliznih ali dipolarnih topilih, kot sta dimetilsulfoksid (DMSO) ali dimetilformamid (DMF). Reakcijski mehanizem je odvisen od topila. Pri vsakem mediju je potreben drug oksidant, kemoluminescenčni spekter pa je pri vsakem mediju malenkost drugačen (Jeran, 2008).

Kemoluminescenčno reakcijo luminola lahko prikažemo z osnovnimi pogoji po enačbi, ki prikazuje, da svetlobna emisija prihaja od aminoftalatnega iona:



Slika 7: Kemoluminescenčna reakcija luminola (Garcia-Campana in Baeyens, 2001)

Snov, ki je potrebna za začetek oksidacije luminola v vodnih raztopinah, je superoksidni radikalni anion O_2^- . Ta snov se tvori v vodni raztopini z razpadom H_2O_2 ali v prisotnosti kakšnega prostega radikala. V zelo bazičnih vodnih sistemih pride do razpada H_2O_2 s pomočjo katalize, ki jo povzročajo oksidacijski aktivatorji, drugače pa lahko razpade s pomočjo encima peroksidaze. Prehodno – kovinski kompleksi so lahko tudi vpleteni v elektronsko – prenosni korak pri oksidaciji luminola (Jeran, 2008).

Metoda AAPH-luminol

Metoda AAPH-luminol se uporablja za določanje različnih antioksidantov. Prosti radikal AAPH (2,2'- azobis 2- amidinopropan dihidroklorid) skupaj z luminolom proizvaja močno luminescenco. AAPH razpade na peroksilne radikale. Intenziteta luminescence hitro doseže maksimalno vrednost in ostane konstantna nekaj minut. Ob dodatku antioksidantov nastopi inhibicija luminescence (Krasowska in sod. 2001). Čas inhibicije luminescence je odvisen od AOP vzorca.

Metoda luminol- H_2O_2

Luminol reagira z oksidanti kot so H_2O_2 , superoksid in drugimi reaktivnimi kisikovimi vrstami v prisotnosti baze in kovinskega katalizatorja. Vir prostih radikalov je H_2O_2 in organski peroksidi, prisotnost kovinskih kationov (Co (II), Cu (I), Cu (II), Fe (II) in Fe (III)) pa katalizira razpad H_2O_2 v hidroksilne radikale. Tako nastane produkt v vzbujenem stanju, ki oddaja svetlobo pri 425 nm. Intenzivnost luminescence je sorazmerna z količino superoksida ali reaktivnih kisikovih vrst v vzorcu. Ob dodatku antioksidantov se stabilni signal intenzitete luminescence zmanjša in se vrne na prvotno vrednost, ko se antioksidanti v vzorcu porabijo (Navas in Jimenez, 2007).

Metoda luminol- H_2O_2 -peroksidaza

Encim peroksidaza reagira s H_2O_2 in pri tem nastane oksidirana peroksidaza, ki reagira naprej z anionom luminola, tako da nastanejo njegovi radikali. Le-ti reagirajo v nadaljnjih reakcijah, pri čemer nastaja endoperoksid, ki se pozneje razgradi v elektronsko vzbujeni dianion 3-aminofalat, ki oddaja svetlobo (luminescira), ko se vrača v prvotno stanje (Di Mambro in sod., 2003). Reakcija je inhibirana ob prisotnosti antioksidantov, dokler so antioksidanti na voljo. Ko se le-ti porabijo, ponovno poteka oksidacija luminola, kar povrne intenziteto luminescence na prvotno vrednost. AOP je povezan s časom zakasnitve luminescence in na ta način lahko posredno ugotavljamo AOP vzorca.

2.2.3 Določanje posameznih antioksidantov

Če želimo izvedeti, katere posamezne antioksidante vsebujejo vzorci, jih moramo najprej ločiti s pomočjo ustreznih separacijskih tehnik (HPLC in GC) in jih nato detektirati s pomočjo ustreznih detektorjev (UV-Vis spektrometer, refraktometer, masni spektrometer...).

2.2.3.1 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

HPLC tehnika se uporablja za detekcijo posameznih antioksidantov kot so polifenoli (antocianidini, flavonoli,...), tokoferoli, karotenoidi, vitamini. Za detekcijo posameznih polifenolov se uporablja HPLC tehnika z diodnim detektorjem pri različnih valovnih dolžinah, ki so specifične za določene polifenole. HPLC splošno predstavlja najbolj razširjeno in zanesljivo tehniko za analizo fenolnih spojin. Tehnika se zlasti uporablja v kombinaciji z UV detektorjem ter amperometričnim detektorjem (Tasioula- Margari in Okogeri, 2001). V zadnjem času se za analizo oksidiranih produktov DNA, proteinov in lipidov ter določanje antioksidantov, ki bi to lahko preprečili, kot eno najprimernejših metod vse pogosteje omenja kombinacijo tekočinske kromatografije in masne spektroskopije. Ta naj bi bila praktično idealna tako za njihovo separacijo kot tudi detekcijo (Shui in Leong, 2005).

Tudi za kvantitativno določanje tokoferolov se izvaja z HPLC. Detektorji, ki se uporabljajo za določanje tokoferolov so UV, fluorescentni in amperometrični detektor (Tasioula- Margari in Okogeri, 2001).

Za detekcijo karotenoidov v ekstraktih sadja in zelenjave, v katerih je prisotnih veliko različnih karotenoidov, HPLC analize ne moremo izvesti istočasno. Najprej je potrebno izolirati posamezne skupine karotenoidov, nato le-te nadaljnje analiziramo pod primernimi HPLC pogoji ter detektiramo z UV detektorjem (Khachik in sod., 1991).

HPLC je široko uporabljena metoda za tudi za detekcijo vitaminov (Vidović in sod., 2008) in je v današnjem času ena najbolj uporabljenih tehnik za analizo AA v različnih vzorcih (Nojavan in sod., 2008). Posamezne komponente vzorca se ločijo med seboj na osnovi različnih fizikalno- kemijskih interakcij med mobilno in stacionarno fazo, kar se na kromatogramu pokaže ko različni retencijski časi. Retencijski čas je karakterističen za vsako komponento v vzorcu. (Jeong in sod., 2008) Sistem HPLC ima različne detektorje, kot so UV-VIS, fluorescenčni, UV-MS, kapilarna elektroforeza. Za detekcijo AA se največkrat uporablja UV-VIS detektor (Vidović in sod., 2008). Različni avtorji navajajo različne valovne dolžine za detekcijo AA in sicer od 245 nm do 254 nm (Vidović in sod., 2008; Nojavan in sod., 2008). Detektor kontinuirno zaznava posamezne komponente pri prehodu skozi kolono in rekorder zapisuje dobljene rezultate v obliki vrhov. Za kvantitativno merilo upoštevamo površino vrha.

Kromatografska analiza je postopek, kjer najprej ločimo posamezne komponente vzorca in jih nato zaznamo z ustreznim detektorjem. Posamezne komponente preiskovanega vzorca se ločijo med seboj na podlagi njihovih različnih fizikalnih in kemijskih interakcij z mobilno in stacionarno fazo.

HPLC ali tekočinska kromatografija visoke ločljivosti je ena izmed najpogosteje uporabljenih kromatografskih tehnik (Martin- Hernandez in Juarez, 1993).

Pri tovrstni kromatografiji vzorec raztopimo v mobilni fazi in ga nato pod visokim pritiskom, do 400 barov, potiskamo skozi kolono. Kolona je napolnjena z delci stacionarne faze, katerih

velikost je manjša od 10 μm (Prošek, 1992). S to tehniko ločujemo snovi na osnovi adsorbcije, porazdelitve, ionske izmenjave, velikosti in biološke afinitete (Kregar, 1996).

Pri metodi HPLC molekule vzorca na poti skozi kolono prehajajo med mobilno in stacionarno fazo, pri čemer se premikajo le z mobilno fazo, v stacionarni fazi pa mirujejo. 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, ki ga komponenta prebije v koloni (Žorž, 1991). Ta je karakterističen za določeno komponento in jo pri konstantnem pretoku lahko uporabimo za njeno identifikacijo. Detektor kontinuirno zaznava posamezne komponente po prehodu skozi kolono in rekorder zapisuje dobljene rezultate v obliki vrhov.

Med migracijo topljenca skozi kromatografsko kolono je proces separacije podvržen disperziji posameznih komponent, ker vse molekule iste komponente ne potujejo z enako hitrostjo. Separacija in disperzija se povečujeta z dolžino kolone.

Širok spekter uporabe HPLC omogoča ravno raznolikost kolon in detektorjev, ki so dandanes naprodaj; tehnologija HPLC se uporablja tako za analizo amino kislin, zdravil, pesticidov, rastlinskih in živalskih hormonov, vitaminov, barvil, kot za separacijo kompleksnih zmesi makromolekul kot so proteini, polisaharidi itd. (Martin- Hernandez in Juarez, 1993).

Najenostavnejši sistem HPLC mora imeti naslednje komponente:

- Rezervoar z mobilno fazo: tukaj shranjujemo mobilno fazo, ki jo uporabljamo v HPLC. Je pogosto mešanica toksičnih in vnetljivih topil. Najpogosteje se uporabljajo primerne steklene posode, ki morajo biti dovolj tesno zaprte, da iz njih ne uhajajo hlapi topil (da se sestava faze med delom ne spreminja, kot tudi zaradi zdravstvenih razlogov). Ne smemo pa jih popolnoma zatesniti, ker bi nastal v njih zaradi črpanja podtlak, kar povzroči motnje v delovanju črpalke.
- Črpalko: zagotavlja enakomeren pretok mobilne faze skozi kolono. Od stabilnosti pretoka je namreč zelo odvisna natančnost analize.
- Injektor: kromatografska ločba je kontinuirn proces, zato vsakršen vnos dodatnih količin v sistem pomeni motnjo stacionarnih pogojev. Da je motnja čim manjša, mora doziranje vzorca v sistemu predstavljati čim manjši delež. Injektorji nam morajo omogočiti tudi dobro ponovljivost med posameznimi doziranjmi.
- Kromatografsko kolono: kolona je tisti del, kjer se ob pravilno izbranih pogojih vrši popolna ali delna separacija zmesi na posamezne komponente.

- Detektor: Vsi detektorji merijo spremembo neke fizikalne količine, ki jo povzroči prehod substance skozi merilno pretočno celico detektorja. V našem primeru je to UV-Vis detektor, katerega delovanje bazira na absorpciji svetlobe v ultravijoličnem in vidnem delu spektra. Na razpolago imamo veliko različnih detektorjev za delo v HPLC tehniki, kot so: UV-Vis, fluorescenčni, detektor na lomni količnik, detektor na električno prevodnost in drugi. Najbolj uporabljeni detektorji so UV-Vis detektorji, zaradi svoje relativno velike univerzalnosti, enostavnosti, selektivnosti in občutljivosti.
- Instrument za zapis signala: Detektorji so v bistvu vmesniki za pretvorbo časovne spremembe neke fizikalne lastnosti, ki jo povzroči prehod eluenta skozi detektorsko celico, v električni signal. Tega nato s pomočjo ustreznih instrumentov pretvorimo v analogni oziroma digitalni zapis. Najpogosteje uporabljamo za zapis signala naslednje instrumente: rekorder, integrator in računalnik. Rekorderji zapisujejo signal analogno v obliki kromatografskega zapisa. Za kvantitativno merilo upoštevamo višino vrha oziroma njegovo površino. Integrator med analizo riše kromatogram, nato pa po zaključku analize še izračuna, po predhodno nastavljenih parametrih, višine in površine posameznih vrhov v kromatogramu (Žorž, 1991).

2.2.3.2 GC-MS

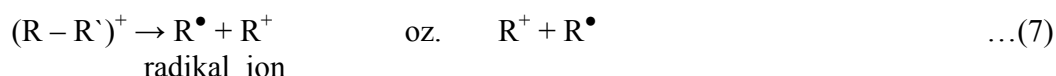
GC-MS je analitična tehnika, ki je uporabna v obsežnem območju in je bila razvita tudi za ugotavljanje polarnih in nepolarnih antioksidantov (Guo in sod., 2006; Kivilompolo in sod., 2007). GC-MS je uporabna za sočasno določanje več antioksidantov (Guo in sod., 2006; Tsai in Lee, 2008).

Prednost GC-MS je ta, da identificira komponente z uporabo retencijskega časa in glede na maso ter naboj iona (Guo in sod., 2006). GC-MS je enostavna, hitra metoda in ima dobro občutljivost, zato je primerna za kvantitativno določanje komponent, ki so prisotne v majhnih koncentracijah (Guo in sod., 2006; Tsai in Lee, 2008).

Aparatura GC-MS je sestavljena iz plinskega kromatografa in masnega spektrometra. Metoda je bila razvita v petdesetih letih prejšnjega stoletja. Plinski kromatograf v povezavi z masnim spektrometrom daje veliko boljše rezultate analiz vzorcev kot pa vsaka komponenta posebej. GC-MS se uporablja za določevanje neznanih komponent v kompleksnih vzorcih kot so hrana, pijača, voda, odpadne vode, zemlja,...

Plinski kromatograf je sestavljen iz naslednjih delov: uparilnika, separacijske kolone, detektorja in rekorderja. V uparilniku se vzorec pretvori v plinsko stanje, pri čemer mora biti uparitev čim hitrejša. Tok nosilnega plina, običajno dušika, helija ali argona, prenese uparjeni vzorec v ogrevano kolono. Kolone za plinsko kromatografijo so lahko napolnjene z granuliranim adsorbentom (aluminiev oksid, aluminijevi silikati) ali z inertnim nosilcem, ki je impregniran s tekočo stacionarno fazo (silikonska olja, polietilen glikol). Kapilarne kolone, ki se uporabljajo pri plinsko tekočinski kromatografiji (GLC), so do 100 m dolge steklene ali

kovinske cevi premera do 1 mm. Stacionarna faza je kot tanek film adsorbirana na notranji strani kapilare. Kapilarne kolone omogočajo mnogo boljše separacije kot polnjene kolone, imajo pa manjšo kapaciteto. Povišanje le-te dosežejo tako, da notranjo površino kapilare prekrijejo z inertnim nosilcem, ki ga nato impregniramo s tekočo stacionarno fazo (Kregar, 1996). Med potovanjem vzorca po koloni se le-ta razgradi na molekule. Različne molekule, različno dolgo potujejo po koloni in ta čas imenujemo retencijski čas. Posamezne molekule izstopajo iz plinskega kromatografa glede na njihov retencijski čas v masni spektrometer. Masni spektrometer molekule ujame, ionizira in detektira. Masni spektrometer je instrument, ki loči ione v plinski fazi glede na maso iona (m) in naboj (z), t.j. m/z . Ločitev ionov poteka v homogenem magnetnem polju. Molekule vzorca iz plinskega kromatografa prehajajo v vakuumski prostor. V vakuumu molekule vzorca obstreljujemo s curkom elektronov določene energije (okoli 70 eV, vakuum 10 Torr), curek elektronov zadane molekulo in izbije iz nje enega ali več elektronov. Dobimo pozitivni ion, ki naprej razpade v nevtralen fragment in ion. Večina pozitivnih ionov je obstojna med 10^{-8} do 10^{-10} sekunde, v tem času prepotujejo magnetni in elektronski sektor in se tam odklonijo. Odklon je obratno sorazmeren z maso. Rekorder beleži odklone- masni spekter (v masnem spektru vidimo samo ione, radikali so nevtralni in jih zato ne vidimo).



Če je pozitiven ion dovolj stabilen, pride do detektorja, kjer ga registriramo kot molski pik.

2.3 RASTLINSKI EKSTRAKTI

Uporaba rastlin za lajšanje bolezní ima zelo bogato zgodovino in ljudje po vsem svetu poznajo lokalne rastline, njihove zdravilne lastnosti in posamezne specifične načine uporabe. Spoznanja o učinkovitosti so temeljila na empiričnih izkušnjah, zato je poleg lajšanja simptomov pogosto prihajalo tudi do zastrupitev (Cowan, 1999).

Po predvidevanjih obstaja na svetu 250.000 do 500.000 vrst različnih rastlin. Od teh jih ljudje in živali v prehrani uporabljajo zelo malo, po ocenah 1-10 %, v zdravstvene namene pa verjetno precej več (Cowan, 1999).

Rastline imajo skoraj neomejeno sposobnost sintetiziranja aromatičnih substanc- sekundarnih metabolitov (v visokih koncentracijah), med katerimi prevladujejo fenoli oziroma njihovi derivati, tanini, terpenoidi, alkaloidi, flavonoidi, esencialna olja in sarsaponini (Kamel, 2001). Mnoge od teh snovi vplivajo na mikrobo aktivnost. Večina sekundarnih metabolitov je z različnimi bioaktivnimi lastnostmi (Dano in Bogh, 1999). Mehanizem, s katerim večina

esencialnih olj deluje antibakterijsko, je uničenje celične membrane zaradi lipofilnega značaja olja (Cox in sod., 2000).

Fenolne spojine običajno najdemo v užitnih in neužitnih rastlinah in imajo mnoge biološke učinke, tudi antioksidacijsko aktivnost. Surovi ekstrakti sadja, zelišč, zelenjave, žit in drugih rastlinskih materialov, ki so bogati z fenoli, so vedno bolj zanimivi za živilsko industrijo, ker zavirajo oksidacijo lipidov in s tem izboljšajo kvaliteto in prehransko vrednost hrane. Antioksidanti so pomembne sestavine rastlinskih materialov, ker ohranjajo zdravje, varujejo pred srčno žilnimi boleznimi in rakom, zato so vedno bolj zanimivi za raziskovalce, živilsko industrijo in potrošnike kot funkcionalna živila s specifičnimi zdravilnimi učinki (Kähkönen, 1999).

Moderna medicina je vedno bolj odprta do protimikrobnih učinkovin izoliranih iz rastlin. Temu botruje predvsem pojav odpornih sevov patogenih mikroorganizmov na tradicionalne antibiotike, ki so produkti metabolizma mikroorganizmov in/ali njihovi derivati (Cowan, 1999).

Sestava rastlinskih ekstraktov je lahko zelo različna, saj nanjo vplivajo številni dejavniki, npr. izbira dela rastline, faza rasti, mikroklimatski pogoji, sezona pobiranja in način ekstrakcije (Cowan, 1999).

V človekovem življenju imajo zelišča in začimbe veliko vlogo kot dodatek h hrani, ter alkoholnim in brezalkoholnim pijačam. Na veliko se uporabljajo kot osnove za dišave in barvila v kozmetični industriji. Prav tako je treba omeniti njihovo pomembno vlogo v zdravilstvu in medicini. Pri hrani imajo zelišča in začimbe vlogo izboljšanja senzoričnih lastnosti, kot so okus, aroma in barva. Imajo tudi pomembne antioksidativne, protimikrobne in druge bioaktivne lastnosti ter lahko pomembno dopolnijo prehransko vrednost živil. Poleg naštetih lastnosti lahko z uporabo zelišč dosežemo tudi zmanjšanje uporabe soli in sladkorja, izboljšamo teksturne lastnosti in preprečimo kvar živil (Sasikumar, 2001).

2.3.1 Šipek (*Rosa Canina* L.)

Navadni šipek (*Rosa canina* L.) je grmovnica iz družine rožnic, ki zraste do višine 3 m. Doma je v Evropi, zahodni in osrednji Aziji ter severni Afriki, udomačila pa se je tudi v Severni Ameriki. Pri nas cveti od maja do julija, dozori pa septembra in oktobra. Do 8 cm široki rožnati, redko beli, dišeči cvetovi so razporejeni posamezno ali v češuljah z malo cvetov. Plod v času obiranja je do poldrugi centimeter širok, jajčast, redko okrogel, gladek in rdeč, sestavljen je iz votlega cvetišča, v njem pa so oreški (Springer, 2003c).



Slika 9: Plodovi šipka (Cortese, 2001)

Zaradi visoke vsebnosti vitamina C uporabljamo šipek proti spomladanski utrujenosti, mlahavosti, bledici, krvavitvah dlesni. Šipkovi izdelki povečujejo odpornost organizma, zato jih uporabljamo pri bolezni z vročico, gripah in prehladih (Špringer, 2003c).

Šipek se uporablja za čaj, iz plodov izdelujejo marmelado, sirup, liker in vino.

Naravni genotipi šipka so zelo bogat vir fenolnih spojin, ogljikovih hidratov in AA, kar pojasnjuje uporabo šipka kot živila in aditiva (Ercisli, 2007).

Šipek se že dolgo uporablja kot živilo in v medicinske namene. Fenoli imajo širok spekter biokemičnih aktivnosti, kot so antioksidativnost, antimutagenost, antikarcinogenost. Temno obarvani sadeži so dober vir fenolov, vključno s flavonoidi, antocianini in kaotenoidi.

Druga zdravilna funkcija šipka je, da vsebuje esencialne maščobne kisline, ki jih ljudje ne moremo sintetizirati in jih moramo dobiti s hrano. Esencialne maščobne kisline so dolgoverižne večkratnenasičene maščobne kisline, to so linolenska, linolna, oleinska maščobna kislina. Te maščobne kisline uravnavajo telesne funkcije, npr. krvni pritisk, viskoznost krvi, imunski in vnetni odziv (Ercisli, 2007).

Šipek je dobro znan po veliki vsebnosti AA, vsebuje tudi druge vitamine (B1, B2, K) in minerale, karotenoide (provitamin A), tokoferole, flavonoide, sadne kisline, tanine, pektin, sladkorje, organske kisline, amino kisline in esencialna olja.

Glavna maščobna kislina v šipku je α -linolenska, sledi palmitinska kislina in linolna kislina. Maščobnokislinska sestava prispeva k vonju šipka (Ercisli, 2007).

Različni avtorji navajajo različne vsebnosti AA in skupnih fenolnih spojin v šipku. Uggla (2004) navaja, da je v šipku od 130 do 6694 mg/100g AA. Gao in sod. (2000) so ugotovili, da vsebuje povprečno 23,23 mg/g AA na suho težo, povprečno 76,26 mg/g skupnih fenolov na suho težo in 0,18 mg/g karotenoidov na suho težo. Ercišli in Eşitken (2004) pravita, da je v šipku od 1074-2557 mg/100g AA. Hornero-Mendez in Minquez-Mosquera (2000) navajata, da je 67,1 mg/kg karotenoidov na suho težo in Ercisli pravi, da je vsebnost AA v šipku 300 do 4000 mg/100g ter skupnih fenolov 73 do 96 mg/g suhe teže.

2.3.2 Lapuh, navadni (*Tussilago farfara*)

Navadni lapuh (*Tussilago farfara*) je rastlina, ki jo pogosto imenujejo tudi lepuh ali lopuh. Je iz roda trajnih zeljnatih rastlin.

Ima široke pritlehne liste in sredinsko brezlistnato steblo višine od 10 do 15 cm, ki nosi na vrhu rumen cvetni košek. Ob cvetenju so listi še v zemlji. Cvete v marcu in aprilu. Najpogosteje raste na vlažnih obalah rek in potokov, na ilovnatih in glinastih tleh. Cveti listi vsebujejo rastlinsko sluz, čreslovino, grenčino, eterično olje, inulin, grenek glikozid, galusovo kislino, fitosterine in rudninske snovi kalij, natrij, kalcij, magnezij.

Je že staro ljudsko zdravilo za izkašljavanje in blažilo pri napadih kašlja in tuberkuloznih težavah pljuč (Špringer, 2003a).

Deluje zoper številne gramnegativne bakterije, med njimi *Staphylococcus aureus* in *Pseudomonas aeruginosa*. Posamezne sestavine učinkujejo protivnetno, zavrejo zlepljenje krvnih ploščic, zvišajo krvni tlak in spodbudijo dihanje (Špringer, 2003a).



Slika 10: Lapuh (Špringer, 2003a)

2.3.3 Trpotec, ozkolistni (*Plantago lanceolata* L.)

Ozkolistni trpotec nabiramo med cvetenjem od aprila do oktobra. Rastlina je trajnica, raste po travnikih in ob poteh ter je ni težko najti. Uporabni so nadzemni deli, suličasti listi in cvetovi. Učinkovine v ozkolistnem trpotcu so glikozidi, sluz, klorogenska kislina, ursolna kislina ter kremenčeva kislina. Na sluznici zgornjega dela dihalnih poti naredijo tanko oblogo, ki sluznico ščiti pred draženjem. Učinkovine imajo tudi blago protimikrobno delovanje (E zdravje: Ozkolistni trpotec (*Plantago lanceolata* L.), 2008; Špringer, 2003d).

Uporabni del trpotca je list. Uporablja se proti suhemu dražečemu kašlju in zunanje za celjenje ran in ustavljanje krvavitev. Draženje na kašelj naj bi odpravljale sluzi in čreslovine. Hladni vodni izvlečki in svež sok zavrejo bakterijsko rast in uničujejo bakterije. Protibakterijsko učinkovitost pripisujejo avkubigeninu. Zniža celokupne maščobe v krvi, holesterol in trigliceride (E zdravje: Ozkolistni trpotec (*Plantago lanceolata* L.), 2008; Špringer, 2003d).



Slika 11: Trpotec (Špringer, 2003d)

2.3.4 Materina dušica (*Thymus vulgaris*)

Raste kot polgrmiček in je visoka do 30 cm. Raste na sončnih prostorih na suhih tleh. Materina dušica vsebuje poleg eteričnega olja še saponine, glikozide in čreslovine, precej je tudi mangana. Materina dušica ima veliko eteričnega olja (predvsem timola), zato razkužuje, blaži krče, rahlja sluz in pospešuje izkašljevanje. Nabiramo jo od maja do septembra (E zdravje: Materina dušica (*Thymus vulgaris*), 2008; Špringer, 2003b).



Slika 12: Materina dušica (Špringer, 2003b)

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Večina raziskave je potekala na modelnih raztopinah AA, klorogenske kisline in troloxa. Za testiranje metode pa smo uporabili ekstrakte šipka, lapuha, trpotca in materine dušice.

3.1.1 Šipek

Za analize smo uporabljali plodove navadnega šipka (*Rosa canina* L.). Po celotnem grmu šipka smo nabrali 50 g plodov, tako da plodovi predstavljajo povprečen vzorec šipka. Plodove šipka smo nabirali dvakrat na istem grmu, in sicer prvič smo jih nabirali v začetku septembra in drugič konec oktobra 2007. Plodove šipka smo nabrali na desetih različnih geografskih legah Slovenije. Plodove šipka smo ekstrahirali z 2 % metafosforno kislino (MFK) in s 95 % metanolom, nakisanim s 5 % mravljično kislino. Ekstrakte smo do analize shranjevali v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.1.2 Lapuh, trpotec in materina dušica

Lapuh, trpotec in materina dušica so bili nabrani meseca maja in junija 2008. Rastline smo ravno tako ekstrahirali z 2 % MFK in s 95 % metanolom, nakisanim s 5 % mravljično kislino ter ekstrakte do analize shranjevali v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.1.3 Reagenti

Pri delu smo uporabljali analitsko čiste reagente in kemikalije podjetij Aldrich, Merck, Sigma in Fluka. Za pripravo vseh raztopin smo uporabljali deionizirano miliQ vodo. Kemikalije, ki smo jih uporabljali pri posameznih eksperimentih, so navedene v opisu različnih eksperimentalnih metod.

3.2 METODE DELA

Priprava 2 % MFK

Kristale MFK smo v terilnici zdrobili v prah in 20 g le-tega kvantitativno prenesli v 1000 mL bučko, dopolnili z 980 g miliQ vode in dobro premešali, da so se kristali raztopili.

3.2.1 Ekstrakcija

3.2.1.1 Ekstrakcija z 2 % metafosforno kislino

6 g plodov šipka smo odtehtali v 50 mL centrifugirke, plodove smo zaradi lažje homogenizacije predhodno razrezali s škarjami. V centrifugirke smo dolili 18 g 2 % raztopine MFK ter homogenizirali toliko časa, da je zmes postala homogena. Za vsak vzorec smo pripravili po dva homogenata, ki smo ju nato skozi celulozni papir filtrirali v majhne čaše. 400 μ L filtrata smo odpipetirali v mikrocentrifugirke, v katere smo predhodno odpipetirali po 800 μ L 2 % MFK. Vsebinsko mikrocentrifugirke smo premešali in centrifugirali pet minut pri 14000 g. Potem smo supernatante s pomočjo injekcij prefiltrirali skozi CA filtre Millipore (0,20 μ m) v nove mikrocentrifugirke. Vzorce smo do analize shranjevali v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.2.1.2 Ekstrakcija z metanolom

Postopek ekstrakcije je enak kot je opisano zgoraj, le da smo namesto 2 % MFK uporabili 95 % metanol s 5 % mravljično kislino. Vzorce smo ravno tako do analize shranjevali v zamrzovalniku pri -20 °C.

Reagenti:

- MFK (Sigma, Nemčija),
- metanol (Merck, Nemčija),
- mravljična kislina (Kemika, Zagreb).

Aparature:

- homogenizator- ULTRA- TURRAX T 25 (Janke & Kunkel IKA® - Labortechnik),
- centrifugator- Eppendorf 5415C.

3.2.2 Določanje skupnih fenolnih spojin

Določitev skupnih fenolnih spojin po metodi Singleton in Rossi temelji na spektrofotometrični metodi z uporabo Folin – Ciocalteu-jevega (F-C) reagenta, kot je opisano v poglavju 2.2.1. V alkalni raztopini se fenolne spojine oksidirajo z F-C reagentom v modro obarvane spojine. Izmerjena absorbanca pri valovni dolžini 746 nm je premosorazmerna količini skupnih fenolov v vzorcu.

Reagenti:

- etanol (Merck, Nemčija),
- Folin- Ciocalteau reagent (Fluka, Nemčija),
- 20 % raztopina Na₂CO₃ (Merck, Nemčija),
- klorogenska kislina (Sigma, Nemčija),
- trolox (Aldrich, Nemčija),
- AA (standard: 99,7 %; Sigma, Nemčija).

Aparature:

- mešalo za epruvete, Tehnica, Železniki, Slovenija,
- spektrofotometer Hewlett- Packard, model HP-8453, ZDA,
- tehtnica- model Exacta 2200 EB, Tehnica, Železniki, Slovenija.

Umeritvena krivulja: Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili standardne raztopine klorogenske kisline, AA in troloxa:

- 3,5 mg klorogenske kisline smo raztopili v 100 mL 2 % MFK, tako da je bila koncentracija standardne raztopine 0,099 mM. V centrifugirke smo nato odpipetirali od 25 do 425 µL te raztopine.
- 30 mg AA smo raztopili v 100 mL 2 % MFK, tako da je bila koncentracija standardne raztopine 1,7 mM. V centrifugirke smo odpipetirali od 5 do 40 µL te raztopine.
- 4,0 mg troloxa smo raztopili v 1 mL etanola, tako da je bila koncentracija standardne raztopine 16 mM. V centrifugirke smo odpipetirali od 1 do 10 µL te raztopine.

Vsem standardnim raztopinam smo nato dodali 2 % MFK 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 Na₂CO₃. Raztopine smo premešali in po eni uri izmerili absorbanco obarvanih raztopin pri 746 nm. Slepri vzorec smo pripravili tako, da smo namesto standarde raztopine odpipetirali 725 µL 2 % MFK in jo pripravili tako kot ostale vzorce. Vse meritve za umeritvene krivulje smo izvedli v dveh paralelkah.

Analiza vzorcev: Na osnovi predposkusov smo ugotovili, koliko posameznih ekstraktov moramo odpipetirati, da signali padejo v območje umeritvene krivulje. Pri ekstraktih z MFK smo tako v centrifugirke odpipetirali po 3 µL vzorca šipka, 7,5 µL vzorca lapuha, 4 µL vzorca trpotca in 4 µL materine dušice. Vzorce, ki so bili ekstrahirani z metanolom, pa smo odpipetirali takole: 1,5 µL vzorca šipka, 7,5 µL vzorca lapuha, 2,5 µL vzorca trpotca in 2 µL vzorca materine dušice. Vse vzorce smo dopolnili do končnega volumna 725 µL z 2 % MFK, dodali 125 µL razredčenega (1:2) F-C reagenta in dobro premešali. Po petih minutah smo dodali 125 µL 20 % raztopine Na₂CO₃ ter še enkrat premešali. Reakcijsko zmes smo nato pustili eno uro na sobni temperaturi in izmerili absorbanco pri 746 nm. Vse vzorce smo analizirali v treh paralelkah.

3.2.3 Določanje antioksidacijskega potenciala z radikalom DPPH[•]

Radikal DPPH[•] absorbira svetlobo pri 517 nm. V reakciji z antioksidanti (redukcija) se radikal reducira in absorpcija se manjša. Absorpcijo smo spremljali pri 517 nm; zmanjševanje absorbance je sorazmerno koncentraciji antioksidantov v vzorcu, kot je bolj natančno opisano v poglavju 2.2.2.

Reagenti:

- DPPH[•]: 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil (Sigma, Nemčija),
- metanol (Merck, Nemčija),
- klorogenska kislina (Sigma, Nemčija),
- trolox (Aldrich, Nemčija),
- AA (standard: 99,7 %; Sigma, Nemčija).

Aparature:

- spektrofotometer Hewlett- Packard, model HP-8453, ZDA,
- magnetno mešalo IKA WERKE RCT basic.

Pripravili smo 0,081 mM raztopino radikala DPPH[•], tako da smo 3 mg radikala raztopili v 60 mL metanola in vse skupaj z magnetnim mešalom mešali 20 minut. Raztopino DPPH[•] smo pripravili vsak dan sproti, saj je precej nestabilna.

Umeritvena krivulja: Pri pripravi umeritvene krivulje smo enako kot pri določanju skupnih fenolnih spojin kot standarde uporabili AA, klorogensko kislino in trolox. Koncentracija standardne raztopine AA je bila 1,25 mM, klorogenske kisline 0,90 mM in troloxa 0,60 mM. Od 10 μ L do 70 μ L standardnih raztopin smo nato odpipetirali v centrifugirke ter jih dopolnili do končnega volumna 70 μ L z 2 % MFK pri AA, pri ostalih dveh pa z destilirano vodo. V tako pripravljene standardne raztopine smo odpipetirali po 1 mL metanolne raztopine DPPH[•] in dobro premešali. Absorbanco vzorca smo po 1 uri merili pri valovni dolžini 517 nm. Slepri vzorec smo pripravili po istem postopku, le da smo v mešanico namesto standarde raztopine dodali samo 2 % MFK ali destilirano vodo. Absorbanca slepega vzorca je bila okrog 1. Vse meritve smo izvedli v dveh paralelkah.

Analiza vzorcev: Na osnovi predposkusov smo ocenili, kakšna je vsebnost antioksidantov v vzorcih in koliko jih je potrebno razredčiti, da pridemo v območje absorbance \approx 0,5. Vodne ekstrakte šipka, lapuha, trpotca in materine dušice smo razredčili z 2 % MFK, metanolne ekstrakte pa z metanolom. V centrifugirke smo odpipetirali po 35 μ L ekstrakta šipka ali 50 μ L ekstraktov lapuha, trpotca in materine dušice ter vsakega razredčili z ustreznim topilom do skupnega volumna 500 μ L. Odpipetirali smo po 70 μ L dobro premešanega razredčenega vzorca, dodali 1 mL raztopine DPPH[•] in po eni uri izmerili absorbanco pri 517 nm. Vse vzorce smo analizirali v treh paralelkah.

AOP smo izračunali po naslednji enačbi:

$$AOP = (A_{\text{vzorca}} - A_{\text{sl.vzorca}}) / \text{naklon umeritvene krivulje}$$

AOP – antioksidativna aktivnost, izražena kot koncentracija klorogenske kisline, ki daje enak signal kot vzorec

A_{vzorca} – absorbanca vzorca po reakciji z reagentom DPPH•

$A_{\text{sl.vzorca}}$ – absorbanca slepega vzorca

3.2.4 Določanje vsebnosti askorbinske kisline na sistemu HPLC

Metoda za določanje AA s sistemom HPLC je enostavna, hitra in natančna. AA ima najboljšo absorpcijo pri valovni dolžini 250 nm. Čas, ki ga potrebuje komponenta, da pride skozi kolono oziroma jo zapusti, imenujemo retencijski čas. Spojino na izhodu kolone detektiramo s spektrofotometričnem UV-VIS detektorjem, kjer merimo absorbanco eluirane raztopine. Detektor kontinuirno zaznava posamezne komponente po prehodu skozi kolono in rekorder zapisuje dobljene rezultate v obliki vrhov, kot je bolj natančno opisano v poglavju 2.2.4.1.

Reagenti:

- H₂SO₄ (Merck, Nemčija),
- MFK (Sigma, Nemčija),
- AA (standard: 99,7 %; Sigma, Nemčija).

Kromatografski pogoji:

- kolona: SynergieC₁₈ 250 mm x 4 mm,
- avtomatski vzorčevalnik (Spark Holland, Marathon XT),
- volumen injiciranega vzorca: 20 µL,
- detektor: spektrofotometrični UV-VIS detektor KNAUER,
- mobilna faza: 5 mM H₂SO₄,
- pretok mobilne faze: 1 mL/min,
- valovna dolžina: 250 nm,
- čas analize: 12 min.

Umeritvena krivulja: Vsebnost AA smo določali na koloni SynergieC₁₈ 250 mm × 4 mm, napolnjeni z delci stacionarne faze dimenzije 4 µm. Kolono smo pred analizami spirali približno 15 min z mobilno fazo. Vse meritve za umeritveno krivuljo smo izvedli v dveh paralelkah.

Pripravili smo standardno raztopino AA v 2 % MFK s koncentracijo 5,68 mM. V steklene vialne smo odpipetirali od 20 µL do 250 µL standardne raztopine in jih dopolnili z 2 % MFK do

končnega volumna 1 mL ter dobro premešali. Viale smo dali v avtomatski vzorčevalnik in pričeli z analizo. Eluirane komponente smo spektrofotometrično detektirali z UV-VIS detektorjem pri 250 nm.

Analiza vzorcev: Analizirali smo samo vzorce šipka, ki so bili ekstrahirani z 2 % MFK. V vialo smo odpipetirali po 300 μ L vzorca in mu dodali 500 μ L 2 % MFK. Vse vzorce smo pripravili v dveh paralelkah. Tako pripravljene vzorce smo takoj analizirali na sistemu HPLC. Koncentracijo AA v ekstraktu smo določali s primerjavo vrednosti površine vrhov AA v kromatogramih standardnih raztopin, ki smo jih uporabili za pripravo umeritvene krivulje.

3.2.5 Optimizacija luminescenčne metode

Ker se v literaturi pojavlja mnogo različnih načinov analize, smo morali metodo najprej optimizirati. S pomočjo različnih poskusov smo ugotovili optimalne koncentracije reagentov luminola, H_2O_2 in hrenove peroksidaze (HRP) ter optimalne pogoje analize, kot so: pH, temperatura in količina vzorca.

Vodikov peroksid (H_2O_2) smo pripravljali vsak dan svež, luminol, raztopljen v dimetilsulfoksidu (DMSO), smo zaščitili pred svetlobo in ga do analize hranili v hladilniku. Fosfatni pufer smo ravno tako shranjevali v hladilniku. Encim HRP smo raztopili v fosfatnem pufru, da je bila njegova aktivnost 30 U/mL in jo pred uporabo vsaj 1 teden pustili v hladilniku. Razredčitve smo pripravljali vsak dan sproti, ravno tako kot tudi raztopine standardov.

Reagenti:

- Na_2HPO_4 (Merck, Nemčija),
- luminol (Fluka, Nemčija),
- dimetilsulfoksid (DMSO) (Merck, nemčija),
- vodikov peroksid (30 % H_2O_2) (Merck, Nemčija),
- hrenova peroksidaza (HRP) (269 U/mg) (Sigma, Nemčija),
- AA (standard: 99,7 %; Sigma, 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).

3.2.5.1 Določanje optimalne valovne dolžine

Priprava raztopin

0,1 M fosfatni pufer (pH = 7,4) smo pripravili tako, da smo 14,2 g Na_2HPO_4 raztopili v destilirani vodi do skupnega volumna 1 L. pH smo naravnali z dodatkom očetne kisline in s pomočjo pH-metra.

50 mg luminola smo raztopili v 1,5 mL DMSO, saj je njegova topnost v vodi zelo slaba. Odpipetirali smo 100 μL te raztopine, dopolnili s fosfatnim pufrom do skupnega volumna 10 mL in postavili v ultrazvočno kopel za približno 3 minute, da je raztopina postala homogena. Koncentracija tako pripravljene standardne raztopine je bila 1,88 mM.

80 mM raztopino H_2O_2 smo pripravili tako, da smo 80 μL H_2O_2 razredčili s fosfatnim pufrom do skupnega volumna 10 mL.

Standardno raztopino encima HRP (30 U/mL) smo s fosfatnim pufrom razredčili v volumskem razmerju 1:10, da smo dobili raztopino z aktivnostjo 3 U/mL.

Priprava reakcijske mešanice

V čašo smo odpipetirali 4,5 mL standardne raztopine luminola (1,88 mM) ter dodali 0,5 mL 80 mM H_2O_2 in dobro premešali. Tako pripravljeno mešanico smo odpipetirali v kiveto (2 mL) in dodali 100 μL encima HRP (3 U/mL) ter s fluorimetrom spremljali emisijo oddane svetlobe reakcijske mešanice, in sicer od 190 nm do 1100 nm.

3.2.5.2 Določanje optimalne koncentracije luminola

0,1 M fosfatni pufer, raztopine 1,88 mM luminola, 80 mM H_2O_2 in encima (3 U/mL) smo pripravili tako, kot je opisano v poglavju 3.2.5.1.

13 mg AA smo raztopili v 5 mL fosfatnega pufru, da smo dobili standardno raztopino s koncentracijo 15 mM. Nadaljnje razredčitve smo prilagodili tako, da so bili časi inhibirane luminescence med 5 in 20 minutami.

Priprava reakcijske mešanice

Pripravili smo različne mešanice luminola in H_2O_2 . Vedno smo odpipetirali 500 μL standardne raztopine H_2O_2 in jim dodali različne količine standardne raztopine luminola, kot je razvidno iz preglednice 1. Vsem mešanicom smo dodali fosfatni pufer do skupnega volumna 5 mL, dobro premešali in odpipetirali 2 mL mešanice v kiveto. Tik preden smo začeli z merjenjem luminescence, smo v kiveto odpipetirali še 50 μL raztopine HRP in 70 μL fosfatnega pufru. Po eni minuti smo dodali standardno raztopino AA. Koncentracije standardnih raztopin AA smo prilagodili občutljivosti metode, ki je bila odvisna od koncentracije luminola v kiveti. Količino standardne raztopine AA (15 mM) smo dodajali glede na čas inhibicije luminescence (preglednica 1), tako da so bili časi inhibicije med 5 in 20 minutami. Pri vsaki koncentraciji luminola smo naredili pet meritev z različnimi koncentracijami AA. Izračunane koncentracije luminola in AA se nanašajo na končno koncentracijo raztopin v kiveti.

Preglednica 1: Koncentracija luminola in koncentracijsko območje askorbinske kisline v kivetih

$c_{\text{luminola}} (\text{mmol} \times \text{L}^{-1})$	$c_{\text{AA}} (\text{mmol} \times \text{L}^{-1} \times 10^{-3})$
0,0741	0,20 – 1,0
0,148	0,80 – 5,0
0,223	1,0 – 10
0,299	1,0 – 10
0,373	5,0 – 15
0,742	10 – 40
1,12	20 – 80
1,65	20 – 90
2,98	80 – 400

3.2.5.3 Določanje optimalne koncentracije vodikovega peroksida

0,1 M fosfatni pufer (pH 7,4) in standardno raztopino luminola (1,88 mM), standardno raztopino encima (3 U/mL) smo pripravili, kot je opisano v poglavju 3.2.5.1.

Standardno raztopino AA (10 mM) smo pripravili tako, da smo 9,0 mg AA raztopili v 5 mL 2 % MFK.

800 mM H_2O_2 smo pripravili, tako da smo 800 μL H_2O_2 razredčili s fosfatnim pufrom do skupnega volumna 10 mL. Pripravili smo razredčitve, kot kaže preglednica 2. Izračunane koncentracije H_2O_2 se nanašajo na njegovo koncentracijo v kivetih.

Preglednica 2: Volumni dodanega 800 mM H_2O_2 in njegova koncentracija v kivetih

$V_{\text{H}_2\text{O}_2} (\mu\text{L})$	$V_{\text{pufra}} (\mu\text{L})$	$c_{\text{H}_2\text{O}_2} (\text{mmol} \times \text{L}^{-1})$
50	450	7,5
100	400	15,0
150	350	22,5
200	300	30,0
250	250	37,5
300	200	45,0

Tako pripravljenim raztopinam H_2O_2 smo dodali po 4,5 mL raztopine luminola in dobro premešali. V kiveto smo nato odpipetirali 2 mL te mešanice, dodali 70 μL fosfatnega pufru in 50 μL raztopine encima, ter takoj pričneli meriti luminescenco. Po eni minuti smo dodali 1 μL standardne raztopine AA. Vse meritve smo izvedli v treh paralelkah.

3.2.5.4 Določanje optimalne koncentracije hrenove peroksidaze

Za analizo smo pripravili 0,1 M fosfatni pufer (pH 7,4), 80 mM H_2O_2 in 1,88, mM luminol, kot je opisano v poglavju 3.2.5.1. Odpipetirali smo 4,5 mL raztopine luminola in dodali 0,5 mL H_2O_2 . 2 mL tako pripravljene raztopine smo odpipetirali v kiveto in dodali različne

volumne standardne raztopine encima HRP (3 U/mL), kot kaže preglednica 3. Po eni minuti smo dodali 10 μ L 10 mM raztopine AA ter merili čas od začetka inhibicije luminescence do takrat, ko se je signal vrnil do začetne vrednosti. Pri vsaki analizi smo naredili po tri paralelke.

Preglednica 3: Volumni dodanega encima hrenove peroksidaze (3 U/mL) in njegova koncentracija v kiveti

$V_{\text{encima HRP}}(\mu\text{L})$	$c_{\text{encima HRP}}(\text{U}\times\text{mL}^{-1})$
25	0,036
50	0,071
75	0,11
100	0,14
150	0,21
200	0,28

3.2.5.5 Določanje optimalnega pH

Pripravili smo fosfatne pufre z različnimi vrednostmi pH. pH smo nastavili z dodatkom očetne kisline, izmerili pa s pH-metrom. Pripravili smo šest pufrov z različnim pH, in sicer 8,5, 8,0, 7,4, 7,0, 6,5, 6,0. Raztopine 1,88, mM luminola, 80 mM H_2O_2 in HRP (3 U/mL) smo pripravili tako, kot je opisano v poglavju 3.2.5.1, le da smo za pripravo raztopin uporabljali pufre z različnimi vrednostmi pH.

Pri pripravi reakcijske mešanice smo odpipetirali 4,5 mL raztopine luminola in dodali 0,5 mL H_2O_2 . 2 mL tako pripravljene raztopine smo odpipetirali v kiveto, dodali 70 μ L pufrin in 50 μ L encima ter takoj pričeli z analizo. Po eni minuti smo v kiveto dodali še 10 μ L 10 mM standardne raztopine AA (tri paralelke) in merili čas inhibicije luminescence.

3.2.5.6 Določanje optimalne temperature

Priprava raztopin in potek analize je bil enak kot pri določanju optimalnega pH (3.2.5.5), le da smo za vse eksperimente uporabili fosfatni pufer s pH 7,4, spreminjali pa smo temperaturo mešanice v kiveti, kar nam je omogočal fluorimeter, ki ima vgrajen termostat. Vse meritve smo izvedli v treh paralelkah. Čas inhibicije luminescence smo merili pri temperaturi od 20 °C do 50 °C.

3.2.5.7 Ponovljivost luminiscenčne metode

Priprava raztopin in potek analize je bil enak kot pri določanju optimalnega pH (3.2.5.5), le da smo pri eksperimentih uporabili večjo encimsko aktivnost. Dodali smo 100 μ L raztopine encima z aktivnostjo 3 U/mL. Vse meritve smo opravili pri sobni temperaturi. Pripravili smo še standardno raztopino AA s koncentracijo 40 mM. V kiveto smo 5-krat zapored, ne da bi pri tem zamenjali reagente v kiveti, odpipetirali po 5 μ L standardne raztopine AA ter vsakič merili čas inhibicije luminescence.

Eksperiment smo ponovili tako, da smo 5-krat odpipetirali po 5 μL standardne raztopine AA in pri tem vsakič zamenjali reagente v kivetu ter merili čas inhibicije luminescence.

Izračun standardne deviacije:

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

x_i = i-ta enota statistične populacije

\bar{x} = aritmetična sredina populacije

N = število vseh enot

3.2.6 Določanje antioksidativne aktivnosti z optimizirano luminescenčno metodo

Reakcija med kisikom in luminolom je inhibirana ob prisotnosti antioksidantov, dokler so antioksidanti na voljo. Ko se le-ti porabijo, ponovno poteka oksidacija luminola, kar povrne intenziteto luminescence na prvotno vrednost. AOP je povezana s časom zakasnitve luminescence in na ta način lahko posredno ugotovljamo AOP vzorca.

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

Reagenti:

- Na_2HPO_4 (Merck, Nemčija),
- luminol (Fluka, Nemčija),
- dimetilsulfoksid (DMSO) (Merck, nemčija),
- vodikov peroksid (H_2O_2) (Merck, Nemčija),
- hrenova peroksidaza (HRP) (369U/mL) (Sigma, Nemčija),
- klorogenska kislina (Sigma, Nemčija),
- trolox (Aldrich, Nemčija),
- AA (standard: 99,7 %; Sigma, 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).

Umeritvena krivulja: Pripravili smo standardne raztopine AA, klorogenske kisline in troloxa. Koncentracija standardne raztopine AA je bila 250 mM, klorogenske kisline 25 mM in troloxa 100 mM. Za vse razredčitve smo uporabljali 0,1 M fosfatni pufer (pH = 7,4). Reakcijsko mešanico smo pripravili tako, da smo odpipetirali 4,5 mL 1,88 mM raztopine luminola in dodali 0,5 mL 80 mM H₂O₂. 2 mL tako pripravljene raztopine smo odpipetirali v kiveto, dodali 70 µL pufra in 100 µL encima ter takoj pričeli z analizo. Koncentracija encima je bila takšna, da je bil začetni signal luminescence vedno približno 600 a.u. Po eni minuti smo dodali standardne raztopine AA. Dodajali smo različne količine standardnih raztopin, kot je razvidno iz preglednice 4. 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 kiveti.

Preglednica 4: Koncentracije in volumni dodanih standardnih raztopin antioksidantov ter območje koncentracij le-teh v kiveti

	$c_{\text{standarda}} \text{ (mmol} \times \text{L}^{-1})$	$V \text{ (}\mu\text{L)}$	$c \text{ (mmol} \times \text{L}^{-1} \times 10^{-3})$
AA	250	0,5-3,5	0,060-0,42
klorogenska kislina	25	1,0-9,0	0,012-0,11
trolox	100	0,5-3,5	0,024-0,17

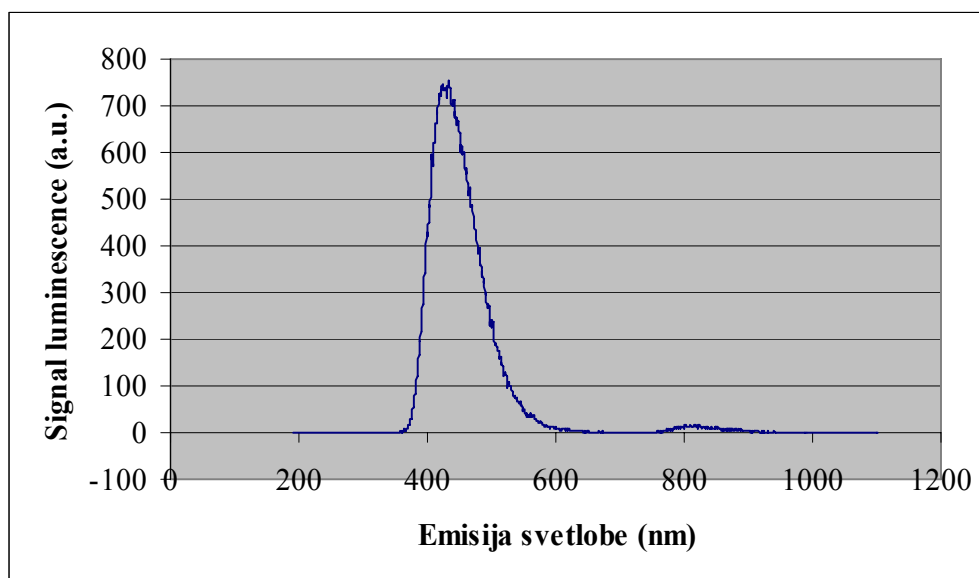
Analiza vzorcev: Postopek priprave raztopin in analize vzorcev je potekal enako kot pri umeritveni krivulji, le da smo namesto standarda v kiveto odpipetirali ekstrakte zdravih zelišč. Analizirali smo vzorce, ekstrahirane z 2 % MFK, kot tudi tiste, ki so bili ekstrahirani z metanolom. Količino dodanega vzorca smo prilagodili glede na AOP posameznega vzorca. Za vsak vzorec smo naredili po dve paralelki. Pri analizi šipkovih ekstraktov smo v reakcijsko mešanico dodali po 5 µL vzorca. Za analizo ekstraktov lapuha, trpotca in materine dušice smo uporabili 20 µL vzorca, razen v primeru metanolnega ekstrakta materine dušice, ko smo uporabili 5 µL vzorca.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 OPTIMIZACIJA LUMINESCENČNE METODE

4.1.1 Določanje optimalne valovne dolžine detekcije

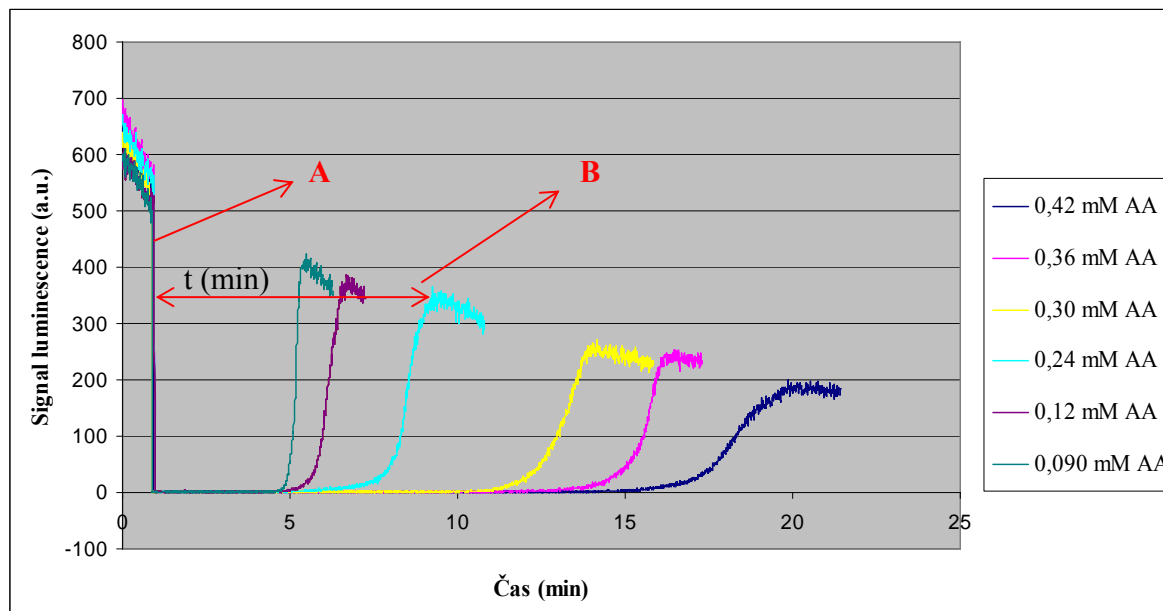
S fluorimetrom smo spremljali spekter oddane svetlobe reakcijske mešanice, ki je vsebovala luminol, H_2O_2 in encim HRP, kot je opisano v poglavju 3.2.5.1. Posneli smo emisijski spekter med 190 nm in 1100 nm.



Slika 13: Emisijski spekter reakcijske mešanice

Kot vidimo na sliki 13, je emisijski maksimum pri valovni dolžini okrog 420 nm, zato smo se odločili, da vse nadaljnje meritve opravljamo pri tej valovni dolžini. Pri meritvah je bila emisijska reža nastavljena na 20 nm, napetost fotopomnoževalke pa je bila 1000 V. Na ta način je bil začetni signal reakcijske mešanice približno 600 a.u.

4.1.2 Merjenje časa inhibicije luminescence

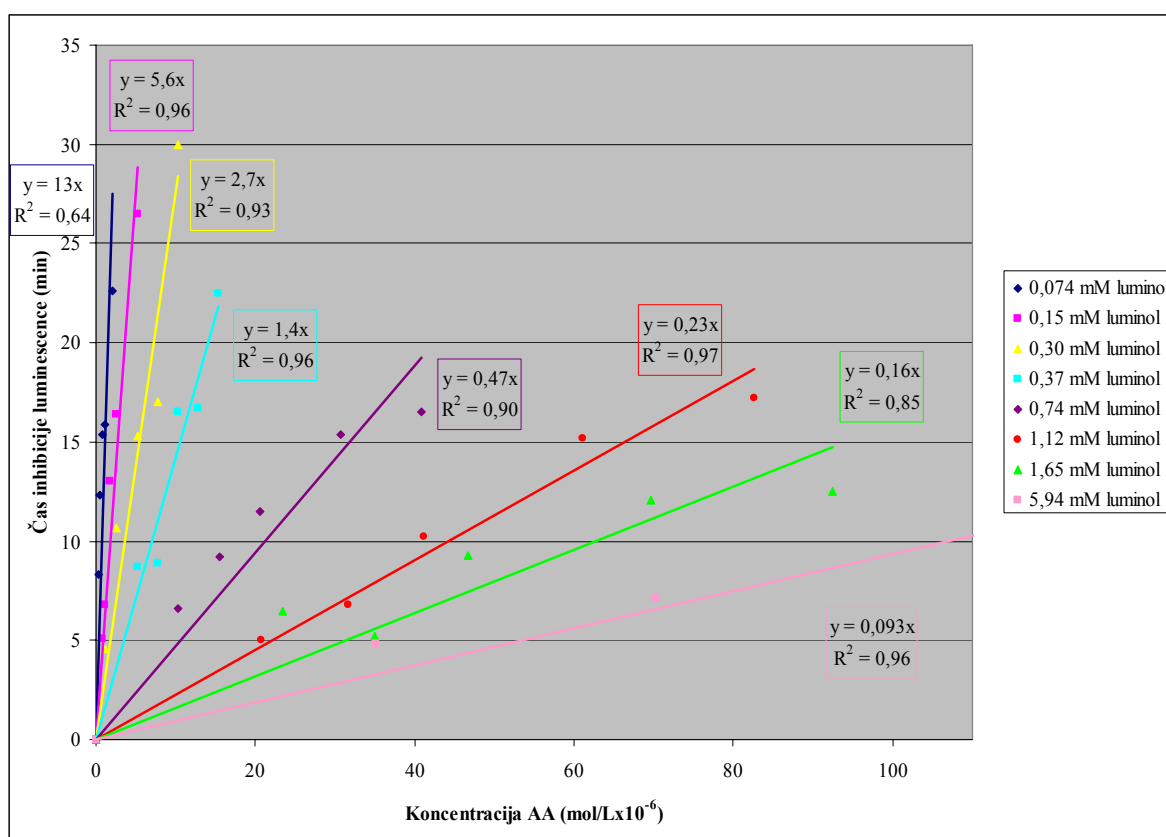


Slika 14: Prikaz merjenja inhibicije luminescence

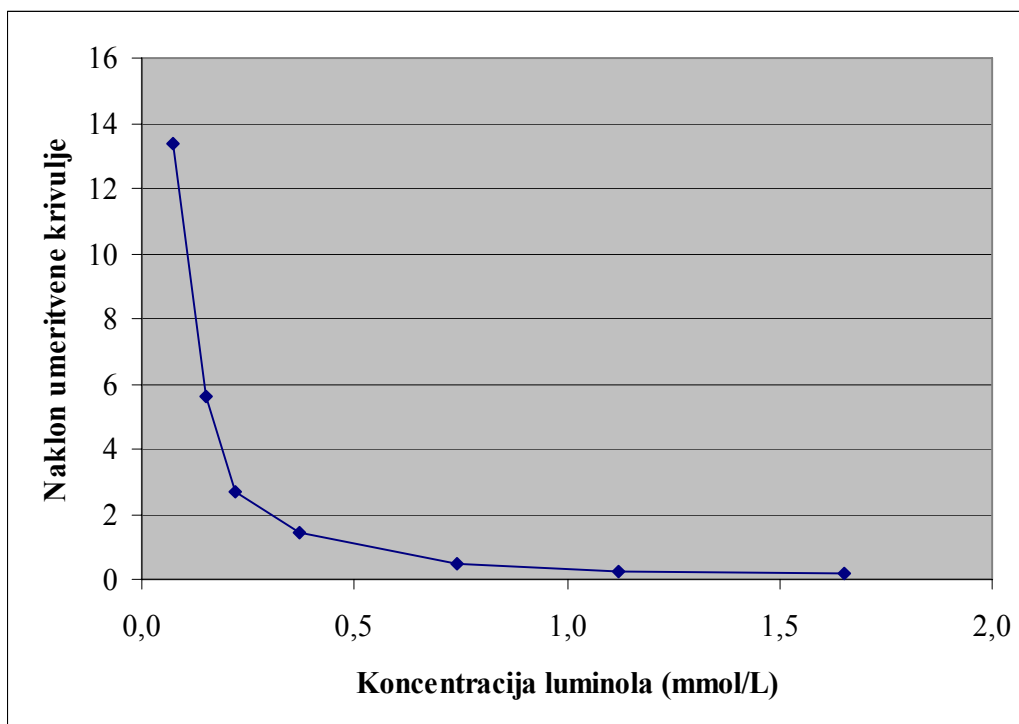
Da bi ugotovili, kako je najbolje odčitati izmerjene vrednosti, smo naredili naslednji poskus. V kiveto smo dali luminol, H_2O_2 in encim HRP, kot je opisano v poglavju 3.2.6 in takoj začeli z merjenjem luminescence. Kot vidimo na sliki 14, se začetna intenziteta luminescence zmanjšuje, saj se v mešanici porablja H_2O_2 , ki povzroči oksidacijo luminola in posredno luminescenco. Po eni minuti smo dodali v kiveto standardne raztopine AA različnih koncentracij. Kot je prikazano na sliki 14, ob dodatku standarda takoj nastopi inhibicija luminescence (točka A). Dokler so antioksidanti v vzorcu na voljo, je reakcija med kisikom in luminolom inhibirana, detektor pa luminescence ne zazna. Ko se antioksidanti iz vzorca porabijo (točka B), ponovno poteka oksidacija luminola, kar povrne intenziteto luminescence na višjo vrednost. Izkazalo se je, da je čas zakasnitve luminescence premo sorazmeren s koncentracijo dodanega antioksidanta. Največjo linearnost smo dosegli, če smo merili čas od začetka inhibicije luminescence do višje vrednosti luminescence, kot je prikazano na sliki, čeprav se v literaturi pojavljajo drugačni načini, saj avtorji ponavadi merijo čas od začetka inhibicije do povrnitve signala na polovično vrednost (Osamu in sod., 1997).

4.1.3 Določanje optimalne koncentracije luminola

Želeli smo določiti optimalno koncentracijo luminola v kiveti, da bo ob dodatku primerne količine (5 μ L) ekstrakta v kiveto čas inhibicije luminescence med 5 in 20 minutami. Povečanje koncentracije luminola v reakciji povzroči, da se kemoluminescenčni signal poveča (Sakharov, 2001), kar smo opazili tudi sami. Mi pa smo želeli preveriti, ali ima količina luminola vpliv tudi na občutljivost metode. Zato smo pripravili umeritvene krivulje z različnimi koncentracijami luminola in AA, kot je opisano v poglavju 3.2.5.2.



Slika 15: Čas inhibicije luminescence v odvisnosti od koncentracije askorbinske kisline



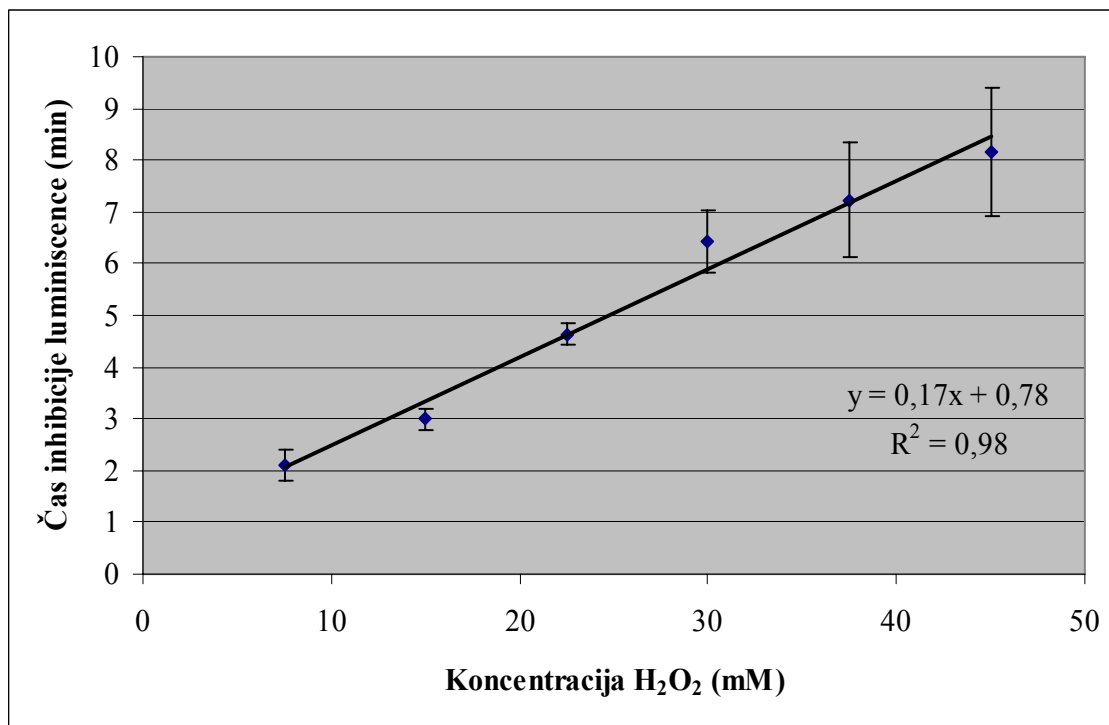
Slika 16: Naklon umeritvenih krivulj za določanje askorbinske kisline v odvisnosti od koncentracije luminola

Iz slik 15 in 16 lahko razberemo, da se z večanjem koncentracije luminola v kiveti nakloni umeritvenih krivulj zmanjšujejo, kar pomeni, da se skrajšujejo časi inhibicije luminescence pri isti koncentraciji standardne raztopine AA. Pri koncentracijah luminola, ki so večje od 2 mM so se pojavile težave s topnostjo le-tega, saj se je v kiveti pojavila oborina, kljub temu, da smo luminol predhodno raztopili v nepolarnem topilu DMSO. Ob spremembi polarnosti topila ob dodatku fosfatnega pufru je tako prišlo do obarjanja luminola v kiveti, kar onemogoča meritve.

Na osnovi teh poskusov smo se odločili, da je optimalna koncentracija luminola v kiveti za analizo ekstraktov zdravilnih zelišč, ki smo jih imeli na voljo, 1,6 mM. Za ekstrakte z nižjimi vsebnostmi antioksidantov, pa lahko občutljivost metode relativno enostavno zvečamo z nižjimi koncentracijami luminola.

4.1.4 Določanje optimalne koncentracije vodikovega peroksida

Da bi določili optimalno koncentracijo H_2O_2 , smo pripravili različne mešanice, kot je opisano v poglavju 3.2.5.3.

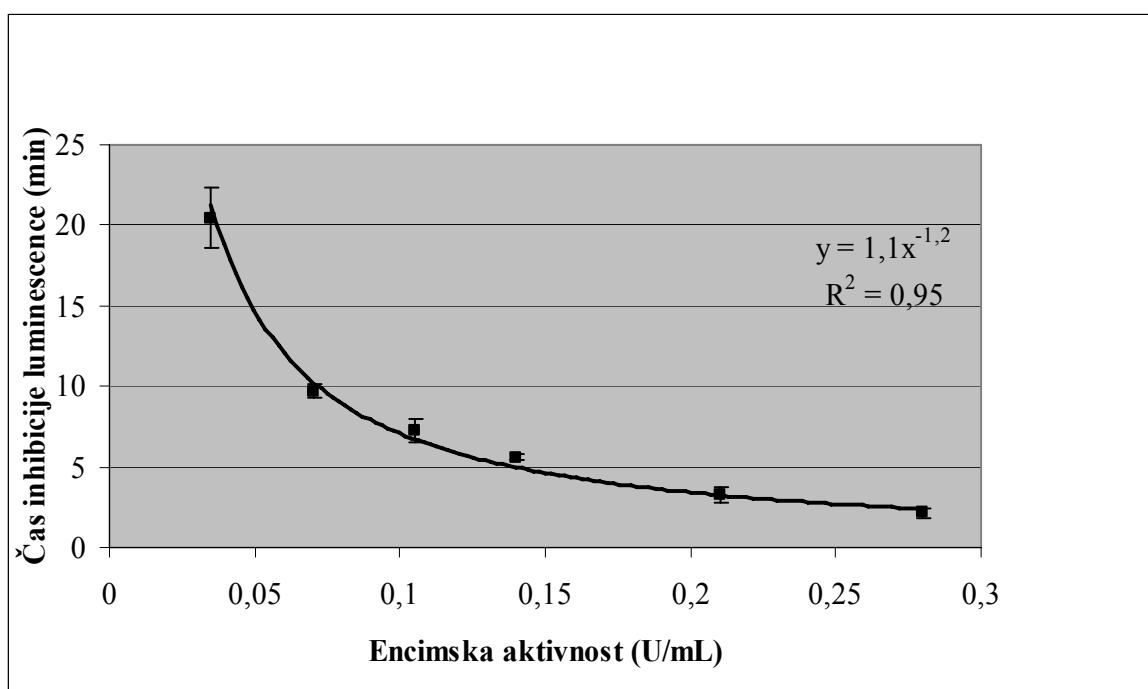


Slika 17: Čas inhibicije luminescence v odvisnosti od koncentracije vodikovega peroksida

S slike 17 lahko vidimo, da se z večanjem koncentracije H_2O_2 v kivetu čas inhibicije luminescence na preiskovanem koncentracijskem območju premo sorazmerno podaljša pri dodatku iste koncentracije standardne raztopine AA. S količino H_2O_2 tako lahko podobno kot s količino luminola vplivamo na občutljivost luminiscenčne metode. Večje koncentracije H_2O_2 so primerne za vzorce, ki vsebujejo malo antioksidantov, ker na ta način podaljšamo čas inhibicije luminescence in na ta način znižamo mejo detekcije antioksidantov. Po drugi strani pa iz slike 17 lahko razberemo, da se pri večjih koncentracijah H_2O_2 pojavijo večje napake meritve pri merjenju časa inhibicije luminescence. Glede na majhno napako meritve in glede na zadostno občutljivost metode za analizo ekstraktov šipka smo se odločili za 7,5 mM H_2O_2 .

4.1.5 Določanje optimalne aktivnosti hrenove peroksidaze

Ugotavljali smo, kako encimska aktivnost vpliva na občutljivost luminescenčne metode. Pripravili smo različne reakcijske mešanice, kot je opisano v poglavju 3.2.5.4. V literaturi smo našli podatek, da obstaja linearna odvisnost med koncentracijo encima in intenziteto luminescence v širokem koncentracijskem območju (Sakharov, 2001). Nas pa je zanimalo, kako encimska aktivnost vpliva na občutljivost luminescenčne metode.

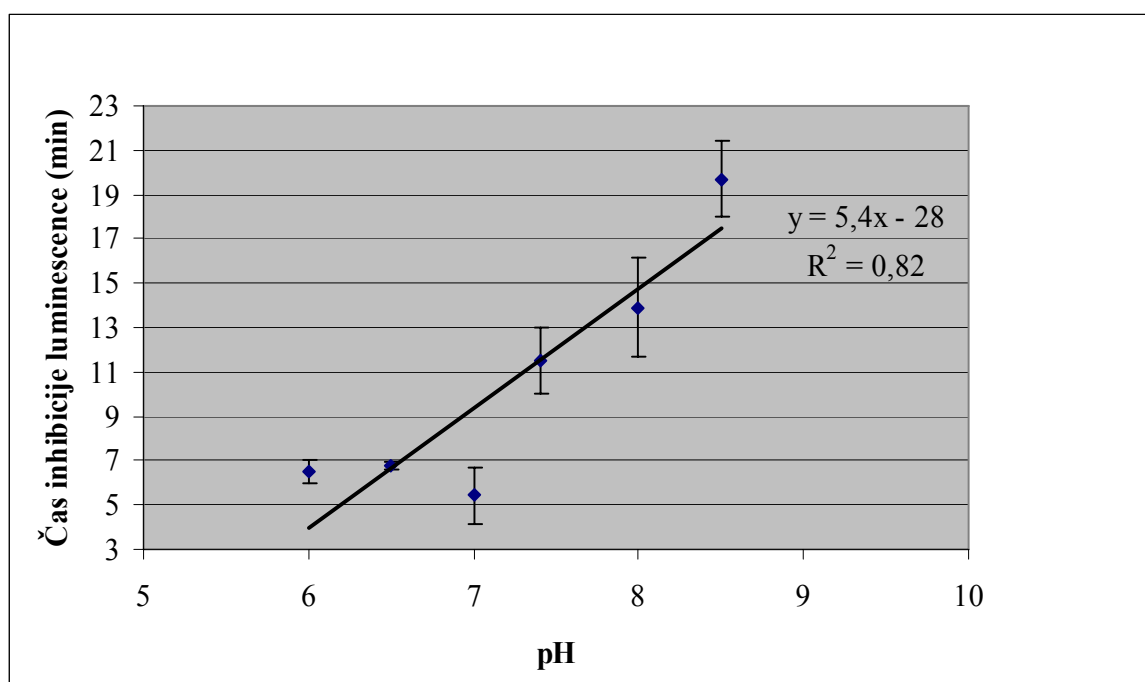


Slika 18: Čas inhibicije luminescence v odvisnosti od encimske aktivnosti

Na sliki 18 vidimo, da se z višanjem encimske aktivnosti v reakcijski mešanici skrajša čas inhibicije luminescence pri isti koncentraciji dodanih antioksidantov. To pomeni, da se z manjšanjem encimske aktivnosti občutljivost luminescenčne metode povečuje. Vpliv encimske aktivnosti na dolžino inhibicije luminescence je precejšen, saj so pri 8-kratnem povečanju encimske aktivnosti čas inhibicije pri enakem AOP zmanjšal od 20,5 minute na le 2,1 minuto. Glede na koncentracijo antioksidantov v preiskovanih vzorcih smo se odločili za encimsko aktivnost 0,14 U/mL, kar je omogočalo tudi najbolj primerne hitrosti analize vzorcev. Pri zelo nizkih encimskih aktivnostih nastane tudi večja napaka pri merjenju časa inhibicije luminescence, kar je prikazano na sliki 18.

4.1.6 Določanje optimalnega pH

Glede na to, da je del reakcij luminescenčne metode encimsko kataliziran, smo predvidevali, da na občutljivost metode lahko vplivamo tudi s spremembo pH pufru, v katerem pripravljamo raztopine. Sakharov (2001) navaja, da je maksimalna luminescenca izmerjena pri pH 8,3 – 8,6. V literaturi je navedeno tudi, da je optimalen pH za delovanje HRP med 6 in 6,5 (Aoyama in sod., 1998).

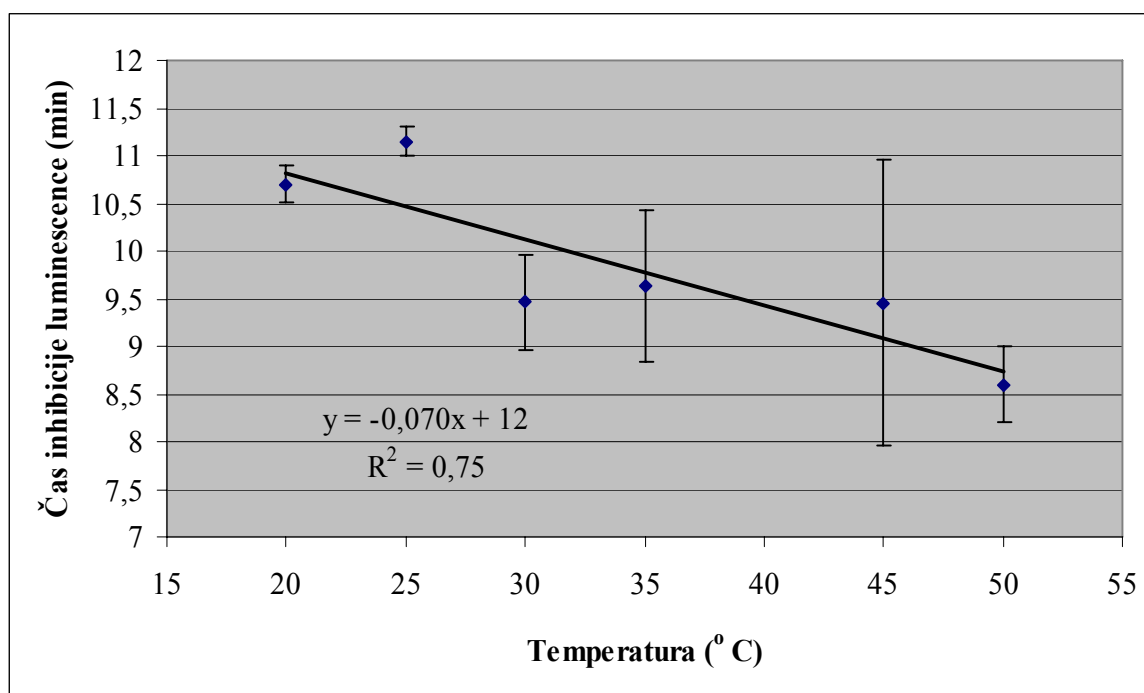


Slika 19: Čas inhibicije luminescence v odvisnosti od pH

Merili smo inhibicijo luminescence na območju pH med 6,0 in 8,5, vedno pri dodatku enake količine antioksidantov. Kot vidimo na sliki 19, ima pH precejšen vpliv na občutljivost metode, saj se čas inhibirane luminescence spreminja od 5,4 min pri pH 7,0 do 19,7 min pri pH 8,5 pri dodatku enake količine antioksidantov. Z višanjem pH fosfatnega pufru se tako podaljšajo časi inhibicije luminescence. Pri nižjih vrednostih pH (6,0-7,0) so se zopet pojavile težave s topnostjo luminola, nastala je namreč oborina. Pri višjih vrednostih pH (8,0 in 8,5) pa se pojavi večja napake meritve, zato smo se odločili, da za naše delo uporabljamo fosfatni pufer s pH 7,4.

4.1.7 Določanje optimalne temperature

Na encimsko katalizirane reakcije močno vpliva tudi temperatura, zato smo opazovali občutljivost luminescenčne metode pri različnih temperaturah reagentov v kivetih. Aktivnost encima HRP narašča do temperature 60 °C (Chattopadhyay in Mazumdar, 2000), ko pride do njegove denaturacije.



Slika 20: Čas inhibicije luminescence v odvisnosti od temperature

Kot vidimo tudi na sliki 20, se z večanjem temperature aktivnost encima povečuje, kar pripelje do krajših časov inhibicije luminescence ob dodatku enake količine antioksidantov. Vpliv temperature na občutljivost metode pa je relativno majhen, saj se časi inhibirane luminescence skrajšajo le za približno dve minuti, če reakcijsko mešanico segrejemo iz 20 °C na 50 °C. Odločili smo se, da nadaljnje meritve izvajamo pri sobni temperaturi, to je temperatura okrog 25 °C. Pri tej temperaturi je tudi napaka merjenja inhibicije luminescence najmanjša. Pri višjih temperaturah je napaka meritve precej večja, pri temperaturah, višjih od 50 °C, pa merjenje časov inhibicije luminescence sploh ni več mogoče, kar je verjetno posledica temperaturnega razpada H₂O₂.

4.1.8 Ponovljivost luminescenčne metode

Zanimalo nas je, ali lahko več meritev izvajamo z isto mešanico reagentov ali je bolje, če le-te vsakič sproti zamenjamo. Primerjali smo standardne deviacije petih zaporednih meritev, ko smo dodali enako količino antioksidantov.

Preglednica 5: Standardna deviacija časa inhibicije luminescence

Čas inhibicije luminescence	t_1 (min)	t_2 (min)	t_3 (min)	t_4 (min)	t_5 (min)	σ (min)
zaporedoma	6,0	5,5	5,1	5,9	6,1	0,37
posamezno	6,0	5,7	5,9	5,8	5,9	0,10

Kot vidimo v preglednici 5, je bila standardna deviacija časa inhibicije luminescence pri dodatku standardne raztopine AA, ki smo jo odpipetirali 5-krat zaporedoma, ne da bi pri tem zamenjali reagente v kiveti (zaporedoma), 0,37 min. Standardna deviacija časa inhibicije luminescence pri dodatku standardne raztopine AA, potem ko smo vsakič zamenjali reagente v kiveti pred analizo (posamezno), pa je bila 0,10 min.

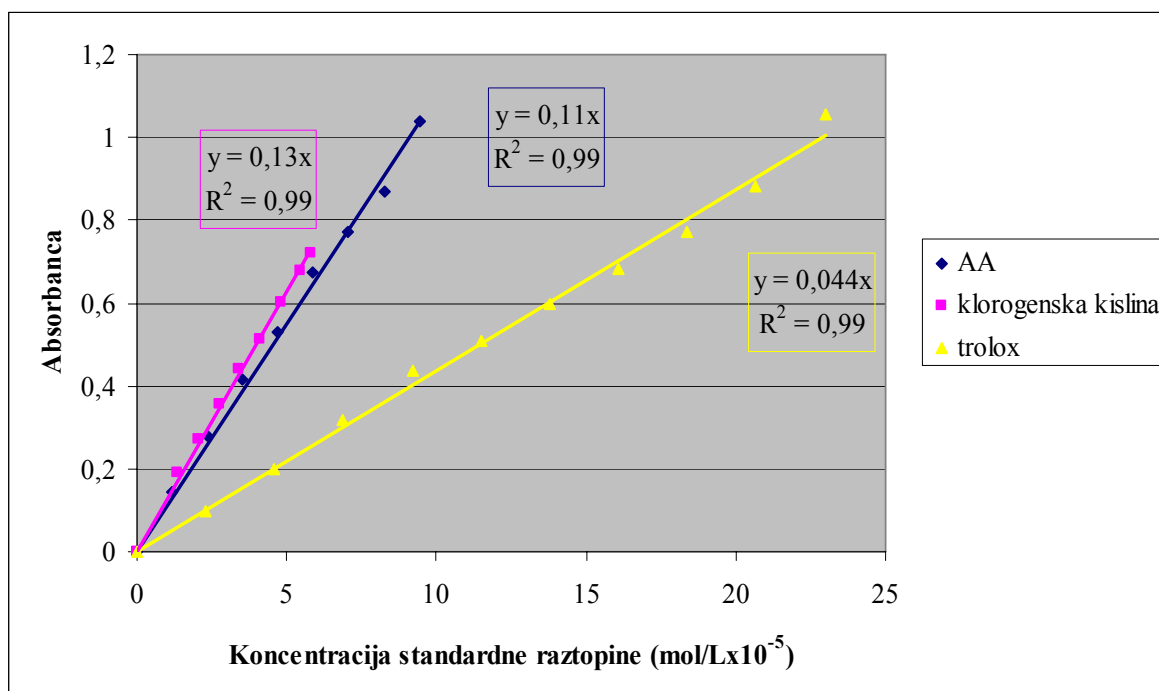
Glede na rezultate lahko zaključimo, da je napaka meritve manjša, če pred vsako analizo pripravimo mešanico svežih reagentov v kiveti, zato smo umeritvene krivulje in analizo vzorcev izvedli na ta način.

4.2 ANALIZE STANDARDNIH RAZTOPIN

4.2.1 Metoda za določanje skupnih fenolnih spojin

Merili smo absorbanco standardnih raztopin AA, klorogenske kisline in troloxa pri valovni dolžini 746 nm. Standardne raztopine oksidirajo s F-C reagentom in nastanejo modro obarvane spojine.

Med seboj smo primerjali standardne raztopine AA, klorogenske kisline in troloxa. Kot je razvidno iz slike 21, so umeritvene krivulje vseh standardnih raztopin linearne. Metoda je najbolj občutljiva za določanje klorogenske kisline in AA, medtem ko nam iste koncentracije troloxa dajejo nižje signale. Razlike v naklonu umeritvenih krivulj za AA in klorogensko kislino v primerjavi s troloxom je relativno velika, saj sta prvi dve kar 2,9-krat bolj strmi kot umeritvena krivulja troloxa.

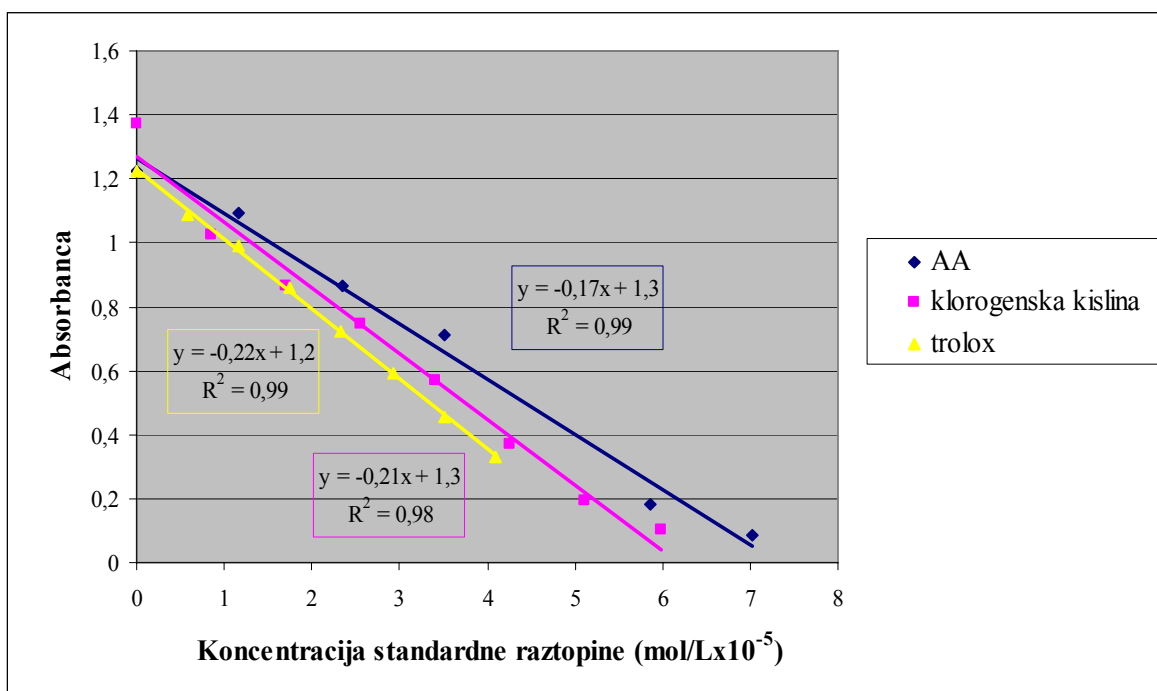


Slika 21: Umeritvene krivulje askorbinske kisline, klorogenske kisline in troloxa s F-C metodo

4.2.2 Metoda za določanje skupne antioksidativne aktivnosti z radikalom DPPH[•]

Spremljali smo absorpcijo svetlobe radikala DPPH[•] pri 517 nm. V reakciji s standardnimi raztopinami radikal razpada in absorpcija se manjša, zmanjševanje absorbance je sorazmerno koncentraciji antioksidanta v standardnih raztopinah.

Na sliki 22 vidimo, da so tudi pri tej metodi vse umeritvene krivulje standardnih raztopin linearne. Raztopine različnih standardov pa različno reagirajo z radikalom DPPH[•]. Najbolj strmo umeritveno krivuljo smo dobili pri troloxu, manj strmo pri klorogenski kislini, najbolj položno pa pri AA. Razlike v naklonu umeritvenih krivulj za posamezne standarde pa so relativno majhne, saj je razlika med najbolj strmo in najbolj položno le 27 %.

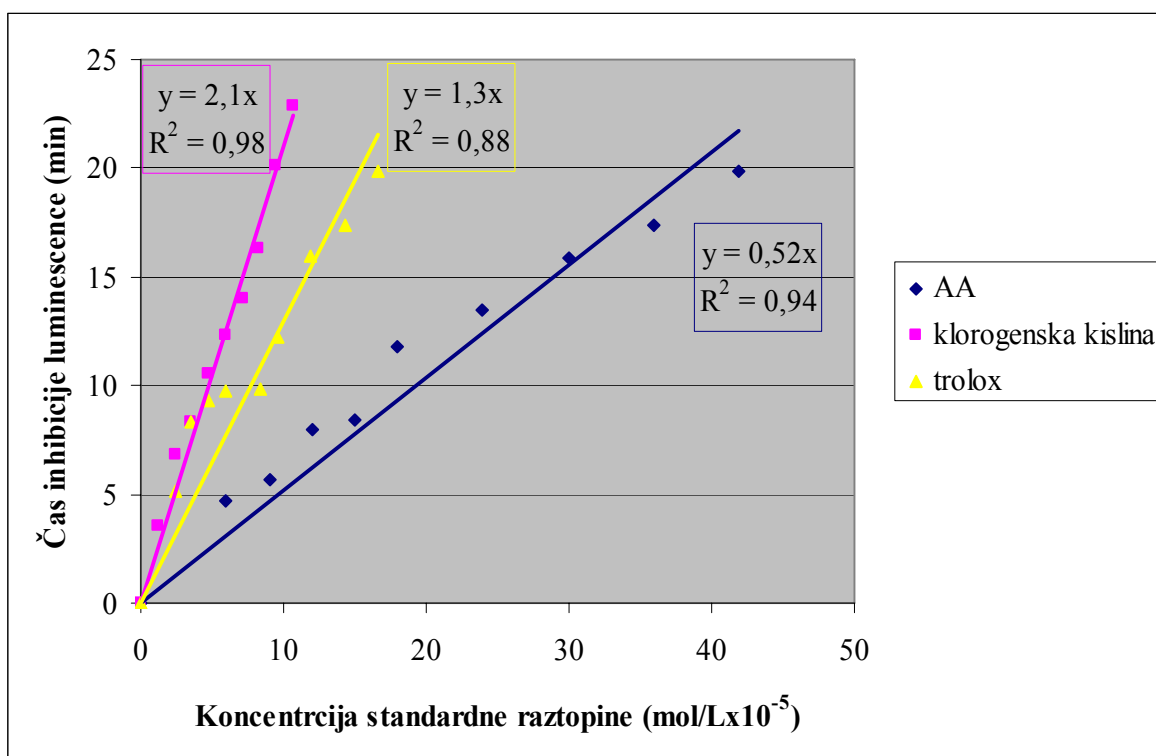


Slika 22: Umeritvene krivulje askorbinske kisline, klorogenske kisline in troloxa z metodo z radikalom DPPH•

4.2.3 Luminescenčna metoda

Z optimizirano luminescenčno metodo smo pripravili umeritvene krivulje standardnih raztopin AA, klorogenske kisline in troloxa.

Podobno kot pri metodi za določanje skupnih fenolnih spojin in metodi za določanje skupne antioksidativne aktivnosti z radikalom DPPH• so tudi pri luminescenčni metodi umeritvene krivulje standardnih raztopin linearne (slika 23). Največji naklon umeritvene krivulje smo določili za raztopine klorogenske kisline, najmanjšega pa za raztopine AA. Naklon je pri klorogenski kislini kar 4,1-krat večji kot pri AA.



Slika 23: Umeritvene krivulje askorbinske kisline, klorogenske kisline in troloxa z luminescenčno metodo

4.3 ANALIZA RASTLINSKIH EKSTRAKTOV

Dvajset vzorcev šipka iz različnih geografskih predelov Slovenije ter vzorce lapuha, trpotca in materine dušice smo analizirali s tremi metodami za ugotavljanje njihove AOP (F-C, DPPH[•] in luminescenčna). Vse vrednosti smo preračunali na ekvivalentno vsebnost klorogenske kisline. V vzorcih šipka smo s pomočjo HPLC določili vsebnosti AA.

4.3.1 Vrednosti antioksidativne aktivnosti v rastlinskih ekstraktih

Da bi primerjali tri metode (F-C metoda, metoda z radikalom DPPH[•] in luminescenčna metoda) za določanje AOP, smo naredili analizo 23 vzorcev zdravilnih zelišč, ekstrahiranih z 2 % MFK, kot je opisano v 3.2.1.1.

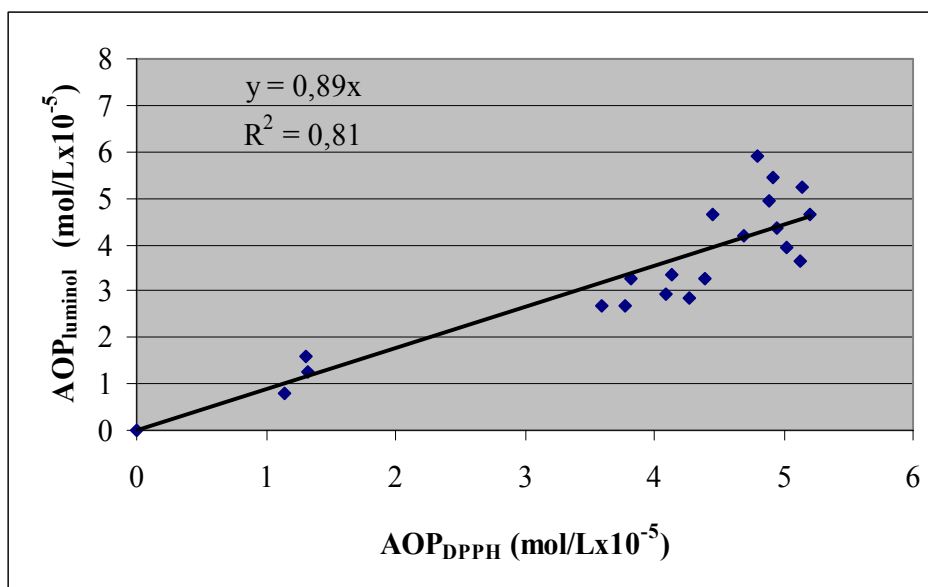
Preglednica 6: Antioksidativna aktivnost v rastlinskih ekstraktih

Vzorci		F-C metoda	metoda z radikalom DPPH [•]	luminescenčna metoda
		\bar{c} (mol/L × 10 ⁻⁵)	\bar{c} (mol/L × 10 ⁻⁵)	\bar{c} (mol/L × 10 ⁻⁵)
1. obiranje	šipek Radeče	4,9 ± 0,3	5,20 ± 0,08	4,6 ± 0,3
	šipek Soča	3,0 ± 0,2	4,27 ± 0,06	2,8 ± 0,2
	šipek Ljubljana	3,7 ± 0,2	4,39 ± 0,07	3,3 ± 0,2
	šipek Mengeš	4,6 ± 0,3	5,03 ± 0,08	3,9 ± 0,2
	šipek Izola	5,2 ± 0,3	5,14 ± 0,08	5,2 ± 0,3
	šipek Hom	4,5 ± 0,2	4,69 ± 0,07	4,2 ± 0,2
	šipek Ormož	5,1 ± 0,3	5,13 ± 0,08	3,7 ± 0,2
	šipek Koblarji (osojno)	2,6 ± 0,1	4,10 ± 0,06	2,9 ± 0,2
	šipek Koblarji (prisojno)	4,9 ± 0,3	4,92 ± 0,07	5,4 ± 0,3
šipek Dormberk	5,2 ± 0,3	4,94 ± 0,07	4,4 ± 0,3	
2. obiranje	šipek Radeče	5,1 ± 0,3	2,82 ± 0,04	5,4 ± 0,3
	šipek Soča	3,3 ± 0,2	3,78 ± 0,06	2,7 ± 0,2
	šipek Ljubljana	3,8 ± 0,2	4,13 ± 0,06	3,3 ± 0,2
	šipek Mengeš	4,3 ± 0,2	4,45 ± 0,07	4,6 ± 0,3
	šipek Izola	6,6 ± 0,4	4,94 ± 0,07	7,4 ± 0,5
	šipek Hom	5,1 ± 0,3	4,88 ± 0,07	5,0 ± 0,3
	šipek Ormož	5,5 ± 0,3	3,73 ± 0,06	7,0 ± 0,4
	šipek Koblarji (osojno)	3,5 ± 0,2	3,60 ± 0,05	2,7 ± 0,2
	šipek Koblarji (prisojno)	3,2 ± 0,2	3,82 ± 0,06	3,3 ± 0,2
šipek Dormberk	5,4 ± 0,3	4,80 ± 0,07	5,9 ± 0,4	
lapuh	1,14 ± 0,06	0,660 ± 0,001	0,81 ± 0,05	
trpotec	1,32 ± 0,07	4,79 ± 0,07	1,25 ± 0,07	
materina dušica	1,31 ± 0,07	4,74 ± 0,07	1,6 ± 0,1	

Kot lahko razberemo iz preglednice 6, so vzorci zdravih rastlin vsebovali različne količine antioksidantov. Opazimo tudi, da različne metode dajejo nekoliko različne rezultate, še posebej pri vzorcih trpotca in materine dušice, kjer so vrednosti antioksidativne aktivnosti nizke. Da bi preverili, kako so posamezne metode med seboj povezane, smo napravili test korelacij med posameznimi metodami.

4.3.2 Korelacija luminescenčne metode z drugimi metodami

4.3.2.1 Vzorci, ekstrahirani z 2 % metafosforno kislino

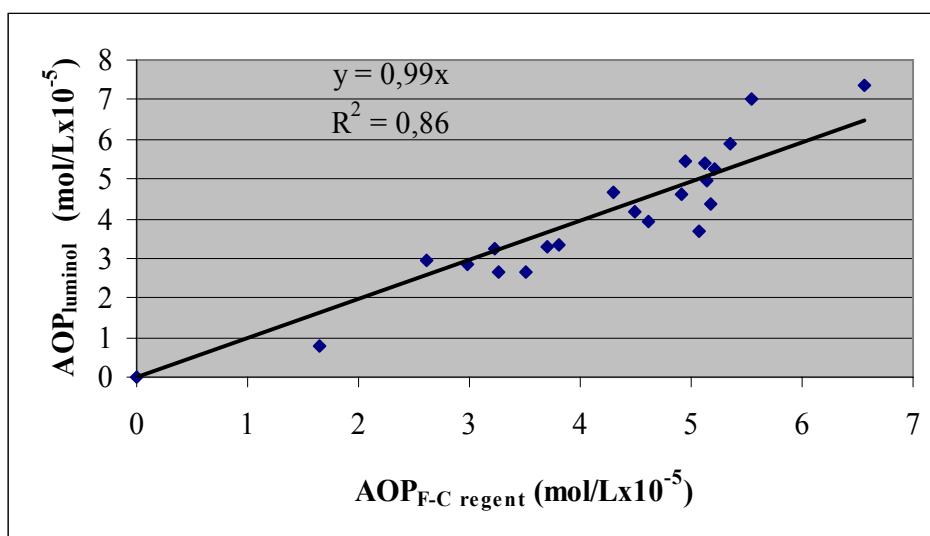


Slika 24: Zveza med antioksidativno aktivnostjo, izmerjeno z luminescenčno metodo (AOP_{luminol}), in antioksidativno aktivnostjo, izmerjeno z metodo z radikalom DPPH[•] (AOP_{DPPH})

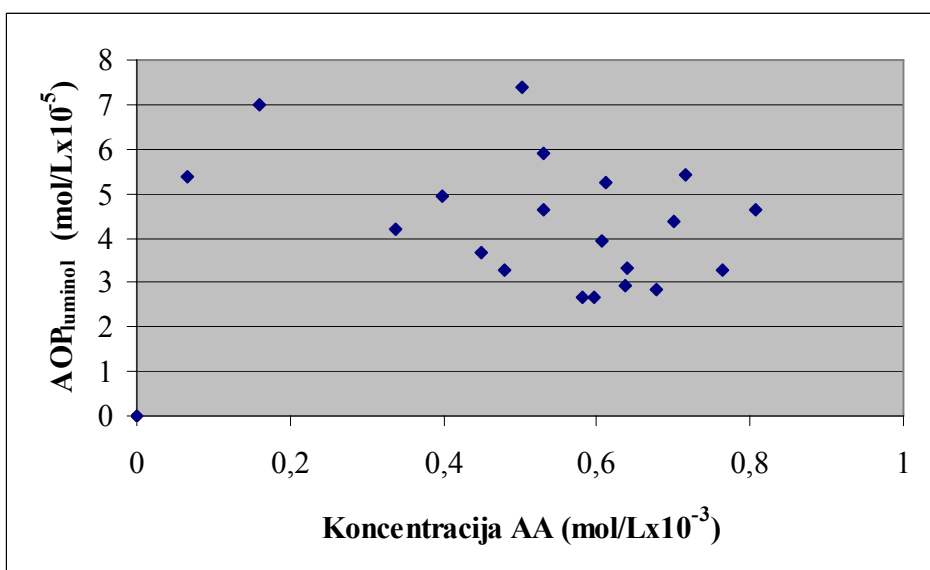
Na sliki 24 lahko vidimo korelacijo med AOP, ki smo jo določili z metodo za določanje AOP z radikalom DPPH[•] (AOP_{DPPH}), in luminescenčno metodo (AOP_{luminol}). Pearsonov korelacijski koeficient (r) je 0,90 ($\alpha < 0,01$), kar kaže na visoko korelacijo obeh metod za določanje AOP v analiziranih rastlinskih ekstraktih.

Primerjava rezultatov AOP v rastlinskih ekstraktih z F-C metodo in luminescenčno metodo, ki jo lahko vidimo na sliki 25, nam pokaže, da je zveza med vrednostmi AOP, izmerjenimi s tema dvema metodama, močna, saj je Pearsonov korelacijski koeficient 0,94 ($\alpha < 0,01$).

Zanimalo nas je tudi, če obstaja povezava med vsebnostjo AA in AOP, saj naj bi ekstrakti zdravilnih zelišč vsebovali precej AA, ki prav tako sodi v skupino antioksidantov. Na sliki 26 je prikazana zveza med koncentracijo AA, ki smo jo določili na sistemu HPLC, in AOP, določenim z luminescenčno metodo. Kot vidimo, med AOP in koncentracijo AA ni korelacije, saj je Pearsonov korelacijski koeficient 0,02 ($\alpha > 0,05$). Vzrok je verjetno ta, da vzorci vsebujejo precej drugih antioksidantov, kljub temu, da smo predvidevali, da je AA glavni antioksidant v šipku.

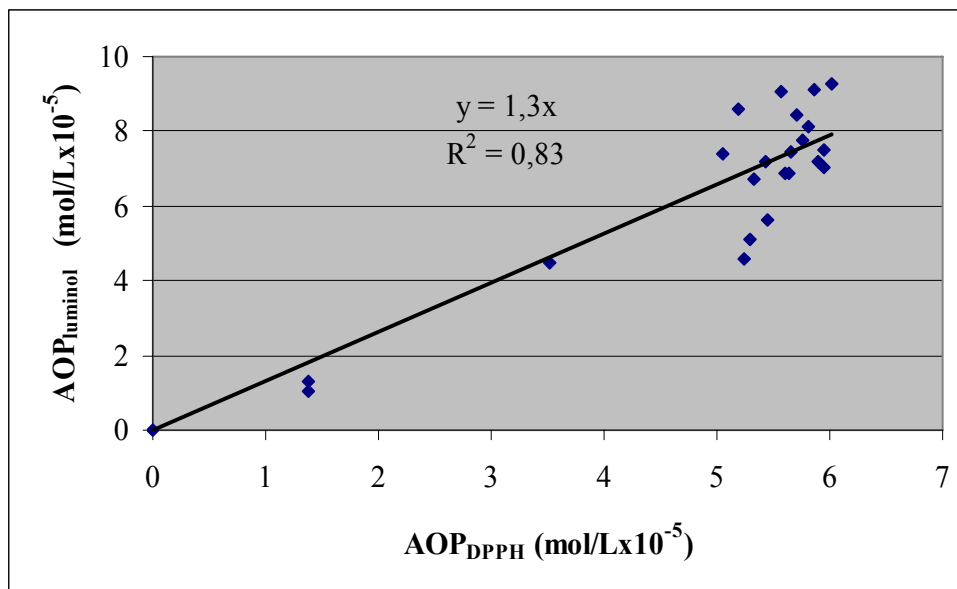


Slika 25: Zveza med antioksidativno aktivnostjo, izmerjeno z luminiscenčno metodo (AOP_{luminol}), in antioksidativno aktivnostjo, izmerjeno z F-C metodo (AOP_{F-C reagent})



Slika 26: Zveza med antioksidativno aktivnostjo, izmerjeno z luminiscenčno metodo (AOP_{luminol}), in koncentracijo askorbinske kisline, izmerjene na HPLC sistemu

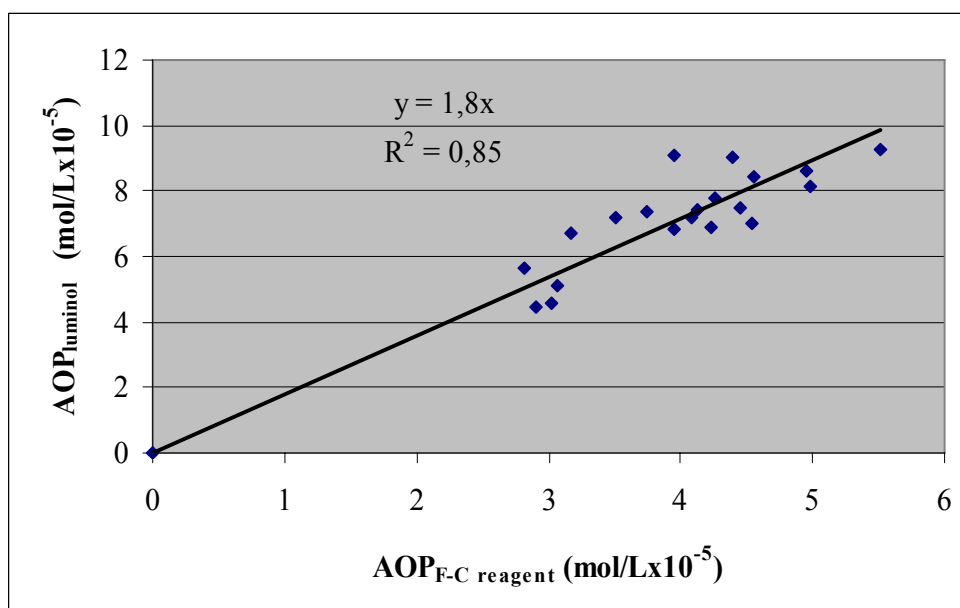
4.3.2.2 Vzorci, ekstrahirani z metanolom



Slika 27: Zveza med antioksidativno aktivnostjo, izmerjeno z luminiscenčno metodo (AOP_{luminol}), in antioksidativno aktivnostjo, izmerjeno z metodo z radikalom DPPH[•] (AOP_{DPPH}), v metanolnih ekstraktih

Zanimalo nas je tudi, kako je z detekcijo manj polarnih antioksidantov, ki smo jih ekstrahirali z metanolom. S slike 27 je razvidna zveza med AOP, določenim z metodo za določanje AOP z radikalom DPPH[•], in luminescenčno metodo. Pearsonov korelacijski koeficient je 0,91 ($\alpha < 0,01$), kar kaže na visoko korelacijo obeh metod za določanje AOP tudi v metanolnih ekstraktih. Opazimo pa, da v primeru metanolnih ekstraktov luminescenčna metoda daje višje rezultate kot metoda z radikalom DPPH[•], medtem ko smo v vodnih raztopinah opazili ravno obratno.

Po pričakovanju sta tudi F-C in luminescenčna metoda v dobri korelaciji (slika 28), saj je Pearsonov korelacijski koeficient 0,93 ($\alpha < 0,01$). Zopet pa opazimo, da tudi v tem primeru luminescenčna metoda daje višje rezultate kot F-C metoda, torej ravno obratno kot pri vodnih ekstraktih.

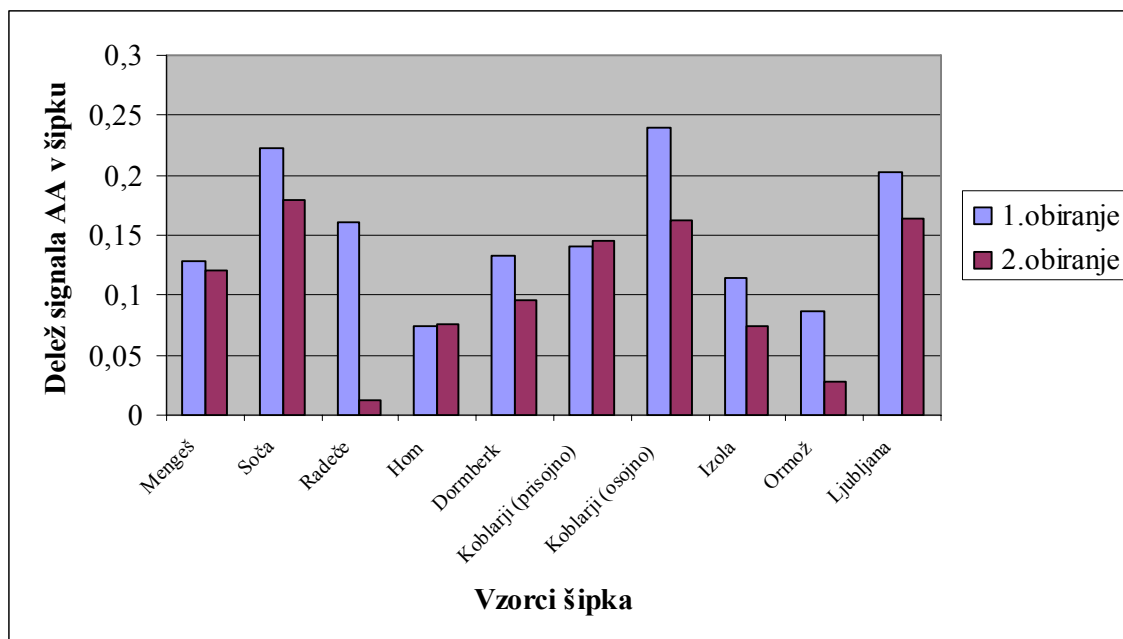


Slika 28: Zveza med antioksidativno aktivnostjo, izmerjeno z luminiscenčno metodo (AOP_{luminol}), in antioksidativno aktivnostjo, izmerjeno z F-C metodo ($AOP_{\text{F-C reagent}}$) v metanolnih ekstraktih

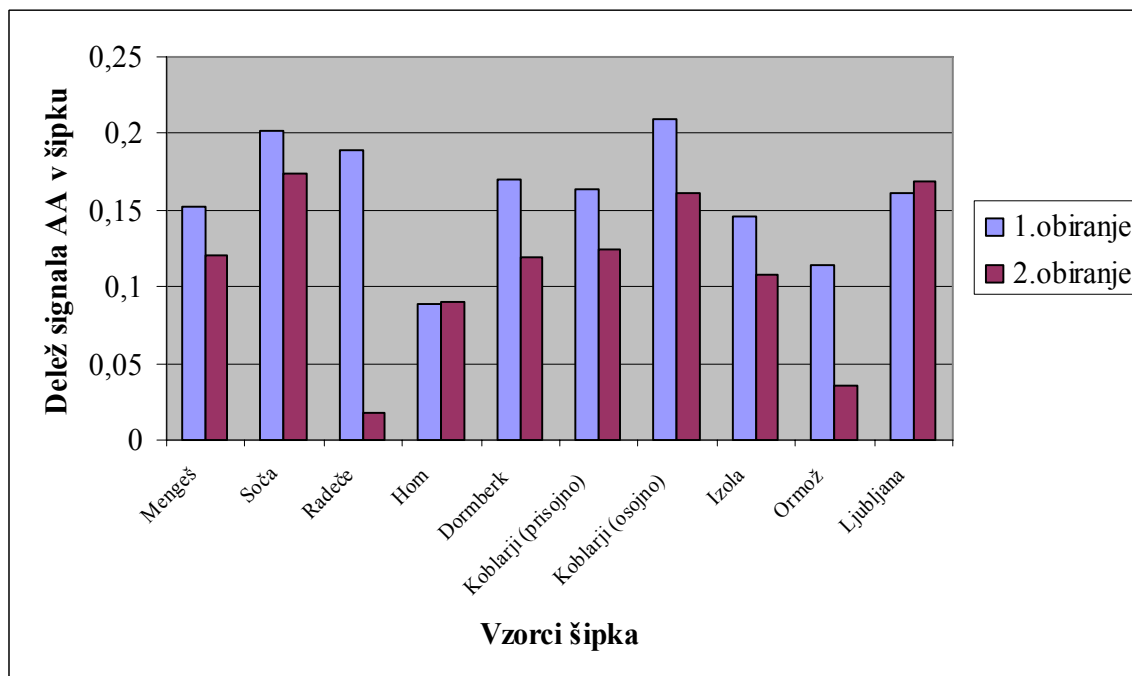
4.3.3 Delež, ki ga k antioksidativni aktivnosti prispeva askorbinska kislina

Da bi ugotovili, zakaj je korelacija med vsebnostjo AA in AOP slaba, smo z analizami določili, kakšen delež k AOP prispeva AA. Bolj natančno smo analizirali vzorce šipka, kjer smo pričakovali največjo vsebnost AA.

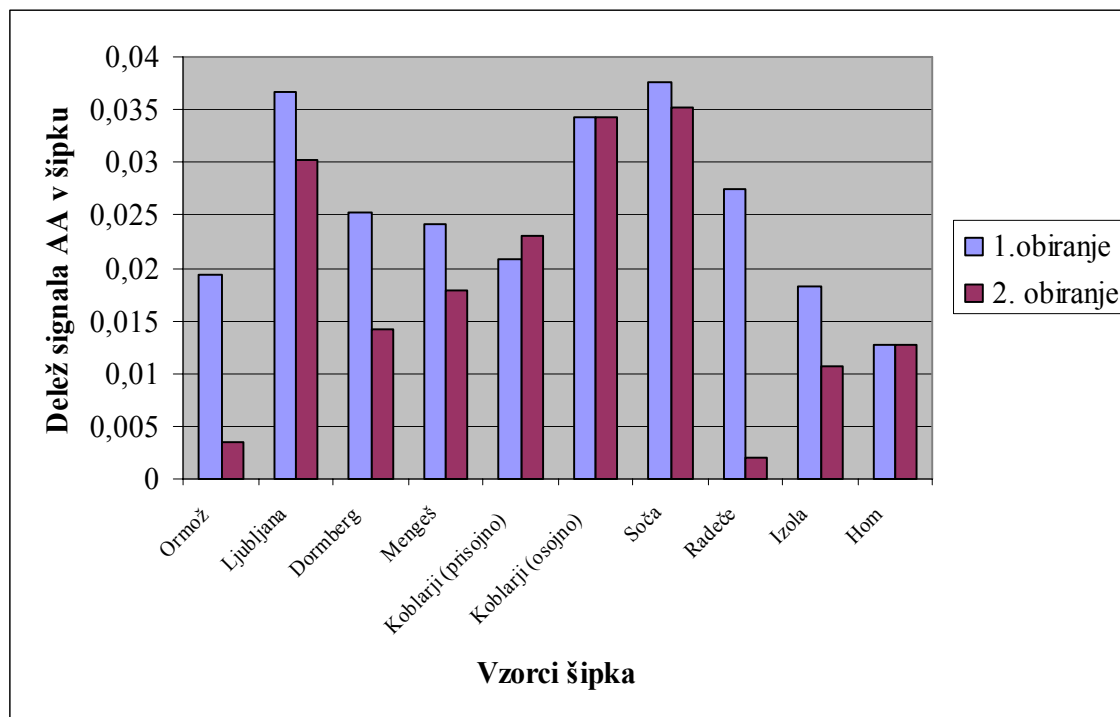
Na slikah 29-31 vidimo, da je delež, ki ga k izmerjenemu signalu za AOP prispeva AA, relativno majhen, precej manjši kot smo pričakovali. Delež AA, ki ga prispeva k skupnemu signalu AOP merjenem s F-C metodo je med 2 % do 24 %. Podoben delež AA k skupnemu signalu AOP, ki smo ga merili z metodo za določanje AOP z radikalom DPPH[•], delež je med 3 % do 21 %. Delež skupnega signala, ki ga predstavlja AA in smo ga izmerili z luminescenčno metodo pa je še precej manjši, in sicer od 0,25 % do 3,7 %. Vzrok tako majhnega deleža AA k skupnemu signalu AOP je lahko ta, da je luminescenčna metoda najmanj občutljiva za določanje AA, kar lahko vidimo iz umeritvene krivulje na sliki 23.



Slika 29: Delež askorbinske kisline v šipku k skupnemu signalu za antioksidativno aktivnost, merjenem s F-C metodo



Slika 30: Delež askorbinske kisline v šipku k skupnemu signalu za antioksidativno aktivnost, merjenem z metodo za določanje antioksidativne aktivnosti z radikalom DPPH•



Slika 31: Delež askorbinske kisline v šipku k skupnemu signalu za antioksidativno aktivnost, merjenem z luminescenčno metodo

5 SKLEPI

Na podlagi rezultatov lahko oblikujemo naslednje sklepe:

- Optimalna valovna dolžina za spremljanje emisije oddane svetlobe reakcijske mešanice pri luminescenčni metodi je 420 nm.
- Optimalna koncentracija standardne raztopine luminola je 1,6 mM.
- Optimalna koncentracija H₂O₂ je 7,5 mM.
- Optimalna encimska aktivnost encima HRP je 0,14 U/mL.
- Optimalni pH reakcijske mešanice je 7,4.
- Optimalna temperatura za potek analize je sobna temperatura (25 °C).
- Ponovljivost luminescenčne metode je boljša, če reakcijsko mešanico v kiveti pred vsako analizo zamenjamo.
- Različne metode za določanje AOP (F-C, DPPH[•] in luminescenčna metoda) so različno občutljive na različne antioksidante.
- Luminescenčna metoda je v dobri korelaciji z metodo za določanje AOP z radikalom DPPH[•] in z metodo za določanje skupnih fenolnih spojin (F-C), tako v primeru vodnih ekstraktov kot pri metanolnih ekstraktih zdravilnih zelišč.
- Luminescenčna metoda daje v vodnih ekstraktih nižje signale kot metoda z radikalom DPPH[•] in F-C metoda, v metanolnih ekstraktih pa je ravno obratno.
- Vsebnost AA v ekstraktih zdravilnih zelišč ni v korelaciji z AOP, določeno s katerokoli metodo.
- AA v vzorcih šipka predstavlja manj kot 25 % vseh antioksidantov.
- Optimizirana luminescenčna metoda je primerna za analize rastlinskih ekstraktov, ki vsebujejo mešanico antioksidantov.
- Občutljivost luminescenčne metode zelo enostavno prilagodimo vsebnostim antioksidantov v vzorcih z uporabo različnih koncentracij luminola, H₂O₂ in encima.

- Najbolj lahko na občutljivost luminescenčne metode vplivamo z različnimi koncentracijami luminola.
- Luminescenčna metoda je dobra alternativa ostalima metodama za določanje AOP (F-C, DPPH[•]), saj je analiza relativno enostavna in hitra, saj vzorec lahko analiziramo že v nekaj minutah.

6 POVZETEK

V okviru diplomske naloge smo želeli ugotoviti optimalne pogoje za določanje antioksidativne aktivnosti z uporabo luminescenčne metode, tako da bo le-ta primerna za analize AOP v rastlinskih ekstraktih.

Vzorci šipka, lapuha, trpotca in materine dušice smo ekstrahirali z 2 % MFK in metanolom. V vzorcih smo določali AOP, in sicer z metodo za določanje AOP z radikalom DPPH[•], z metodo za določanje skupnih fenolnih spojin (F-C) ter določili vsebnost AA na sistemu HPLC.

Optimizirali smo luminescenčno metodo z uporabo luminola, H₂O₂ in encima HRP. Luminescenca smo merili s pomočjo fluorimetra. Določili smo optimalno valovno dolžino emisije, optimalno koncentracijo luminola in H₂O₂, optimalno encimsko aktivnost HRP, optimalni pH in optimalno temperaturo ter opazovali ponovljivost metode.

Emisijski spekter reakcijske mešanice ima maksimum pri valovni dolžini okrog 420 nm, zato smo se odločili, da vse nadaljnje meritve opravljamo pri tej valovni dolžini. Ugotovili smo, da je optimalna koncentracija luminola v kivetih za analizo ekstraktov zdravilnih zelišč, ki smo jih imeli na voljo, 1,6 mM, koncentracija H₂O₂ 7,5 mM ter encimska aktivnost 0,14 U/mL. Za analize smo uporabljali fosfatni pufer s pH 7,4. Vse analize so potekale pri sobni temperaturi. Napaka meritve je manjša, če pred vsako analizo pripravimo mešanico svežih reagentov v kivetih, kot pa če med več zaporednimi analizami ne zamenjamo reagentov v kivetih, zato smo umeritvene krivulje in analizo vzorcev izvedli na ta način, da smo vsakič pripravili svežo mešanico reagentov v kivetih.

Luminescenčno metodo smo primerjali z drugimi metodami za določanje AOP. Primerjali smo jo z metodo za določanje AOP z radikalom DPPH[•], z metodo za določanje skupnih fenolnih spojin in z metodo za določanje AA na HPLC sistemu, ker smo predvidevali, da je AA glavni antioksidant v šipku. Umeritvene krivulje AA, klorogenske kisline in troloxa, izmerjene z vsemi navedenimi metodami, so linearne. Metoda za določanje fenolnih spojin je najbolj občutljiva za določanje klorogenske kisline in AA, medtem ko nam iste koncentracije troloxa dajejo nižje signale. Pri metodi za določanje AOP z radikalom DPPH[•] smo dobili najbolj strmo umeritveno krivuljo pri troloxu, manj strmo pri klorogenski kislini, najbolj položno pa pri AA. Pri luminescenčni metodi pa smo največji naklon umeritvene krivulje določili za raztopine klorogenske kisline, najmanjšega pa za raztopine AA.

Z optimizirano luminescenčno metodo smo določili AOP ekstraktov zdravilnih zelišč (šipek, lapuh, trpotec, materina dušica). Najboljšo korelacijo luminescenčne metode z drugimi metodami za določanje AOP smo dobili z F-C metodo pri vzorcih, ekstrahiranih z 2 % MFK, saj je Pearsonov korelacijski koeficient 0,94. Sledi F-C metoda pri vzorcih, ekstrahiranih z metanolom ($r = 0,93$), potem metoda za določanje AOP z radikalom DPPH[•] pri vzorcih ekstrahiranih z metanolom ($r = 0,91$) in metoda za določanje AOP z radikalom DPPH[•] pri

vzorcih ekstrahiranih z 2 % MFK ($r = 0,90$). Med AOP in koncentracijo AA ni korelacije, saj je r le 0,02.

Ugotovili smo še, da je delež, ki ga k skupnemu AOP signalu prispeva AA, manjši od pričakovanega, saj v nobenem vzorcu ne presega 25 %. Najmanjši delež k skupnemu signalu smo določili ravno pri luminescenčni metodi, saj je le-ta za detekcijo AA najmanj občutljiva. Glede na rezultate lahko sklepamo, da AA ni glavni antioksidant v šipku, ampak da v njem najdemo precej drugih antioksidantov, ki prispevajo k AOP signalu.

Ugotovili smo, da je optimizirana luminiscenčna metoda primerna za določanje AOP v rastlinskih ekstraktih. Občutljivost metode relativno enostavno prilagodimo potrebam s spreminjanjem koncentracij reagentov, še posebej s spremembo koncentracije luminola, H_2O_2 in encima. Metoda je relativno hitra, saj ob ustrezni izbiri reagentov analizo lahko opravimo že v nekaj minutah, kar ne velja za ostali metodi (F-C, DPPH[•]), ki se uporabljata za določanje AOP.

7 VIRI

Abdalla D.S.P. 2003. Antioxidant status. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 3. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press, Elsevier Science: 1654-1663.

Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. Farmaceutski vestnik, 48: 573-589.

Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26-27 okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32.

Antonovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., Robards K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. Analyst, 127: 183-198.

Aoyama M., Shiga M., Ohya H., Kamada H. 1998. A novel ESR method for horseradish peroxidase activity using a combination of p-acetamidophenol and hydroxylamine, and its application to enzyme immunoassays. Analytical Sciences, 14: 1107-1113.

Belitz H.D., Grosch W. 1999. Food chemistry. 2nd ed. Berlin, Springer: 60-61, 206-210, 222-230, 764-777.

Brainina Kh.Z., Ivanova A.V., Sharafutdinova E.N., Lozovskaya E.L., Shkarina E.I. 2006. Potentiometry as a method of antioxidant activity investigation. Talanta, 71: 13-18.

Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie/ Food Science and Technology, 28: 25-30.

Chattopadhyay K., Mazumdar S. 2000. Structural and conformational stability of horseradish peroxidase: effect of temperature and pH. Biochemistry, 39,1: 263-270.

Cortese D. 2001. Šipek: okus divjine. Gea, 11, 12: 66-67.

Costin J.W., Barnett N.W., Lewis S.W., McGillivray D.J. 2003. Monitoring the total phenolic/antioxidant levels in wine using flow injection analysis with acidic potassium permanganate chemiluminescence detection. Analytica Chimica Acta, 499: 47-56.

Cowan M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, 12, 4: 564-582.

Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R., Wyllie S.G. 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88: 170-175.

Dano A.R., Bogh H.O. 1999. Use of herbal medicine against helminthes in livestock – renaissance of an old tradition. *World Animal Review*: 93: 60-67.

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.

E zdravje: Materina dušica (*Thymus vulgaris*). 2008. Novo Mesto, Krka d.d.
http://www.ezdravje.com/si/zeli/izkasljevanje/?v=m_dusica (junij 2008): 1 str.

E zdravje: Ozkolistni trpotec (*Plantago lanceolata* L.). 2008. Novo Mesto, Krka d.d.
http://www.ezdravje.com/si/zeli/kaselj/?v=o_trpotec (junij 2008): 1 str.

Ercisli S. 2007. Chemical composition of fruits in some rose (*Rosa* spp.) species. *Food Chemistry*, 104, 4: 1379-1384.

Ercisli S., Eşitken A. 2004. Fruit characteristics of native rose hip (*Rosa* spp.) selections from the Erzurum province of Turkey. *Journal of Crop and Horticultural Science*, 32: 51-53.

Gao X., Björk L., Trajkovski V., Uggla M. 2000. Evaluation of antioxidant activities of rosehip ethanol extracts in different test systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 2021-2027.

Garcia-Campana A.M., Baeyens W.R.G. 2001. *Chemiluminescence in analytical chemistry*. New York, CRC Press: 621 str.

Gelb T. 2005. Antioksidanti kot pomožne snovi in zdravilne učinkovine. Seminarska naloga pri predmetu Farmacevtsko tehnološke operacije in farmacevtske oblike. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 5-10.

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.

Girotti S., Ferri E., Fini F., Bolelli L., Sabatini A.G., Budini, R., Sichertova D. 2004. Automated and manual luminescent assay of antioxidant capacity: analytical features by comparison. *Talanta*, 64: 665-670.

Girotti S., Fini F., Bolelli L., Savini L., Sartini E., Arfelli G. 2006. Chemiluminescent determination of total antioxidant capacity during winemaking. *Luminescence*, 21, 4: 233-238.

Girotti S., Bolelli L., Budini R., Arfelli G. 2002. Comparison of analytical methods in determining total antioxidant capacity in red wine. *Analytical Letters*, 35:4: 747-758.

Gordon M.H. 2003. Antioxidants. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 1. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press, Elsevier Science: 261-289.

Guo L., Xie M., Yan A., Wan Y., Wu Y. 2006. Simultaneous determination of five synthetic antioxidants in edible vegetable oil by GC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386, 6: 1881-1887.

Hirayama O., Takagi M., Hukumoto K., Katoh S. 1997. Evaluation of antioxidant activity by chemiluminescence. *Analytical Biochemistry*, 247: 237-241.

Hornero-Mendez D., Minquez-Mosquera M.I. 2000. Carotenoid pigments in *Rosa mosqueta* hips, an alternative carotenoid source for foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 825-828.

Jeong D.M., Jung H.A., Choi J.S. 2008. Comparative antioxidant activity and HPLC profiles of some selected Korean thistles. *Archives of Pharmacal Research*, 31: 28-33.

Jeran M. 2008. Študija pogojev kemoluminiscenčne reakcije. Raziskovalna naloga. Celje, Srednja šola za elektrotehniko in kemijo Celje: 7-16.

Kähkönen M.P., Heinämäki J., Ollilainen V., Heinonen M. 2003. Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83: 1403-1411.

Kähkönen M.P., Heinonen M. 2003. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agricultural of Food chemistry*, 51: 628-633.

Kähkönen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J.P., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 47: 3954-3962.

Kamel C. 2001. Tracing models of action and roles of plant extracts in non-ruminants. V: *Recent advances in animal nutrition*. Garnsworthy P.C., Wiseman J. (eds.). Nottingham, University Press: 151-165.

Khachik F., Beecher G.R., Goli M.B., Lusby W.R. 1991. Separation, identification, and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by high performance liquid chromatography. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, 63, 1: 71-80.

- Kivilompolo M., Obúrka V., Hyötyläinen T. 2007. Comparison of GC–MS and LC–MS methods for the analysis of antioxidant phenolic acids in herbs. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388, 4: 881-887.
- Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26-27 okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-22.
- 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.
- Kregar I. 1996. Kromatografske metode. V: *Biotehnologija. Osnovna znanja*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 609-632.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. *Brock biology of microorganisms*. 10th ed. New York, Prentice Hall: 1019 str.
- Marquele F.D., Di Mambro V.M., Georgetti S.R., Casagrande R., Valim Y.M.L., Fonseca M.J.V. 2005. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39: 455-462.
- Martin-Hernandez M.C., Juarez M. 1993. *Cromatography*. 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.
- Marxen K., Vanselow K.H., Lippemeier S., Hintze R., Ruser A., Hansen U.P. 2007. Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements. *Sensors*, 7: 2080-2095.
- Miliauskas G., Venskutonis P.R., van Beek T.A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85, 2: 231-237.
- Molyneux P. 2004. The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26, 2: 211-219.
- Moure A., Cruz J.M., Franco D., Dominguez M., Sineiro J., Dominguez H., Nuñez J., Parajo J.C. 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72: 145-171.
- Mozetič B., Tomažič I., Škvarč A., Trebše P. 2006. Determination of polyphenols in white grape berries cv. Rebula. *Acta Chimica Slovenica*, 53: 58-64.

- Murkovic M. 2003. Phenolic compounds. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 3. 2nd ed. Caballero B. (ed.) Oxford, Academic Press: 4507-4513.
- Navas M.J., Jimenez A.M. 1999. Chemiluminescent methods in alcoholic beverage analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 183-189.
- Navas M.J., Jiménez A.M. 2007. Chemiluminescent methods in olive oil analysis. Journal of the American Oil Chemists' Society, 84: 405-411.
- Nojavan S., Khalilian F., Kiaie F.M., Rahimic A., Arabanian A., Chalavi S. 2008 Extraction and quantitative determination of ascorbic acid during different maturity stages of *Rosa canina* L. fruit. Journal of Food Composition and Analysis, 21: 300-305.
- Prior R.L., Cao G., Martin A., Sofic E., McEwen J., O'Brien C., Lischner N., Ehlenfeldt M., Kalt W., Krewer G. in Mainland M.C. 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. Journal of Agricultural and Food chemistry, 46: 2686-2693.
- 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. 1992. Kromatografske metode v biotehnologiji. V: Biotehnologija. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 341-354.
- Rajalakshmi D., Narasimhan S. 1995. Food antioxidants: Sources and methods of evaluation. V: Food antioxidants: technological, toxicological, and health perspectives. Madhavi D.L., Deshpande S.S., Salunkhe D.K. (eds.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 65-76.
- Raspor P., Kovač B., Batič M., Berglez D. 2000. Bioproces pridobivanja antioksidantov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26-27 okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 53-65.
- Roginsky V., Lissi A.E. 2005. Review of methods to determine chain- breaking antioxidant activity in food. Food Chemistry, 92: 235-254.
- Sakharov I.Y. 2001. Long-term chemiluminescent signal is produced in the course of luminal peroxidation catalyzed by peroxidase isolated from leaves of African oil palm tree. Biochemistry, 66, 5: 515-519.
- Sasikumar B. 2001. Rosemary. V: Handbook of herbs and spices. Vol.2. Peter K.V. (ed.). Abington, Woodhead Publishing Ltd: 243-255.

Scott J. 2006 Adaption of the Folin-Ciocalteu method to measure polyphenols via the Astoria Pacific Analyzer 2. . Pittsburgh, Fisher Scientific.

http://www.fishersci.com/wps/portal/CMSTATIC?href=Scientific/researchAnalytical/Products/Services/Food_Diagnostics/sc_rea_AdaptionoftheFolinC_080706_1053.jsp&store=Scientific&segment=researchAnalytical (junij 2008): 1 str.

Shahidi F., Naczki M. 1995. Food phenolics. Lancaster, Technomic Publishing Co., Inc.: 75-107, 178.

Shui G., Leong L.P. 2005. Screening and identification of antioxidants in biological samples using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry and its application on *Salacca edulis* Reinw. Journal of Agricultural and Food chemistry, 53: 880-886.

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.

Skvarča M. 2000. Učinek antioksidantov na kakovost maščob. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26-27 okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 179-191.

Swanson B.G. 2003. Tannins and polyphenols. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 9. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press, Elsevier Science: 5729-5733.

Szabo M.R., Iditoiu C., Chambre D., Lupea A.X. 2007. Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. Chemical Papers, 61, 3: 214-216.

Špringer J. 2003a. Lapuh, navadni (*Tussilago farfara*). Murska Sobota, Pomurske lekarne. <http://www.pomurske-lekarne.si/si/index.cfm?id=1521> (junij 2008): 1 str.

Špringer J. 2003b. Materina dušica (*Thymus vulgaris*). Murska Sobota, Pomurske lekarne. <http://www.pomurske-lekarne.si/si/index.cfm?id=1531> (junij 2008): 1 str.

Špringer J. 2003c. Šipek, navadni ali Divja roža (*Rosa canina*). Murska Sobota, Pomurske lekarne. <http://www.pomurske-lekarne.si/si/index.cfm?id=1563> (junij 2008): 1 str.

Špringer J. 2003d. Trpotec, ozkolistni (*Plantago lanceolata* L.). Murska Sobota, Pomurske lekarne. <http://www.pomurske-lekarne.si/si/index.cfm?id=1565> (junij 2008): 1 str.

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.

Tsai T., Lee M. 2008. Determination of antioxidants and preservatives in cosmetics by SPME combined with GC-MS. *Chromatographia*, 67: 425-431.

Uggla M. 2004. Domestication of wild roses for fruit production. Doctoral thesis. Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences: 8-8.

Vidović S., Stojanović B., Veljković J., Pražić-Arsić L., Roglić G., Manojlović D. 2008. Simultaneous determination of some water-soluble vitamins and preservatives in multivitamin syrup by validated stability-indicating high-performance liquid chromatography method. *Journal of Chromatography A*, 1202, 2: 155-162.

Vidrih R., Kač M. 2000. Analitika antioksidantov. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26-27 okt. 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 101-111.

Wechtersbach L. 2005. Stabilnost polarnih in nepolarnih antioksidantov v kompleksnem matriksu. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 59 str.

Wright J.S., Johnson E.R., DiLabio G. 2001. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 123: 1173-1183.

Žorž M. 1991. HPLC. Ljubljana, samozaložba: 5-118.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Lei Pogačnik za vse nasvete, pomoč in skrben pregled diplomskega dela.

Najlepša hvala recenzentki prof. dr. Tereziji Golob za koristne nasvete pri pisanju in oblikovanju diplome.

Hvala tudi vsem zaposlenim na Katedri za kemijo, ki ste mi kakorkoli priskočili na pomoč pri delu v laboratoriju.

Iskreno hvala staršema za vsestransko podporo med študijem.

Hvala Dejanu za vso potrpežljivost in ker mi je ves čas stal ob strani.