

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA JAMŠEK

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA JAMŠEK

**KORELACIJA MED AKTIVNOSTJO IN KVANTITATIVNO
VSEBNOSTJO ANTIOKSIDANTOV V SLOVENSKIH BELIH
VINIH**

**THE CORRELATION BETWEEN ANTIOXIDANT
ACTIVITY AND QUANTIFICATION IN SLOVENIAN
WHITE WINES**

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravila na Katedri za farmacevtsko kemijo, Fakultete za farmacijo, pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm. in somentorstvom dr. Jožka Cesarja, mag. farm.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm. in dr. Jožka Cesarja, mag. farm.

Anja Jamšek

Komisija za zagovor magistrskega dela:

1. Predsednik: prof. dr. Samo Kreft
2. Mentor: izr. prof. dr. Janez Mravljak
3. Član: izr. prof. dr. Rok Dreu

KAZALO VSEBINE

KAZALO SLIK	III
KAZALO PREGLEDNIC	V
POVZETEK	VI
ABSTRACT	VII
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1. UVOD	1
1.1. ANTIOKSIDANTI	1
1.2. VINO	2
1.3. ANTIOKSIDANTI V VINU – (POLI)FENOLI	3
1.3.1. FLAVONOIDI	4
1.3.1.1. Flavanoli	5
1.3.1.2. Flavonoli in dihidroflavonoli	5
1.3.1.3. Flavanoni	6
1.3.2. NEFLAVONOIDI	7
1.3.2.1. Fenolne kisline	7
1.3.2.1.1. Hidroksibenzojske kisline	7
1.3.2.1.2. Hidroksicimetove kisline	8
1.3.2.2. Stilbeni	9
1.3.2.3. Tanini	10
Hidrolizirajoči tanini	10
1.3.2.4. Kumarini	10
1.3.2.5. Kurkuminoidi	11
1.4. METODE ZA VREDNITENJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI	11
1.4.1. REDUKCIJA DPPH [•]	11
1.4.2. ŽELEZO IN FENTONOVA REAKCIJA	12
1.4.3. FOLIN-CIOCALTEAU-JEVA METODA	13
1.5. KVALITATIVNA IN KVANTITATIVNA ANALIZA ANTIOKSIDATNOV	14
1.5.1. TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)	14
1.5.1.1. Kvalitativna analiza	15
1.5.1.2. Kvantitativna analiza	15
2. NAMEN DELA	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1. VINA	17
3.2. STANDARDI	17
3.3. REAGENTI	18
3.4. LABORATORIJSKA OPREMA:	18
4. EKSPERIMENTALNO DELO	20
4.1.1. MERJENJE PH VIN	20
4.1.2. MERJENJE GOSTOTE VIN	20

4.1.3.	ANALIZA ANTIOKSIDATIVNE KAPACITETE	20
4.1.3.1.	Sposobnost redukcije radikala DPPH [•]	20
4.1.3.2.	Vsebnost prostih Fe ²⁺ ionov	22
4.1.3.3.	Določanje skupne vsebnosti fenolnih spojin s Folin-Ciocalteaujevo metodo	24
4.1.4.	IDENTIFIKACIJA IN KVANTITATIVNA ANALIZA ANTIOKSIDANTOV S HPLC	25
4.1.4.1.	Optimizacija metode in identifikacija antioksidantov	25
4.1.4.2.	Kvantitativna analiza antioksidantov v vzorcih vin	28
4.1.5.	IZRAČUN KORELACIJE	29
5.	REZULTATI	30
5.1.	MERJENJE pH IN GOSTOTE VZORCEV	30
5.2.	REDUKCIJA DPPH[•]	30
5.3.	VSEBNOST PROSTIH FE²⁺ V VINU	37
5.4.	FOLIN-CIOCALTEAU-JEVA METODA	37
5.5.	PEARSONOV KORELACIJSKI KOEFICIENT:	38
5.6.	ANALIZA VZORCEV S HPLC METODO	38
5.6.1.	KVALITATIVNA ANALIZA	38
5.6.1.1.	Optimizacija metode	38
5.6.1.2.	Identifikacija izbranih standardov antioksidantov	41
5.6.2.	KVANTITATIVNA ANALIZA	42
6.	RAZPRAVA	47
7.	SKLEP	54
8.	VIRI IN LITERATURA	55

KAZALO SLIK

Slika 1: <u>Razdelitev antioksidantov glede na mehanizem delovanja (4).</u>	1
Slika 2: <u>Osnovna struktura flavonoidov.</u>	5
Slika 3: <u>Struktura katehina.</u>	5
Slika 4: <u>Kvercetin.</u>	6
Slika 5: <u>Rutin.</u>	6
Slika 6: <u>Hesperidin.</u>	6
Slika 7: <u>Galna kislina.</u>	7
Slika 8: <u>Kavna kislina.</u>	8
Slika 9: <u>p-Kumarna kislina.</u>	8
Slika 10: <u>Ferulna kislina.</u>	9
Slika 11: <u>trans-Resveratrol.</u>	9
Slika 12: <u>Elagna kislina.</u>	10
Slika 13: <u>Eskulin.</u>	10
Slika 14: <u>Kurkumin.</u>	11
Slika 15: <u>Prikaz barvne spremembe DPPH (33).</u>	12
Slika 16: <u>Deprotonirani fenolni ligandi reagirajo s kovinskim ionom (Fe^{3+}) in nastane stabilen kompleks. Galati $\text{R}=\text{OH}$, kateholi $\text{R}=\text{H}$.</u>	13
Slika 17: <u>Komponente HPLC sistema.</u>	15
Slika 18: <u>Potek redukcije DPPH[•] v plastičnih kivetah.</u>	22
Slika 19: <u>Raztopine vzorcev s FC reagentom pred in po inkubaciji.</u>	25
Slika 20: <u>Prikaz odvisnosti absorbance od koncentracije (mg/mL) vzorca 4.</u>	31
Slika 21: <u>Prikaz odvisnosti absorbance od koncentracije (mg/mL) vzorca 13.</u>	31
Slika 22: <u>Graf % redukcije DPPH v odvisnosti od koncentracij vzorca 1 (mg/mL).</u>	32
Slika 23: <u>Graf % redukcije DPPH v odvisnosti od koncentracij vzorca 2 (mg/mL).</u>	32
Slika 24: <u>Graf % redukcije DPPH v odvisnosti od koncentracij vzorca 3 (mg/mL).</u>	32
Slika 25: <u>Graf % redukcije DPPH v odvisnosti od koncentracij vzorca 4 (mg/mL).</u>	33
Slika 26: <u>Graf % redukcije DPPH v odvisnosti od koncentracij vzorca 5 (mg/mL).</u>	33
Slika 27: <u>Graf % redukcije DPPH v odvisnosti od koncentracij vzorca 6 (mg/mL).</u>	33
Slika 28: <u>Graf % redukcije DPPH v odvisnosti od koncentracij vzorca 7 (mg/mL).</u>	34
Slika 29: <u>Graf % redukcije DPPH v odvisnosti od koncentracij vzorca 8 (mg/mL).</u>	34
Slika 30: <u>Graf % redukcije DPPH v odvisnosti od koncentracij vzorca 9 (mg/mL).</u>	34
Slika 31: <u>Graf % redukcije DPPH v odvisnosti od koncentracij vzorca 10 (mg/mL).</u>	35
Slika 32: <u>Graf % redukcije DPPH v odvisnosti od koncentracij vzorca 11 (mg/mL).</u>	35
Slika 33: <u>Graf % redukcije DPPH v odvisnosti od koncentracij vzorca 12 (mg/mL).</u>	35

Slika 34: <u>Graf % redukcije DPPH v odvisnosti od koncentracij vzorca 13 (mg/mL).</u>	36
Slika 35: <u>Prikaz vrednosti EC₅₀ ±SD (mg/mL) v vzorcih.</u>	36
Slika 36: <u>Prikaz koncentracije prostih Fe²⁺ v vinskih vzorcih.</u>	37
Slika 37: <u>Vsebnost (poli)fenolnih spojin v vzorcih 1-13 predstavljeno kot mg galne kisline/L.</u>	38
Slika 38: <u>Prikaz kromatograma ob uporabi kolone Agilent-Eclipse.</u>	38
Slika 39: <u>Prikaz kromatograma ob uporabi kolone Accucore.</u>	39
Slika 40: <u>Prikaz kromatograma ob uporabi kolone Kinetex.</u>	39
Slika 41: <u>Prikaz kromatograma z uporabo MeOH.</u>	40
Slika 42: <u>Prikaz kromatograma z uporabo MeCN.</u>	40
Slika 43: <u>Prikaz kromatograma z uporabo mešanice MeCN:MeOH=50:50.</u>	40
Slika 44: <u>Primerjava kromatogramov 0,5% fosforne kisline in trifluoroacetne kisline kot MFA.</u>	41
Slika 45: <u>Kromatogram identificiranih vrhov v zmesi izbranih antioksidantov (λ=280 nm).</u>	41
Slika 46: <u>Kromatogram vzorca 1.</u>	42
Slika 47: <u>Kromatogram vzorca 2.</u>	42
Slika 48: <u>Kromatogram vzorca 3.</u>	42
Slika 49: <u>Kromatogram vzorca 4.</u>	43
Slika 50: <u>Kromatogram vzorca 5.</u>	43
Slika 51: <u>Kromatogram vzorca 6.</u>	43
Slika 52: <u>Kromatogram vzorca 7.</u>	44
Slika 53: <u>Kromatogram vzorca 8.</u>	44
Slika 54: <u>Kromatogram vzorca 9.</u>	44
Slika 55: <u>Kromatogram vzorca 10.</u>	45
Slika 56: <u>Kromatogram vzorca 11.</u>	45
Slika 57: <u>Kromatogram vzorca 12.</u>	45
Slika 58: <u>Kromatogram vzorca 13.</u>	46

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: <u>Seznam vzorcev vin.</u>	17
Preglednica II: <u>Pripravljena redčenja vzorcev 1-13.</u>	21
Preglednica III: <u>Priprava redčitev železovega(II) klorida tetrahidrata.</u>	23
Preglednica IV: <u>Priprava kalibracijskih standardov galne kisline.</u>	24
Preglednica V: <u>Gradient pufer/MeCN (1).</u>	26
Preglednica VI: <u>Gradient pufer/metanol (1).</u>	27
Preglednica VII: <u>Gradient pufer/MeCN (2).</u>	27
Preglednica VIII: <u>Gradient pufer/MeCN (3).</u>	27
Preglednica IX: <u>Priprava redčitev standardov in kontrolnih standardov.</u>	28
Preglednica X: <u>Seznam vzorcev vin z vrednostmi izmerjenega pH in gostote.</u>	30
Preglednica XI: <u>Koncentracije (mg/L \pm SD) identificiranih antioksidantov v posameznih vzorcih.</u>	46
Preglednica XII: <u>Delež celokupne vsebnosti izbranih antioksidantov v vzorcih.</u>	53

POVZETEK

Antioksidanti so snovi, ki so sposobne že v manjših koncentracijah upočasniti ali preprečiti oksidativne poškodbe tarčnih molekul. Z magistrsko nalogo smo se osredotočili na antioksidante v slovenskih belih vinih. Analizirali smo antioksidativni potencial (poli)fenolov z uporabo metode redukcije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila in zmožnostjo kelacije prostih Fe^{2+} ionov. Z uporabo kolorimetričnega Folin-Ciocalteau-jevega reagenta smo določili skupno vsebnost (poli)fenolov. Glede na literaturo in komercialno dostopnost smo izbrali standarde antioksidantov, jih identificirali z reverzno fazno metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti ter v posameznih vzorcih vin določili kvantitativno vsebnost pripadajočih analitov.

Uporabili smo 10 vzorcev različnih belih vin ter 3 vzorce oranžnih vin. Analiza z redukcijo 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila je pokazala, da dosegajo oranžna vina višjo antioksidativno aktivnost kot bela vina. Z uporabo Folin-Ciocalteau-jevega reagenta smo ugotovili, da je skupna vsebnost (poli)fenolov v oranžnih vinih precej višja v primerjavi z belimi. Vsebnost v oranžnih vinih se je gibala med 646,50 – 1037,20 mg GAE/L, v belih pa med 195,50 – 507,80 mg GAE/L. Analiza zmožnosti kelacije prostih Fe^{2+} ionov z uporabo ferozina, je bila ustrezna, vendar smo ugotovili, da sta koncentracija Fe^{2+} ionov in antioksidativna kapaciteta vin dve povsem neodvisni spremenljivki. Za kvalitativno in kvantitativno analizo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti smo uporabili standarde galne kisline, eskulina, katehina, kavne kisline, p-kumarne kisline, ferulne kisline, rutina, elagno kisline, hesperidina, *trans*-resveratrola in kvercetina. Ugotovili smo, da so izbrani antioksidanti dosegali višjo vsebnost v oranžnih vinih kot v belih. V vseh vzorcih so bili prisotni galna kislina, katehin in kavna kislina. V vzorcih nismo identificirali eskulina, ki je bil najverjetneje v zmesi z drugo spojino ali v obliki derivata. Način pridelave belih vin (klasični ali z maceracijo) vsekakor vpliva na vsebnost antioksidantov, na kar so nakazali naši rezultati. Vendar bi potrebovali več vzorcev oranžnih vin, da bi pridobili relevantne podatke. Prav tako obstaja visoka povezanost med antioksidativno aktivnostjo in celokupno vsebnostjo fenolov v vinih. Analizo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti je smiselno sklopiti z masnim spektrometrom za doseganje višje občutljivosti in boljše selektivnosti metode.

KLJUČNE BESEDE: antioksidanti, polifenoli, HPLC, DPPH, Folin-Ciocalteau.

ABSTRACT

Antioxidants are substances that, when presented in low concentrations significantly delay or inhibit the oxidative damage of targeted substrates. The focus of our research were antioxidants in Slovenian white wines. Firstly we analyzed the antioxidant potential by using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method and by detecting the chelating ability of free Fe^{2+} ions. We used the Folin-Ciocalteu method to measure the total polyphenolic content in the wine samples. We chose our standards for the chromatographic method according to literature facts and commercial availability. We performed a quality and quantity analyze with the use of the reversed-phase high performance liquid chromatography method.

We used 10 samples of white wines and 3 samples of orange wines. The results of the reduction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl showed that the antioxidant activity is much higher in orange wines than in white wines. The analysis with the Folin-Ciocalteu reagent determined that the total polyphenolic content is also higher in orange wines than in white wines. In orange wines the phenolic content ranged from 646,50 – 1037,20 mg GAE/L and in white wines from 195,50 – 507,80 mg GAE/L. The ferrozine-based method for detecting free Fe^{2+} ions was correct, but we realized through the process that the concentration of Fe^{2+} ions and the antioxidant capacity are two independent variables. For the quality and quantity analysis with the high performance liquid chromatography following standards were used: gallic acid, esculin, catechin, caffeic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, rutin, ellagic acid, hesperidin, *trans*-resveratrol and quercetin. We determined that the content of the selected antioxidants is higher in orange wines than in white wines. Gallic acid, catechin and caffeic acid were present in all samples. We could not identify esculin, because the molecule was probably in a derivative form or bound to another compound.

Our results showed that there is definitely a connection between the white wine production process (classic or maceration) and the content of antioxidants. But they were inconclusive because we would need a bigger number of orange wine samples for more concrete proof. We determined that there is a high correlation between the antioxidant activity and the total phenolic content in wines. In case of further work with the high performance liquid chromatography the use of a mass spectrophotometer would be advised to achieve higher sensitivity and selectivity.

KEY WORDS: antioxidants, polyphenols, HPLC, DPPH, Folin-Ciocalteu.

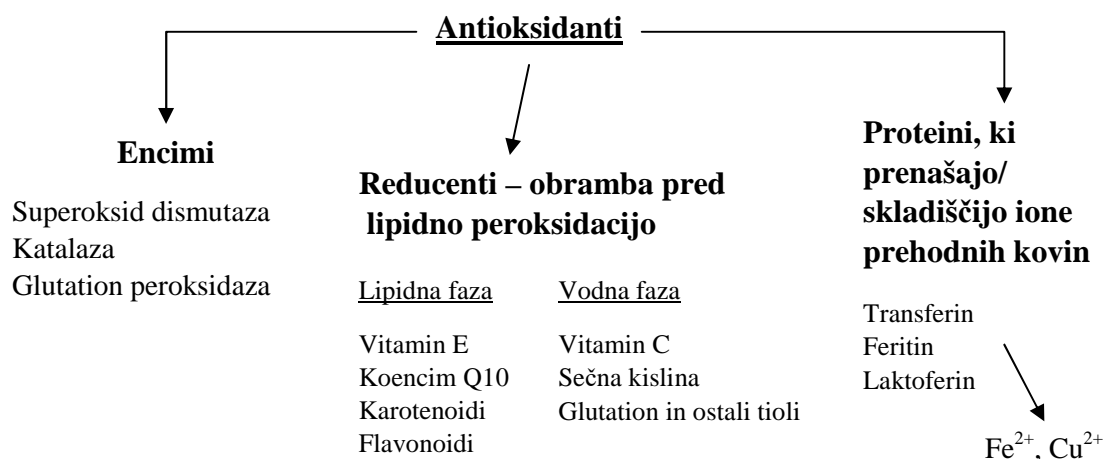
SEZNAM OKRAJŠAV

ROS	reaktivne kisikove zvrsti
RNS	reaktivne dušikove zvrsti
RSS	reaktivne žveplove zvrsti
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DPPH[•]	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EC₅₀	50 % efektivna koncentracija
FC	Folin Ciocalteau
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
UV	ultravijolična svetloba (200 – 350 nm)
VIS	vidna svetloba (350 – 700 nm)
t_r	retencijski čas
TFA	trifluoroocetna kislina
MFA	mobilna faza A
MFC	mobilna faza C
MFD	mobilna faza D

1. UVOD

1.1. ANTIOKSIDANTI

Antioksidanti so snovi, ki so sposobne že v manjših koncentracijah upočasniti ali preprečiti oksidativne poškodbe pomembnih biomolekul: maščob, nukleinskih kislin in beljakovin (1). Ločimo jih po izvoru, načinu delovanja, fizikalnih in kemičnih lastnostih ter velikosti in strukturi. Glede na izvor poznamo endogene, ki so naravno prisotni v telesu, kot na primer glutation, melatonin ter encimi superoksid dismutaza, katalaza; eksogene antioksidante, kot so vitamini in polifenoli, pa vnesemo v telo s hrano ali prehranskimi dopolnili. Njihova vloga je preprečevanje oziroma zaviranje nekontroliranih oksidativnih procesov v našem organizmu, ki povzročajo patofiziološko stanje le-tega in so hkrati osnova degenerativnim obolenjem (2, 3).



Slika 1: Razdelitev antioksidantov glede na mehanizem delovanja (4).

Rastlinski antioksidanti so zanimivi in pomembni zaradi vsaj štirih razlogov. Kot prvo so zelo uporabni za konzerviranje hrane. Če vzamemo za primer začimbe, bogate z antioksidanti, se te že vrsto stoletij med kuhanjem in pri shranjevanju uporabljajo za upočasnitev procesa oksidativnega propadanja živil, predvsem lipidne peroksidacije, ki vpliva na neprijetni vonj in žarkost hranil. Drug razlog je absorptivnost antioksidantov v gastrointestinalnem traktu. To področje postaja vse pomembnejše in vedno bolj raziskano, predvsem absorpcija fenolov. Na primer kvercetin in katehin s svojimi metaboliti, po zaužitju z njima bogatimi hranili, dosegata plazemske koncentracije v razponu 0,1-1 μM (5, 6), kar *in vitro* zadošča za upočasnitev lipidne peroksidacije liposomov, mikrosomov, in

lipidov z nizko gostoto. Antioksidanti odigrajo pomembno vlogo tudi v samem gastrointestinalnem traktu, saj kot tretje, povečajo gastroprotektivni efekt. Na primer v ustih ali želodcu, kjer je povečana koncentracija reaktivnih dušikovih zvrsti ali v kolonu, kjer zaradi prisotnosti železovih ionov nastajajo reaktivne kisikove zvrsti. Četrty razlog je raba rastlinskih ekstraktov v terapevtske namene. Poznani so protivnetni učinki (propolis, brin), antitusični učinki (gozdni slezenovec), odvajalni učinki (slive, fige), hepatoprotektivni učinki (pegasti badelj), analgetični učinek (vražji krempelj) in številni drugi učinki rastlinskih antioksidantov (3, 7).

1.2. VINO

Vino je pridelek, dobljen s popolnim ali delnim alkoholnim vrenjem sladkorja v svežem ali zdrozganem grozdju ali moštu. Vino je tista alkoholna pijača, ki je pridobljena iz plemenitih sort vinske trte *Vitis vinifera*.

V starem veku so vino uporabljali za preprečevanje bolečin pri operacija, porodih in za razkuževanje ran. Sedaj vemo, da je vino s kemičnimi sestavinami zelo bogata pijača, ki v zmernih količinah ugodno vpliva na človeški organizem. Razvoj farmacevtske industrije in boljše življenjske razmere (neoporečna voda, z vitamini bogata hrana in višji življenjski standard) so povsem izrinili vino iz medicine. Vino so obravnavali le še v povezavi z alkoholizmom. Šele v začetku sedemdesetih let 20. stoletja je postala medicina spet pozorna na vino, zlasti zaradi 'francoskega paradoksa', ki govori o zmanjšanju smrtnosti zaradi obolelosti ožilja in srca pri zmernih uživalcih vina. Doslej še ni zanesljivih dokazov, da bi uživanje vina znižalo splošno umrljivost določene populacije. Raziskave potrjujejo, da se tveganje strmo zvišuje pri večjih količinah. Pri pitju samo kozarca dnevno naj bi se sicer zmanjšalo tveganje za koronarno bolezen, je pa možno zvečanje tveganja za nastanek nekaterih bolezni, zlasti v grlu, želodcu, urinarnem traktu in možganih (8).

Vino je več kot samo alkoholna pijača. Alkohol v vinu je samo ena izmed sedemsto različnih, nekaterih še ne povsem raziskanih sestavin. Sestava je odvisna od sorte grozdja, lege in vrste zemljišča, vremenskih razmer, zrelosti in zdravstvenega stanja grozdja, načina predelave grozdja in nege vina (8).

Sestavine v vinu:

- voda 75-85%,
- alkoholi 7,5-15%,

v minimalnih količinah:

- kisline,
- minerali,
- aldehidi,
- tanini,
- estri,
- dušikove snovi,
- fenolne snovi,
- aromatične snovi,
- vitamini.

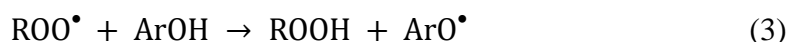
1.3. ANTIOKSIDANTI V VINU – (POLI)FENOLI

Večino fenolov v grozdju najdemo v kožici in pečkih. V procesu nastanka belega vina se grozdju najprej odstranijo peclji, grozdne jagode pa nežno stisnejo v stiskalnici. Maksimalna količina soka se mora stisniti pri minimalnem pritisku. Pri nadaljnjem stiskanju pri večjem pritisku priteka sok z manj sladkorja, a z več taninskimi in fenolnimi snovmi. Moštu se za čim hitrejši začetek vrenja in za nadaljnjo zaščito pred oksidacijo dodajo selekcionirane kvasovke. Z alkoholnim vrenjem se sladkor pretvori v alkohol in tako nastane vino. Dejanska vsebnost fenolov v grozdu ali vinu je odvisna od veliko parametrov kot so sorta, geografsko poreklo, podlaga, obdelava trte, stopnja zrelosti grozdja, predelave in drugih tehnoloških posegov v vino (čiščenje), starost vina ... (8). Bela vina vsebujejo povprečno 200 mg/L polifenolnih spojin (9).

Fenole v grozdju najdemo kot monomerne in polimerne komponente. Glede na njihove strukturne značilnosti jih razdelimo v dve glavni skupini: flavonoidi in neflavonoidi. V skupino flavonoidov spadajo flavoni, flavanoni, flavanoli, flavonoli, flavononoli, flavani in antocianidini, v skupino neflavonoidov pa prištevamo fenolne kisline, tanine, stilbene, kumarine, feniletanolne derivate ter lignane in neolignane (11, 12). Glavni predstavnik neflavonoidov so derivati hidroksicimetove kisline z nizko molekulsko maso, med flavonoidi so najbolj pogosti flavan-3-oli, flavonoli in antocianidini (rdeča vina) (10). V tej nalogi se bomo osredotočili samo na skupine, ki so prisotne v belem vinu in katerih predstavnike smo uporabili kot standarde.

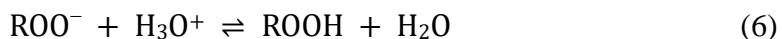
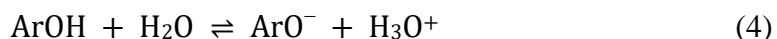
Funkcija rastlinskih fenolov izhaja iz njihove osnovne strukture, fenilnega obroča s pripeto hidroksilno skupino. Fenoli imajo amfifilne lastnosti, ki združujejo hidrofobni značaj

planarnega aromatskega jedra s hidrofilnimi značilnostmi polarnega hidroksi substituenta, ki deluje kot donor ali akceptor vodikove vezi. Zmožnost homolitične sprostitve vodikovega atoma je eden izmed glavnih procesov, ki jih povezujejo z antioksidativnim delovanjem rastlinskih fenolov. Reakcija z ROS lahko poteče po dveh mehanizmih. Prvi je že omenjeno doniranje vodikovega atoma radikal R^\bullet kot na primer peroksilnemu radikal (ROO^\bullet) , ki je nastal med lipidno peroksidacijo. Pri tem fenolni antioksidant sam postane radikal.



Šibkejša kot je O-H vez fenola, tem lažje in hitrejšo bo potekla odtegnitev vodikovega atoma. Moč vezi je odvisna od števila in mesta ostalih skupin na obroču, tvorbe potencialnih intramolekularnih vezi in možne delokalizacija elektronov večjega dela molekule.

Drugi mehanizem je pritegnitev elektrona, pri čemer nastane stabilen radikalski kation.

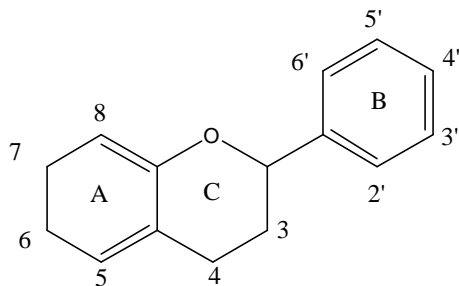


Reakcija je odvisna od ionizacijskega potenciala. Nižji kot je potencial, hitreje poteče prenos elektrona.

Rastlinski polifenoli delujejo kot antioksidanti tudi s keliranjem kovinskih ionov Fe^{2+}/Cu^+ in Fe^{3+}/Cu^{2+} , ki sodelujejo pri pretvorbi $O_2^{\bullet-}$ in H_2O_2 v agresiven HO^\bullet v procesu Haber-Weiss/Fenton-ovih reakcij. Prav tako delujejo na določene encime, kot sta ksantin oksidaza in protein kinaza C, ki so odgovorni za nastajanje $O_2^{\bullet-}$ (13, 14, 15).

1.3.1. FLAVONOIDI

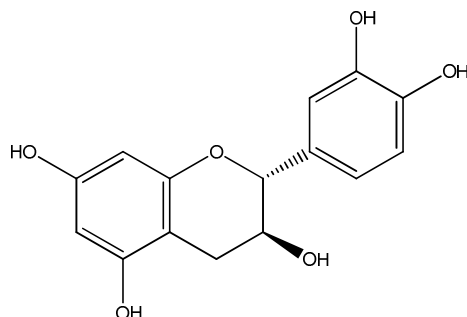
Družino flavonoidov v vinu sestavljajo flavanoli, flavanoni, flavonoli in dihidroflavanoli, in antocianidini (prisotni v rdečem grozdju in vinih). Značilna je $C_6-C_3-C_6$ veriga (slika 2), sestavljena iz dveh fenolnih obročev (A in B), ki ju povezuje heterociklični piranski obroč (C). Skupine flavonoidov se med seboj razlikujejo v številu in lokaciji hidroksilnih skupin ter prav tako glede na naravo in obseg alkilacije in/ali glikozilacije teh skupin (15).



Slika 2: Osnovna struktura flavonoidov.

1.3.1.1. Flavanoli

Natančneje imenovani flavan-3-oli so v grozdju prisotni kot monomeri ter prav tako kot oligomeri ali polimeri. Najbolj prepoznavni predstavniki monomerov te skupine so (+)-katehin, njegov izomer (-)-epikatehin ter epikatehin-3-galat. Oligomeri in polimeri te skupine so prepoznavni tudi pod drugim imenom, kondenzirani tanini ali proantocianidini, saj interagirajo s proteini, jih obarjajo, in ob segrevanju v kislih pogojih tvorijo rdeče obarvane komplekse (16).

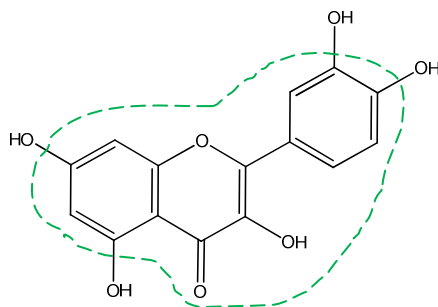


Slika 3: Struktura katehina.

Katehin (slika 3) je *trans* oblika flavan-3-olov. Najpogostejša oblika je (+)-katehin. Pripisujejo mu antioksidativne lastnosti pod pogojem, da je prisoten v visokih koncentracijah. V primerjavi z ostalimi flavonoidi ima nizek antioksidativni potencial (17).

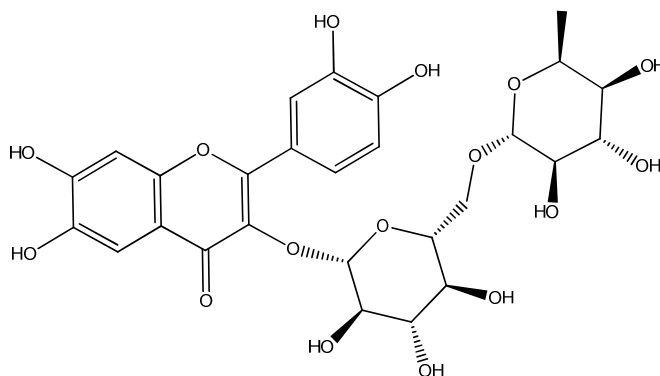
1.3.1.2. Flavonoli in dihidroflavonoli

Flavonoli so podskupina flavonoidov, ki imajo 3-hidroksiflavonsko osnovno strukturo (označena na sliki 4). Med seboj se razlikujejo glede na mesto in število fenolnih –OH skupin (18). Igrajo pomembno vlogo v zaščiti proti UV žarčenju. Večina jih je prisotni v grozdni lupini in mesu ter trtnih listih. Glavni predstavniki skupine, ki jih najdemo v grozdju, so kvercetin in njegovi 3-glikozidi (16). Iz njihove vsebnosti je moč razbrati, koliko je bila trta obsijana s soncem, saj več kot je bilo sonca, večja je njihova vsebnost.



Slika 4: Kvercetin.

Kvercetinu (slika 4) pripisujejo antioksidativne, antiarterogene in antikancerogene lastnosti. Na zelo ojačan antioksidativni učinek vplivajo 3',4'-dihidroksifenilna skupina v B obroču in v C obroču prosti hidroksilna skupina na mestu 3 ter dvojna vez konjugirana s karbonilno skupino (19).

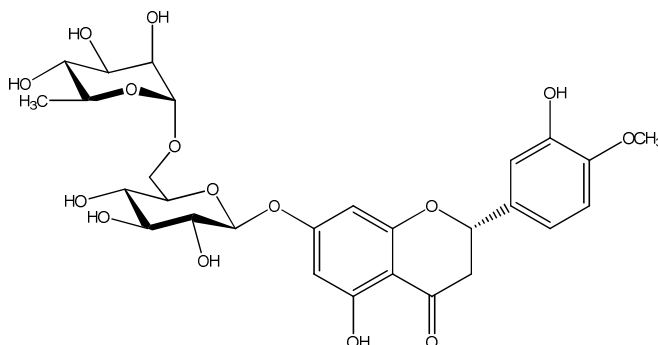


Slika 5: Rutin.

Rutin (slika 5) je glukozid kvercetina, imenovan tudi kvercetin-3-O-rutinozid. Pripisujejo mu dobre antioksidativne lastnosti, saj zelo učinkovito kelira kovinske ione in tako zmanjšuje Fentonovo reakcijo ter zavira lipidno peroksidacijo (20).

1.3.1.3. Flavanoni

Skupina flavanonov je prepoznavna po svojih pigmentacijskih lastnostih, saj ti polifenoli dajejo barvo rastlinam. Glavni predstavnik v grozdu in vinu je hesperidin (slika 6) (18).



Slika 6: Hesperidin.

Glede na strukturo je hesperidin glukozid flavanona hesperetina. Kot je značilno za to skupino v C obroču ni dvojne vezi med 2 in 3 ogljikom, kar omogoča večjo zvitost in s tem manjšo planarnost molekule. Pripisujejo mu antioksidativne lastnosti ter vazodilatatorni vpliv na pospešitev krvnega pretoka, saj je njegova absorpcija v krvni obtok hitrejša od večine antioksidantov. Zraven vina ga najdemo predvsem v citrusih (21).

1.3.2. NEFLAVONOIDI

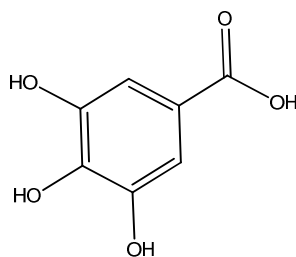
Neflavonoidne komponente v vinu se delijo na fenolne kisline, tanine, stilbene, kumarine, feniletanolne derivate ter lignane in neolignane. Zraven antioksidativnih značilnosti jih povezujejo z barvnimi in senzoričnimi lastnostmi v vinu (18). Antioksidativna aktivnost molekul je odvisna od števila hidroksilnih skupin, elektronskih učinkov ter od steričnega efekta med njimi. Karboksilna skupina negativno vpliva na oddajo vodikovih atomov. Glede na kemijsko strukturo so hidroksicimetove kisline bolj učinkoviti antioksidanti kot hidroksibenzojske kisline (15). V belih vinih med monomernimi fenoli prevladujejo predvsem neflavonoidne fenolne kisline (22).

1.3.2.1. Fenolne kisline

1.3.2.1.1. Hidroksibenzojske kisline

Vsebnost v belih vinih se giblje okrog 20 mg/L (11).

Kot derivat benzojske kisline imajo hidroksibenzojske kisline značilno aromatsko strukturo. Najbolj pogosti derivati, ki jih najdemo v vinu, so galna (slika 7), vanilinska in siringinska kislina (16). Antioksidativno aktivnost dosegajo derivati, ki imajo na aromatskem obroču hidroksilne substituentne na *meta* položaju, saj so študije pokazale, da na *orto* in *para* mestu ni izkazane aktivnosti, zaradi negativnega induktivnega učinka karbonilne skupine. Morebitna veriga med aromatskim obročem in karboksilno skupino, tudi če samo za en atom ogljika, zmanjša negativni induktivni učinek karboksilne skupine in poveča antioksidativno aktivnost za skoraj dvojno vrednost (15).



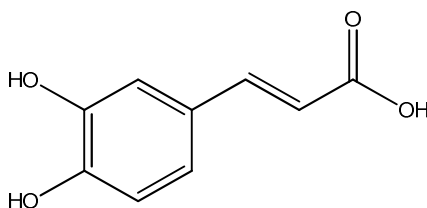
Slika 7: Galna kislina.

Galna kislina (slika 7) v skupini hidroksibenzojskih kislin dosega najvišje vsebnosti v vinu. Je naravno prisotna v grozdju, prav tako nastaja med hidrolizo hidrolizirajočih taninov (16). Pripisujejo ji antioksidativne, antiinflamatorne, antimutagene in antikancerogene lastnosti. Zraven vina jo najdemo tudi v čaju, jagodičevju ter lubju hrasta in kostanja (23).

1.3.2.1.2. Hidroksicimetove kisline

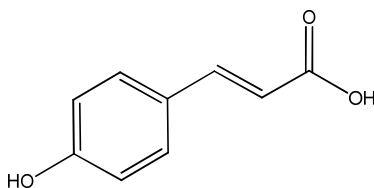
Vsebnost v belih vinih se giblje okrog 130 mg/L (24).

Zaradi načina pridelave belih vin (odsotnost maceracije) so hidroksicimetove kisline najbolj zastopani polifenoli belih vin. Sestavlja jih stirenski skelet. Predstavniki skupine v vinu so p-kumarinska kislina, ferulna kislina, kavna kislina ter kaftarna kislina. Derivati so lahko prisotni v *cis*- in *trans*- obliki, pri čemer je *trans*- oblika bolj stabilna in pogosta. Znano je, da derivati hidroksicimetove kisline nastajajo tudi med procesom staranja vin. Detektirali so predvsem etilne estre kavne in kumarne kisline ter etilni in dietilni ester kaftarne kisline (16).



Slika 8: Kavna kislina.

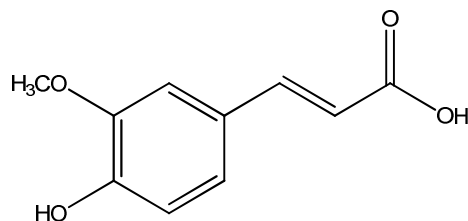
Kavna kislina (slika 8) nastane z biosintezo iz fenilalanina v rastlinah. Najdemo jo v vinu, olivah in artičoki. Molekulo sestavlja kateholna skupina z α , β -nenasičeno karboksilno kislinsko verigo, kar pomembno vpliva na učinkovitost interakcij z radikali. Predvsem kateholna skupina je pomembna pri keliranju kovinskih ionov in antioksidativnem delovanju (23).



Slika 9: p-Kumarna kislina.

p-Kumarna kislina (slika 9) nastaja z biosintezo iz cimetove kisline ali L-tirozina. Struktura molekule ugodno vpliva na antioksidativne lastnosti spojine. Etilenska veriga, ki povezuje fenolno skupino in karboksilat, okrepi reducirajoče lastnosti fenolne –OH skupine v primerjavi s cimetovo kislino, ki nima fenolne –OH skupine (15). V hrani jo

poleg vina najdemo še v paradižniku, korenčku, česnu in medu. Pripisujejo ji antioksidativne lastnosti in vpliv na zmanjšanje možnosti nastanka raka na želodcu (25).

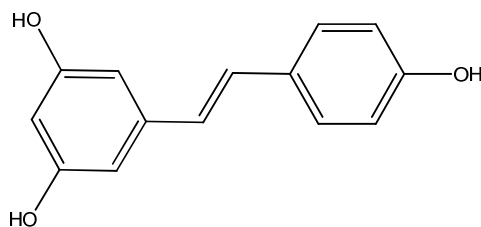


Slika 10: Ferulna kislina.

Ferulna kislina (slika 10) je fenolna komponenta, ki jo najdemo v veliki večini rastlin. Kot antioksidant izkazuje dobro citoprotektivno vlogo, saj uspešno reducira radikale in spodbuja obrambo organizma pred oksidativnim stresom. Prav tako inhibira aktivacijo citotoksičnih encimov (kaspaza, ciklooksigenaza-2, inducibilna sintaza NO) (23). S temi lastnostmi kaže velik potencial za preprečevanje nastanka rakavih obolenj, upočasnjeno napredovanje Alzheimerjeve bolezni, kardiovaskularnih zapletov, diabetesa in kožnih bolezni (26).

1.3.2.2. Stilbeni

Stilbeni so podskupina fenolov, ki so naravno prisotni v velikem številu rastlinskih družin, vendar sta med njimi grozdje in vino eden njihovih najpomembnejših virov. Biosintetizirajo se tudi med samim procesom proizvodnje vina, saj nastajajo kot odgovor na tako imenovani stres, kot so mikrobiološke infekcije (glive *Botrytis cinerea*) in UV obsevanje, ki so lahko prisotne med procesom obdelave ali pridelave grozdja. Glede na njihov antioksidativni, antikarcinogeni in antimutageni potencial so stilbeni izredno pomembni v naši prehrani. Eden najprepoznavnejših in najbolj raziskanih derivatov je *trans*-resveratrol (slika 11).



Slika 11: *trans*-Resveratrol.

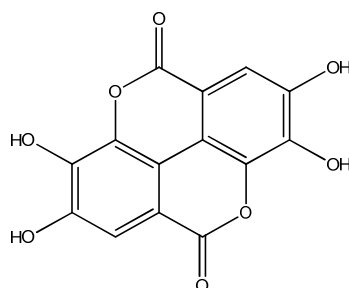
Resveratrol je prisoten v grozdni kožici v *cis* ali bolj stabilni *trans* obliki. Njegove koncentracije so v belih vinih zelo nizke; običajno < 5 mg/L, predvsem v primerjavi z ostalimi polifenoli. Zaradi kompleksne sestave (poli)fenolov v grozdju in vinih je zelo težko pripisati zdravilne učinke vina točno določeni komponenti (22), vendar je resveratrol

eden prvih antioksidantov, ki so jih identificirali v vinu in mu, kljub zgornjemu dejstvu, pripisujejo zelo veliko lastnosti, ki naj bi ugodno vplivale na življenjsko dobo pivcev vina. Predvsem sta zanimiva vpliva na zmanjšanje srčnih zapletov in insulinske rezistence, kar posredno tudi dejansko vpliva na življenjsko dobo ljudi (27).

1.3.2.3. Tanini

Hidrolizirajoči tanini

Njihov vir so leseni sodi, lahko pa so tudi namensko dodani vinu (enološki tanini). Ti kompleksni polifenoli nastanejo s polimerizacijo estrov galne in elagne kisline z glukozo in njej podobnimi sladkorji. Nastanejo tako imenovani galotanini in elagotanini (11).

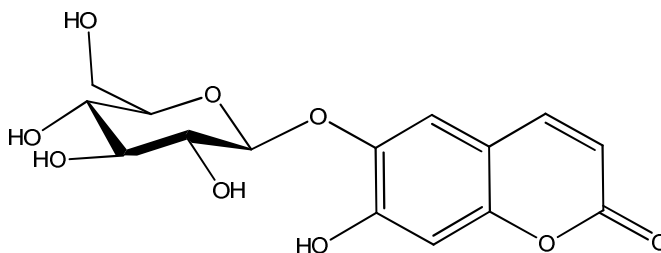


Slika 12: Elagna kislina.

Elagno kislino (slika 12) povezujejo z antioksidativnimi in antiproliferacijskimi lastnostmi. Razen v vinu in grozdju jo najdemo tudi v jagodah, malinah, robidah, brusnicah in lešnikih (28).

1.3.2.4. Kumarini

So derivati cimetove kisline, katerih vir je prav tako hrastov les. V vinarski analitiki služijo kot značilni marker shranjevanja vina v hrastovih sodih (16).



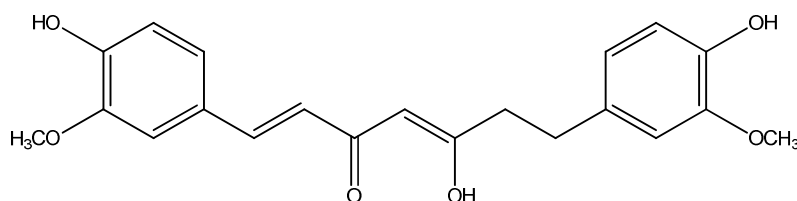
Slika 13: Eskulin.

Eskulin (slika 13) je eden glavnih predstavnikov te skupine v vinih. Najdemo ga samo v vinih, ki so zorela v hrastovih sodih. Povezujejo ga z antioksidativnim, antipiretičnim in analgetičnim učinkom. Prav tako ga najdemo v navadnem divjem kostanju (*Aesculus*

hippocastanum), pri čemer peroralna uporaba čiste učinkovine povzroči hud gastroenteritis (29).

1.3.2.5. Kurkuminoidi

Kurkumin (slika 14) je glavni predstavnik te skupine. Poznan je pod imenom diferuloilmetan, saj ga sestavljata dve ferulni kislini, ki sta med seboj povezani z dodatnim ogljikovim atomom. Obstaja lahko v keto ali enolni obliki (30).



Slika 14: Kurkumin.

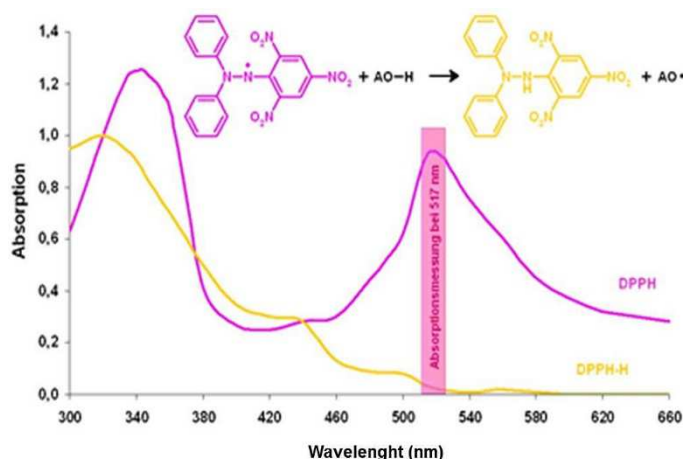
1.4. METODE ZA VREDNITENJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

Polifenoli so področje, ki je vedno bolj raziskano zaradi njihovih antioksidativnih lastnosti. Antioksidativna aktivnost je termin, s katerim označujemo sposobnost spojin redukcije radikalnih zvrsti (ROS, RNS, RSS) ter preprečevanja nastanka le-teh z vezavo železovih in bakrovih ionov (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^+ , Cu^{2+}). V tej nalogi smo izbrali metode, ki so standardizirane za analizo teh sposobnosti.

1.4.1. Redukcija DPPH[•]

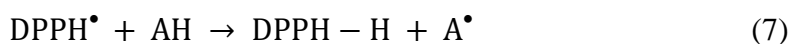
Metoda z redukcijo 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilnega radikala (DPPH[•]) je ena najstarejših metod za določanje antioksidativne aktivnosti. Razvil jo je Marsden Blois leta 1958, izpopolnil pa Brand-Williams s sodelavci leta 1995. Metoda je hitra, enostavna, cenovno ugodna in široko uporabna. Uporabljamo jo za določanje antioksidativne aktivnosti ter kvantifikacijo antioksidantov v tekočih ali trdnih kompleksnih bioloških sistemih.

DPPH[•] je stabilen radikal, katerega stabilnost omogoča delokalizacija prostega elektrona s preprečevanjem dimerizacije molekule. Spojina ima značilno vijolično barvo in v raztopini z etanolom ali metanolom absorbira pri 515-520 nm (3, 31). Ob dodatku snovi, ki lahko donira vodikov atom, reakcija povzroči redukcijo radikala. Pri tem se spremeni barva iz vijolične v blede rumeno, kar zaznamo analitično v upadu absorbance pri 517 nm (slika 15). Antioksidativno aktivnost merimo pri sobni temperaturi (v izogib možni termični degradaciji molekul); priporočen pH raztopine je 5,0 – 6,5 in inkubacija v temi (32).



Slika 15: Prikaz barvne spremembe DPPH (33).

V reakciji DPPH^\bullet z antioksidantom se DPPH^\bullet pretvori v DPPH-H , ki ne absorbira pri 517 nm. V reakciji z radikalom pa dobimo dimagnetni produkt. Poteče ena od sledečih reakcij:

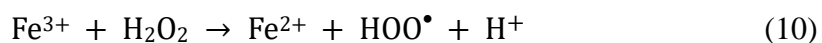
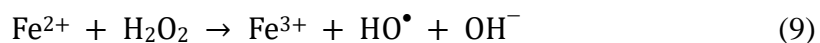


Prednost te metode je, da lahko DPPH^\bullet reagira s celotno količino vzorca in tudi s šibkimi antioksidanti, če le pustimo reakcijo potekati dovolj časa. Prav tako je zelo vsestranska metoda, saj je kompatibilna za analizo v vodnih in nepolarnih organskih topilih ter se uporablja za analizo tako hidrofilnih kot lipofilnih antioksidantov (31).

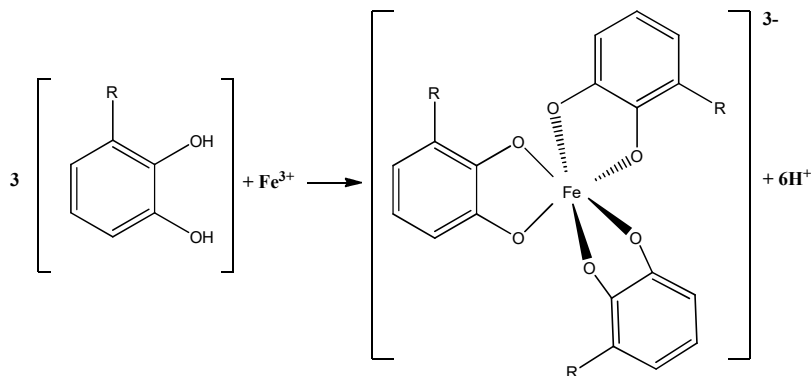
1.4.2. Železo in Fentonova reakcija

Železo je prisotno v večini situacij povezanih z oksidativnim stresom. Je primarni vzrok za nastanek ROS, kot sta R-O^\bullet in HO^\bullet *in vivo* in igra ključno vlogo pri nastanku oksidativnega stresa, zaradi česar pride do poškodb DNK in drugih biomolekul ter končno do propadanja celic. Zato se vedno več študij posveča razumevanju biokemije železa in preprečevanju, zaviranju ter prestrežanju nastajanja škodljivih produktov oksidativnega stresa.

Fentonova reakcija je radikalska reakcija katalizirana s prehodnimi kovinami ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$). Železovi ali bakrovi ioni reagirajo z vodikovim peroksidom, pri čemer se kovinski ioni oksidirajo, iz vodikovega peroksida pa nastaneta hidroksilni radikal in hidroksidni ion (enačba (9)). Oksidirani kovinski ioni se ob ponovni reakciji z vodikovim peroksidom reducirajo in nastaneta hidroperoksilni radikal ter proton (enačba (10)). Radikali nato sodelujejo v drugih sekundarnih reakcijah z organskimi molekulami.



Sposobnost (poli)fenolov, da lahko vežejo ione prehodnih kovin, je ena od značilnosti, s katero lahko ovrednotimo antioksidativno aktivnost polifenolnih spojin. Znano je, da večina (poli)fenolov, predvsem derivati katehola in galata, spada med zelo dobre kelatorje kovinskih ionov (33). Deprotonirana molekula katehina lahko reagira z železovimi ioni v razmerju 2:1 ali 3:1 (slika 16).



Slika 16: Deprotonirani fenolni ligandi reagirajo s kovinskim ionom (Fe^{3+}) in nastane stabilen kompleks. Galati $\text{R}=\text{OH}$, kateholi $\text{R}=\text{H}$.

Deprotonirani polifenolni ligandi se obnašajo kot Lewisove baze. Fe^{3+} je v primerjavi z Fe^{2+} močna Lewisova kislina, medtem ko se Fe^{2+} slabše vežejo z atomi kisika polifenolnih spojin in zato nastajajo manj stabilni kompleksi, ki se ob prisotnosti kisika takoj oksidirajo. Številnost kompleksov v vzorcih vina je odvisno tako od razmerja (poli)fenolov in kovinskih ionov kot od pH raztopine. Nižji, kot je pH, slabši bo nastanek kompleksov; pri $\text{pH} < 4$ polifenoli vežejo železo v razmerju 1:1 (34).

1.4.3. Folin-Ciocalteu-jeva metoda

Folin-Ciocalteu-jeva (FC) metoda se uporablja za kvantifikacijo celokupnih fenolnih spojin v hrani in bioloških vzorcih in temelji na redukciji kolorimetričnega FC reagenta. FC reagent je mešanica fosfomolibdenove in fosfovolframove kisline. Singleton je leta 1999 metodo priredil za analizo vinskih vzorcev. V alkalnem mediju elektroni z oksidirane fenolne molekule prehajajo na fosfomolibdenove/fosfovolframove kislinske komplekse, pri tem nastane modro obarvan kompleks, ki ga lahko spektrofotometrično pomerimo v vidnem delu spektra; 760-765 nm (35, 36). Intenziteta absorpcije svetlobe je proporcionalna koncentraciji fenolnih spojin; višja, kot je absorpcija, več je fenolnih spojin in temnejše je modro obarvanje raztopine. Učinkovitost metode je glede na posamezno fenolno spojino različna, saj je redukcijska sposobnost odvisna od števila in pozicije hidroksilnih spojin na aromatskem obroču. Reakcija je uspešnejša, ko sta prisotni dve -OH skupini v *para*- ali *orto*-položaju (37, 38).

1.5. KVALITATIVNA IN KVANTITATIVNA ANALIZA ANTIOKSIDANTNOV

1.5.1. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Kromatografija je separacijski proces, pri katerem se raztopina vzorca porazdeli med dve fazi; stacionarno in mobilno fazo. Nato komponente vzorca z ustrežno metodo detekcije (UV-VIS spektroskopija, masna spektrometrija, elektrokemični detektorji, fluorescenčni detektorji, radioaktivni detektorji) kvalitativno in kvantitativno analiziramo. Kromatografske analize tehnike so zelo pogosto uporabljene, saj slovijo po mnogih prednostih, med katere spadajo dobra ponovljivost in selektivnost ter visoka občutljivost. Metode ločimo glede na mehanizem porazdeljevanja in glede na mobilno fazo. Glede na slednjo poznamo tekočinsko in plinsko kromatografijo. Po različnem porazdeljevanju pa jih delimo na reverzno fazno, normalno fazno, ionsko-izmenjevalno in izključitveno kromatografijo (39, 40).

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je prva izbira analiznih tehnik pri določanju posameznih komponent biomolekul (polifenoli), zdravil, polimerov, ionskih in organskih spojin v kompleksnih mešanicah. Tradicionalno se za analizo vin in s tem dokazovanje polifenolnih komponent uporablja reverzno fazna kromatografija. Metoda je učinkovita, stabilna, lahka za uporabo, robustna, ponovljiva ter prav tako omogoča lažjo kontrolo gradienta, boljšo ločbo in detekcijo nečistot in večjo obstojnost kolon (41, 42). Stacionarna faza kolone je nepolarna (C_8 , C_{18} , cikloheksilne in fenolne skupine), mobilna faza pa polarna (pogosto acetonitril in/ali metanol v kombinaciji z bidestilirano vodo). Analiziramo majhne volumne vzorca, ki se injicirajo na kolono, po kateri se, s pomočjo spreminjanja pH, temperature kolone in količine organskega modifikatorja (sestave mobilne faze) pod visokim tlakom ločijo komponente vzorca glede na polarnost med polarno in nepolarno fazo. Iz kolone se komponente eluirajo ob različnih časih, ki jih zazna detektor in podatke grafično predstavi v obliki kromatograma (40, 43).

HPLC sistem je sestavljen iz več enot, ki so predstavljene na sliki 17. Komponente sestavljajo dva dela. Prvi je separacijski del, katerega sestavljajo črpalka, injektor in kolona, drugi del pa je detekcijski, kjer eden ali več detektorjev zbira podatke in jih pošilja računalniku z ustrežno programsko opremo.



Slika 17: Komponente HPLC sistema.

1.5.1.1. Kvalitativna analiza

Identifikacija posameznih komponent vzorca temelji na analizi in primerjavi retencijskih časov (t_r ; čas potreben, da substanca pripotuje skozi kolono) in UV spektra raztopine vzorca in referenčne snovi. V primeru, da ta dva podatka nista dovolj, moramo uporabiti masno spektrometrijo ali nuklearno magnetno resonanco. Retencijski čas je odvisen od mnogih faktorjev (mobilna faza, temperatura, tlak, pretok ...) in če so ti konstantni, je tudi t_r konstanten. Če t_r analita sovpada v okvir t_r standarda, je zelo verjetno, da gre za isto komponento, vendar je potrebno upoštevati dejstvo, da lahko ima več komponent enak t_r . Temu se lahko izognemo med optimizacijo metode z zagotavljanjem zadostne resolucije med želenim analitom in potencialnimi vsiljivimi spojinami (39, 40).

1.5.1.2. Kvantitativna analiza

S kvantitativno metodo določimo koncentracijo in količino analita v vzorcu. Potrebna je kalibracija podatkov, najpogosteje z uporabo zunanega standarda, lahko pa tudi z internim standardom ali standardnim dodatkom ('spiking'). Metoda temelji na analizi višine kromatografskih vrhov ali površine pod krivuljo. Pri čemer je potrebna velika pozornost na možne napake, ki se pojavijo zaradi vpliva zunanega standarda na višino in površino kromatografskega vrha ter možnega prekrivanja kromatografskih vrhov (41).

Za zanesljivost metode morajo biti zagotovljeni naslednji validacijski parametri:

- točnost,
- natančnost (ponovljivost, rigidnost in reproducibilnost),
- specifičnost,
- linearnost (40, 41).

2. NAMEN DELA

Rastlinski polifenoli so zelo učinkoviti antioksidanti, ki jih najdemo v sadju, zelenjavi, semenih ter v njihovih produktih. Ključna je njihova sposobnost lovljenja radikalov, saj na tak način varujejo naše telo pred oksidativnim stresom in radikali, ki so glavni povzročitelji degenerativnih bolezni. Veliko antioksidantov najdemo v vinih. Njihova vsebnost je zaradi postopka pridobivanja vina višja v rdečih kot v belih vinih. Tako je ogromno raziskav namenjenih analizi antioksidantov v rdečih vinih, zelo malo pa najdemo raziskav teh analitov v belih vinih. Na ozemlju Republike Slovenije imamo registriranih dobrih 16.000 ha vinogradov, na katerih ocenjujejo letno pridelavo vina med 80 in 100 milijoni litrov. Od tega 27% rdečih vin, 63% belih vin in 10% penečih ter roze vin (44).

Namen magistrske naloge je analizirati antioksidativne lastnosti (poli)fenolov v različnih vzorcih slovenskih belih vin, identificirati in kvalitativno določiti vsebnost določenih antioksidantov v teh vinih ter iz pridobljenih podatkov sklepati o možni korelaciji med njihovo vsebnostjo in aktivnostjo. Analizirali bomo 13 vzorcev belih vin iz različnih vinorodnih okolišev v Sloveniji, od katerih bodo 3 vzorci tako imenovanih oranžnih vin, ki so pridelana z maceracijo (postopek za pridelavo rdečega vina) belega grozdja. Posredno želimo namreč tudi dokazati vpliv načina pridelave vina na vsebnost antioksidantov. Uporabili bomo že ustaljene in dokazano učinkovite analizne metode. Antioksidativno aktivnost izbranih vzorcev bomo preverjali z metodo redukcije radikala DPPH[•] in zmožnostjo kelacije prostih Fe²⁺ ionov. Predvidevamo, da bo aktivnost višja v vzorcih z večjo vsebnostjo polifenolnih spojin in bo prav tako odvisna od položaja in števila -OH skupin na posameznih molekulah. Skupno vsebnost fenolnih spojin v vinskih vzorcih bomo določili s Folin-Ciocalteu-jevo metodo. Na podlagi literature in komercialne dostopnosti standardov bomo izbrali standarde antioksidantov, s pomočjo katerih bomo najprej z reverzno fazno HPLC metodo poskušali identificirati pripadajoče anlite, s primerjavo retencijskega časa in UV spektra standarda in analita v vzorcu. Nato bomo s kvantitativno analizo določili njihovo koncentracijo v vinskih vzorcih. Dejanska vsebnost fenolov v vinu je odvisna od veliko parametrov (sorta, geografsko poreklo, predelava in drugi tehnološki posegi v vino (čiščenje), starost vina ...), zato pričakujemo, da bodo rezultati raznoliki, vendar bodo skupaj tvorili zelo smiselno celoto in nam bodo omogočili smotrni dokaz korelacije med antioksidativno aktivnostjo in kvantitativno vsebnostjo antioksidantov v izbranih vzorcih belih vin.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. VINA

Preglednica I: Seznam vzorcev vin.

št.vzorca	ime/pridelovalec	sorta	stopnja sladkorja	letnik	vol%	poreklo
<u>1</u>	Jamšek	renski rizling	polsuho	2014	11	Svečina, Zg. Kungota
<u>2</u>	Kušter	souvignon	polsuho	2013	12,5	Svečina, Zg. Kungota
<u>3</u>	Radgonske gorice	ranina	polsuho	2014	11	Gornja Radgona
<u>4</u>	Ljutomerčan	šipon	suho	2012	13	Ormož
<u>5</u>	Marof	laški rizling	suho	2012	12,5	Mačkovci
<u>6</u>	Zlati grič	chardonnay	suho	2012	13	Slovenske Konjice
<u>7</u>	Vinska klet Krško	beli pinot	suho	2013	13,5	Krško
<u>8</u>	Vipava	chardonnay	suho	2013	12	Vipava
<u>9</u>	Vina Koper	rumeni muškat	suho	2013	11	Koper
<u>10</u>	Zalatel	chardonnay	suho	2013	13	Hruševlje, Dobrovo
<u>11</u>	Čotar	malvazija	suho	2009	12	Gorjansko, Komen
<u>12</u>	Mlečnik	beli cuvée	suho	2009	13	Bukovica, Vipava
<u>13</u>	Batič	sivi pinot	suho	2011	13,5	Šempas, Vipava

3.2. STANDARDI

Uporabljali smo standarde proizvajalcev Sigma-Aldrich, Merck KgaA in TCI.

- Galna kislina ($C_7H_6O_5$, $M= 170,12$ g/mol), CAS: 149-91-7, Merck KgaA, Nemčija.
- Eskulin ($C_{15}H_{16}O_9$, $M= 340,28$ g/mol), CAS: 531-75-9, TCI, ZDA.
- Katehin ($C_{15}H_{14}O_6$, $M= 290,27$ g/mol), CAS: 154-23-4, Sigma-Aldrich, ZDA.
- Kavna kislina ($C_9H_8O_4$, $M= 180,16$ g/mol), CAS: 331-39-5, Sigma-Aldrich, ZDA.
- p-Kumarna kislina ($C_9H_8O_3$, $M= 164,16$ g/mol), CAS: 501-98-4, Sigma-Aldrich, ZDA.
- Ferulna kislina ($C_{10}H_{10}O_4$, $M= 194,18$ g/mol), CAS: 1135-24-6, TCI, ZDA.
- Rutin ($C_{27}H_{30}O_{16}$, $M= 610,52$ g/mol), CAS: 153-18-4, Sigma-Aldrich, ZDA.

- Elagna kislina ($C_{14}H_6O_8$, $M= 302,19$ g/mol), CAS: 476-66-4, TCI, ZDA.
- Hesperidin ($C_{28}H_{34}O_{15}$, $M= 610,56$ g/mol), CAS: 520-26-3, Sigma-Aldrich, ZDA.
- Resveratrol ($C_{14}H_{12}O_3$, $M= 228,24$ g/mol), CAS: 501-36-0, Merck KgaA, Nemčija.
- Kvercetin ($C_{15}H_{10}O_7$, $M= 338,27$ g/mol), CAS: 117-39-5, Sigma-Aldrich, ZDA.
- Kurkumin ($C_{21}H_{20}O_6$, $M= 3680,38$ g/mol), CAS: 458-37-7, TCI, ZDA.

3.3. REAGENTI

- MiliQ[®] prečiščena voda.
- DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, $C_{18}H_{12}N_5O_6$, $M = 394,32$ g/mol), Merck KgaA, Nemčija.
- Etanol za HPLC, >99,9 (C_2H_6O , $M= 46,07$ g/mol), J.T.Baker, ZDA.
- Kalijev acetat ($C_2H_3KO_2$, $M= 98,14$ g/mol), Merck KgaA, Nemčija.
- Ocetna kislina ($C_2H_4O_2$, $M= 60,05$ g/mol), Merck KgaA, Nemčija.
- Ferozin (3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazin-4',4''-natrijeva sol disulfonske kisline, $C_{20}H_{13}N_4NaO_6S_2$, $M=492,46$ g/mol), Sigma-Aldrich, ZDA.
- Železov (II) klorid tetrahidrat ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$, $M= 198,81$ g/mol), Sigma-Aldrich, ZDA.
- Metanol za HPLC, >99,9 (CH_4O , $M= 32,04$ g/mol), J.T.Baker, ZDA.
- Acetonitril za HPLC, >99,9 (CH_3CN , $M= 41,05$ g/mol), J.T.Baker, ZDA.
- Fosforeva (V) kislina (H_3PO_4 , $M= 98,00$ g/mol), Fluka, ZDA.
- Trifluoroocetna kislina ($C_2HF_3O_2$, $M= 114,02$ g/mol), Sigma-Aldrich, ZDA.

3.4. LABORATORIJSKA OPREMA:

- UV-VIS spektrofotometer Cary 100 Bio (Agilent, ZDA),
- HPLC UltiMate 3000 (DIONEX, Thermo Fischer Scientific, Nemčija),
 - kolone:
 - a) Agilent-Eclipse Plus XDB C18 $4,6 \times 150$ mm, 3 μ m,
 - b) Accucore C18 $100 \times 4,6$ mm, 2,6 μ m (Thermo Scientific, ZDA),
 - c) Kinetex 2.6u C18 100A $100 \times 4,6$ mm, 2,6 μ m (Phenomenex, ZDA),
 - programska oprema: DIONEX Chromeleon 7.1 SR2 (Thermo Scientific, ZDA),
- pH meter MP220 (Mettler Toledo, ZDA),
- analitska tehtnica AG 245 (Mettler Toledo, ZDA),
- ultrazvočna kadička Sonis 4 (Iskra Pio, Slovenija),

- avtomatska pipeta in tipsi (Transferpipette 10-100 μ L, Brand GmbH, Nemčija; Biohit M1000 mLINe 100-1000 μ L, Biohit Oyj, Finska),
- kiveta iz kvarčnega stekla 2,5 mL,
- plastične kivete semi micro (Brand, Nemčija),
- steklen piknometar (Brand, Nemčija),
- merilne bučke: 10 mL, 20 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL,
- čaše,
- merilni valji,
- merilne in polnilne pipete,
- steklene kapalke,
- laboratorijske steklenice,
- tehtalni čolnički,
- spatule,
- kovinske in plastične žličke,
- penicilinke z gumjastimi zamaški,
- filtri 0,45 μ m (Minisart RC25 17765, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Nemčija),
- igle 0,90 \times 40 mm, 20G \times 1,5 (B. Braun Melsungen AG, Nemčija),
- plastične brizge Braun Injekt 5 mL Luer Solo (B. Braun Melsungen AG, Nemčija),
- viala z navojem in pokrovčki 2 mL (Agilent Technologies, ZDA).

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1.1. Merjenje pH vin

pH meter MP220 smo najprej kalibrirali. Za umeritev smo uporabili komercialni pufni raztopni s pH 4,01 in pH 7,00. Nato smo v 100 mL čašo natočili 50 mL posamičnega vzorca **1** – **13**, v čašo potopili elektrodo in pomerili pH.

4.1.2. Merjenje gostote vin

Eksperimentalno delo smo začeli s tehtanjem suhega in praznega piknometra (m). Nato smo piknometer napolnili do oznake s prečiščeno vodo in ga stehali (m_2). Vsebino smo izlili, ga očistili in napolnili z vzorcem vina ter ponovno stehali (m_1). Med tehtanji vzorcev **1** – **13** smo piknometer sprali s prečiščeno vodo, očistili in pobrisali.

Gostoto vin smo izračunali po enačbi:

$$\rho(\text{vzorca}, 20^\circ\text{C}) = \rho(\text{vode}) \frac{m_1 - m}{m_2 - m} \quad (11)$$

4.1.3. Analiza antioksidativne kapacitete

4.1.3.1. Sposobnost redukcije radikala DPPH[•]

Sledili smo metodi iz članka (45) z majhnimi modifikacijami.

Priprava delovne raztopine in vzorcev:

Za pripravo delovne raztopine 50 μM DPPH smo v 25 mL bučko natehtali 9,85 mg DPPH in z metanolom dopolnili do oznake. 1 mL pripravljene raztopine smo odpipetirali v 20 mL bučko in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.

Za analizo smo za vsak vzorec vina **1** - **13** pripravili 2 paraleli čistega vzorca in šestih redčitev. Glede na razpoložljivo steklovino smo se odločili za slednja redčenja:

5 mL vzorca smo odpipetirali v 10 mL bučko in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.

3,5 mL vzorca smo odpipetirali v 10 mL bučko in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.

5 mL vzorca smo odpipetirali v 25 mL bučko in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.

3 mL vzorca smo odpipetirali v 20 mL bučko in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.

1 mL vzorca smo odpipetirali v 10 mL bučko in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.

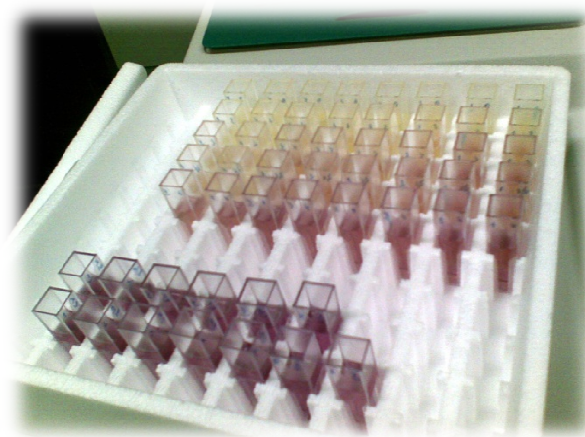
1 mL vzorca smo odpipetirali v 20 mL bučko in s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.

Preglednica II: Pripravljena redčenja vzorcev 1-13.

	0 [mg/mL]	5 na 10	3,5 na 10	5 na 25	3 na 20	1 na 10	1 na 20
<u>1</u>	1,0013	0,5007	0,3505	0,2003	0,1502	0,1001	0,0501
<u>2</u>	0,9974	0,4987	0,3491	0,1995	0,1496	0,0997	0,0499
<u>3</u>	1,0000	0,5000	0,3500	0,2000	0,1500	0,1000	0,0500
<u>4</u>	0,9923	0,4962	0,3473	0,1985	0,1488	0,0992	0,0496
<u>5</u>	0,9904	0,4952	0,3466	0,1981	0,1486	0,0990	0,0495
<u>6</u>	0,9923	0,4962	0,3473	0,1985	0,1488	0,0992	0,0496
<u>7</u>	0,9912	0,4956	0,3469	0,1982	0,1487	0,0991	0,0496
<u>8</u>	0,9924	0,4962	0,3473	0,1985	0,1489	0,0992	0,0496
<u>9</u>	0,9940	0,4970	0,3479	0,1988	0,1491	0,0994	0,0497
<u>10</u>	0,9908	0,4954	0,3468	0,1982	0,1486	0,0991	0,0495
<u>11</u>	0,9929	0,4965	0,3475	0,1986	0,1489	0,0993	0,0496
<u>12</u>	0,9926	0,4963	0,3474	0,1985	0,1489	0,0993	0,0496
<u>13</u>	0,9911	0,4956	0,3469	0,1982	0,1487	0,0991	0,0496

Z UV-VIS spektrofotometrom Cary 100 Bio smo pomerili spekter 50 μ M DPPH, pri čemer smo odpipetirali 2,5 mL reagenta v kiveto iz kvarčnega stekla. Iz rezultatov je bilo razvidno, da je smiselno merjenje absorbanc pri valovni dolžini 517 nm, saj je pri tej valovni dolžini absorpcijski maksimum. Izmerili smo absorbanco 50 μ M DPPH in čistega vzorca 1. Nato smo preverili kinetiko redukcije DPPH treh razredčitev vzorca 1 (5 mL vzorca v 10 mL bučki, 3,5 mL vzorca v 10 mL bučki in 5 mL vzorca v 25 mL bučki).

Za analizo redukcije radikala DPPH[•] smo v plastične kivete odpipetirali 100 μ L vzorca 1 - 13 (preglednica II) in mu dodali 1,65 mL 50 μ M DPPH. Raztopino smo s pomočjo avtomatske pipete premešali in jo v temi inkubirali 90 minut pri sobni temperaturi. Z UV-VIS spektrofotometrom Cary 100 Bio smo nato pomerili absorbanco pri valovni dolžini 517 nm. Za ozadje smo uporabili etanol. Kot rezultat smo uporabili povprečje absorbanc obeh paralelek posameznega vzorca.



Slika 18: Potek redukcije DPPH• v plastičnih kivetah.

Pri izračunu deleža DPPH, ki se ne reducira (I(%)), smo se oprli na sledečo enačbo:

$$I(\%) = \frac{(A_{DPPH} - (A_{vzorca} - A_{slepa}))}{A_{DPPH}} \cdot 100 \quad (12)$$

Obseg redukcije smo podali z izračunom deleža A_{vzorca}/A_{DPPH} (%) in v programu Microsoft Excell 2007 pripravili ustrezne grafe vzorcev v odvisnosti od koncentracij posameznega vzorca. Nato smo z uporabo funkcije STEYX izračunali standardne napake predvidenih vrednosti y za vsak x . Kot končen rezultat smo podali vrednost $EC_{50} \pm$ standardna napaka, ki smo jo izračunali z uporabo enačbe regresijske premice.

4.1.3.2. Vsebnost prostih Fe^{2+} ionov

Sledili smo metodi iz virov (46, 47) z majhnimi modifikacijami. Predpostavljali smo, da je v vzorcih prisotno železo in dovolj antioksidantov, ki bodo vezali proste Fe^{2+} . Zato nismo razklapljali molekul, dodajali $FeCl_2$ in nato kelirali.

Priprava reagentov:

500 mM kalij acetatni pufer, pH 5,5

Za pripravo pufru smo se ravnali po *Handerson-Hasselbachovi enačbi* in $m = c \cdot V \cdot M$. Pripravili smo ga 1000 mL, pri čemer smo natehtali 42,40 g trdnega kalijevega acetata, ga vsuli v 1000 mL merilno bučo, mu dodali 4,40 mL očetne kisline, raztopino premešali ter s prečiščeno vodo dopolnili do oznake. Pripravimo po potrebi.

1 mM ferozin

Najprej smo pripravili 5 mL osnovne raztopine 5mM ferozina (enačba $m = c \cdot V \cdot M$). V 10 mL čašo smo natehtali 12,31 mg ferozina in dodali 5 mL 500 mM kalij acetatnega pufra, pH 5,5.

Iz pripravljene raztopine smo nato pripravili 5 mL delovne raztopine 1 mM ferozina. V 10 mL čašo smo odpipetirali 4 mL 500 mM kalij acetatnega pufra, pH 5,5 in mu dodali 1 mL osnovne raztopine 5 mM ferozina. Pripravimo dnevno sveže.

250 μ M FeCl₂

Kot pri ferozinu smo tudi tukaj najprej pripravili 5 mL osnovne raztopine 6 mM železovega(II) klorid tetrahidrata (enačba $m = c \cdot V \cdot M$). V 10 mL čašo smo natehtali 5,96 mg FeCl₂·4H₂O in dodali 5 mL prečiščene vode. Nato smo za pripravo 250 μ M delovne raztopine v čašo odpipetirali 4600 μ L prečiščene vode in dodali 200 μ L osnovne raztopine 6 mM FeCl₂.

Umeritvena krivulja FeCl₂

Za umeritveno krivuljo smo pripravili 5 redčitev 6 mM železovega(II) klorida tetrahidrata navedenih v preglednici III. Reagent smo v 10 mL bučkah redčili s prečiščeno vodo. 2 mL posameznih redčitev smo odpipetirali v kivete in pomerili absorbance pri 562 nm.

Preglednica III: Priprava redčitev železovega(II) klorida tetrahidrata.

Postopek	Končna koncentracija v vzorcu	Redčitev
200 μ L 6 μ M FeCl ₂ + 5 mL H ₂ O	40 μ M	240 μ M
150 μ L 6 μ M FeCl ₂ + 5 mL H ₂ O	30 μ M	180 μ M
100 μ L 6 μ M FeCl ₂ + 5 mL H ₂ O	20 μ M	120 μ M
100 μ L 240 μ M FeCl ₂ + 800 μ L H ₂ O	10 μ M	60 μ M
200 μ L 120 μ M FeCl ₂ + 800 μ L H ₂ O	5 μ M	30 μ M

Priprava in analiza vzorcev

600 μ L nerazredčenega vzorca **1** – **13** smo odpipetirali vsakega v svojo plastično kiveto in dodali 400 μ L 1 mM ferozina. Na sobni temperaturi in v temi smo vzorce inkubirali 1 h. Absorbanco smo pomerili pri 562 nm. Za ozadnje smo uporabili narazredčen vzorec vina brez dodatka ferozina.

S pomočjo enačbe premice umeritvene krivulje FeCl₂ smo nato izračunali vsebnost prostih železovih (II) ionov v vzorcih vina.

4.1.3.3. Določanje skupne vsebnosti fenolnih spojin s Folin-Ciocalteaujevo metodo

Sledili smo metodi iz člankov (35, 48) z majhnimi modifikacijami.

Priprava reagentov:

Delovna raztopina natrijevega karbonata (Na_2CO_3)

Natehtali smo 50 g trdnega Na_2CO_3 , ga vsuli v 250 mL bučko in do oznake dopolnili s prečiščeno vodo.

Galna kislina – kalibracijski standard

Za pripravo 100 mL standarda (5 g/L) smo natehtali 500 mg galne kisline, jo vsuli v 100 mL bučko, dodali 10 mL etanola in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake. Nato smo pripravili več redčitev standarda in dva kontrolna standarda (k_1 in k_2), ki so predstavljene v preglednici IV. Za pripravo osnovne raztopine kontrolnih standardov smo v 50 mL bučko vsuli 250 mg galne kisline, dodali 5 mL etanola ter do oznake dopolnili s prečiščeno vodo.

Preglednica IV: Priprava kalibracijskih standardov galne kisline.

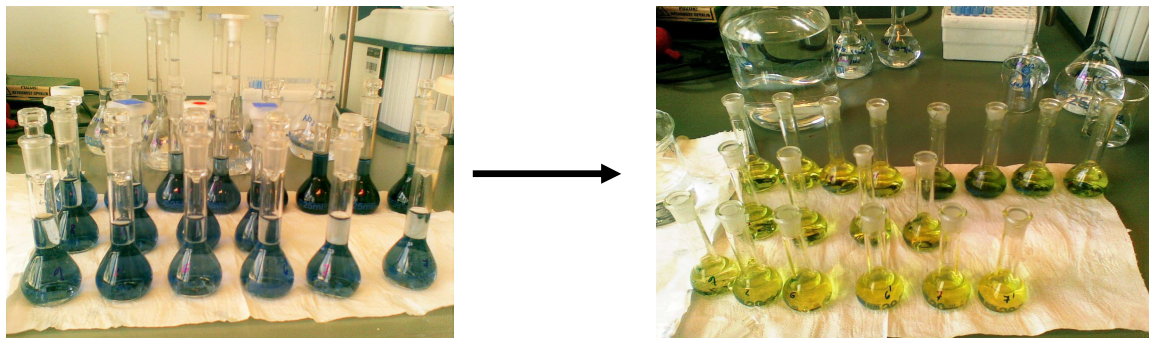
Koncentracija galne kisline [mg/L]	Postopek
50	V 100 mL bučko odpipetiramo 1 mL standarda galne kisline in s prečiščeno vodo dopolnimo do oznake.
100	2 mL galne kisline/100 mL
125 (k_1)	2,5 mL kontrolnega standarda/100 mL
200 (k_2)	4 mL kontrolnega standarda/100 mL
250	5 mL galne kisline/ 100 mL
500	10 mL galne kisline/100 mL

Analiza vzorcev in kalibracijskih standardov

250 μL vzorca **1** – **13**, kalibracijskih standardov galne kisline in prečiščene vode (slepi vzorec) smo odpipetirali vsakega v svojo 25 mL bučko, dodali 17,5 mL prečiščene vode in 1,25 mL Folin-Ciocalteau-jevega (FC) reagenta. Raztopino smo premešali in inkubirali 8 minut pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 3 mL raztopine Na_2CO_3 in dopolnili s

prečiščeno vodo do oznake. Raztopino smo premešali in pri sobni temperaturi inkubirali 2 h. Za vzorce **1** – **13** smo pripravili dve paraleli.

2 mL raztopine smo odpipetirali v kiveto in pomerili absorbanco pri 765 nm (A_{765}). Za ozadje smo uporabili slepi vzorec.



Slika 19: Raztopine vzorcev s FC reagentom pred in po inkubaciji.

Absorbance kalibracijskih standardov galne kisline smo uporabili za pripravo umeritvene krivulje in pripravili graf odvisnosti A_{765} od koncentracij galne kisline. S pomočjo enačbe premice in A_{765} vzorcev vin smo izračunali koncentracije fenolnih spojin v posameznem vzorcu in jih predstavili v grafu kot ekvivalent mg galne kisline/L (mg GAE/L).

4.1.4. Identifikacija in kvantitativna analiza antioksidantov s HPLC

Sledili smo metodi članka (49) in jo ustrezno modificirali.

4.1.4.1. Optimizacija metode in identifikacija antioksidantov

Priprava standardov za identifikacijo

Za pripravo raztopine galne kisline, eskulina, kavne kisline, katehina, p-kumarne kisline, ferulne kisline, rutina, resveratrola in kurkumina smo v penicilinke natehtali 2 mg posameznega standarda in ga raztopili z 2 mL metanola.

Zaradi slabše topnosti smo 2 mg elagne kisline, hesperidina in kvercetina raztopili v 4 mL metanola.

1,5 mL posamezne raztopine standardov smo odpipetirali v vialo. V dodatni viali smo pripravili zmes standardov, pri čemer smo vanjo odpipetirali po 100 μ L raztopine vsakega standarda.

Priprava mobilnih faz

Mobilna faza A (MFA):

- a) v 1000 mL merilno bučko smo odpipetirali 5 mL koncentrirane fosforjeve(V) kisline in z MQ vodo dopolnili do oznake (0,5% fosforna kislina). Pripravili smo dnevno svežo mobilno fazo.
- b) v 1000 mL merilno bučko smo odpipetirali 5 mL TFA in z MQ vodo dopolnili do oznake. Pripravili smo dnevno svežo.

Mobilna faza C (MFC): v 1000 mL merilno bučko smo odpipetirali 10 mL MeCN za HPLC in z MQ vodo dopolnili do oznake.

Mobilna faza D (MFD):

- a) 500 mL acetonitrila za HPLC.
- b) 500 mL metanola za HPLC.
- c) Acetonitril/metanol (50/50): v 200 mL bučki smo zmešali 100 mL MeCN za HPLC in 100 mL metanola za HPLC.

Priprava vzorcev

Z avtomatsko pipeto smo napolnili vialo z vzorcem (približno 1,5 mL).

Eksperimentalno delo je potekalo na HPLC UltiMate 3000. V procesu optimiziranja metode smo preizkusili tri kolone: Agilent-Eclipse Plus XDB C18 4,6 × 150 mm, Accucore 2,8 μm C18 100 × 4,6 mm in Kinetex 2.6u 100A 100 × 4,6 mm.

Metoda je potekala 30 minut pri temperaturi 30°C. Spremljali smo signale pri 210 nm, 280 nm, 320nm in 360nm. Z vsako kolono smo pomerili sekvenco z MeCN in z metanolom (preglednice V, VI, VII in VIII). Pretok mobilne faze je bil konstanten 1 mL/min in volumen injiciranja vzorca 10 μL/min.

Agilent-Eclipse Plus XDB C18 4,6 × 150 mm

Preglednica V: Gradient pufer/MeCN (1).

		Čas [min]	Gradient [%MFD]
MFA	0,5% fosforna kislina	-7	5
MFC	10% MeCN	0	5
		4	5
		28	60
		29,5	90
		30	5

Preglednica VI: Gradient pufer/metanol (1).

		Čas [min]	Gradient [%MFD]
MFA	0,5% fosforna kislina	-7	5
MFC	10% MeCN	0	5
		4	5
		28	75
		29,5	90
		30	5

Preglednica VII: Gradient pufer/MeCN (2).

		Čas [min]	Gradient [%MFD]
MFA	0,5% fosforna kislina	-7	4
MFC	10% MeCN	0	4
		5	4
		27	75
		27,5	90
		29,5	90
		30	5

Accucore 2,8 μ m C18 100 \times 4,6 mm

Volumen injiciranja smo zmanjšali na 5 μ L/min. Uporabili smo metodi pufer/MeCN (2) in pufer/metanol (1), ki sta navedeni v preglednicah VI in VII.

Kinetex 2,6 μ 100A 100 \times 4,6 mm

V nadaljevanju smo preizkusili kolono Kinetex 2.6 μ . Najprej smo ji dodali predkolono, vendar so se na kromatogramih pojavljali dvojni vrhovi, zato smo proces ustavili in odstranili predkolono. Pri meritvah smo ohranili gradient naveden v spodnji preglednici VIII ter znižali volumen injiciranja na 5 μ L/min.

Preglednica VIII: Gradient pufer/MeCN (3).

		Čas [min]	Gradient [%MFD]
MFA	0,5% fosforna kislina	-7	5
MFC	10% MeCN	0	5
		3	5
		25,5	50
		28,5	95
		29,5	95
		30	5

Sekvence smo pomerili še z dvema MFD: metanolom in MeCN/metanol (50/50) ter ponovili metodo z MeCN pri čemer smo za MFA uporabili TFA.

Za identifikacijo standardov smo uporabili kolono Kinetex 2.6u ter pogoje, ki so predstavljeni v preglednici VIII.

4.1.4.2. Kvantitativna analiza antioksidantov v vzorcih vin

Priprava standardov

V 10 mL bučko smo natehtali po 10,00 mg vsakega standarda, razen elagne kisline in kvercetina, ter z metanolom dopolnili do oznake. Druga dva standarda se slabše raztapljata, zaradi česar smo ju posebej pripravili. 10,00 mg kvercetina smo natehtali v 10 mL bučko in z metanolom dopolnili do oznake. Natehtali smo 5,00 mg elagne kisline v 25 mL bučko in prav tako dopolnili z metanolom do oznake. Bučki s kvercetinom in elagno kislino smo dali v UV kadičko za 1 - 5 minut, dokler se raztopini nista zbistrili.

Za pripravo več redčitev standardov, ki so predstavljene v spodnji preglednici IX, smo uporabili 10% metanol. V ta namen smo v 1000 mL merilno bučko odpipetirali 100 mL metanola za HPLC in z MQ vodo dopolnili do oznake.

Preglednica IX: Priprava redčitev standardov in kontrolnih standardov.

standard	postopek	koncentracija
st. 1	V 20 mL bučki zmešamo 1 mL zmesi standardov, 1 mL kvercetina in 1 mL elagne kisline ter z MQ vodo dopolnimo do oznake.	0,05 mg/mL
st. 2	V 50 mL bučki zmešamo 1 mL zmesi standardov, 1 mL kvercetina, 1 mL elagne kisline in 2 mL metanola ter z MQ vodo dopolnimo do oznake.	0,02 mg/mL
st. 3	V 25 mL bučko odpipetiramo 5 mL st. 1 in dopolnimo z 10% metanolom do oznake.	0,01 mg/mL
st. 4	V 25 mL bučko odpipetiramo 5 mL st. 2 in dopolnimo z 10% metanolom do oznake.	0,004 mg/mL
st. 5	V 20 mL bučko odpipetiramo 5 mL st. 3 in dopolnimo z 10% metanolom do oznake.	0,0025 mg/mL
st. 6	V 25 mL bučko odpipetiramo 5 mL st. 4 in dopolnimo z 10% metanolom do oznake.	0,0008 mg/mL
kontr. st. 1	V 20 mL bučki zmešamo 0,5 mL zmesi standardov, 0,5 mL kvercetina in 0,5 mL elagne kisline ter z 10% metanolom dopolnimo do oznake.	0,025 mg/mL
kontr. st.2	V 100 mL bučki zmešamo 0,5 mL zmesi standardov, 0,5 mL kvercetina in 0,5 mL elagne kisline ter z 10% metanolom dopolnimo do oznake.	0,005 mg/mL

Priprava vzorcev

Z avtomatsko pipeto smo vzorce **1** – **13** posamično napolnili v vialo (približno 1,5 mL).

Najprej smo pomerili slep vzorec, nato raztopine standardov začeni z najnižjo koncentracijo (6-1), kontrolna standarda, vzorce **1** – **13** ter zaključili s slepim vzorcem.

Sekvenco smo ponovili še enkrat.

4.1.5. Izračun korelacije

Na koncu smo preverili, če obstaja povezava med celokupno vsebnostjo fenolov v vzorcih (FC metoda) in njihovo antioksidativno aktivnostjo (EC₅₀ izračunani z DPPH metodo). Predpostavili smo, da je odvisnost spremenljivk linearna in v Microsoft Excell 2007 za izračun uporabili Pearsonov korelacijski koeficient:

$$r_{xy} = \frac{C_{xy}}{\sigma_x \cdot \sigma_y} \quad (13)$$

$$C_{xy} = \frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \mu_x) \cdot (y_i - \mu_y) \quad (14)$$

C_{xy} - kovarianca

σ_x - standardni odklon spremenljivke x

σ_y - standardni odklon spremenljivke y

N - število vseh enot

Vrednosti stopnje (moči, jakosti) povezanosti se opredeljujejo med 0 in |1|:

0 - ni povezanosti,

|0-0,2| - neznatna (pozitivna/negativna) povezanost,

|0,2-0,4| - nizka (šibka) povezanost,

|0,4-0,6| - srednja (zmerna) povezanost,

|0,7-0,9| - visoka povezanost,

|0,9-1| - zelo visoka povezanost,

1 - popolna (funkcijska) povezanost.

5. REZULTATI

5.1. MERJENJE pH IN GOSTOTE VZORCEV

Preglednica X: Seznam vzorcev vin z vrednostmi izmerjenega pH in gostote.

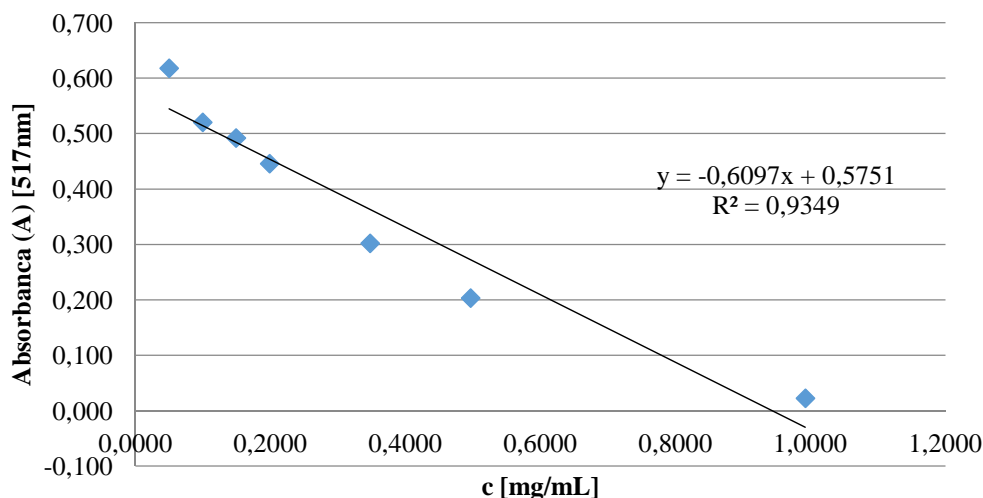
št.vzorca	ime/pridelovalec	sorta	stopnja sladkorja	letnik	vol%	pH	gostota [g/mL]
<u>1</u>	Jamšek	renski rizling	polsuho	2014	11	3,26	1,003
<u>2</u>	Kušter	souvignon	polsuho	2013	12,5	3,24	0,9974
<u>3</u>	Radgonske gorice	ranina	polsuho	2014	11	3,35	1,0000
<u>4</u>	Ljutomerčan	šipon	suho	2012	13	3,13	0,9923
<u>5</u>	Marof	laški rizling	suho	2012	12,5	3,42	0,9904
<u>6</u>	Zlati grič	chardonnay	suho	2012	13	3,20	0,9923
<u>7</u>	Vinska klet Krško	beli pinot	suho	2013	13,5	3,55	0,9912
<u>8</u>	Vipava	chardonnay	suho	2013	12	3,46	0,9924
<u>9</u>	Vina Koper	rumeni muškat	suho	2013	11	3,49	0,9940
<u>10</u>	Zalatel	chardonnay	suho	2013	13	3,27	0,9908
<u>11</u>	Čotar	malvazija	suho	2009	12	3,37	0,9929
<u>12</u>	Mlečnik	beli cuvée	suho	2009	13	3,95	0,9926
<u>13</u>	Batič	sivi pinot	suho	2011	13,5	3,63	0,9911

V preglednici X smo zbrali rezultate meritev pH in relativne gostote vzorcev. Razvidno je, da se pH giblje med 3,13 – 3,95. Oranžna vina imajo višje vrednosti kot bela vina. Relativna gostota se med vzorci zelo malo razlikuje. Natančneje je opazna razlika med plosuhimi in suhimi vini, saj imajo slednja rahlo nižje vrednosti.

5.2. REDUKCIJA DPPH*

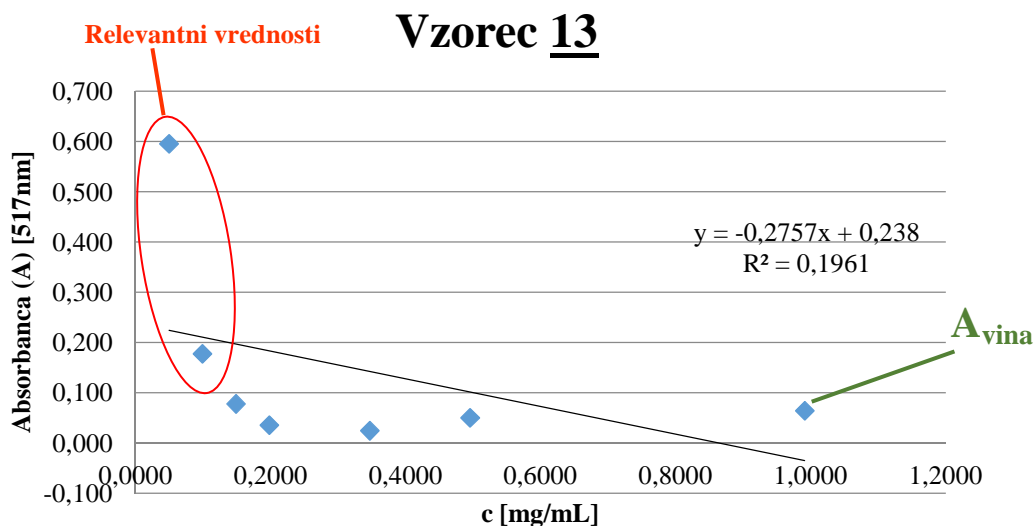
Spektrofotometrična analiza redukcije DPPH v vzorcih belih vin 1 – 10 nam je podala rezultate, ki so se zelo približali linearnemu modelu. Kot primer je predstavljen graf vzorca 4 (slika 20).

Vzorec 4



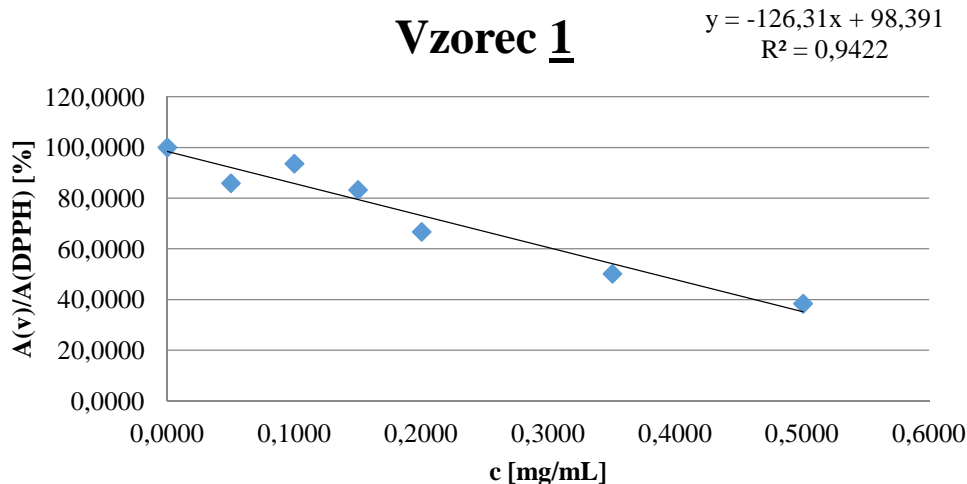
Slika 20: Prikaz odvisnosti absorbance od koncentracije (mg/mL) vzorca 4.

Pri vzorcih oranžnih vin, 12 in 13, je opazen takojšen padec koncentracije DPPH, zaradi pričakovane visoke vsebnosti antioksidantov. Kot primer je predstavljen graf vzorca 13 (slika 21). Pri absorbanci pod 0,1 DPPH ni več v prebitku, zato smo za nadaljnjo obdelavo podatkov uporabili samo podatke prvih dveh redčitev.

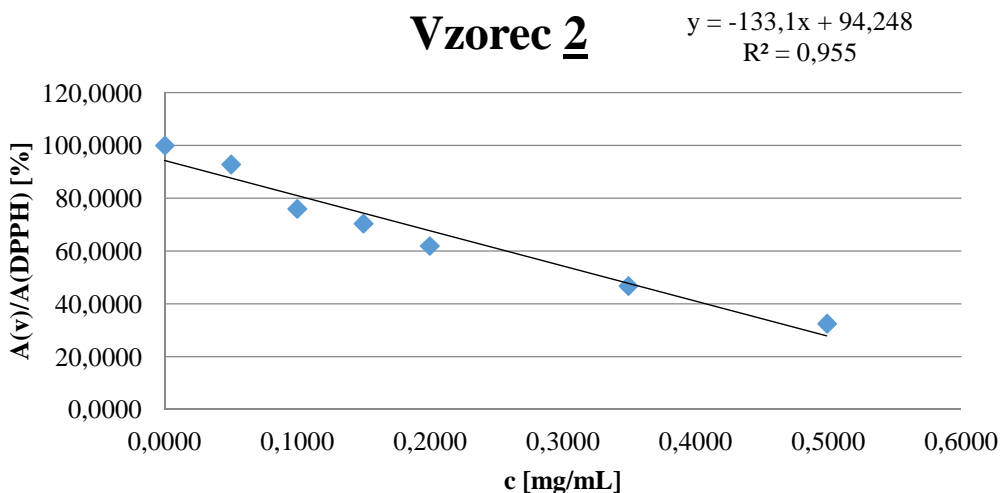


Slika 21: Prikaz odvisnosti absorbance od koncentracije (mg/mL) vzorca 13.

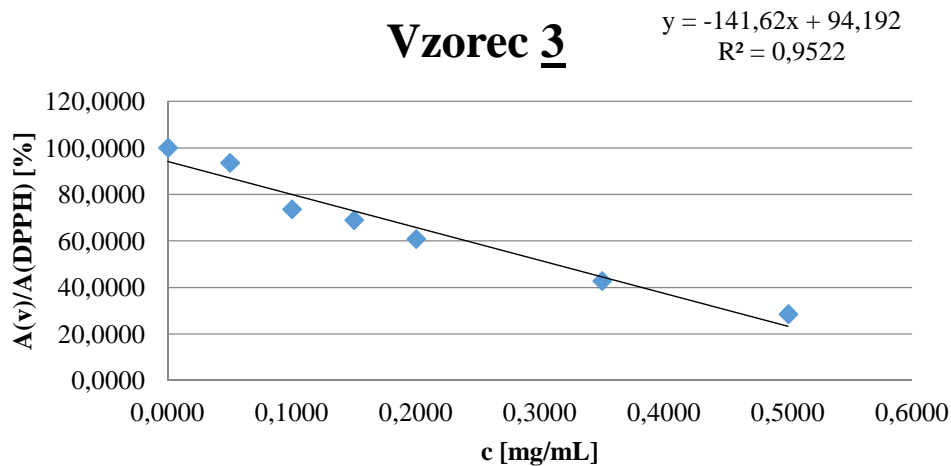
Spodnji grafi (slika 22 – 34) prikazujejo rezultate redukcije DPPH (%) v odvisnosti od koncentracije vzorcev (mg/mL). Pri obdelavi podatkov smo upoštevali absorbance vzorcev višje od 0,1 ter dodali absorbance DPPH.



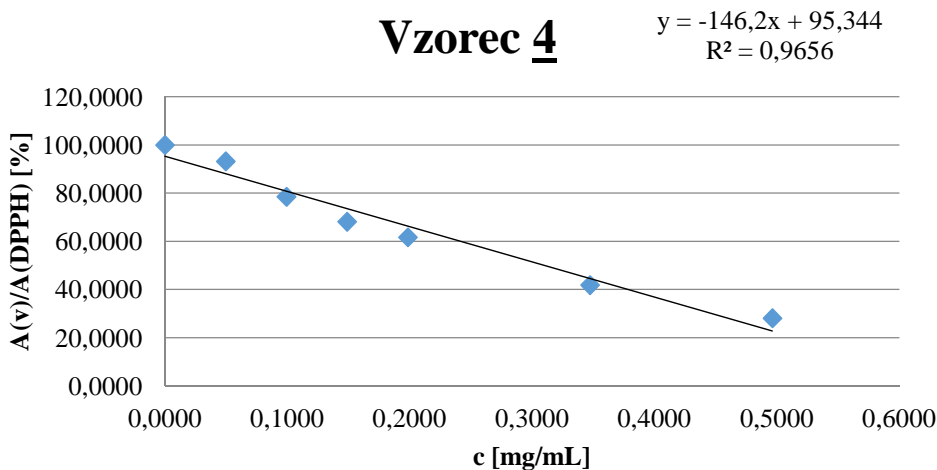
Slika 22: Graf % redukcije DPPH v odvisnosti od koncentracij vzorca 1 (mg/mL).



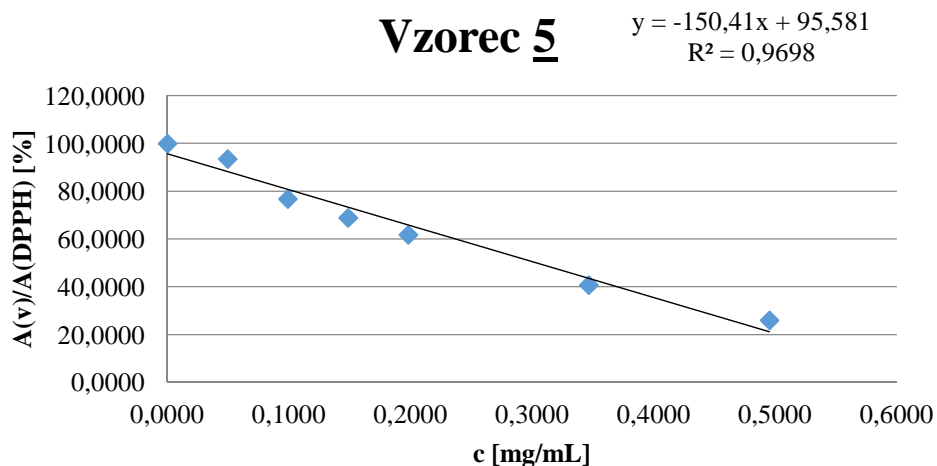
Slika 23: Graf % redukcije DPPH v odvisnosti od koncentracij vzorca 2 (mg/mL).



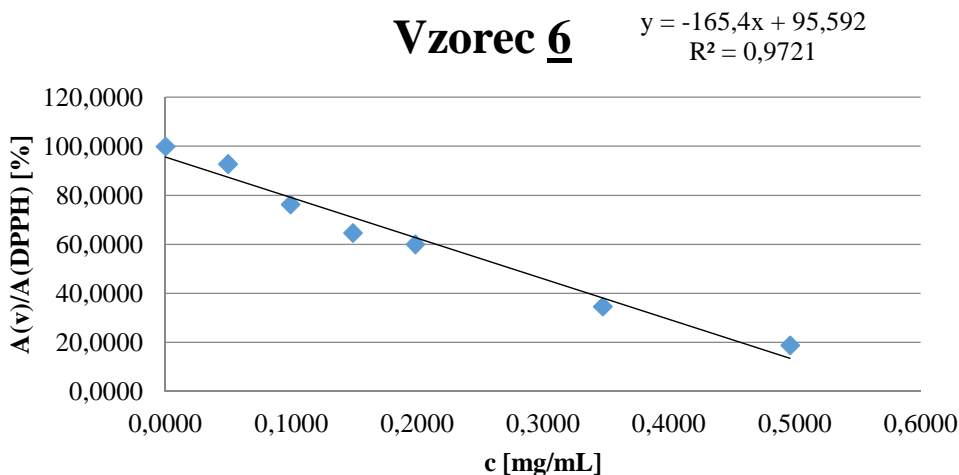
Slika 24: Graf % redukcije DPPH v odvisnosti od koncentracij vzorca 3 (mg/mL).



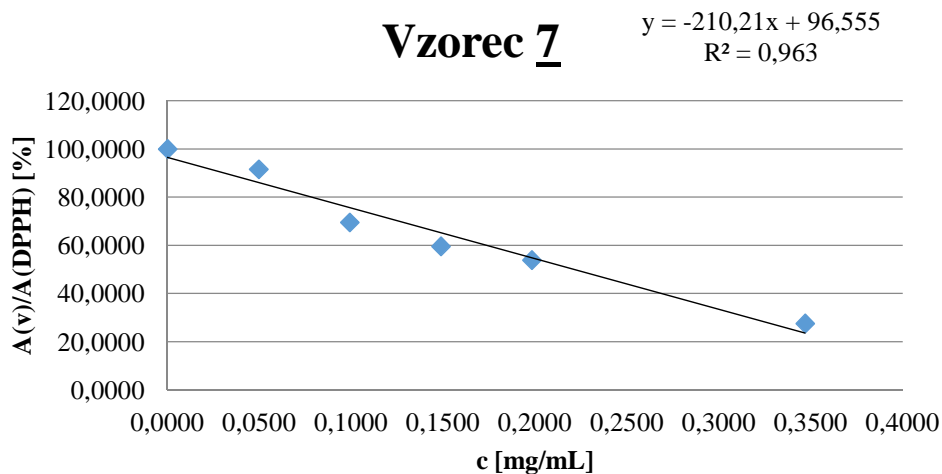
Slika 25: Graf % redukcije DPPH v odvisnosti od koncentracij vzorca 4 (mg/mL).



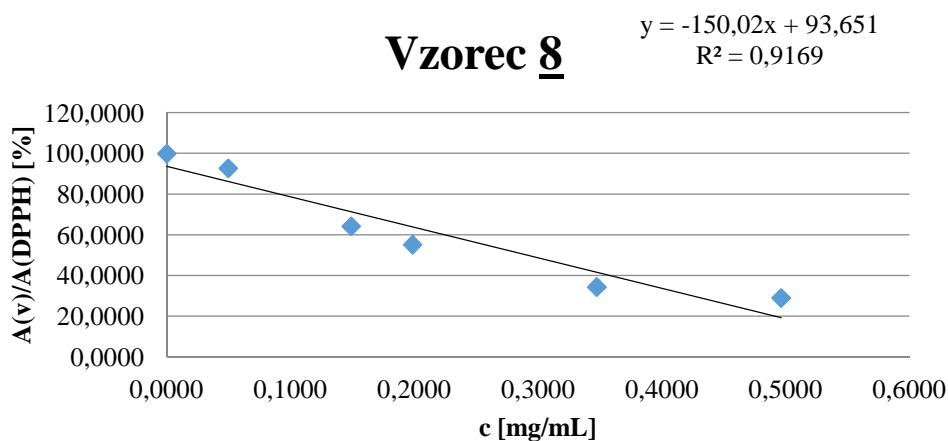
Slika 26: Graf % redukcije DPPH v odvisnosti od koncentracij vzorca 5 (mg/mL).



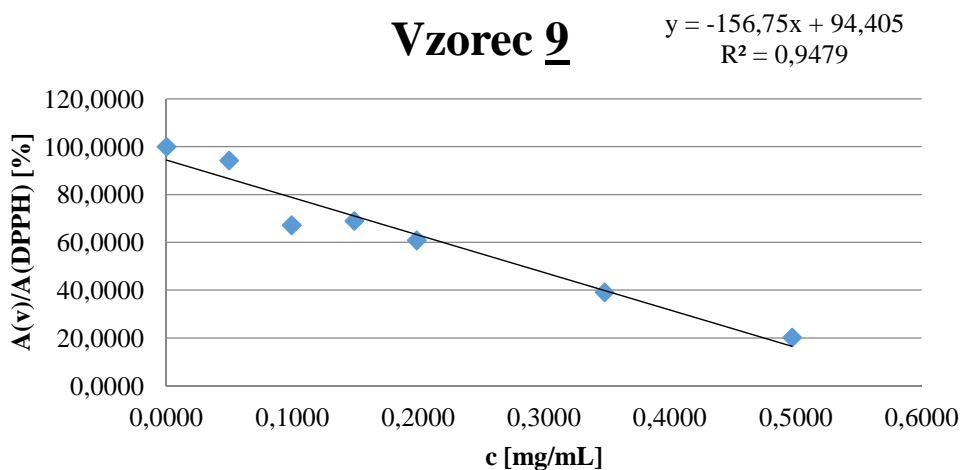
Slika 27: Graf % redukcije DPPH v odvisnosti od koncentracij vzorca 6 (mg/mL).



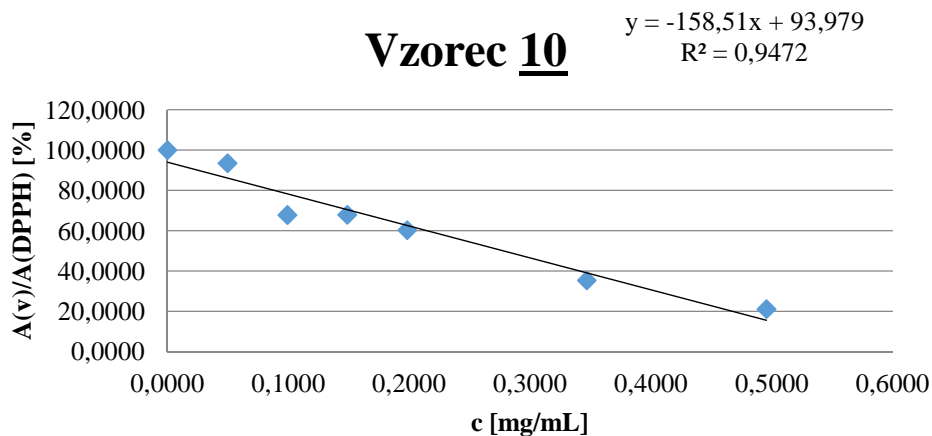
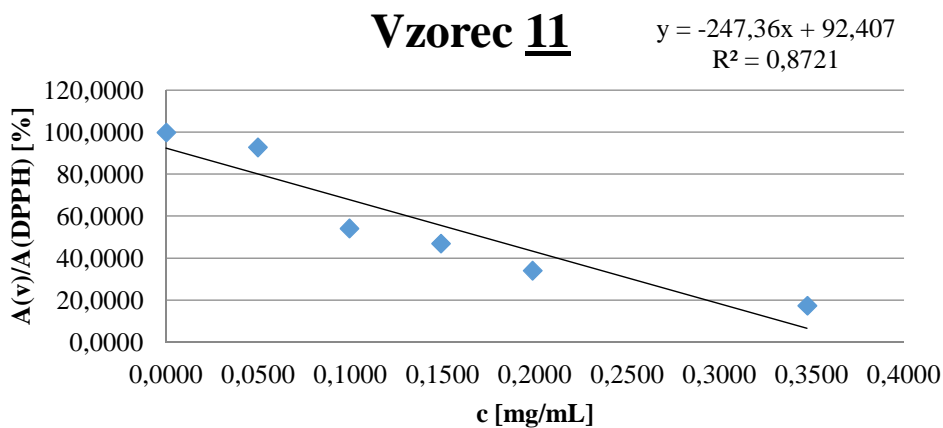
Slika 28: Graf % redukcije DPPH v odvisnosti od koncentracij vzorca 7 (mg/mL).



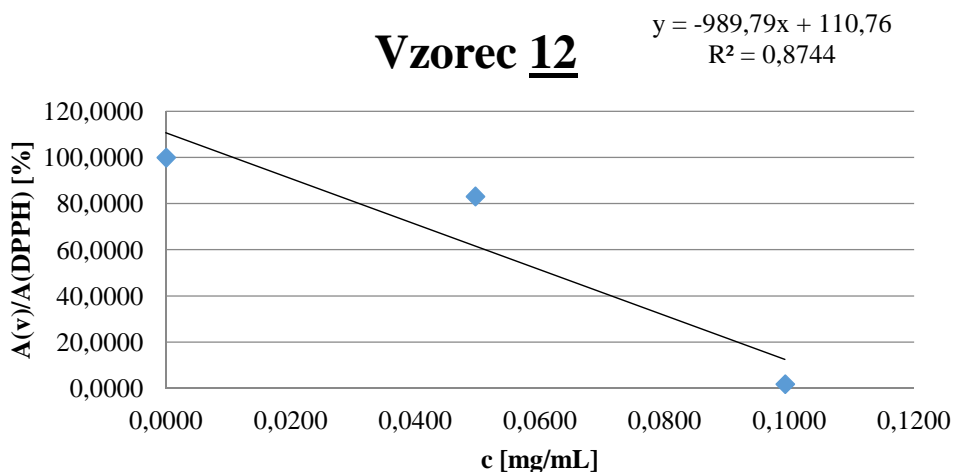
Slika 29: Graf % redukcije DPPH v odvisnosti od koncentracij vzorca 8 (mg/mL).

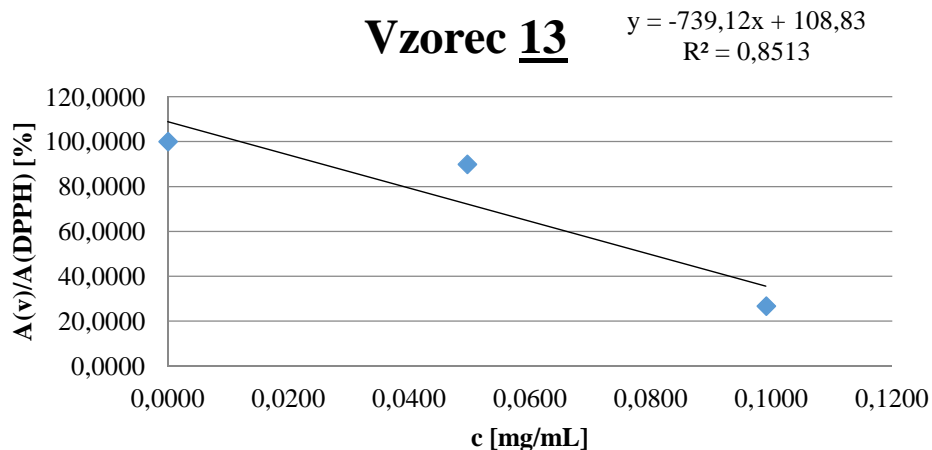


Slika 30: Graf % redukcije DPPH v odvisnosti od koncentracij vzorca 9 (mg/mL).

Slika 31: Graf % redukcije DPPH v odvisnosti od koncentracij vzorca 10 (mg/mL).Slika 32: Graf % redukcije DPPH v odvisnosti od koncentracij vzorca 11 (mg/mL).

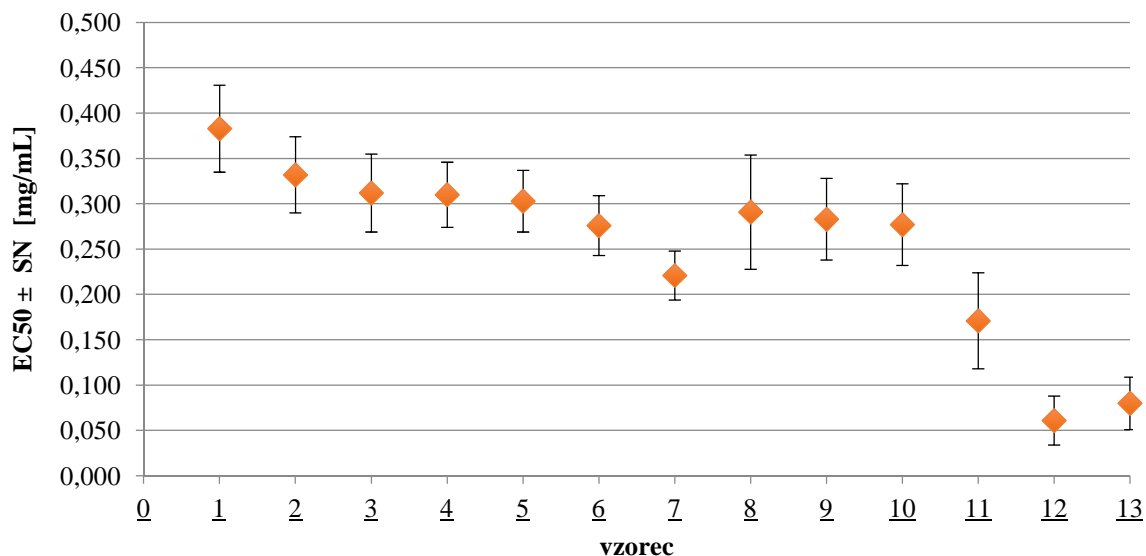
Vzorec 11 v primerjavi z ostalimi vzorci izkazuje največje odstopanje od linearnega modela.

Slika 33: Graf % redukcije DPPH v odvisnosti od koncentracij vzorca 12 (mg/mL).



Slika 34: Graf % redukcije DPPH v odvisnosti od koncentracij vzorca **13** (mg/mL).

Grafa **12** in **13** nam zelo malo povesta. Za bolj ustrezne rezultate bi bile potrebne dodatne razredčitve vzorcev. Zaradi majhnega števila podatkov je tudi odstopanje od linearnega modela večje. Posledično tudi EC_{50} teh dveh vzorcev, prikazan na spodnji sliki 33, ni najbolj ustrezno izračunan.

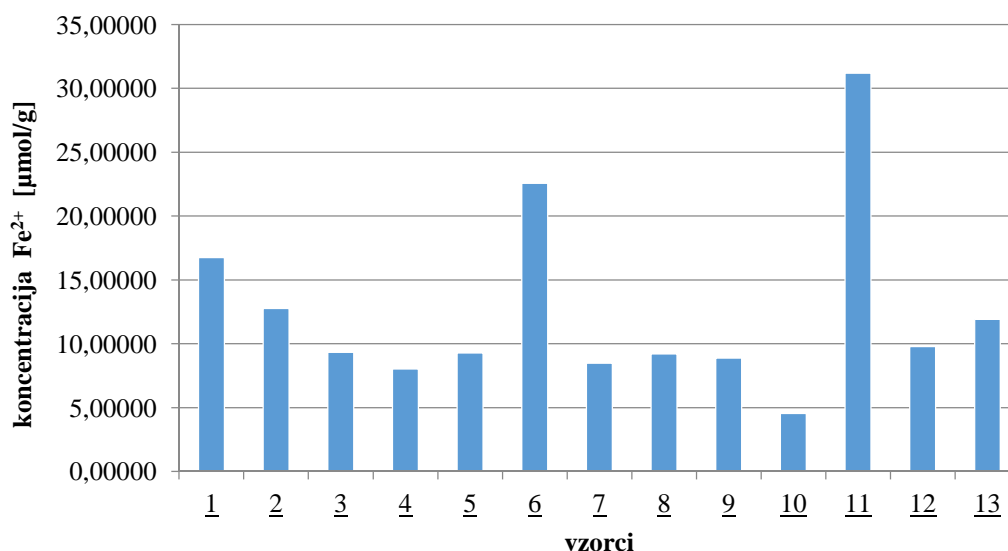


Slika 35: Prikaz vrednosti $EC_{50} \pm SD$ (mg/mL) v vzorcih.

Iz slike 35 je razvidno, da dosegajo najvišjo antioksidativno aktivnost oranžna vina (vzorci **11**, **12** in **13**). Vzorca **1** in **2** sta v primerjavi z ostalimi vzorci izkazala najslabšo redukcijo DPPH. EC_{50} vzorcev **3**, **4**, **5**, **6**, **8**, **9** in **10** se zelo malo razlikuje. Izstopa vzorec **7**, ki med vzorci belih vin izkazuje najvišjo antioksidativno aktivnost.

5.3. VSEBNOST PROSTIH Fe^{2+} V VINU

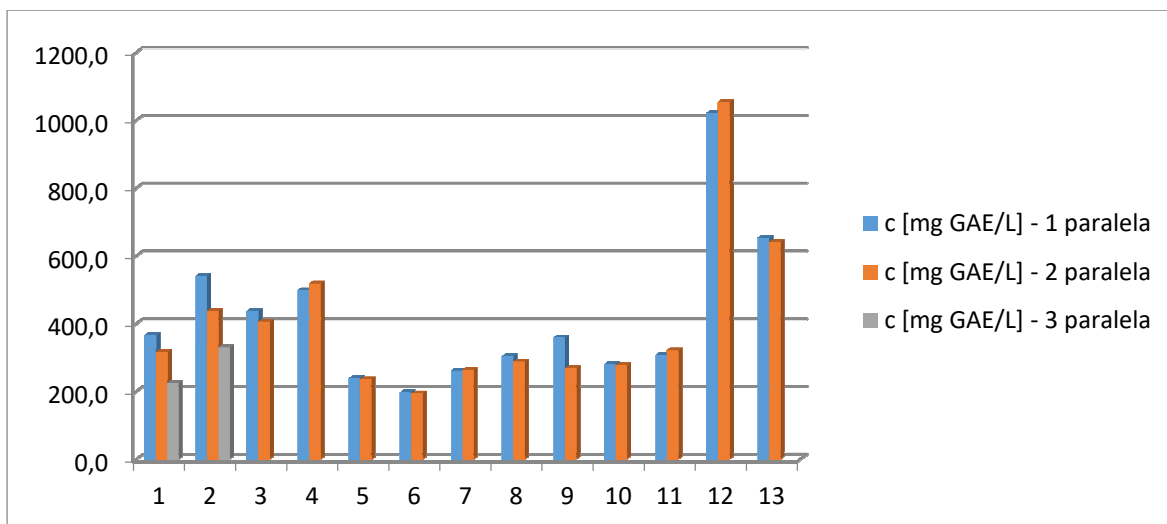
Spodnji graf (slika 36) prikazuje koncentracije prostih železovih ionov, ki so tvorili komplekse Ferozin- Fe^{2+} . Iz rezultatov vidimo, da je največ prostega železa v vzorcih **6** in **11**. Glede na povprečje koncentracij je tudi v vzorcih **1** in **2** nastalo večje število kompleksov. Najmanj prostih Fe^{2+} je imel vzorec **10** ($4,55 \mu\text{mol/g}$).



Slika 36: Prikaz koncentracije prostih Fe^{2+} v vinskih vzorcih.

5.4. FOLIN-CIOCALTEAU-JEVA METODA

Iz danih podatkov s slike 37 je razvidno, da se vsebnosti fenolov med vzorci precej razlikujejo. Med analiziranjem dveh paralel vzorcev **1** in **2** smo ugotovili večje odstopanje rezultatov med njima, kot smo želeli, zato smo pomerili še tretjo paralelo vzorcev. Kot je razvidno iz grafa, je pri teh dveh vzorcih za primerjavo najbolj smiselno upoštevati drugo paralelo, saj je vrednost najbližje povprečju.. Vzorci **1** ter **5** - **11** vsebujejo fenolne snovi v razponu od $195,50 - 316,90 \text{ mg/L}$, kar sovпада s podatki v literaturi (49). Med njimi je vzorec **6**, ki vsebuje najmanj fenolov. Vzorci **2**, **3** in **4** med belimi vini celo presegajo pričakovano zgornjo mejo 357 mg/L (49) in so v razponu $421,30 - 507,80 \text{ mg/L}$. Precej višji vsebnosti fenolov imata vzorca **12** in **13**, pri čemer jih vzorec **12** vsebuje največ ($1037,20 \text{ mg/L}$).



Slika 37: Vsebnost (poli)fenolnih spojin v vzorcih 1-13 predstavljeno kot mg galne kisline/L.

5.5. PEARSONOV KORELACIJSKI KOEFICIENT:

$$r_{XY} = -0,68$$

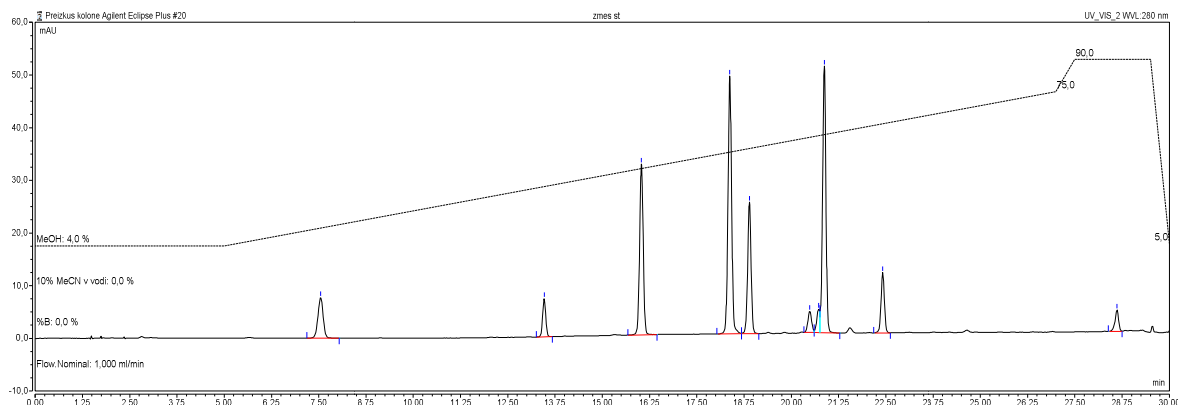
Vrednost korelacijskega koeficienta je potrdila našo sklepanje o linearni povezavi med vrednostmi EC_{50} in celokupno vsebnostjo fenolov v vzorcih. Stopnjo korelacije lahko interpretiramo kot visoko povezanost. Negativen predznak pomeni, da višji kot je EC_{50} , manjša je celokupna vsebnost fenolov v vinu.

5.6. ANALIZA VZORCEV S HPLC METODO

5.6.1. Kvalitativna analiza

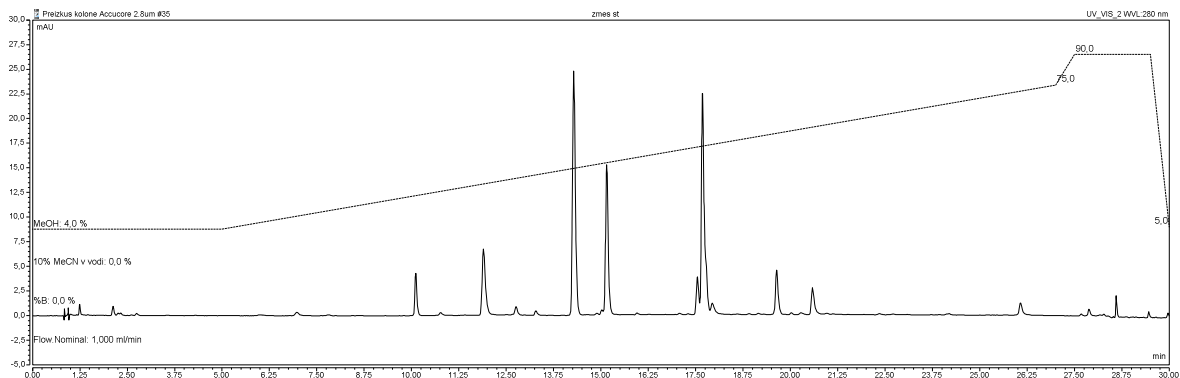
5.6.1.1. Optimizacija metode

Slike 38, 39, 40 prikazujejo kromatograme zmesi standardov antioksidantov ob uporabi različnih kolon.



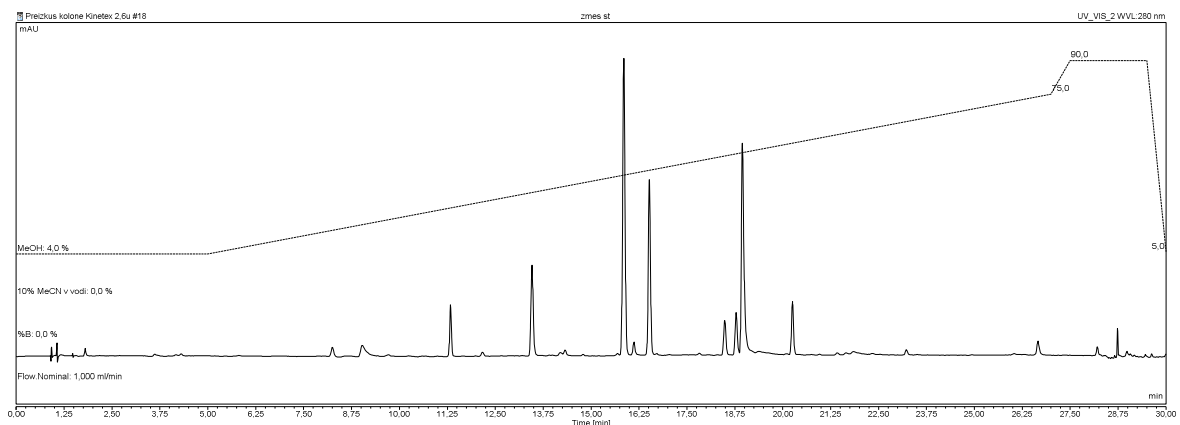
Slika 38: Prikaz kromatograma ob uporabi kolone Agilent-Eclipse.

Že s prvo kolono, Agilent-Eclipse, smo dobili dobre rezultate. Kromatogram je premalo raztegnjen, zato so nekateri vrhovi slabo ločeni.



Slika 39: Prikaz kromatograma ob uporabi kolone Accucore.

S kolono Accucore smo dobili dovolj raztegnjen kromatogram in boljše ločene vrhove kot pri Agilent-Eclipse, vendar ločba še vedno ni bila ustrezno visoka. Simetričnost nekaterih vrhov je bila slabša (tailing).



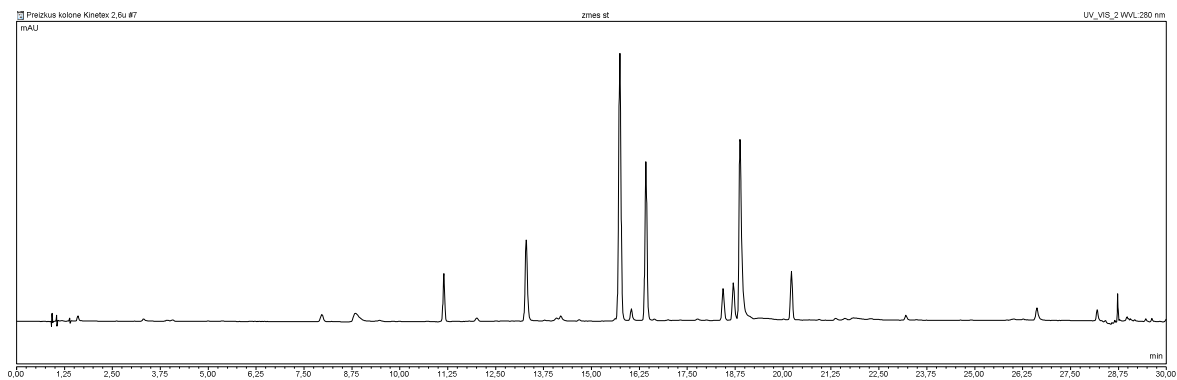
Slika 40: Prikaz kromatograma ob uporabi kolone Kinetex.

Kromatogram pridobljen s kolono Kinetex 2,6u je ustrezno raztegnjen, vrhovi so dobro ločeni in simetričnost je ustrezna.

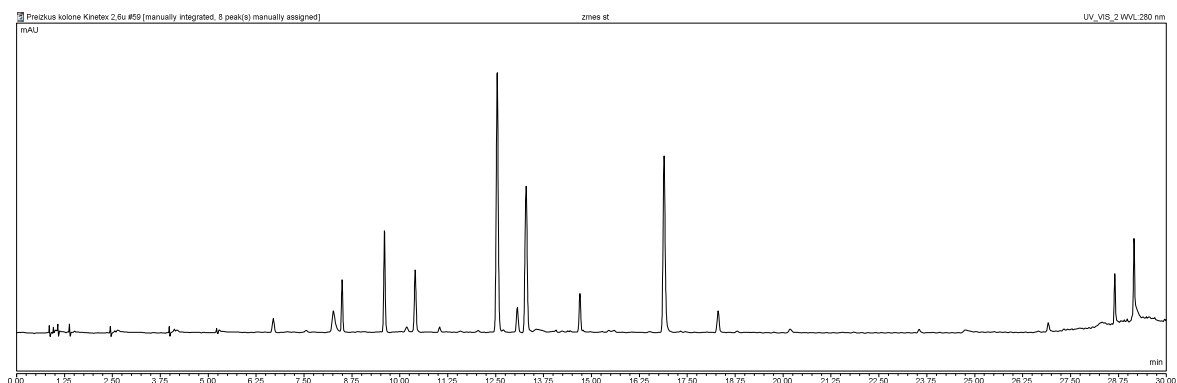
Primerjava topil primernih za mobilno fazo

Mobilna faza D:

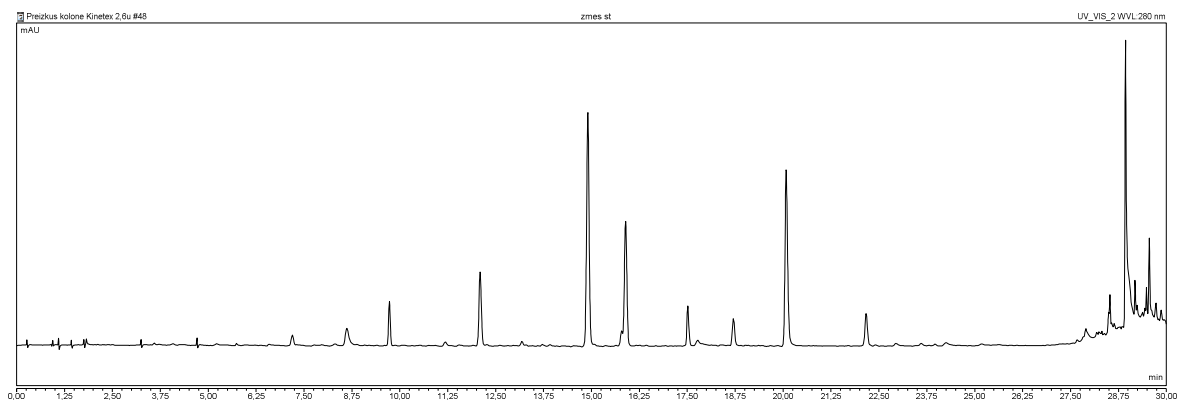
V procesu optimizacije metode smo izbirali tudi primerno topilo za fazo organskega modifikatorja. Na slikah 41, 42, 43 so predstavljeni kromatogrami zmesi standardov antioksidantov posneti s kolono Kinetex 2.6u in spremenjenim gradientom.



Slika 41: Prikaz kromatograma z uporabo MeOH.



Slika 42: Prikaz kromatograma z uporabo MeCN.

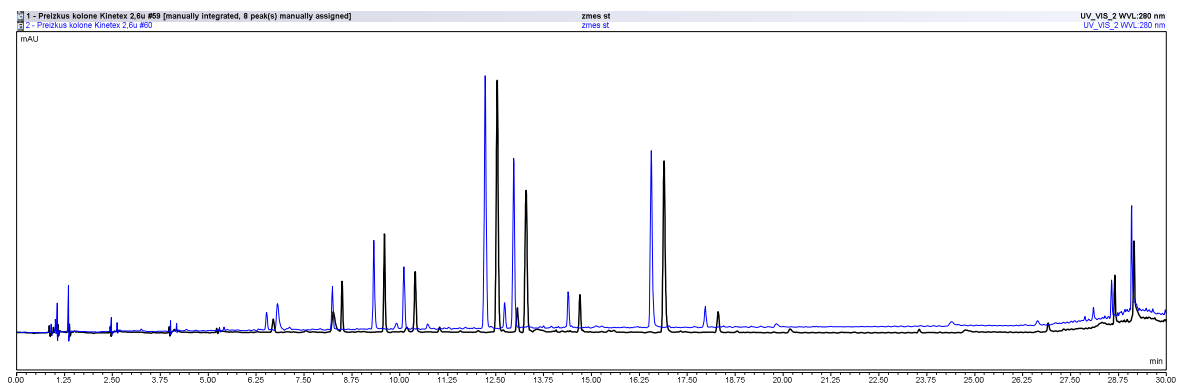


Slika 43: Prikaz kromatograma z uporabo mešanice MeCN:MeOH=50:50.

Iz slike 43 je razvidno, da so nekateri kromatografski vrhovi lepše ločeni, vendar smo bili mnenja, da bosta ostali dve mobilni fazi kljub temu dali boljše rezultate.

Mobilna faza A:

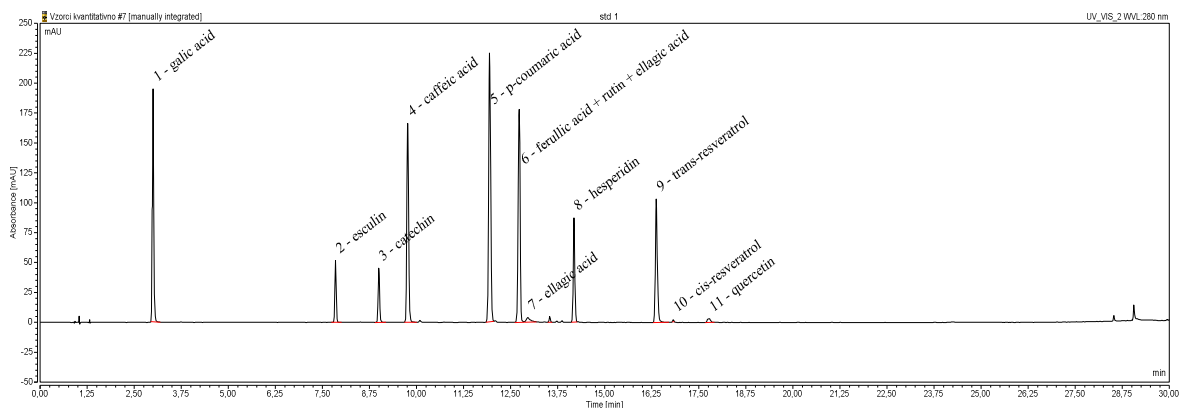
Med analizo smo preizkusili dve topili za MFA. Spodnja slika 44 prikazuje kromatograma zmesi standardov, ki smo ju dobili ob uporabi 0,5% fosforne kisline (črni kromatogram) in TFA (modri kromatogram). Rezultati so zelo podobni, zato bi bili obe topili ustrezni. Odločili smo se za fosforno kislino, saj smo jo uporabljali že od začetka optimizacije metode.



Slika 44: Primerjava kromatogramov 0,5% fosforne kisline in trifluoroacetne kisline kot MFA.

5.6.1.2. Identifikacija izbranih standardov antioksidantov

Slika 45 prikazuje identificirane kromatografske vrhove v zmesi standardov antioksidantov.

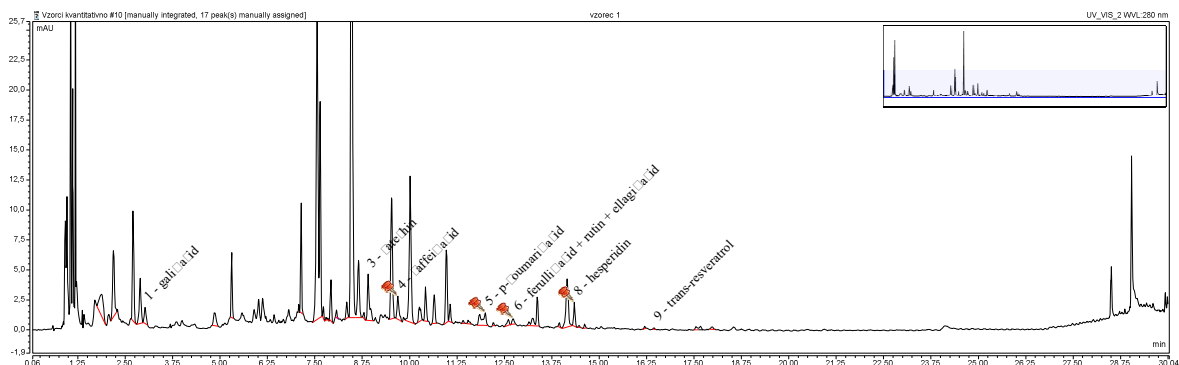


Slika 45: Kromatogram identificiranih vrhov v zmesi izbranih antioksidantov ($\lambda=280$ nm).

1 – galna kislina, 2 – eskulin, 3 – katehin, 4 – kavna kislina, 5 – p-kumarna kislina, 6 – ferulna kislina in rutin, 7 – elagna kislina, 8 – hesperidin, 9 – *trans*-resveratrol, 10 – *cis*-resveratrol, 11 – kvercetin.

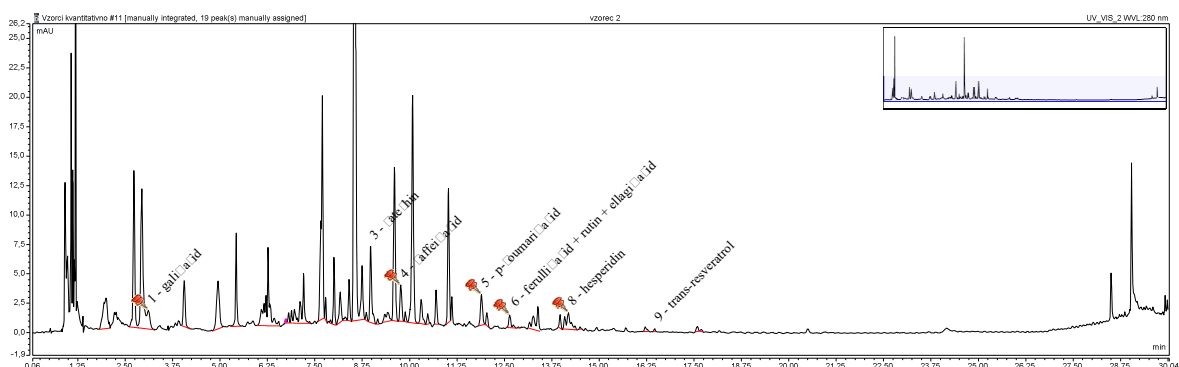
5.6.2. Kvantitativna analiza

Predstavljene so slike kromatogramov vzorcev **1** – **13** z ustrezno identificiranimi kromatografski vrhovi antioksidantov (slika 46 – 58). V preglednici XI so navedene koncentracije identificiranih antioksidantov pri 280 nm kot povprečje dveh meritev \pm SD.



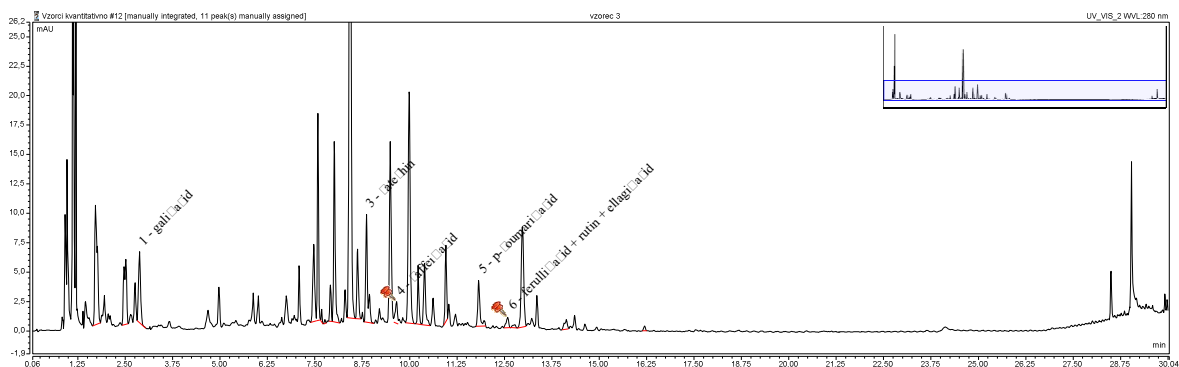
Slika 46: Kromatogram vzorca **1**.

Identificirani vrhovi si po vrsti sledijo: galna kislina, katehin, kavna kislina, p-kumarna kislina, ferulna kislina, rutin in elagna kislina, hesperidin in *trans*-resveratrol.



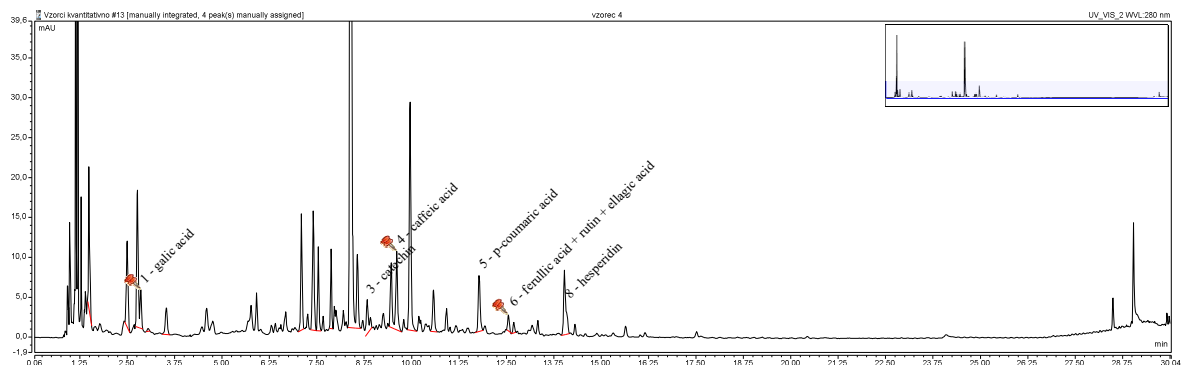
Slika 47: Kromatogram vzorca **2**.

Identificirani vrhovi si po vrsti sledijo: galna kislina, katehin, kavna kislina, p-kumarna kislina, ferulna kislina, rutin in elagna kislina, hesperidin in *trans*-resveratrol.



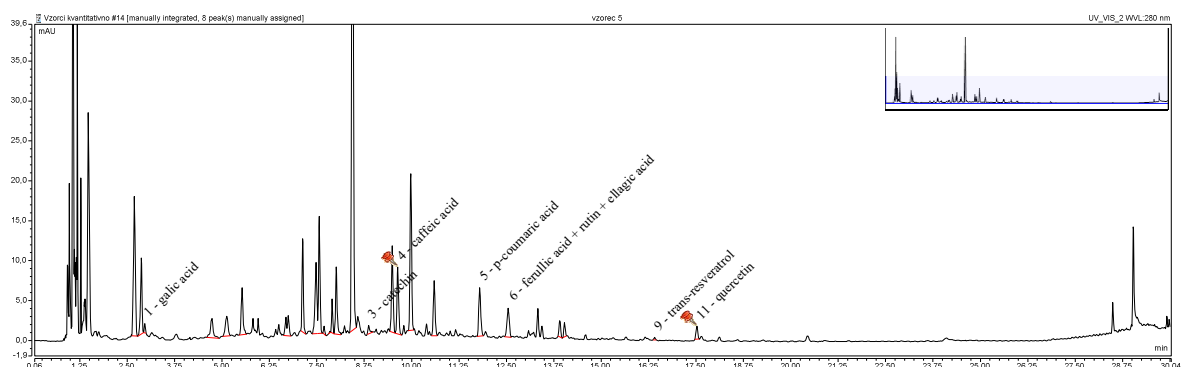
Slika 48: Kromatogram vzorca **3**.

Identificirani vrhovi si po vrsti sledijo: galna kislina, katehin, kavna kislina, p-kumarna kislina, ferulna kislina, rutin in elagna kislina.



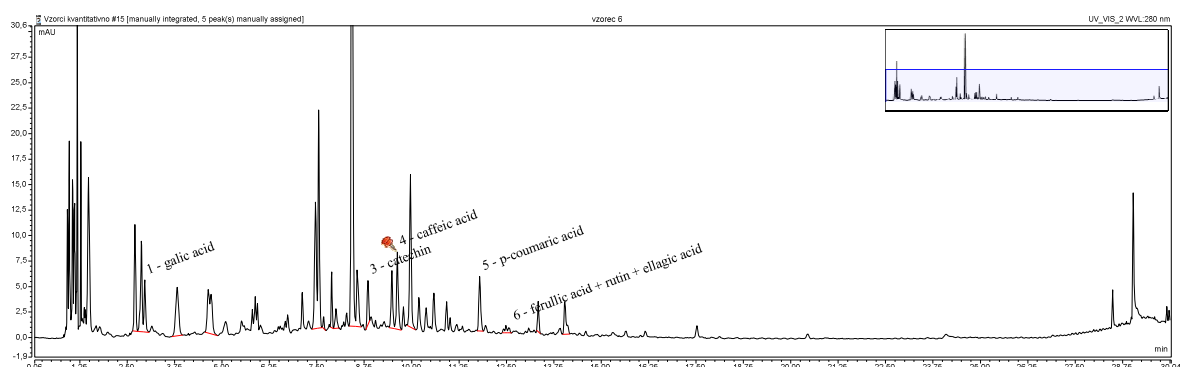
Slika 49: Kromatogram vzorca **4**.

Identificirani vrhovi si po vrsti sledijo: galna kislina, katehin, kavna kislina, p-kumarna kislina, ferulna kislina, rutin in elagna kislina in hesperidin.



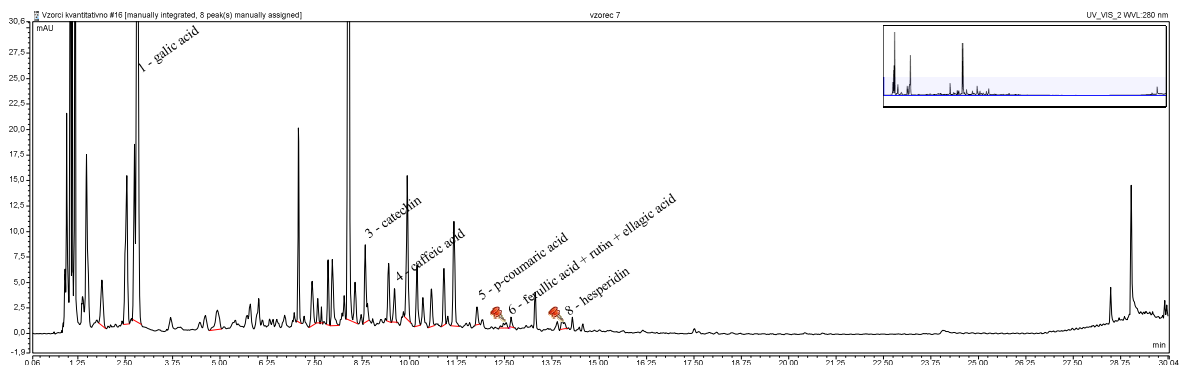
Slika 50: Kromatogram vzorca **5**.

Identificirani vrhovi si po vrsti sledijo: galna kislina, katehin, kavna kislina, p-kumarna kislina, ferulna kislina, rutin in elagna kislina, *trans*-resveratrol in kvercetin.



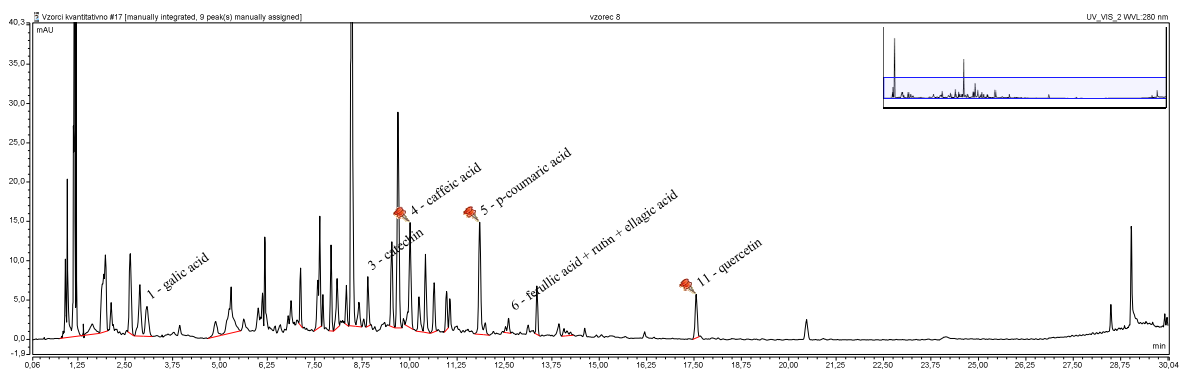
Slika 51: Kromatogram vzorca **6**.

Identificirani vrhovi si po vrsti sledijo: galna kislina, katehin, kavna kislina, p-kumarna kislina in ferulna kislina, rutin in elagna kislina.



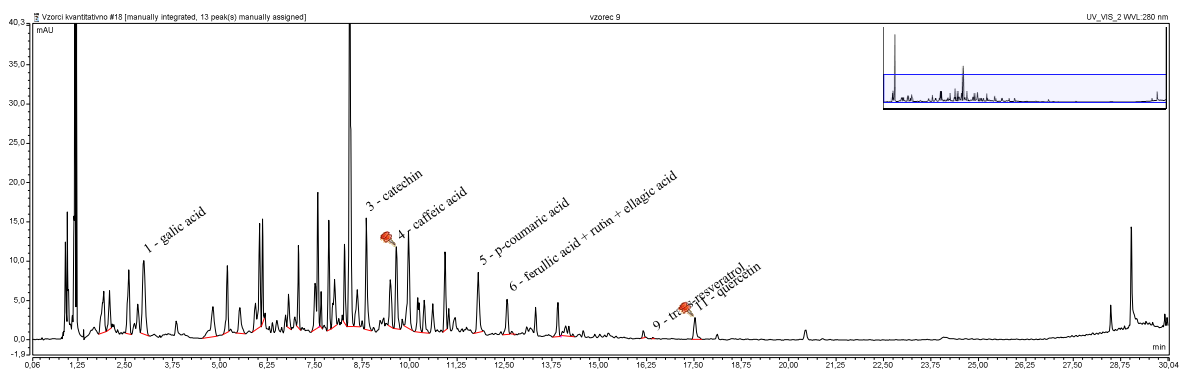
Slika 52: Kromatogram vzorca 7.

Identificirani vrhovi si po vrsti sledijo: galna kislina, katehin, kavna kislina, p-kumarna kislina, ferulna kislina, rutin in elagna kislina in hesperidin.



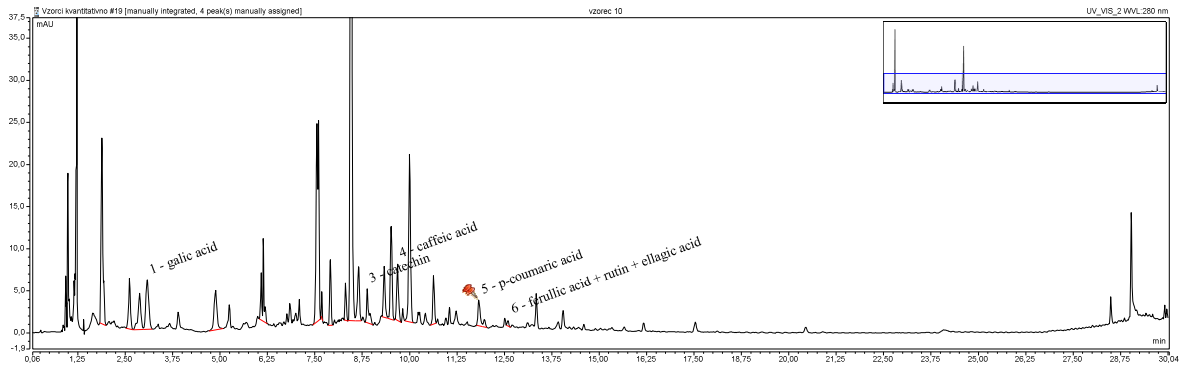
Slika 53: Kromatogram vzorca 8.

Identificirani vrhovi si po vrsti sledijo: galna kislina, katehin, kavna kislina, p-kumarna kislina in ferulna kislina, rutin in elagna kislina.

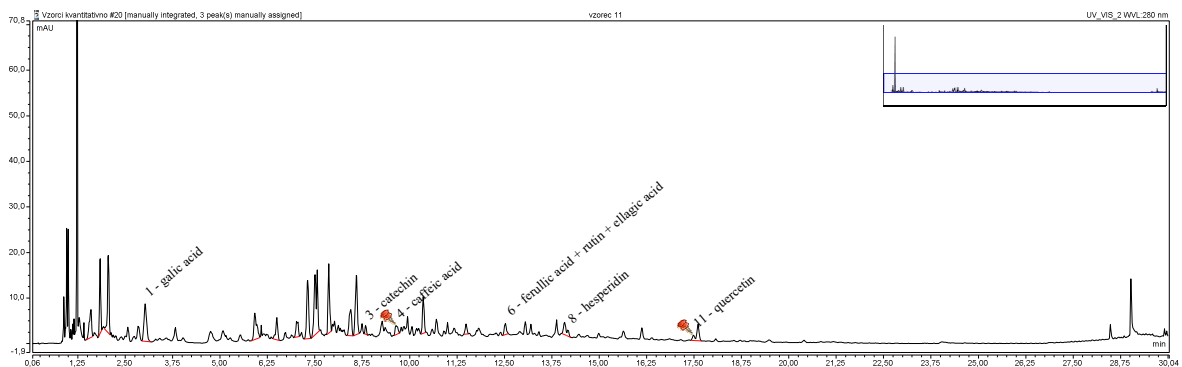


Slika 54: Kromatogram vzorca 9.

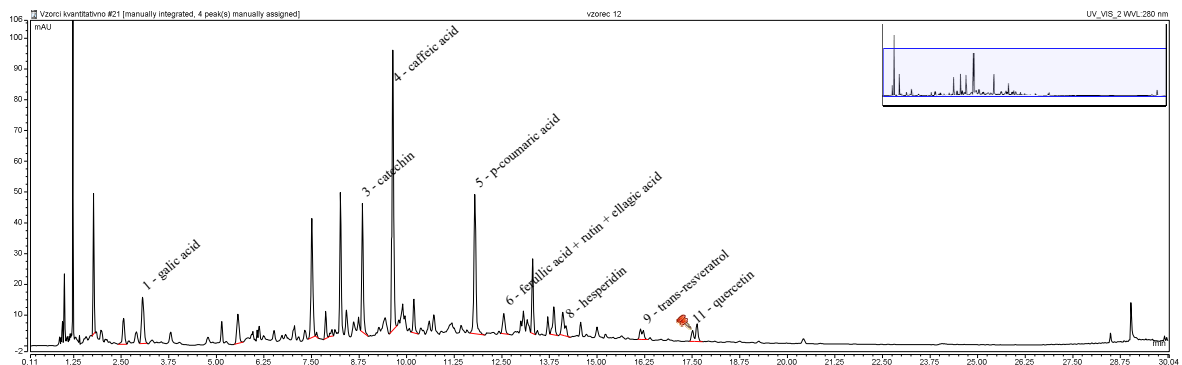
Identificirani vrhovi si po vrsti sledijo: galna kislina, katehin, kavna kislina, p-kumarna kislina, ferulna kislina, rutin in elagna kislina, *trans*-resveratrol in kvercetin.

Slika 55: Kromatogram vzorca 10.

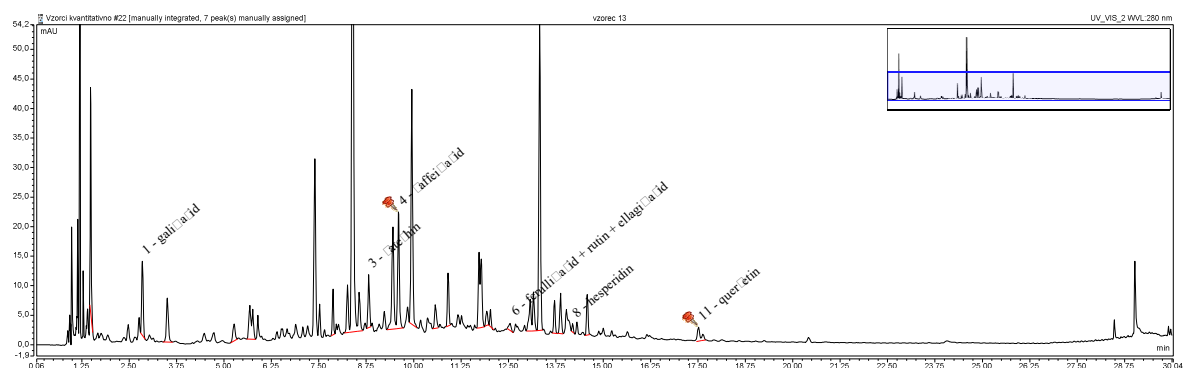
Identificirani vrhovi si po vrsti sledijo: galna kislina, katehin, kavna kislina, p-kumarna kislina in ferulna kislina, rutin in elagna kislina.

Slika 56: Kromatogram vzorca 11.

Identificirani vrhovi si po vrsti sledijo: galna kislina, katehin, kavna kislina, ferulna kislina, rutin in elagna kislina, hesperidin in kvercetin.

Slika 57: Kromatogram vzorca 12.

Identificirani vrhovi si po vrsti sledijo: galna kislina, katehin, kavna kislina, p-kumarna kislina, ferulna kislina, rutin in elagna kislina, hesperidin, *trans*-resveratrol in kvercetin.

Slika 58: Kromatogram vzorca 13.

Identificirani vrhovi si po vrsti sledijo: galna kislina, katehin, kavna kislina, ferulna kislina, rutin in elagna kislina, hesperidin in kvercetin.

Koncentracija identificiranih antioksidantov v vinih

V spodnji preglednici XI so predstavljene koncentracije identificiranih antioksidantov v posameznem vzorcu, ki smo jih določili pri valovni dolžini 280 nm. Izražene so v mg/L \pm SD.

Preglednica XI: Koncentracije (mg/L \pm SD) identificiranih antioksidantov v posameznih vzorcih.
GAL= galna kislina; KAT= katehin; KAV= kavna kislina; p-KU= p-kumarna kislina; FRE= ferulna kislina, elagna kislina in rutin; HES= hesperidin; tRES= *trans*-resveratrol; KVE= kvercetin.

	GAL	KAT	KAV	p-KU	FRE	HES	tRES	KVE
<u>1</u>	0,23 \pm 0,01	5,10 \pm 0,67	0,35 \pm 0,50	0,01 \pm 0,01	n.d.	0,69 \pm 0,08	4,23 \pm 0,01	/
<u>2</u>	0,52 \pm 0,16	8,15 \pm 0,03	0,93 \pm 0,16	0,36 \pm 0,06	0,06 \pm 0,01	1,32 \pm 0,09	4,26 \pm 0,01	/
<u>3</u>	1,98 \pm 0,12	13,25 \pm 0,00	0,32 \pm 0,28	0,63 \pm 0,13	0,05 \pm 0,07	/	/	/
<u>4</u>	0,71 \pm 0,47	8,22 \pm 1,11	2,89 \pm 0,04	1,31 \pm 0,04	0,27 \pm 0,05	1,51 \pm 0,23	/	/
<u>5</u>	0,02 \pm 0,02	1,62 \pm 0,46	2,23 \pm 0,00	1,08 \pm 0,02	0,95 \pm 0,00	/	4,31 \pm 0,03	15,62 \pm 1,80
<u>6</u>	1,02 \pm 0,20	5,02 \pm 0,09	2,13 \pm 0,07	0,95 \pm 0,12	n.d.	/	/	/
<u>7</u>	26,04 \pm 2,38	8,35 \pm 2,03	0,88 \pm 0,08	0,16 \pm 0,03	n.d.	0,14 \pm 0,02	/	/
<u>8</u>	2,08 \pm 0,15	5,98 \pm 0,98	6,38 \pm 2,96	2,84 \pm 0,20	0,36 \pm 0,17	/	/	61,17 \pm 0,39
<u>9</u>	4,84 \pm 0,21	14,99 \pm 3,25	3,26 \pm 0,11	1,49 \pm 0,12	1,07 \pm 0,05	/	4,23 \pm 0,00	31,93 \pm 5,50
<u>10</u>	2,88 \pm 0,08	6,53 \pm 0,51	1,94 \pm 0,10	0,45 \pm 0,10	n.d.	/	/	/
<u>11</u>	4,36 \pm 0,85	1,54 \pm 0,28	0,56 \pm 0,23	/	0,53 \pm 0,04	0,66 \pm 0,13	/	12,94 \pm 0,20
<u>12</u>	6,02 \pm 0,36	44,35 \pm 5,71	26,31 \pm 0,11	9,76 \pm 0,54	2,04 \pm 0,08	1,97 \pm 0,19	5,63 \pm 0,16	40,89 \pm 0,01
<u>13</u>	3,04 \pm 0,09	11,55 \pm 1,88	5,61 \pm 0,09	/	0,32 \pm 0,21	0,50 \pm 0,29	/	25,71 \pm 2,58

6. RAZPRAVA

V magistrski nalogi smo se ukvarjali z določanjem antioksidativne aktivnosti trinajstih vzorcev belih Slovenskih vin z uporabo metode redukcije DPPH[•] in kelacije prostih Fe²⁺ s ferozinom. Z uporabo Folin-Ciocalteau-jevega reagenta smo določili vsebnost skupnih fenolnih spojin v vzorcih. Izbrali smo dvanajst v vinu potencialno prisotnih antioksidantov in jih kvalitativno in kvantitativno določili z uporabo reverzno fazne HPLC metode.

Zbrali smo po dve steklenici izbranega vina. Izbira vzorcev vin je bila dokaj naključna. Glavni kriterij je bil vključitev vin iz vseh treh vinorodnih dežel Slovenije. Tako smo izbrali 6 vin (vzorci **1-6**) iz dežele Podravje, 1 vino iz dežele Posavje (vzorec **7**) in 6 vzorcev iz dežele Primorska, od katerih so bili vzorci **11-13** oranžna vina. Glavna razlika med klasičnimi belimi in maceriranimi vini je, da se pri pridelavi klasičnih belih vin po drobljenju grozdje takoj stisne in mošt loči od grozdnih kožic, še pred začetkom fermentacije, pri oranžnih vinih pa je pridelava ista kot pri rdečih vinih z dolgo maceracijo (stik mošta s kožico, ki lahko traja več tednov ali mesecev). Zaradi načina pridelave in ostalih že omenjenih parametrov, imajo rdeča vina deset krat višjo vsebnost (poli)fenolov kot bela. Z analizo treh vzorcev oranžnih vin smo želeli dokazati morebiten vpliv maceracije na vsebnost (poli)fenolov.

Vzorci smo najprej senzorično ocenili in potrdili ustreznost vseh vzorcev z izjemo vzorca **11**, pri katerem smo zaznali napako (vonj in okus po oksidaciji). Kljub temu smo se odločili analizirati vseh 13 vzorcev. Vzorce smo tudi karakterno opredelili. Izmerili smo jim pH in določili gostoto. Običajno je pH vina manjši od 3,6. Za bela vina je zaželjen pH v območju od 3,1-3,4. Vpliv višjega pH se značilno kaže v neselektivnem delovanju na mikroorganizme, v intenzivnosti in odtenku barve, okusu, oksidacijsko-redukcijskemu potencialu, razmerju med prostim in vezanim žveplovim dioksidom, v občutljivosti za pojav motnosti (zaradi železovih spojin), idr. Med naštetimi parametri je prav pH odločilen za pojav napak in bolezni vina (52). Klasična bela vina so vsa ustrezala kriteriju, macerirani vini **12** in **13** sta imeli nekoliko višji pH (3,95 in 3,63). Med klasičnimi vini je imel najnižji pH vzorec **4** (3,13), najvišjega pa **7** (3,54).

Suha vina imajo relativno gostoto malo pod 1 g/L; izjema so le suha in hkrati alkoholno zelo bogata vina, ki imajo relativno gostoto večjo od 1 g/L. Vina s preostankom sladkorja imajo praviloma relativno gostoto večjo od 1 g/L. Na gostoto vplivajo vse raztopljene snovi (sladkorji, kisline, glicerol, alkohol) (52). Vrednosti relativnih gostot vzorcev so

precej podobne in sovpadajo z navedenim kriterijem. Najmlajši vini **1** in **3** dosežata najvišjo gostoto, kljub temu so razlike zelo majhne. Naša analiza ni potrdila trditve, da imajo suha in alkoholno bogata vina gostoto višjo od 1 g/L, saj so vse vrednosti vzorcev **4**, **6**, **7**, **10**, **12** in **13** nižje; vzorec **7** ima najvišjo vsebnost alkohola 13,5 vol% njegova relativna gostota 0,9912 g/L pa je med najnižjimi.

Pri določanju antioksidativne aktivnosti z analiziranjem sposobnosti redukcije prostega DPPH[•] smo kot topilo uporabili etanol. Metoda je učinkovita z uporabo tako metanola kot etanola, vendar smo se odločili za etanol, ker je manj toksično topilo. Znano je, da ob mešanju vina in alkoholne raztopine DPPH lahko v nekaterih primerih pride do obarjanja, zaradi povišanja alkoholnega deleža. Vendar pri naši analizi nismo zaznali teh težav, kot jih niso zaznali tudi raziskovalci članka, po katerem smo se orientirali (45). DPPH[•] je radikal, katerega raztopina je temno vijolične barve in absorbira v območju 515-520 nm (31). Ob redukciji nastane stabilnejša rumeno obarvana oblika. Višji kot je antioksidativna kapaciteta komponent v vinu, večje je razbarvanje vijolične barve. Težava, s katero se srečujejo raziskave, je slaba linearnost med koncentracijo in % inhibicije, saj je linearnost pri belih vinih dosežena le do 40% redukcije DPPH in je podajanje rezultatov z EC₅₀ lahko problematično. (31, 38, 45). Linearnost je od vzorca do vzorca različna. Naša analiza je pokazala zelo podobne rezultate med vzorci. Za natančnejši dokaz linearosti bi bilo smiselno izpustiti zadnjo točko (nerazredčen vzorec). Reagent je namreč v celoti zreagiriral, zaradi česar ne vemo, koliko reagenta bi bili antioksidanti v vzorcu sposobni zreagirati. Prav tako bi potrebovali daljši čas inkubacije, v primeru klasičnih belih vin, in več redčitev vzorcev, predvsem v primeru vzorcev **11**, **12** in **13**, ki imajo pričakovano višjo vsebnost antioksidantov. V tem primeru smo imeli za izračun EC₅₀ zelo malo uporabnih podatkov in je izračun precej negotov. Potrebno bi bilo pripraviti vzorce s koncentracijami med našima relevantnima koncentracijskima točkama (slika 21). Kljub temu so ti vzorci dosegli najvišjo antioksidativno aktivnost. Pri vzorcu **11** smo dobili nižje vrednosti kot smo pričakovali, kar sovпада z organoleptično napako (vonj in okus po oksidaciji), ki smo jo zaznali na začetku. Vzorec **12** je dosegel EC₅₀ 0,061±0,027 mg/mL, vzorec **13** pa 0,080±0,029 mg/mL. Od klasičnih belih vin je najnižji EC₅₀ dosegel vzorec **7** (0,221±0,027 mg/mL). Najslabšo redukcijo DPPH[•] sta izkazali štajerski vini **1** in **2**, ki sta dosegli vrednosti EC₅₀ 0,383±0,048 mg/mL in 0,332±0,042 mg/mL. Druga vina so imela podobne vrednosti, ki so se gibale v območju 270-310 mg/mL. Vpliv na antioksidativno

kapaciteto lahko pripišemo vsebnosti ali številu in mestu vezanih -OH skupin (poli)fenolov.

Z analizo vsebnosti prostih Fe^{2+} ionov z uporabo ferozina smo določali vsebnost prostih železovih(II) ionov v vinih. Za kvantifikacijo smo uporabili raztopino ferozina, ki je vijolično obarvana. Tako kot v primeru DPPH metode, z nastajanjem kompleksom ferozin- Fe^{2+} raztopina postaja vedno bolj obarvana. V tej magistrski nalogi smo najprej pripravili umeritveno krivuljo FeCl_2 . S pomočjo enačbe premice smo izračunali koncentracije prostih ionov v vzorcih. Ugotovili smo, da je metoda ustrezna, vendar rezultati niso relevantni za analizo antioksidativne kapacitete. Vino je živilo, kjer celice grozdja niso več ohranjene, zato tudi ni smiselno, da bi bilo vso železo vezano in ne prosto. Tako nismo mogli potrditi sklepa: višjo kot ima vino vsebnost (poli)fenolov ali več kot imajo molekule -OH skupin, manj bo prostih Fe^{2+} ionov in višja bo antioksidativna kapaciteta. Koncentracija Fe^{2+} ionov in antioksidativna kapaciteta sta namreč povsem neodvisni spremenljivki.

Skupno vsebnost fenolnih spojin smo določili z uporabo FC reagenta in rezultate izrazili kot ekvivalente galne kisline (mg GAE/L) s pomočjo umeritvene krivulje galne kisline. Vsebnosti fenolov so, kot je bilo že večkrat omenjeno, odvisne od mnogih parametrov in so iz leta v leto drugačne. Po podatkih diplomantke Biotehniške fakultete v Ljubljani je razpon (poli)fenolov belih vin od 168-357 mg GAE/L, pri oranžnih vinih pa je vsebnost neuradno lahko višja od 450 mg GAE/L (50). V naši analizi sta najvišjo vsebnost (poli)fenolov dosegla, po pričakovanju, vzorca **12** in **13**, pri čemer je vzorec belega cuvéea vinarstva Mlečnik dosegel 1037,20 mg GAE/L, vzorec vinarstva Batič pa 646,50 mg GAE/L. Od vzorcev klasičnih belih vin je najvišjo vsebnost dosegel šipon (vzorec **4**) iz Ljutomera s 507,80 mg GAE/L. Sledijo mu vzorci štajerskih vin **1**, **2** in **3**. Najnižjo vsebnost (poli)fenolov je vseboval vzorec kleti Zlati grič s 195,50 mg GAE/L. Ostali vzorci so v koncentracijskem območju, ki ga je določila študentka Biotehniške fakultete (50). Zanimivo je, da so vrednosti vsebnosti padale z pomerjanjem novih paralel v primeru vzorcev **1** in **9**. Mogoče sta imeli večji delež žvepla (SO_2), ki je ob odprtju steklenice začelo izhajati ali pa se je zaradi kisika porabilo.

Korelacijo med vsebnostjo in antioksidativno aktivnostjo smo dokazali z izračunom Pearsonovega korelacijskega koeficienta. Za spremenljivki smo izbrali vrednosti EC_{50} , ki smo jih dobili z DPPH metod, in celokupnimi vrednostmi fenolov v vzorcih, pridobljenih z

FC metodo. Iz dobljene vrednosti $-0,68$ smo lahko sklepali, da med parametroma obstaja linearna povezava, ki z negativnim predznakom pomeni obratno sorazmernost spremenljivk. Rezultat potrjuje, da z večanjem celokupne vsebnosti (poli)fenolov, pada koncentracija reagenta DPPH. Kar pomeni, da višja kot je vsebnost antioksidantov v vzorcu, večja bo antioksidativna kapaciteta spojine. Številčna vrednost Pearsonovega korelacijskega koeficienta izbrani spremenljivki po stopnji (moči, jakosti) opredeli kot visoko povezani. S tem izračunom smo potrdili začetno hipotezo, da obstaja povezava med vsebnostjo in antioksidativno aktivnostjo antioksidantov v izbranih vzorcih vin.

Za kvalitativno in kvantitativno analizo izbranih antioksidantov smo odprli nove steklenice vzorcev. Po pregledu fizikalno-kemijskih značilnosti izbranih standardov smo se odločili kot topilo uporabiti metanol. Takoj smo imeli težave z raztapljanjem elagne kisline, hesperidina in kvercetina, zato smo jih raztopili v metanolu ter si pri bistrenju raztopine teh standardov pomagali z ultrazvočno kadičko Sonis 4. Kot analizno metodo smo izbrali reverzno fazno HPLC, saj se tradicionalno uporablja pri analizi (poli)fenolov v vinih. Prav tako je prednost te metode, pri uporabi diode array detektorja, možnost merjenja absorbance pri petih valovnih dolžinah hkrati, kar pripomore k lažji identifikaciji in določanju ujemanja podatkov standarda in analita (54). V tej nalogi smo se odločili pomeriti analite pri 210 nm, 280 nm, 320 nm in 360 nm. Pri optimizaciji kromatografske metode smo za določanje ustrezne resolucije in selektivnosti preizkusili tri kolone Agilent-Eclipse, Accucore in Kinetex. Kot organski modifikator smo preizkusili topili 10% MeCN in 10% MeOH, ter za pufer 0,5% fosforno kislino in TFA.

Med optimizacijo smo analizirali raztopine slepega vzorca, posameznih standardov in zmes standardov. S primerjavo t_r v zmesi in posamičnih vzorcih smo identificirali posamezne analite in določili njihovo okvirno lokacijo na kromatogramu. Preizkus prve kolone Agilent-Eclipse se je izkazal kot zelo dober, vendar je bil kromatogram premalo raztegnjen in vrhovi kromatogramov preslabo ločeni (slika 38). Kot drugo smo uporabili krajšo kolono Accucore in ohranili isti gradient. Pričakovali smo hitrejšo eluiranje analitov (nižji t_r) in možnost slabše ločbe vrhov. Rezultati so potrdili slabšo učinkovitost izbrane kolone. Kromatogram je bil ustrezno raztegnjen, vendar ločba še vedno ni bila dovolj dobra, saj vrhovi niso bili dovolj ostri in povečal se je faktor asimetrije (tailing) (slika 39). V tretje smo poskusili s kolono Kinetex, ki se je izkazala za najbolj ustrezno.

Kromatogram je bil dovolj raztegnjen, vrhovi analitov dobro ločeni in simetrija ustrežna (slika 40).

Tekom preizkušanja kolon smo določali tudi ustreznost uporabe 10% MeCN in 10% MeOH kot mobilne faze D in njun vpliv na retencijske čase in ločbo vrhov izbranih analitov. Topilo mobilne faze se veže z molekulami vzorca s kombinacijo dipolnih interakcij in vodikovih vezi. Tako lahko pričakujemo odvisnost selektivnosti topila od dipolnega momenta ter kislosti in bazičnosti molekul topila. Zamenjava topil običajno povzroči velike spremembe v resoluciji in selektivnosti. Velikokrat se dobro ločeni vrhovi začnejo prekrivati ali obratno. V tem primeru je možna uporaba kombinacije dveh topil, kar smo preizkusili tudi mi z mešanico topil MeOH:MeCN = 50 : 50. S primerjavo kromatogramov vseh treh potencialnih topil (slike 40, 41 in 42), ki smo jih posneli s kolono Kinetex, smo opazili, da smo najbolj ustrezne kromatograme dobili z uporabo 10% MeCN. Vrhovi so v primerjavi z ostalima dvema topiloma najbolj ustrezno ločeni. Hkrati so se analiti v primeru 10% MeCN hitreje eluirali, zaradi česar smo lahko ohranili dolžino sekvence 30 min. V primeru mešanice topil so bili nekateri vrhovi boljše ločeni kot v primeru 10% MeCN, vendar smo bili mnenja, da bodo generalno rezultati boljši z uporabo 10% MeCN.

Med procesom optimizacije metode smo kot mobilno fazo A uporabljali 0,5% fosforno kislino, saj smo bili zadovoljni z rezultati. Za primerjavo smo preizkusili tudi TFA. Opazna ni bila nobena večja razlika (slika 44), zato smo se odločili obdržati fosforno kislino.

Za gradientno ločbo smo se odločili, ker imamo vzorce z veliko neznanimi komponentami. Gradientna elucija se ravno v teh primerih najbolj pogosto uporablja, saj z njo izboljšamo ločbo komponent in skrajšamo čas analize ter izboljšamo resolucijo in ločbo (39, 40, 41). Kot je vidno iz preglednic V-VIII, smo gradient kar nekaj krat spremenili, da smo dosegli želene rezultate. Prav tako smo zmanjšali volumen injiciranja iz 10 na 5 μ L/min. Posledično so se vrhovi rahlo znižali, smo pa s tem zmanjšali razmerje med signalom in šumom.

Glavna težava, ki se je pojavljala med analiziranjem, je bilo veliko nihanje tlaka. Težavo smo poskušali odpraviti s pogostimi spiranji kolone in mehaničnimi popravili, vendar nam težave kljub temu ni uspelo povsem odpraviti.

Med analizo smo ugotovili, da se kurkumin ne eluira z MeOH, zaradi česar smo ga izločili iz nadaljnje analize.

Iz pridobljenih rezultatov smo se odločili za uporabo kolone Kinetex, 10% MeCN kot mobilne faze D in 0,5% fosforne kisline kot mobilne faze A. Sekvenca je potekala po pogojih predstavljenih v preglednici VIII.

Za identifikacijo analitov smo uporabili kromatograme posnete pri 280 nm, saj je bil šum bazne linije teh meritev najnižji. Med analizo vin smo naleteli na neustrezno ločbo ferulne kisline, rutina in elagne kisline. Ker se je težava pojavljala pri vseh vzorcih, smo jih v nadaljnji analizi obravnavali kot zmes, ki je predstavljena z enim vrhom. Kot je razvidno iz slike 45, so se analiti eluirali po sledečem zaporedju: galna kislina, eskulin, katehin, kavna kislina, p-kumarna kislina, zmes ferulne kisline, rutina in elagne kisline, hesperidin, *trans*-resveratrol, *cis*-resveratrol in kvercetin. Med analizo posameznih standardov smo v primeru resveratrola imeli priložnost identificirati tako *trans* kot *cis* obliko. Vendar samo pri analizi svežih vzorcev. Ko smo analizirali isti analit po preteklih 24 h od priprave, smo določili samo *trans*-resveratrol, saj je *cis*- izomer najverjetneje izomeriziral v *trans*- obliko ali reagiral z zračno atmosfero do drugih produktov.

Za kvantitativno analizo smo natehtali po 10,0 mg posameznega standarda. Pripravili smo slepi vzorec, šest razredčitev zmesi standardov in dva kontrolna standarda ter posamične vialo napolnili z vzorci. Najprej smo pomerili slep vzorec, nato raztopine standardov začeni z najnižjo koncentracijo (st. 6, st. 5, st. 4, st. 3, st. 2 in st. 1), kontrolna standarda 1 in 2, vzorce **1** – **13** ter zaključili s slepim vzorcem. Sekvenco smo nato ponovili še enkrat. V programu Chromeleon 7.1 smo s primerjavo UV spektrov in retencijskega časa standardov v vzorcih vin poiskali ustrezne vrhove antioksidantov in z analizo površine pod krivuljo določili njihovo vsebnost.

Tako kot smo predpostavljali na začetku naloge, so se vina med seboj razlikovala po številu in vrsti izbranih antioksidantov ter njihovi vsebnosti. V vzorcih nismo identificirali eskulina, ki je bil zelo verjetno prisoten, vendar najverjetneje v zmesi z drugo spojino ali v obliki derivata. Obstaja pa tudi možnost, da dejansko ni prisoten v vzorcih, če nobeno vino ni zorelo v hrastovih sodih (29).

Iz preglednice XI in slik kromatogramov posameznih vzorcev lahko sklepamo sledeče:

- Vzorec **12** je bil edini, pri katerem smo določili 10 izbranih antioksidantov in je prav tako imel najvišjo vsebnost teh antioksidantov.
- Vzorec **1** je vseboval vse antioksidante, z izjemo kvercetina in eskulina, vendar so bile njihove vsebnosti med najnižjimi.

- V vseh vzorcih so bili prisotni galna kislina, katehin in kavna kislina, katerih vrhovi so bili zelo lepo ločeni in smo jih lahko brez težav identificirali..
- Z izjemo vzorcev **11** in **13**, je bila tudi p-kumarna kislina prisotna v vseh vzorcih.
- Kvercetin je bil prisoten v le nekaj vzorcih, pri čemer so bile njegove vrednosti, v primerjavi z ostalimi antioksidanti, zelo visoke.
- Vsebnost zmesi ferulne kisline, rutina in elagne kisline so bile pri vzorcih **1**, **6**, **7** in **10** nižje od meje detekcije.
- Med klasičnimi belimi vini sta najvišjo celokupno vsebnost izbranih antioksidantov dosegla vzorca **8** in **9** ($78,80 \pm 2,49$ mg/L in $61,81 \pm 8,60$ mg/L).
- Resveratrol je poznan po svoji nizki vsebnosti v vinih, še posebej v belih vinih (22). Njegovo prisotnost smo dokazali samo v vzorcih **1**, **2**, **5**, **9** in **12**.
- Hesperidin smo identificirali s kar nekaj napora, saj je njegova koncentracija v vzorcih zelo nizka.

Ob primerjavi celokupnih vsebnosti (mg/L) izbranih antioksidantov z (poli)fenoli (FC metoda) v vzorcih dobimo sledeče rezultate:

Preglednica XII: Delež celokupne vsebnosti izbranih antioksidantov v vzorcih.

vzorec	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
celokupna vsebnost (poli)fenolov	302,4	435,7	421,3	507,8	237,3	195,5	262,0	295,5	313,5	278,1	313,4	1037,2	646,5
celokupna vsebnost izbr. antioksidantov	10,6	15,6	16,2	14,9	25,8	9,12	34,1	78,8	61,8	11,8	20,6	136,9	46,7
%	3,5	3,6	3,8	2,9	10,9	4,7	13,0	26,7	19,7	4,2	6,6	13,2	7,2

Iz preglednice XII je razvidno, da vrednosti izbranih antioksidantov predstavljajo zelo majhen delež glede na celotno vsebnost (poli)fenolov v vzorcih vin, saj v povprečju predstavljajo le 10%. Kar kaže na to, da je pestrost antioksidantov v vinih res velika.

Izbrana metoda je po našem mnenju ustrezna za identifikacijo in kvantifikacijo izbranih antioksidantov. Ferulne kisline, rutina in elagne kisline nismo mogli natančno opredeliti, saj so bili njihovi vrhovi združeni v enoten vrh. Višjo občutljivost in odlično selektivnost bi dosegli z uporabo kombinacije tekočinske kromatografije in masnega spektrometra (LC/MS), pri katerem bi spojine ločili in identificirali glede na maso. Nadaljevanje naše analize z omenjeno metodo bi bilo vsekakor smiselno. Prav tako bi bilo smiselno analizirati vsebnost posameznih podskupin (poli)fenolov in njihov vpliv na antioksidativno kapaciteto (53).

7. SKLEP

Namen magistrske naloge je bil analizirati antioksidativno kapaciteto (poli)fenolov v vzorcih slovenskih vin in določiti vsebnosti izbranih antioksidantov v teh vzorcih. Iz podatkov pridobljenih z DPPH in FC metodo smo želeli potrditi korelacijo med parametri.

Iz rezultatov lahko sklepamo sledeče:

- ⊙ Vsebnost in posledično antioksidativna kapaciteta (poli)fenolov sta odvisni od sorte vina, starosti, metode pridelave vina (klasična ali maceracija).
- ⊙ Večina oranžnih vin ima višjo vsebnost antioksidantov kot klasična bela vina, vendar zaradi malega števila vzorcev oranžnih vin težko posplošimo to trditev.
- ⊙ Pri analizi redukcije DPPH[•] se slovenska bela vina zelo približajo linearnemu modelu.
- ⊙ V belih vinih je med polifenoli največ fenolnih kislin.
- ⊙ Izbrani antioksidanti predstavljajo v povprečju le 10% celokupne vsebnosti (poli)fenolov v vzorcih.
- ⊙ Med antioksidativno aktivnostjo in celokupno vsebnostjo fenolov v vinih obstaja linearna korelacija.
- ⊙ Za doseganje višje občutljivosti in boljše selektivnosti je smiselno nadaljevanje analize s tekočinsko kromatografijo sklopljeno z masnim spektrometrom.

Vsekakor lahko potrdimo hipotezo, da obstaja korelacija med vsebnostjo (poli)fenolov in antioksidativno kapaciteto antioksidantov. Več kot je prisotnih antioksidantov v vzorcu več ionov prehodnih kovin lahko vežejo in več radikalov lahko reducirajo. Ni pa ključna samo celokupna koncentracija, saj je učinkovitost vezave radikalov in kovin odvisna predvsem od števila OH skupin in mesta na aromatskem obroču (3, 6, 14, 15). Tako je zelo pomemben podatek pri določanju antioksidativne kapacitete količina posameznih skupin (poli)fenolov. Več kot bo spojina vsebovala molekul z visokim številom -OH skupin vezanih na *orto* in *para* mesto aromatskega obroča, večja bo antioksidativna kapaciteta.

8. VIRI IN LITERATURA

1. Jeyakumar H: Advances in food and nutrition research, Elsevier Inc, volume 71 Oxford, 2014: 3.
2. Seminar Antioksidanti. Spletna stran: http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/FK/Gradiva_FK/2010/Seminarji/Antioksidanti.pdf (dostop november 2016).
3. Prakash A, Rigelhof F, Miller F: Antioxidant activity. Medallion Laboratories Analytical progress 2001; 19(2): 1-4.
4. Young I. S, Woodside J. V: Antioxidants in health and disease. J Clin Pathol 2001; 54: 176-186.
5. Paganga G, Rice-Evanc C. A: The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. FEBS Letters 1997; 401: 78-82.
6. Hollman P. C. H, Tijburg L. B. M, Yang C. S: Bioavailability of flavanoids from tea. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 1997; 37: 719-738.
7. Cadenas E, Packer L: Handbook of antioxidants, 2nd Ed. Marcel Dekker Inc, New York, 2002: 1-5.
8. Šikovec S: Vino, pijača doživetja. Kmečki glas, Ljubljana, 1996: 222-247.
9. Vinarstvo. Spletna stran: http://www.kis.si/Podrocje_dela_OSVV/Vinarstvo_OSVV_tekst_1/ (dostop november 2016).
10. Galanakis C. M, Kotanidis A, Dianellou M, Gekas V: Phenolic content and antioxidant capacity of Cypriot wines. Czech J, Food Sci 2015; 33(2): 126-136.
11. Garrido J, Borges F: Wine and grape polyphenols – A chemical perspective. Food research international 2013; 54(2): 1844-1858.
12. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegu L: Plant polyphenols: chemical properties, biological activities and synthesis. Angewandte Chemie International Edition 2011; 50(3): 586-621.
13. Mravljak J: Radikali, verižne radikalske reakcije, ROS, RNS, RSS in oksidativni stres, Antioksidanti. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko kemijo, Farmacevtska kemija III, Ljubljana, 2011: 1-35.
14. Mravljak J: Radikali in oksidativni stres. Farmacevtski vestnik 2015; 66: 127-132.

15. Rice-Evans C. A, Miller N. J, Paganga G: Structure – antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine* 1996; 20(7): 933-956.
16. Moreno-Arribas M. V, Polo M. C: *Wine chemistry and biochemistry*. Springer, New York, vol. 233, 2009: 437-528.
17. Catechin. Spletna stran : <https://en.wikipedia.org/wiki/Catechin> (dostop december 2016).
18. Prakash D, Sharma G: *Phytochemicals of nutraceutical importance*. CABI, Boston, 2014: 196-207.
19. Pečar S, Mravljak J. Šumi Življenja ali radikali in druge reaktivne snovi v telesu. Slovensko farmacevtsko društvo. Ljubljana, 2015: 138-198.
20. Rutin. Spletna stran: <https://en.wikipedia.org/wiki/Rutin> (dostop december 2016).
21. Hesperidin. Spletna stran: <https://examine.com/supplements/Hesperidin/> (dostop december 2016).
22. Carkeet C, Grann K, Randolph R. K, Venzon D. S, Izzy S: *Phytochemicals: health promotion and therapeutic potential*. CRC Press, Florida, 2012: 21-26.
23. Ruiz-Capillas C, Nollet L. M: *Flow injection analysis of food additives*. CRC Press, Florida, vol. 1, 2015: 397- 398.
24. Waterhouse A. L: *Wine phenolics*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002; 957(1): 21-36.
25. p-coumaric acid. Spletna stran: https://en.wikipedia.org/wiki/P-Coumaric_acid (dostop december 2016).
26. Mankuso C, Santangelo R: *Ferulic acid: pharmacological and toxicological aspects*. *Food Chem Toxicol* 2014; 65:185-195.
27. Resveratrol. Spletna stran: <https://examine.com/supplements/Resveratrol/> (dostop december 2016).
28. Ellagic acid. Spletna stran: https://en.wikipedia.org/wiki/Ellagic_acid (dostop december 2016).
29. Aesculin. Spletna stran: <http://www.chm.bris.ac.uk/webprojects2001/gerrard/aesculin.html> (dostop december 2016)
30. Curcumin. Spletna stran: <https://examine.com/supplements/curcumin/> (dostop december 2016).

31. Kedare S. B, Singh R. P: Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology* 2011; 48(4): 412-422.
32. Molyneux P: The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol* 2004; 26(2): 211-219.
33. Graph showing the colour change of DPPH. Spletna stran: <http://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-and-chronic-degenerative-diseases-a-role-for-antioxidants/chemistry-of-natural-antioxidants-and-studies-performed-with-different-plants-collected-in-mexico> (dostop januar 2017).
34. Perron N. R, Brumaghim J. L: A review of the antioxidant mechanism of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell chemistry and biophysics* 2009; 53(2): 75-100.
35. Stoica R, Ion R. M, Bunghez I. R, Senin R, Bajenaru I. G: Assessing the total phenolics of Romanian wine varieties. *The Scientific Bulletin of Valahia University, Materials and Mechanics* 2011; 6(9): 101-103.
36. Ainsworth E. A, Gillespie K. M: Estimation of thotal phenolic content and other oxidation substances in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature protocols* 2007; 2(4): 875-877.
37. Singleton V. L, Orthofer R, Lamuela-Raventos R. M: [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology* 1999; 299: 152-178.
38. Karadag A, Ozcelik B, Saner S: Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods* 2009; 21(4): 41-60.
39. Meyer V. R: *Practical high-performance liquid cromatography*, 4th Ed. John Wiley & Sons, Chichester, 2004: 4-14, 255-256.
40. Snyder L. R, Kirkland J. J, Dolan J. W: *Introduction to modern liquid chromatography*. John Wiley & Sons, Canada, 2011: 2, 303, 319-331, 516, 520.
41. Snyder L. R, Kirkland J. J, Glajch J. L: *Practical HPLC method development*, 2nd Ed. John Wiley & Sons, Canada, 2012: 1-20.
42. Arribas A. S, Martínez-Fernández M, Chicharro M: The role of electroanalytical techniques in analysis of polyphenols in wine. *TrAc Trends in Analytical Chemistry* 2012; 34; 78-96.

43. Agilent, Fundamentals of HPLC. Spletna stran: http://polymer.ustc.edu.cn/xwxx_20/xw/201109/P020110906263097048536.pdf (dostop december 2016).
44. Osnovni podatki o vinogradniško vinarski Sloveniji. Spletna stran: <http://www.vinskadruzba.si/zemljevid/osnovni-podatki-o-vinogradnisko-vinarski-sloveniji/> (dostop december 2016).
45. Carmona-Jiménez Y, García-Moreno M. V, Igartuburu J. M, Barroso C. G: Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of the wine by-products. *Food chemistry* 2014; 165: 198-204.
46. Jeitner T. M: Optimized ferrozine-based assay for dissolved iron. *Analytical biochemistry* 2014; 454: 36-37.
47. Matjaž M: Antioksidativne lastnosti izbranih barbituratov in cikličnih imiddioksimov. Magistrska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Laboratorijska biomedicina, Ljubljana, 2016.
48. Folin-Ciocalteu micro method for total phenol in wine. Spletna stran: <http://waterhouse.ucdavis.edu/faqs/foolin-ciocalteu-micro-method-for-total-phenol-in-wine> (dostop december 2016).
49. Mitić M. N, Obradović M. V, Grahovac Z. B, Pavlović A. N: Antioxidant capacities and phenolic levels of different varieties of Serbian white wines. *Molecules* 2010; 15(3): 2016-2027.
50. Sovinc N: Vpliv letnika na antioksidacijski potencial belih in rdečih vin. Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana, 2005.
51. Kožmerl T: Uravnavanje kislosti belih in rdečih vin s kemijskim razkissom. *Acta agriculturae Slovenica* 2005; 85(2): 227-237.
52. Kožmerl T, Kač M: Osnove kemijske in senzorične analize mošta in vina. Laboratorijske vaje pri predmetu Tehnologije predelave rastlinskih živil - vino, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2009: 24-25.
53. Watkins T. R: Wine – nutritional and therapeutic benefits. ACS Symposium Series 661, Division of Agricultural and Food Chemistry, New Jersey, 1996: 6-68.
54. Boulton R. B, Singleton V. L, Bisson L. F, Kunkee R. E: Principles and practices of winemaking. University of California, Chapman & Hall, California, 1996: 115-151.