



ZVEZA ZA TEHNIČNO KULTURO SLOVENIJE



Gimnazija Kranj

# **SKUPNA VSEBNOST POLIFENOLOV IN ANTIOKSIDATIVNA KAPACITETA TEMNIH ČOKOLAD Z RAZLIČNO VSEBNOSTJO KAKAVA**

Področje: Druga področja

Raziskovalna naloga

Avtorica: Lea Ažbe

Mentor: dr. Rok Rudež

Gimnazija Kranj

Koroška cesta 13

4000 Kranj

Kranj, 2022

## **Zahvala**

Velika zahvala gre mojemu mentorju profesorju dr. Roku Rudežu, ki me je ves čas spodbujal, usmerjal in mi pomagal.

Zahvaljujem se tudi profesorici Tadeji Polajnar iz Biotehniškega centra Naklo, ki mi je omogočila dostop do dela materiala, potrebnega za eksperimentalni del moje raziskave. Zahvala gre tudi profesorici Petri Flajnik in laborantki Martini Hribovšek za nasvete in pomoč, ko sem naletela na izzive v laboratoriju.

Posebna zahvala gre tudi mojim staršem za vso podporo.

## KAZALO VSEBINE

Zahvala.....	2
Povzetek.....	5
1. UVOD .....	6
1.1. Cilji raziskovalne naloge .....	6
1.2. Raziskovalno vprašanje .....	6
1.3. Hipoteze .....	6
2. TEORETIČNI DEL.....	7
2.1. Sestavine v čokoladi .....	7
2.2. Antioksidanti.....	7
2.3. Polifenoli.....	7
2.4. Antioksidativna kapaciteta .....	8
2.5. Skupna vsebnost polifenolov.....	8
2.6. Razmerje med antioksidativno kapaciteto in vsebnostjo fenolov .....	9
2.7. Čokolada in njen pozitiven vpliv na zdravje.....	9
3. RAZISKOVALNI DEL .....	9
3.1. Predmet raziskovanja.....	9
3.1.1. Spremenljivke.....	9
3.1.2. Varstvo pri delu.....	10
3.2. Raziskovalne metode .....	10
3.2.1. Metode dela.....	10
3.2.2. Materiali.....	11
3.2.3. Postopek .....	12
3.2.4. Preliminarni testi .....	14
4. REZULTATI IN RAZPRAVA .....	15
4.1. Neobdelani podatki.....	15
4.1.1. Kvalitativni očitki .....	16
4.2. Procesirani podatki .....	16
4.2.1. Izračuni celotne vsebnosti fenolov .....	16
4.2.2. Računanje antioksidativne kapacitete.....	17
4.2.3. Merske napake .....	19
4.2.4. Trendi in vrhovi .....	19
5. ZAKLJUČEK IN SKLEPI .....	20
5.1. Potrditev hipotez .....	20
5.2. Zaključek.....	21
5.3. Prednosti in slabosti .....	21

5.4. Razširitve ter predlogi za nadaljnje delo .....	22
6. VIRI IN LITERATURA .....	23

## KAZALO SLIK

Slika 1: Fenolna skupina (Wikipedia 2021) .....	7
Slika 2: Glavni flavanoli, ki jih lahko najdemo v čokoladi (Afoakwa 2010) .....	8
Slika 3: Reakcija DPPH z antioksidantom (R predstavlja antioksidativni radikal in H predstavlja antioksidanta kot odstranjevalca radikalov (Övet 2015) .....	8
Slika 4: Redukcija FC reagenta ob izpostavljenosti fenolom (Ford et al. 2019) .....	9

## KAZALO TABEL

Tabela 1: Pripomočki in materiali uporabljeni v eksperimentu .....	11
Tabela 2: Redčenje DPPH raztopin z destilirano vodo.....	13
Tabela 3: Delanje standardov galne kisline z serijskim redčenjem 1 mg/ml standarda galne raztopine .....	13
Tabela 4: Priprava kalibracijske krivulje galne kisline.....	14
Tabela 5: Odvisnost absorbance glede na koncentracijo razredčenih vzorcev standardov galne kisline .....	15
Tabela 6: Rezultati izračunov, potrebnih za skupno vsebnost polifenolov .....	17
Tabela 7: Absorbanca, % RSA in EC50 pri različnih odstotkih čokolad .....	18

## KAZALO GRAFOV

Graf 1: Absorbanca pri 66 % čokoladnih DPPH vzorcih .....	15
Graf 2: Absorbanca pri FC čokoladnih vzorcih .....	16
Graf 3: Krivulja galne kisline.....	16
Graf 4: DPPH metoda za 66 % čokoladne vzorce .....	17
Graf 5: DPPH metoda za 77 % čokoladne vzorce .....	18
Graf 6: DPPH metoda za 88 % čokoladne vzorce .....	18
Graf 7: EC50 vs. % RSA .....	19
Graf 8: TPC in EC50 pri različnih odstotkih čokolade, uporabljenih v eksperimentu .....	20

## Povzetek

Temna čokolada je v zadnjih letih s porastom številnih diet postala »zdrava« alternativa mlečne čokolade. Temna čokolada za razliko od mlečne vsebuje večjo količino kakavovih zrn, ki so bogat vir polifenolov. Zaradi polifenolov kakav in njegovi produkti delujejo kot antioksidanti, ki odstranjujejo reaktivne substance in nas s tem varujejo pred škodljivimi vplivi. Cilj raziskovalne naloge je bil raziskati skupno vsebnost polifenolov in antioksidativno kapaciteto v temnih čokoladah z različnimi odstotki kakava (66 %, 77 % in 88 %).

Skupno vsebnost polifenolov sem merila s pomočjo absorbance svetlobe v spektrofotometru pri valovni dolžini 765 nm, antioksidativno kapaciteto pa s pomočjo absorbance svetlobe v spektrofotometru pri valovni dolžini 517 nm. Za meritve skupne vsebnosti polifenolov sem uporabljala FC reagent, za meritve antioksidativne kapacitete pa DPPH reagent. S pomočjo grafov absorbance vzorcev in galne kisline sem izračunala TPC (skupno vsebnost polifenolov) in EC50 (polovično efektivno koncentracijo) ter izdelala grafe, ki predstavljajo medsebojno odvisnost EC50 in TPC. Rezultati so pokazali, da ima čokolada z višjim odstotkom kakava višjo antioksidativno kapaciteto in skupno vsebnost polifenolov iz česar lahko sklepamo, da so čokolade z večjo vsebnostjo kakava zaradi polifenolov koristnejše za zdravje. Dodatno sta se skupna vsebnost polifenolov ter antioksidativna kapaciteta izkazali kot medsebojno odvisni.

**Ključne besede:** temna čokolada, skupna vsebnost polifenolov, antioksidativna kapaciteta, spektrofotometrija.

## Abstract

Dark chocolate has become, with the recent increase in number of diets, a “healthier” alternative of milk chocolate. Dark chocolate has, compared to milk chocolate, more cacao beans in it, which are a rich source of polyphenols. Because of polyphenols cocoa and its products act as antioxidants, which eliminate reactive substances and protect us against harmful effects of reactive substances. The aim of this study was to investigate total phenolic content and antioxidant capacity in dark chocolates with different percentage of cocoa (66 %, 77 % and 88 %).

Total phenolic content was measured spectrophotometrically with absorbance values at 765 nm, and antioxidant capacity was measured spectrophotometrically with absorbance values at 517 nm. For the measurements of total phenolic content I used FC reagent and for measurements of antioxidant capacity I used DPPH reagent. With the help of raw data derived graphs and graph of gallic acid, I calculated TPC (total phenolic content) and EC50 (efficient concentration value) as well as drew graphs, which showed the correlation between EC50 and TPC. The results have shown that chocolates with higher percentage of cocoa have higher antioxidant capacity as well as higher total phenolic content, from which we can deduce that the chocolates with higher percentage of cacao used in this experiment are more beneficial for your health than chocolates with lower percentage of cocoa. Furthermore, total phenolic content and antioxidant capacity have a correlational relationship.

**Key words:** dark chocolate, total phenolic content, antioxidant capacity, spectrophotometry.

## 1. UVOD

Kot mala deklica sem se vsak dan igrala s kuhanjem na štedilniku (pa četudi je bil štedilnik le igrača za otroke). V zadnjih letih se je moje začetno otroško igranje preneslo v pravo kuhinjo, kjer so me poleg tehnik kuhanja začele zanimati tudi sestavine. Ob poplavi različnih diet sem se začela zanimati za zdravo prehrano, o kateri sem prebrala številne knjige. Lansko leto sem naletela na knjigo *Genius foods*, v kateri avtor podrobno predstavi jedi, ki jih moramo uživati, da si izboljšamo delovanje možganov. Eden izmed njegovih nasvetov je uživanje temne čokolade, še posebej tiste z vsebnostjo kakava, ki presega 85 %, saj vsebuje spojine imenovane polifenoli, ki so bili že večkrat predmet raziskav, predvsem zaradi njihovega prispevka k zdravju ljudi in izboljšanju našega delovanja možganov.

Ob branju knjige me je najbolj zanimal vpliv različnih odstotkov kakava v temni čokoladi na pozitivno delovanje, ki ga ima za zdravje, oziroma število polifenolov in antioksidantov v njej. To me je pripeljalo do raziskovanja **vpliva različne vsebnosti kakava na skupno vsebnost polifenolov in antioksidativno kapaciteto v temni čokoladi**.

V raziskovalni nalogi so opisana teoretična izhodišča za merjenje vsebnosti polifenolov in antioksidativne kapacitete, ki ji sledijo metode in postopek dela. Na koncu je podana še analiza rezultatov in skupni zaključki raziskovalne naloge.

### 1.1. Cilji raziskovalne naloge

Kljub porastu kemijsko analiznih raziskav s področja prehrane, so številna živila in njihove lastnosti še neraziskana ali premalo raziskana. Antioksidanti so zaradi svojih pozitivnih vplivov na zdravje pomembna tema raziskovanja, vendar se mnenja strokonjakov o pravi količini antioksidantov v živilih razlikujejo. Za namen raziskave antioksidativnih lastnosti v čokoladi sem si pri raziskovalni nalogi zastavila naslednje cilje:

- preizkusiti dve metodi za merjenje skupne vsebnosti polifenolov in antioksidativne kapacitete v čokoladi,
- raziskovanje možne odvisnosti med skupno vsebnostjo polifenolov in antioksidativno kapaciteto,
- med vzorci čokolade izbrati tisto, ki je boljša za naše zdravje.

Upam, da bo ta raziskovalna naloga spodbudila dodatne raziskave na področju prehrane. Lokalna podjetja s čokolado lahko podobne raziskave izvedejo za svoje čokolade, rezultati pa lahko služijo kot predmet trženja »bolj zdravih« izdelkov. Ta raziskava lahko tudi spodbudi proizvodnjo podobnih izdelkov (npr. čokolade, ki je boljša za zdravje zaradi svojih antioksidativnih lastnosti ali izdelkov, ki vsebujejo tako čokolado) v lokalnem okolju, hkrati pa je tudi podpora drugim podobnim raziskavam s to tematiko.

### 1.2. Raziskovalno vprašanje

*Kakšna je razlika v skupni vsebnosti polifenolov in antioksidativni kapaciteti v čokoladah istega tipa z različno vsebnostjo kakava (66 %, 77 % in 88 %), ob uporabi spektrofotometrične metode z absorbanco svetlobe pri valovnih dolžinah 517 nm (antioksidativna kapaciteta) in 765 nm (skupna vsebnost polifenolov)?*

### 1.3. Hipoteze

Na osnovi raziskovalnega vprašanja sem postavila naslednje hipoteze:

- **Hipoteza 1:** Čokolade z višjo vsebnostjo kakava bodo imele višjo skupno vsebnost polifenolov in višjo antioksidativno kapaciteto.
- **Hipoteza 2:** Obe metodi (skupna vsebnost polifenolov, izračunana z meritvijo s FC reagentom in galno kislino ter antioksidativna kapaciteta, izračunana z meritvijo z DPPH reagentom) bosta

linearno odvisni, kar bi pomenilo povezavo med skupno vsebnostjo polifenolov in antioksidativno kapaciteto.

## 2. TEORETIČNI DEL

### 2.1. Sestavine v čokoladi

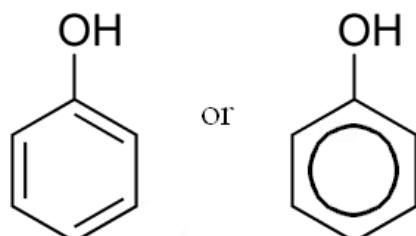
Obstajajo trije tipi čokolade: bela čokolada, mlečna čokolada in temna čokolada, ki se razlikujejo glede na količino kakavovega masla, kakavovega prahu in kakavove mase. Temna čokolada vsebuje približno 40 % kakavove mase, kateri je dodano zelo malo kakavovega masla. Mleka v prahu ne vsebuje, vendar pa so ji pogosto dodane druge sestavine, kot na primer sladkor, lecitin in vanilin. Ker mleka ne vsebuje, ni dober vir proteinov (hkrati pa je relativno grenka po okusu) in ima nizke vsebnosti kalcija, vendar pa se v njej nahaja veliko magnezija. Med vsemi tremi tipi čokolad ima temna čokolada tudi najnižje energijske vrednosti (Övet, 2015).

### 2.2. Antioksidanti

Antioksidanti so snovi, ki preprečujejo in odstranjujejo vpliv oksidativnega stresa, ki nastane zaradi reaktivnih snovi. Antioksidanti imajo dva glavna mehanizma, ki zavirata škodo, ki lahko nastane zaradi oksidativnega stresa – razpad vezi in mehanizem za odstranjevanje prostih radikalov. Prosti radikali so snovi, ki vsebujejo najmanj en neparni elektron in reagirajo z biološkimi molekulami, da povzročijo poškodbe na celicah. Antioksidanti reagirajo kot reducenti, saj oddajo vodikov atom oziroma elektron, da povzročijo redukcijo radikala v manj reaktivno in stabilno formo, s čimer zmanjšajo možnost oksidacije. Uživanje hrane z visoko antioksidativno kapaciteto je koristno, saj varuje tarčne celice v telesu pred škodljivimi vplivi prostih radikalov (Övet, 2015; Pečar et al., 2015). Antioksidanti so zgrajeni iz treh različnih skupin, ki vključujejo encime, vitamine in fitokemikalije. Fitokemikalije se v nadaljevanju delijo na tri subgrupe – karotenoide, polifenole in alilne sulfide (Ravishankar and Ambati, 2019).

### 2.3. Polifenoli

Polifenoli so eni izmed najpomembnejših metabolitov v rastlinah in so substance, ki na svojem benzenovem obroču nosijo več kot eno hidroksilno skupino (OH). Ker se polifenoli obnašajo kot antioksidanti, v reakcijah donirajo vodikov atom oziroma elektron (Pečar et al., 2015).

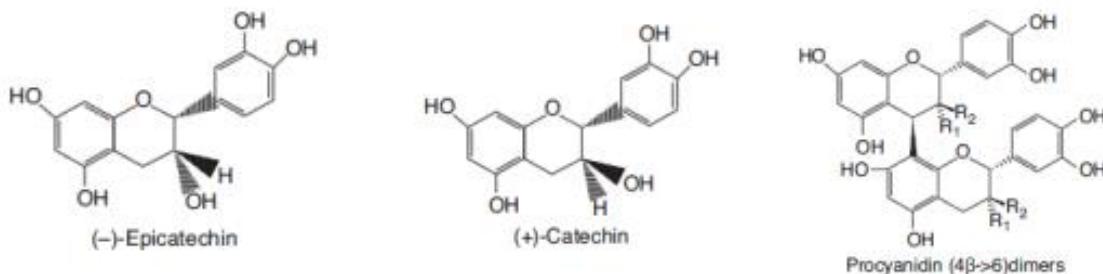


Slika 1: Fenolna skupina (Wikipedia 2021)

Glede na njihovo kemijsko strukturo se polifenoli delijo na fenolne kisline, kumarine, flavonoide, izoflavonoide, stilbeni, ligande in fenolne polimere. Najbolj razširjen tip rastlinskih fenolov so flavonoidi (Övet, 2015).

Kakovava zrna so bogat vir polifenolov (saj ti v povprečju zavzemajo 15 % njihove suhe mase) (Krähmer et al., 2015). Vsebnost polifenolov v čokoladi je odvisna od porekla kakavovih zrn in njihovega procesiranja – ta so izpostavljena fermentaciji, različnim sušilnim postopkom, alkalizaciji in praženju, ki močno vplivajo na kvaliteto končnega izdelka (Aprotozoaie, Luca and Miron, 2015). Pomembno je poudariti, da čokolada vsebuje precej manjšo količino polifenolov kot kakavova zrna, saj poleg procesiranih kakavovih zrn vsebuje še sladkor, mleko in druge sestavine (omenjene v poglavju Sestavine v čokoladi, str. 7), ki pa se razlikujejo glede na tip čokolade. Kakovost procesiranja kakavovih

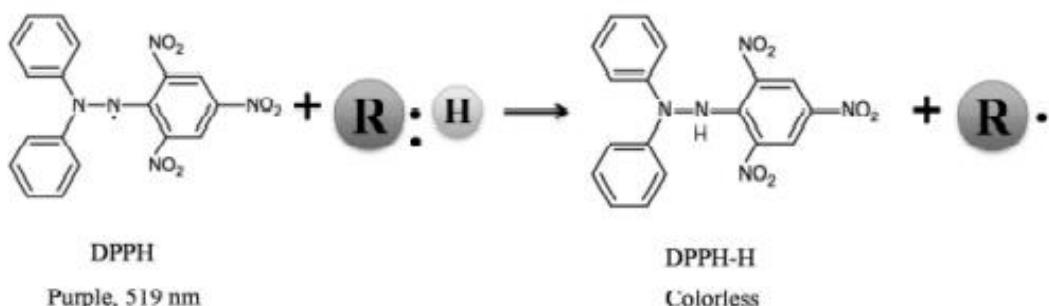
zrn in pogoji, pod katerimi se ta procesirajo lahko povzročijo še dodatno degradacijo vsebnosti polifenolov v čokoladi (Wollgast and Anklam, 2000). Glavni polifenoli, ki jih najdemo v kakavovih zrnih in njihovih produktih so epikatehin, catehin, antocianidini in procianidini. Najpomembnejši med njimi v čokoladi je epikatehin, ki je zaradi svoje visoke razpoložljivosti zelo raziskan in ima številne zdravstvene koristi na kardiovaskularni sistem (Övet, 2015).



**Slika 2: Glavni flavanoli, ki jih lahko najdemo v čokoladi (Afoakwa 2010)**

#### 2.4. Antioksidativna kapaciteta

Polifenoli v kakavu odstranjujejo reaktivne substance, ki so uporabljene v številnih raziskovalnih postopkih in metodah. Najbolj uporabljene so 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) in 2,2'-azino-bis (3-etylbenzotiazolin-6-žveplova) kislina oziroma ABTS. DPPH radikal reagira z antioksidantom in je pri tem reducirana, zato spremeni barvo iz vijolične v brezbarvno (v tekoči kakavovi zmesi tako dobi svetlo rumeno barvo) (Övet 2015).

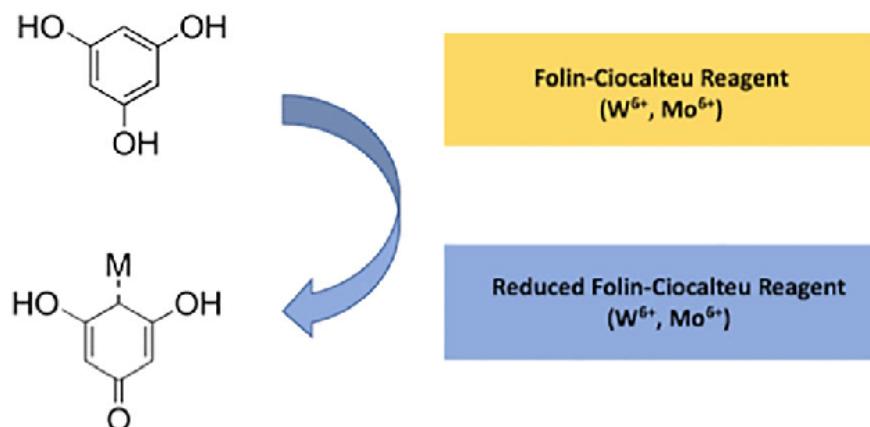


**Slika 3: Reakcija DPPH z antioksidantom (R predstavlja antioksidativni radikal in H predstavlja antioksidanta kot odstranjevalca radikalov) (Övet 2015)**

Metoda 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) nam omogoča meritev antioksidativne kapacitete (največkrat v rastlinskih ekstraktih in ekstraktih hrane) (Övet 2015). Antioksidativna kapaciteta je definirana kot celota prostih radikalov, ki jih lahko vzorec odstrani (Rubio et al., 2016). Rezultate interpretiramo v polovični efektivni koncentraciji (okr. EC50), ki je definirana kot koncentracija substrata, ki povzroči 50 % izgubo aktivnosti DPPH in jo izračunamo kot parameter za izraz antioksidativne kapacitete v številu vseh antioksidatorjev v spojnini (Molyneux, 2003).

#### 2.5. Skupna vsebnost polifenolov

Skupna vsebnost polifenolov (okr. TPC, angleško total phenolic content) je količina oziroma število vseh fenolov (ozziroma polifenolov) v spojnini. Ena izmed metod za merjenje vsebnosti fenolnih spojin je Folin – Ciocalteu metoda. Folin – Ciocalteu reagent je reducirana ob prisotnosti fenolov, kar povzroči obarvanje spojine v molibden – volfram modro barvo (Malta, Liu and Alfen, 2014).



Slika 4: Redukcija FC reagenta ob izpostavljenosti fenolom (Ford et al. 2019)

Rezultate te metode izrazimo kot ekvivalent galne kisline (GAE) na mg originalnega vzorca čokolade (mg GAE/mg) oziroma mg GAE na 100 g originalne čokolade (mg GAE/100 g). Galna kislina je uporabljena, ker je klasificirana kot hidroksilbenzolna kislina (fenolna kislina) in jo zato lahko uporabimo kot standard (saj spada pod polifenole) (Övet, 2015).

## 2.6. Razmerje med antioksidativno kapaciteto in vsebnostjo fenolov

Antioksidativne lastnosti fenolov so odvisne od števila hidroksilnih skupin, ki prosto dajejo vodik in njihove konfiguracije ter posledično vplivajo na antioksidativno kapaciteto (Soobrattee et al., 2005). Skupna vsebnost polifenolov vključuje vse polifenole v vzorcu, ki so lahko del redoks procesov in lahko delujejo kot antioksidanti. Študija Piluzza and Bullita (2011) zato navaja, da bi bil med antioksidativno kapaciteto in skupno vsebnostjo polifenolov linearna povezava (v primeru izbranih pravih metod za merjenje TPC in antioksidativne kapacitet).

## 2.7. Čokolada in njen pozitiven vpliv na zdravje

Kakav in njegovi produkti so naravni vir antioksidantov, zato reducirajo poškodbe celic, s čimer polifenoli v njih zagotovijo številne koristi za zdravje (te vključujejo protimikrobne, protivnetne in antioksidativne lastnosti) (Rajbhar, Dawda and Mukundan, 2014). V študiji Grassi et al. (2008) so dokazali, da uživanje temne čokolade, ki prinese 500 mg flavanolov na dan v 14 dneh, da pozitivne rezultate za metabolizem glukoze in senzitivnost za inzulin.

## 3. RAZISKOVALNI DEL

### 3.1. Predmet raziskovanja

#### 3.1.1. Spremenljivke

##### a) Neodvisna spremenljivka

Za namen eksperimenta so bile čokolade kupljene v lokalni trgovini. Čokolade se so se razlikovale le po odstotkih kakava, ki so ga vsebovale in ne po ostalih sestavinah (le odstotek ostalih sestav in v njih je bil drugačen).

Neodvisna spremenljivka v eksperimentu je bila odstotek kakava v čokoladah, ki je bila zastopana v treh različnih vrednostih: 66 %, 77 % in 88 %. Vse čokolade so po tipu temne čokolade in so bile izbrane ter uporabljene zaradi manjšega vpliva ostalih sestavin (mlečna in bela čokolada se navadno razlikujeta v drugih sestavinah in ne le odstotkih teh sestavin). Vse uporabljene čokolade so iste blagovne znamke zato, da bi bile uporabljene sestavine med seboj kar najbolj podobne. Ker eksperiment raziskuje tri specifične čokolade, bi morali vsa posploševanja na ostale tipe čokolad zato vzeti z rezervo.

### b) Odvisna spremenljivka

Odvisni spremenljivki sta skupna vsebnost polifenolov in antioksidativna kapaciteta, ki sta bili izmerjeni z absorbanco pri specifičnih valovnih dolžinah (517 nm za antioksidativno kapaciteto in 765 nm za vsebnost fenolov) in izračunani s pomočjo dveh enačb. Valovne dolžine so bile izmerjene z UV-Vis spektrofotometrom. Predpostavljala sem, da sta 517 nm in 765 nm idealni za merjenje antioksidativne kapacitete in skupne vsebnosti polifenolov, saj so ju predlagale študije, ki sem jih uporabila kot teoretično podlago eksperimentu. Absorbanca je bila izmerjena za vse tri različne odstotne vrednosti kakava v čokoladi z reagentom in slepim vzorcem, dodatno pa je bila izmerjena še absorbanca galne kisline, da sem lahko rezultate na koncu obrazložila z ekvivalenti galne kisline.

### c) Kontrolirane spremenljivke

- Vzorce je bilo potrebno prevažati, zato se je **temperatura** spreminja med transportom. Za to, da to ni vplivalo na eksperiment, so vsi vzorci šli skozi enako gibanje in variiranje temperature.
- Absorbanca je bila izmerjena z **isto kiveto** za vse meritve za vsebnost vseh fenolov, antioksidativno kapaciteto in galno kislino (tri kivete skupaj), tako da različna kiveta ni vplivala na absorbanco. Pred vsako meritvijo so bile kivete umite z manjšo količino razredčene raztopine, da bi preprečili nadaljnjo razredčitev z vodo oziroma mešanje z prej uporabljenimi vzorci.
- Izmerjena je bila **enaka masa čokolade** za preprečitev vpliva dodatne teže v eksperimentu. Vsi začetni vzorci so tehtali 2.0000 g ( $\pm 0.0001$  g).
- Vse meritve antioksidativne kapacitete in celotne vsebnosti fenolov so bile narejene na **isti dan iz enakih začetnih vzorcev**, da bi preprečili možne spremembe med različnimi vzorci, kar bi lahko vplivalo na različne rezultate meritev.
- **Enak spektrofotometer** je bil uporabljen za vse meritve, da se v primeru napak, te izničijo.
- Narejena je bila predpostavka, da heksan v raztopinah ne bo izhlapel (glede na nizko vrelische heksana), vendar so bile za vsak slučaj **raztopine pokrite**, da se prepreči izhlapevanje.

#### 3.1.2. Varstvo pri delu

Varnostni ukrepi: Eksperiment vključuje uporabo strupenih kemikalij, zato so potrebne zaščitne rokavice in zaščitna očala (strupene kemikalije vključujejo n – heksan, metanol, galno kislino, DPPH, natrijev karbonat in FC reagent). Zaščitni plašč je potreben zaradi uporabe strupenih kemikalij in pigmentov, ki jih težko odstranimo iz oblačil. Za metanol, n – heksan in DPPH reagent je potrebna tudi uporaba maske. Vse strupene kemikalije so bile za zagotovitev varnosti uporabljeni kar se le da malo.

Etični zadržki: Med eksperimentov ni bilo etičnih zadržkov.

Varstvo okolja: N – heksan je škodljiv za okolje, zato ga ne smemo izliti v odtok, kanalizacijo in druge vodne poti in ga odstraniti pravilno.

## 3.2. Raziskovalne metode

### 3.2.1. Metode dela

Za določitev koncentracije vseh polifenolov in antioksidativnih lastnosti mora biti čokolada procesirana skozi različne metode. Najprej mora iti vzorec skozi ekstrakcijo s topili, nato mora biti centrifugiran, ko mu dodamo reagente gre skozi redoks proces (opisan na strani 8 v poglavju Teoretični del) in potem ga lahko izmerimo spektroskopsko, da dobimo potrebno absorbanco za izračune.

Čokolada vsebuje mnogo spojin, zato moramo fenole (in njihove antioksidante) izolirati s pomočjo ekstrakcije s topili. Merjenje vsebnosti fenolov in antioksidativne kapacitete je močno odvisno od uporabljenega topila zaradi različnih antioksidativnih potencialov spojin različnih polarnosti (Barchan

et al., 2014). Ekstrakcija, ki je bila uporabljena v tej raziskavi je bila trdna – tekoča nepolarna ekstrakcija s heksanom (ki ji je sledila polarna ekstrakcija z metanolom), in je bila izbrana, ker so metanol, aceton in voda (ki so zelo uporabljena polarna topila) nezadostna topila za ekstrakcijo fenolov, saj so polifenoli povezani z ostalimi biomolekulami, kot so na primer proteini, polisaharidi, lipidi in anorganske molekule (Rajbhar, Dawda and Mukundan, 2014). Za pripravo vzorcev je bil izbran metanol za nadaljnjo ekstrakcijo (namesto na primer etanola oziroma acetona), saj je njegov donos pri ekstrakciji večji od donosa etanola oziroma acetona, kar nakazuje na višanje donosa ekstrakcije z večanjem polarnosti topila, uporabljenega v ekstrakciji (Do et al., 2013).

Rezultat centrifugacije (ki loči molekule različnih gostot) je sestavljen iz tekočega supernatanta in usedline. Usedlino sestavljajo vsi koncentrirani delci, ki ostanejo v kiveti po uspešno opravljeni centrifugaciji (v tem eksperimentu so bili to trdni delci čokoladne raztopine oziroma kakavova trdna snov). Supernatant je raztopina, ki ostane nad usedlino in je bil v eksperimentu sestavljen iz heksana ter tekočih delov čokoladne raztopine (Eppendorf, 2019).

Obstaja več vrst spektrofotometričnih analiz, ki se razlikujejo po območju valovnih dolžin. V tem eksperimentu je bila uporabljena ultravijolično – vidna spektrofotometrija (krajše UV – Vis), v kateri je vzorec v kiveti absorbiran in izmerjen med valovnimi dolžinami 390 – 900 nm, valovne dolžine so bile izmerjene s pomočjo dveh računalniških programov – LoggerPro in Vernier Spectral Analysis program.

### 3.2.2. Materiali

**Tabela 1: Pripomočki in materiali uporabljeni v eksperimentu**

<p><u>Splošna oprema (uporABLJENA skozi celoten eksperiment):</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Avtomatična pipeta (<math>\pm 0.024</math> ml)</li> <li>• Nastavki za pipeto</li> <li>• Analitična tehnicka (<math>\pm 0.0001</math> g)</li> <li>• Destilirana voda</li> <li>• Zaščitne rokavice (za uporabo z jedkimi snovmi)</li> <li>• Zaščitna maska (za specifične substance)</li> <li>• Zaščitni plašč</li> <li>• Merilni valj (<math>\pm 0.52</math> ml)</li> </ul>	<p><u>Priprava čokoladnih vzorcev:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 66 %, 77 % in 88 % čokolada, naribana (<math>2.0000</math> g <math>\pm 0.0001</math> vsaka)</li> <li>• 30 mL n – heksana</li> <li>• 3 epruvete</li> <li>• Lij</li> <li>• Terilnica s pestilom</li> <li>• Čaša</li> <li>• Urno steklo</li> </ul>
<p><u>Priprava DPPH vzorca:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0.0197 g DPPH reagenta</li> <li>• 100 mL 96 % etanola</li> <li>• 4 čaše</li> <li>• 9 mL 96 % ethanola</li> </ul>	<p><u>Nadaljnja priprava čokoladnih vzorcev:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 15 mL metanola</li> <li>• Majhna lopatica</li> <li>• 3 čaše</li> <li>• Arec X Heating magnetic stirrer (Arec X toplotno magnetno mešalo)</li> <li>• Magnet</li> </ul>

**Centrifugacija:**

- 3 zamaški
- 6 kivet
- Škatla za shranjevanje kivete
- Vibromix 10 Vortex
- Centrifuga Eppendorf MiniSpin
- Čaša za supernatant
- Hladilnik

**Priprava galne kisline:**

- 0.1 g galne kisline
- 10 mL metanola
- 90 mL destilirane vode
- 29 mL destilirane vode
- 1 mL metanola
- 9 mL destilirane vode
- 7 čaš

**Priprava FC vzorcev:**

- 20 g natrijevega karbonata ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )
- 100 mL destilirane vode
- Magnet
- Arec X Heating magnetic stirrer (Arec X toplotno magnetno mešalo)
- 20 mL Folin – Ciocalteu reagenta
- 360 mL destilirane vode
- Aluminijasta folija
- 11 čaš

**Meritve antioksidativne kapacitete in celotne vsebnosti polifenolov:**

- 13 čaš
- Kapalka
- Kivete
- 13.4 mL etanola
- 66 mL destilirane vode
- UV – Vis spektrofotometer

**3.2.3. Postopek****a) Ekstrakcija in priprava čokoladnih vzorcev**

Čokolade (66 %, 77 % in 88 %) sem naribala na urno steklo in stehtala, da je masa vsakega vzorca dosegla 2.0000 g ( $\pm 0.0001$  g). Vse vzorce sem raztopila v 10 ml heksana ob pomoči terilnice in pestila. Vsak vzorec je bil narejen posebej; vsi vzorci so bili nato prelit v epruvete s pomočjo lija.

Epruvete sem zaprla z zamaški in jih transportirala z vozilom s pomočjo škatle za shranjevanje epruvet. Vožnja je trajala 20 min. Vsako raztopino sem najprej mešala 10 sekund s pomočjo Vibromixa 10 Vortex. Nato sem 2 ml vsakega vzorca prenesla v kiveto s pomočjo avtomske pipete. Vsi vzorci so bili označeni. Za vse tri čokolade (z različno vsebnostjo kakava) sta bila narejena po 2 vzorca (ki sta vsak vseboval 2 ml raztopine). Vzorci so bili nato vstavljeni v centrifugo Eppendorf MiniSpin in centrifugirani pri 5.600 rpm za 15 min. Po centrifugiranju sem uporabila avtomsko pipeto za ločitev supernatanta od usedline. Kivete s supernatantom so bile nato transportirane z vozilom za 20 min in potem shranjene v hladilniku (4 °C) do nadaljevanja postopka.

Usedlino vzorca v vsaki kiveti sem premaknila s pomočjo majne lopatice v 3 čaše (poimenovane po vsebnosti kakava v pripadajočih čokoladah). Masa vzorca v čašah mora tehtati 0.25 g. Vsem trem 0.25 gramskim vzorcem sem dodala 5 ml metanola. Vsaka čaša je bila nato zmešana z Arec X Heating magnetic stirrer za boljše mešanje metanola in čokolade.

**b) Priprava DPPH vzorcev**

DPPH raztopina je bila pripravljena z razapljanjem 19.7 mg (0.0197 g) DPPH reagenta v 100 ml etanola (za pripravo 0.5 mmol raztopine). DPPH raztopina je bila takoj po pripravi postavljena v temo. Iz vsake

čaše sem vzela 0.5 ml čokoladne raztopine, ki sem jih prenestila v 3 nove čaše, poimenovane po odstotni vrednosti pripadajoče čokolade, dodamo pa jim 3 ml 96 % etanola ter 0.3 ml DPPH raztopine. Čaše so bile postavljene v temo pri sobni temperaturi (čas inkubacije je vzet iz študije Geremu, Tola and Sualeh (2016)).

Po 30 minutah DPPH raztopin v temi, sem vzela 3 dodatne čaše in vsaki dodala 2 ml DPPH raztopine. Raztopine so bile nato razredčene; dodano jim je bilo 8, 11.33, 14, 18 in 24.67 ml destilirane vode, da sem lahko dobila naslednje koncentracije DPPH raztopin v primerjavi z celotnim volumenom (ki je vseboval DPPH raztopino in vodo) v razmerju ozziroma volumskem ulomku, izračunanim v Tabeli 2. Kontrolni vzorec je bil prav tako pripravljen za meritve in je vseboval 0.3 ml DPPH radikalne raztopine zmešane z 3.5 ml etanola.

**Tabela 2: Redčenje DPPH raztopin z destilirano vodo**

Številka čaše	Volumen DPPH raztopine (v ml):	Volumen dodane destilirane vode (v ml):	Volumski ulomek med DPPH raztopino dodano in celotnim volumenom:
1	2.000	8.000	0.200
2	2.000	11.33	0.150
3	2.000	14.00	0.125
4	2.000	18.00	0.100
5	2.000	24.67	0.075

**c) Priprava raztopin s FC reagentom**

20g natrijevega karbonata sem raztopila v 100 ml destilirane vode (za pripravo 16,67 % natrijevega karbonata). V čašo sem položila magnet za mešanje, da sem jo raztopila hitreje. Za pripravo raztopine s FC reagentom brez vzorcev sem dala 10 ml Folin – Ciocalteu reagenta v še eni čaši in ji dodala 10 ml destilirane vode.

Za pripravo čokoladnih vzorcev z FC reagentom sem vzela 0.5 ml čokoladnih vzorcev (brez dodanega DPPH reagenta) in jih dala v tri dodatne čaše, poimenovane po vsebnosti kakava v pripadajočih čokoladah. Vsaki izmed treh čaš sem dodala 2.5 ml raztopine FC reagenta, 30 ml destilirane vode in 7.5 ml natrijevega karbonata. Destilirano vodo sem dodatno dodala, da je raztopina doseglja volumen 50 ml. Čaše so pokrite z aluminijasto folijo in položene v temno omarico za 30 minut (čas inkubacije je bil vzet po Geremu, Tola and Sualeh (2016)). Po 30 minutah sem FC raztopine odkrila in 2 ml vsake raztopine sem prestavila v 3 nove čaše, vsaki pa sem dodala še 6 ml vode.

**d) Priprava kalibracijske krivulje galne kisline**

Za pripravo 1 mg/ml standarda galne kisline sem zmešala 100.0 mg (0.1g) galne kisline z 10 ml metanola, ki sem jo nato še dodatno raztopila v destilirani vodi, da raztopina doseže 100 ml (0.1L).

Standardi so narejeni z dodatnim redčenjem 1.00 mg/ml standarda galne kisline (Tabela 3). Standardi brez galne kisline so prav tako pripravljeni tako, da zmešamo 1 ml metanola z destilirano vodo, da doseže skupna raztopina 10 ml.

**Tabela 3: Delanje standardov galne kisline z serijskim redčenjem 1 mg/ml standarda galne raztopine**

Številka čaše	Količina dodanega standarda galne kisline s koncentracijo 1.00 mg/ml [ml]	H <sub>2</sub> O [ml]	Standard galne kisline [mg/ml]
1	1	9	0.100
2	2	8	0.200
3	3	7	0.300
4	5	5	0.500
5	10	0	1.000

Za pripravo kontrolnih vzorcev galne kisline za kalibracijsko krivuljo galne kisline sem vzela 0.5 ml vsakega vzorca galne kisline (vključno z standardom brez galne kisline pripravljenega prej) in ga dala v dodatne čaše, katerim sem dodala še 2.5 ml FC reagenta, 30 ml destilirane vode in 7.5 ml natrijevega karbonata. Dodatno sem dodala destilirano vodo, da raztopina doseže 50 ml. Čaše so pokrite z aluminijasto folijo in dane v temno omarico, kjer stojijo 30 minut.

Po 30 minutah sem vzela vzorce razredčene galne kisline iz teme in jih odvila. 7 ml vsake raztopine sem zmešala z 1 ml destilirane vode. Koncentracije raztopin v katerih sem zmerila absorbanco so prikazane v Tabeli 4.

**Tabela 4: Priprava kalibracijske krivulje galne kisline**

Številka čaše:	Koncentracija standarda galne kisline (v mg/ml):	Volumen dodane raztopine (v ml):	Volumen dodane destilirane vode (v ml):	Koncentracija raztopljenih vzorcev galne kisline:
1	0.100	7	1	0.0875
2	0.200	7	1	0.1750
3	0.300	7	1	0.2625
4	0.500	7	1	0.4375
5	1.000	7	1	0.8750

#### e) Merjenje polifenolov in antioksidantov v vzorcih

Absorbance vzorcev polifenolov, antioksidantov in kalibracijske krivulje galne kisline so bili izmerjeni z UV – Vis spektrofotometrom takoj po pripravi vsakega vzorca. Za meritve sem s kapalko dodala 3 ml raztopine.

Vernier UV – Vis spektrofotometer sem povezala z računalnikom. Za kalibracijsko krivuljo galne kisline je bil spektrofotometer kalibriran z standardom brez galne kisline, ki smo ga pripravili prej. Za kalibracijsko krivuljo sem uporabila program Vernier Spectral Analysis. Za meritve skupne vsebnosti polifenolov in antioksidativne kapacitete sem uporabila program Logger Pro. Za meritve skupne vsebnosti polifenolov je bil spektrofotometer kalibriran z destilirano vodo in za meritve antioksidativne kapacitete je bil spektrofotometer kalibriran z etanolom.

#### 3.2.4. Preliminarni testi

Preliminarni testi so bili narejeni za izboljšanje postopka, ki sem ga napisala po združitvi več različnih postopkov. Med eksperimentom ni bilo signifikantnih problemov, čeprav sem naredila manjše spremembe v postopku. Na začetku je bil v postopek vključeno 24 ur sušenja začetnega vzorca z heksanom. Rezultat je bila delna separacija supernatanta od usedline. Ker je bila separacija le delna in so bili trdi delci čokolade še vedno v zmesi, je bil potrebna dodatna centrifugacija za boljšo ločitev in manjše izgube trdega materiala. Ta korak je bil torej odstranjen v finalni verziji postopka, kjer je bila uporabljena le centrifugacija.

Dodatne težave so nastale z redčenjem vzorcev, ker v nobeni literaturi ni bilo podanih količin dodane destilirane vode, zato sem to ugotovila eksperimentalno, kar je pomenilo večkratno redčenje vzorcev v manjših količinah, da sem prišla do konsistentnih meritev v grafu.

Dodatni izračuni so bilo potrebni še za določitev količine DPPH reagenta, raztopljenega v etanolu. Za izračun mase potrebnega DPPH reagenta, sem poiskala molarno maso DPPH v teoriji (394.32 g/mol). Ker je 39.432 mg DPPH potrebnih za pripravo 0.1 mmol raztopine, je za pripravo potrebne 0.5 mmol raztopine potrebnih 197.16 mg (za 1 liter raztopine z etanolom, za pripravo 100 ml smo torej uporabili le 19,7 mg raztopine).

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

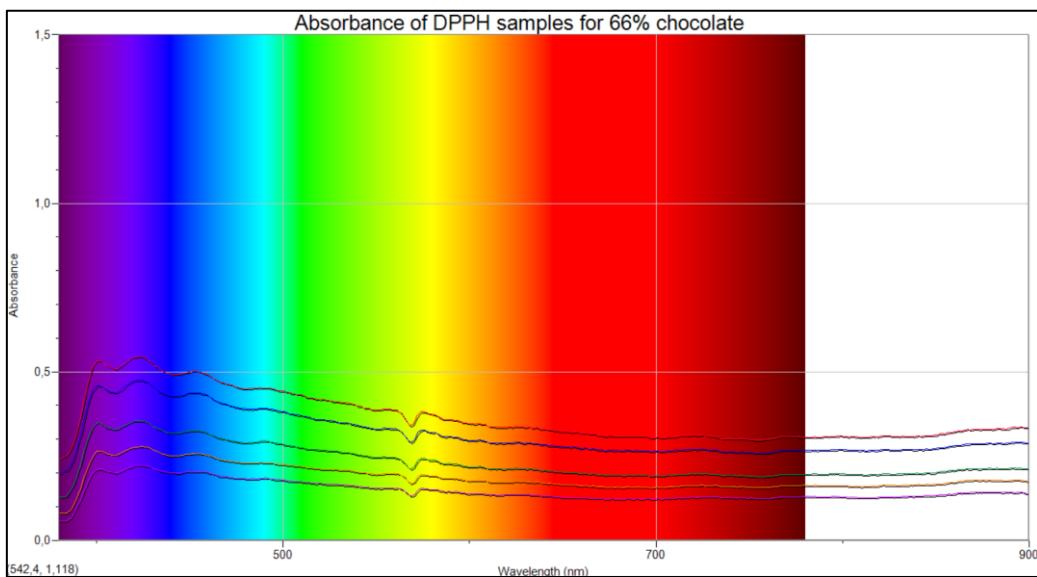
### 4.1. Neobdelani podatki

Iz eksperimenta so bili pridobljeni štirje grafi (trije z meritvami DPPH raztopine in eden z meritvami FC raztopine) ter tabela s koncentracijami vzorcev in absorbance, ki so bili kasneje uporabljeni za izračune ekvivalentov galne kisline. Tabela 5 kaže koncentracije razredčenih standardov galne kisline (izračunanih prej – glej Tabelo 4) na levi strani in absorbance pri 765 nm na desni strani Tabele 5.

**Tabela 5: Odvisnost absorbance glede na koncentracijo razredčenih vzorcev standardov galne kisline**

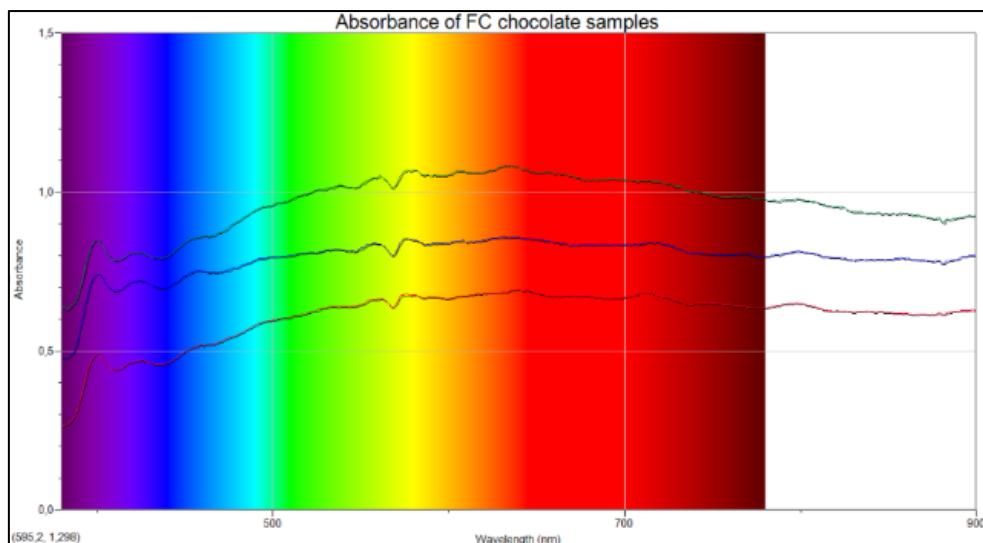
Številka čaše:	Koncentracije razredčenih standardov galne kisline (v mg/ml):	Absorbanca pri 765 nm:
1	0.0875	0.110
2	0.1750	0.204
3	0.2625	0.295
4	0.4375	0.457
5	0.8750	0.999

Trije grafi so bili pridobljeni za meritve čokoladnih vzorcev z DPPH reagenti – kasneje poimenovanih kot DPPH vzorci. Graf 1 kaže absorbanco DPPH vzorcev za 66 % čokolado, med valovnimi dolžinami od 380 nm in 900 nm. Rdeča krivulja kaže vzorce pri 0.2 koncentraciji (kasneje poimenovano z 20; enote kasneje uporabljeni so v g/100 ml), modra krivulja prikazuje vzorec s koncentracijo 0.15 (kasneje poimenovane z 15), zelena vzorec s koncentracijo 0.125 (kasneje označeo z 12.5), oranžna vzorec z koncentracijo 0.1 (kasneje označeno z 10) in vijolična krivulja vzorec s koncentracijo 0.075 (kasneje označeno z 7.5). Kontrolni vzorec je bil prav tako izmerjen in njegova absorbanca je bila izmerjena pri 0.686 nm. Grafi pri čokoladni vzorec s 77 % in 88 % kakava z DPPH reagentom so bili podobni Grafu 1, z izjemo dviga absorbanc ob čokoladi z višjim odstotkom kakava.



**Graf 1: Absorbanca pri 66 % čokoladnih DPPH vzorcih**

Graf 2 prikazuje četrти graf pridobljen v eksperimentu in prikazuje absorbance čokoladnih vzorcev z FC reagentom (kasneje poimenovane kot FC čokoladni vzorci) pri valovnih dolžinah 380 nm do 900 nm. Rdeča krivulja prikazuje čokoladni vzorec s 66 % kakava, modra krivulja čokoladni vzorec s 77 % kakava in zelena krivulja čokoladni vzorec s 88 % kakava.



**Graf 2: Absorbanca pri FC čokoladnih vzorcih**

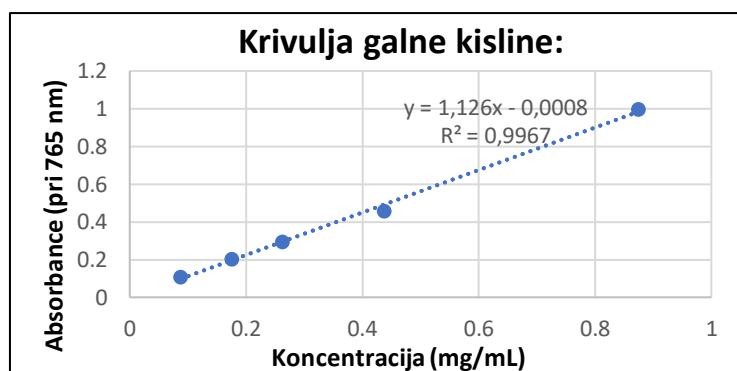
#### 4.1.1. Kvalitativni očitki

- Barva DPPH vzorec se je, po 30 minutah čakanja v temi, malo razlikovala, s čokoladnim vzorcem z 88 % kakava najtemnejše rumene barve in čokoladnim vzorcem s 66 % kakava z nasvetlejšo rumeno barvo.
- Barva FC vzorcev je po 30 minutah v temi ostala enaka – vse raztopine so bile enakega odtenka modre barve.
- V obeh grafih imajo čokoladni vzorci z višjimi odstotki kakava višjo absorbanco skozi vse valovne dolžine.

#### 4.2. Procesirani podatki

##### 4.2.1. Izračuni celotne vsebnosti fenolov

Po podatkih, ki so bili pridobljeni s pomočjo vzorcev z galno kislino je bil narejen graf galne kisline. Koncentracije vzorcev galne kisline so bile dane na x – os in absorbance pri 765.1 nm so bile dane na y – os.



**Graf 3: Krivulja galne kisline**

Iz grafa lahko opazimo standardno krivuljo galne kisline, ki jo lahko zapišemo z enačbo:  $y = 1.126x - 0.0008$ . Ekvivalent galne kisline (GAE) je bil izračunan po naslednji enačbi:  $x = (y + 0.0008) / 1.126$ . Za y so bile v izračunih uporabljene absorbance vzorcev pri 765.1 nm.

Za izračune skupne vsebnosti polifenolov je bila uporabljena naslednja enačba, privzeta po Maungchanburee et al. (2020):  $TPC = (C \times DF \times V) \div m$ ; C predstavlja koncentracijo galne kisline

(izračunane iz standardne krivulje), DF faktor redčenja (angleško dilution factor), V volumen vzorca in m maso vzorca.

Uporabljeni faktor redčenja je bil 3, volumen vzorca 3 ml, masa pa 250 mg pri vseh vzorcih. Za pretvorbo iz TPC (mg/ml) v TPC (mg/100g) so bile vrednosti TPC (mg/ml) pomnožene s celotnim volumnom vzorcev (24 ml), da sem lahko dobila TPC v mg/0.25g vzorcev. Te rezultati so bili nato pomnoženi s 400, zato da so bili lahko izraženi v mg/100g. Tabela 6 prikazuje rezultate izračunov za TPC.

**Tabela 6: Rezultati izračunov, potrebnih za skupno vsebnost polifenolov**

% čokoladnega vzorca	Masa suhega vzorca (v g)	Absorbanca vzorcev pri 765.1 nm	GAE koncentracije (v mg/ml)	TPC (v mg/ml)	TPC (v mg/100g)
66	0.25	0.640	0.56909	0.02049	196.68
77	0.25	0.803	0.71385	0.02570	246.71
88	0.25	0.985	0.87549	0.03152	302.57

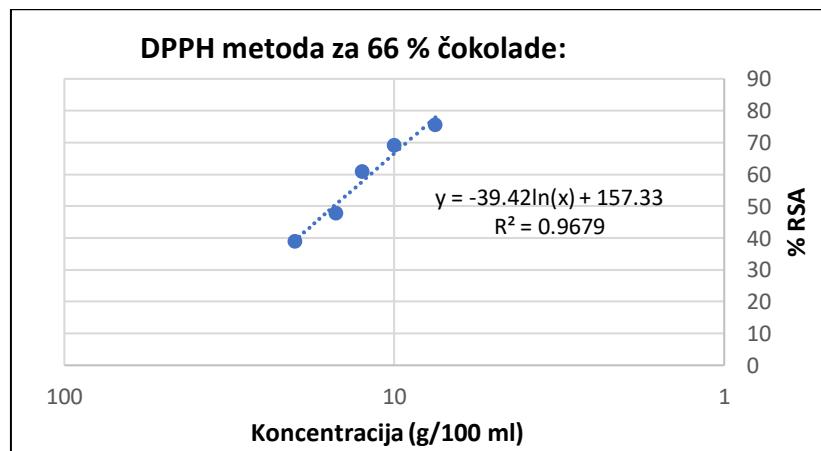
#### 4.2.2. Računanje antioksidativne kapacitete

Za izračunanje odstotka inhibicije je bila uporabljena naslednja enačba:

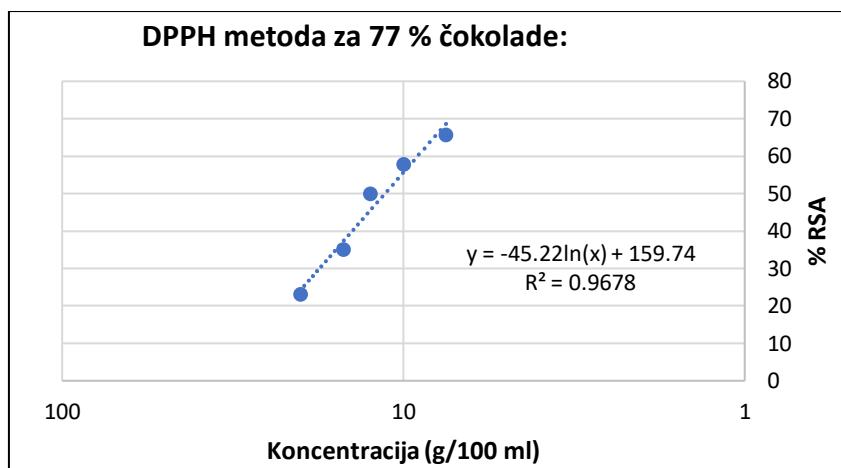
$$\% \text{ Radikalna aktivnost odstranjevanja} = \frac{\text{Absorbanca (kontrol)} - \text{Absorbanca (vzorec)}}{\text{Absorbanca (kontrol)}} \times 100,$$

ki je bila predlagana po Maungchanburee et al. (2020).

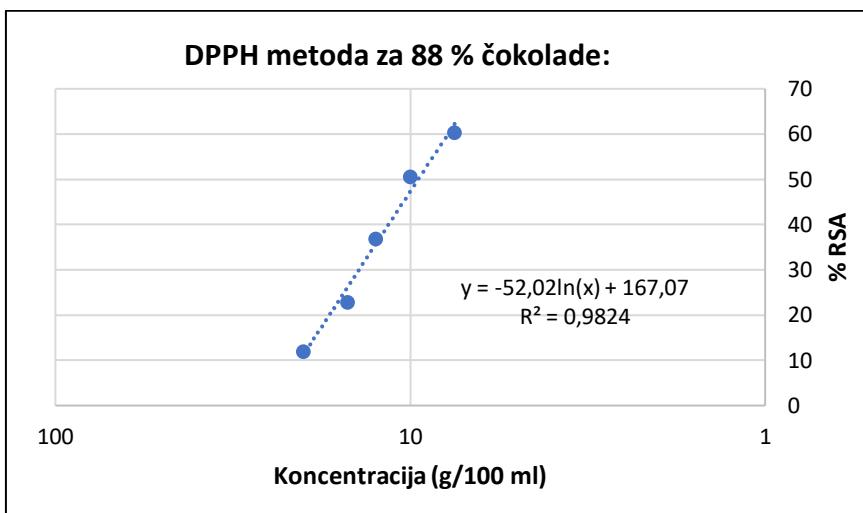
Absorbanca kontrole (ki je bila enaka za vse vzorce) in absorbance, ki so bile izmerjene iz vzorcev z različnimi odstotki čokolade, so prikazane v Tabeli 7. Odstotek radikalne aktivnosti odstranjevanja je bil izračunan iz grafa koncentracije s % RSA (% Radikalna aktivnost odstranjevanja), ki je bil izdelan iz čokolad iz istega odstotka kakava. EC50 za vse tri odstotne vrednosti kakava je bil izračunan iz enačbe premice,  $y = mx + k$ , kjer y predstavlja koncentracijo, m naklon premice, k presečišče in x vrednosti EC50. Grafi so bili izdelani v logaritemski skali, ker DPPH metode ne dajo linearnih rezultatov. EC50 je bil nato izračunan s potenciranjem x na potenco dobljenih rezultatov. Rezultati % RSA in EC50 so bili prepisani v Tabelo 7. Na vrhu tabele so zapisane različne koncentracije, saj so bile vse meritve merjene pri več različnih koncentracijah, da bi lahko izračunali EC50. Vse koncentracije so zapisane v g/100 ml. Začetna koncentracija vzorca je bila c = 20, kar pomeni koncentracijo 20 g/100 ml.



**Graf 4: DPPH metoda za 66 % čokoladne vzorce**



Graf 5: DPPH metoda za 77 % čokoladne vzorce

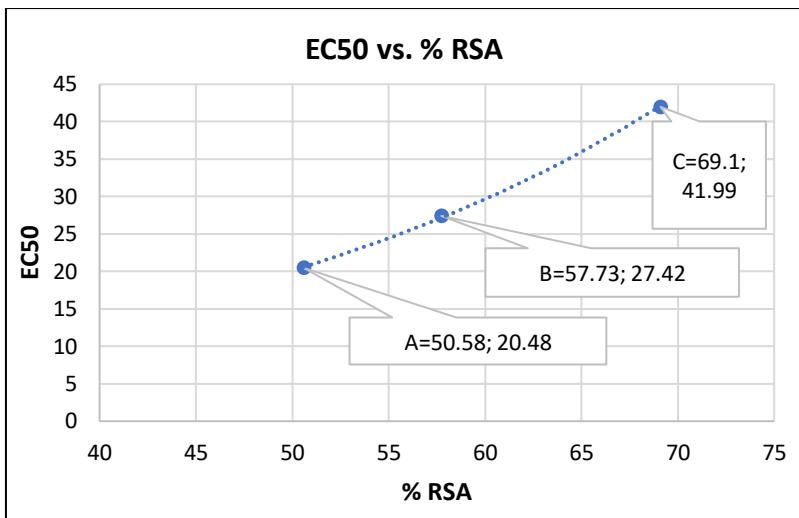


Graf 6: DPPH metoda za 88 % čokoladne vzorce

Tabela 7: Absorbanca, % RSA in EC50 pri različnih odstotkih čokolad

	c = 20	c = 15	c = 12,5	c = 10	c = 7,5
Absorbanca kontrole (v nm):	0.686	0.686	0.686	0.686	0.686
Absorbanca v 66 % vzorcu pri 517.3 nm:	0.419	0.358	0.269	0.212	0.168
Absorbanca v 77 % vzorcu pri 517.3 nm:	0.528	0.446	0.344	0.290	0.235
Absorbanca v 88 % vzorcu pri 517.3 nm:	0.603	0.529	0.433	0.339	0.272
% RSA v 66 % čokoladi:	38.92 %	47.81 %	60.79 %	69.10 %	75.51 %
% RSA v 77 % čokoladi:	23.03 %	34.99 %	49.85 %	57.73 %	65.74 %
% RSA v 88 % čokoladi:	12.01 %	22.89 %	36.88 %	50.58 %	60.35 %
EC50 v 66 % čokolada:	32.58	36.99	39.41	41.99	44.74
EC50 v 77 % čokolada:	21.98	24.55	25.95	27.42	28.98
EC50 v 88 % čokolada:	16.89	18.60	19.51	20.48	21.48

Dodaten graf je bil zrisan, da predstavlja odvisnost EC50 od odstotka radikalne aktivnosti odstranjevanja v čokoladah z različno vsebnostjo kakava. Za to so bile vzete vrednosti EC50 pri koncentraciji 10 g/100 ml, saj je EC50 enaka 50 % izgubljenega DPPH (začetna koncentracija je bila 20 g/100 ml).



**Graf 7: EC50 vs. %RSA**

Točka A na grafu 7 predstavlja čokolado s 88 % deležem kakava, točka B predstavlja čokolado s 77 % deležem kakava in točka C čokolado s 66 % kakava. V Grafu 7 se EC50 in %RSA dviguje eksponentno in lahko opazimo, da nižji odstotek radikalne aktivnosti odstranjevanja prikaže manjše vrednosti EC50. Manjše vrednosti EC50 pomenijo višje antioksidativne vrednosti, zato lahko sklepamo, da ima čokolada s 88 % deležem kakava večje antioksidativne lastnosti.

#### 4.2.3. Merske napake

- Upoštevati je treba **čas po 30-minutnem mirovanju raztopin** do redčenja in obdelave vzorcev, pri katerem vsaki naslednji raztopini dodamo  $\pm 1$  min. Upoštevati je potrebno tudi **čas od redčenja vzorcev** do merjenja vsakega vzorca, ki se spreminja za  $\pm 0,5$  min.
- Za eksperiment je bila uporabljena **merilna oprema**, kot je avtomatska pipeta, analitična tehnicka in merilni valj. Avtomatska pipeta ima mersko napako  $\pm 0,01$  ml, analitična tehnicka mersko napako  $\pm 0,0001$  g in merilni valj mersko napako  $\pm 0,5$  ml. Te merske napake je potrebno pri eksperimentu upoštevati večkrat (ob vsaki uporabi).
- Skozi eksperiment je treba upoštevati tudi napake, ki so nastale ob **prelivanju snovi** (iz ene opreme v drugo) ter ostale **človeške napake**.
- Za izračun % RSA in EC50 je potrebno uporabiti koncentracijo vzorca. **Predvidevala sem, da je gostota vzorca enaka gostoti vode**, zato je lahko koncentracija vzorca v eksperimentu enaka razmerju med vzorcem in vodo v raztopini.
- Ker so rezultati izraženi kot meritve antioksidantov in polifenolov za celotno ploščico čokolade (in dodatno za 100 g čokolade), je potrebno upoštevati mersko napako vzorca (za poskus sem uporabila le 2 g čokolade, kar je **lahko nereprezentativni vzorec**).
- Upoštevati je potrebno **nepopolno selektivnost** UV-Vis spektrofotometra, saj bi nekatere spojine v vzorcih čokolade lahko povečale signal UV-Vis spektrofotometer.
- **Kalibracija z analitom** pomembno vpliva na rezultate, zato je treba opozoriti na napake zaradi čistosti in koncentracije kalibrantov.

#### 4.2.4. Trendi in vrhovi

Iz grafov neobdelanih podatkov, je bilo mogoče opaziti naslednje tende:

- Prvič, iz absorbance čokolad z različno vsebnostjo kakava z DDPH metodo lahko vidimo, da imajo višje koncentracije vzorcev višje vrednosti absorbance. To je mogoče opaziti tudi kvantitativno, saj imajo višje koncentracije raztopin intenzivnejšo barvo. Če primerjamo še tri grafe, ki kažejo čokolade z različnim odstotkom kakava z reagentom DPPH (v raziskovalno nalogu je vključen le en graf za 66 % čokolado – glej Graf 1), lahko vidimo, da imajo čokolade z višjo vsebnostjo višje vrednosti absorbance. To ustreza teoretičnim podatkom in nadaljnjam

izračunom za merjenje antioksidativne kapacitete. Iz vseh treh dobljenih grafov smo lahko opazili tudi začetno povečanje absorbance, sledilo pa je rahlo znižanje vseh vrednosti absorbance, kar približno ustreza absorpcijskemu spektru DPPH reagenta. Prav tako lahko domnevamo, da DPPH ni popolnoma reagiral, saj barva ni bila pričakovana (svetlo rumena) temveč je bila nekoliko temnejša, vrh na grafu pa ni bil opažen pri 520 nm.

- Drugič, iz vrednosti absorbance iz vzorcev s FC reagentom (glej Graf 2) je bilo razvidno, da imajo vzorci čokolad z višjim odstotkom kakava s FC reagentom višje vrednosti absorbance. To ustreza teoretičnim podatkom in nadaljnji izračunom skupne vsebnosti fenolov. V obeh grafih pomembnih vrhov ni opaziti.

Grafi 4, 5 in 6 prikazujejo splošno znižanje vrednosti % RSA s povečanjem koncentracije. Vsak naslednji graf je imel nižje vrednosti % RSA pri enakih koncentracijah vzorcev, z vzorcem 66 % čokolade z največjimi vrednostmi % RSA ter vzorcem 88 % čokolade najmanjših vrednostih % RSA, zato so rezultati skladni s teoretičnimi podatki in kasnejšimi izračuni antioksidativne kapacitete. Zanimivo je, da se je koncentracija 15 g/100 ml najbolj razlikovala od enačbe premice, kar kaže na največjo mersko napako tega vzorca.

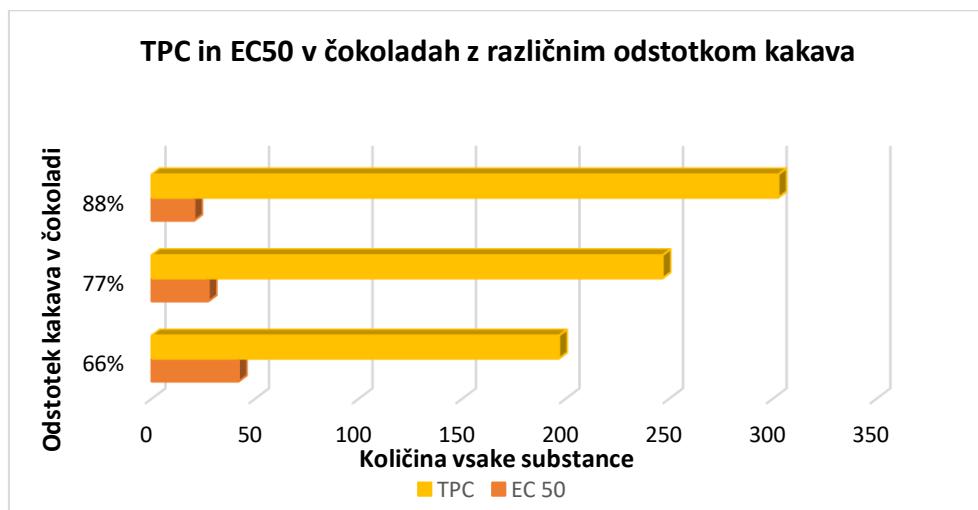
## 5. ZAKLJUČEK IN SKLEPI

### 5.1. Potrditev hipotez

- Trend je skladen s teoretičnimi podatki.

Polovična efektivna koncentracija (EC 50) kaže koncentracijo substrata, ki povzroči 50 odstotno izgubo aktivnosti DPPH, kar kaže na število antioksidantov oziroma snovi, ki kažejo antioksidativne lastnosti. Nižja je vrednost EC 50, višje antioksidativne lastnosti ima snov. Ker je bila v čokoladah z višjim odstotkom kakava nižja vrednost EC 50, lahko sklepamo, da imajo čokolade z višjim odstotkom kakava večje antioksidativne lastnosti.

- Hipoteza 1 je bila **podprta**, saj so čokolade z višjim odstotkom kakava imele tako višjo skupno vsebnost polifenolov kot tudi višjo antioksidativno kapaciteto.
- Hipoteza 2 je bila **podprta**, saj sta skupna vsebnost polifenolov in antioksidativna kapaciteta, izračunana z metodami z reagentoma FC in DPPH, linerano odvisni.



Graf 8: TPC in EC50 v čokoladah z različnim odstotkom kakava

Čeprav vrednosti TPC in EC 50 nimata enakih metričnih enot, sem narisala graf, saj jasno predstavlja korelacijo med njima. Iz Grafa 8 lahko razberemo, da se z zmanjšanjem odstotka kakava v čokoladah, zmanjšujejo tudi vrednosti TPC, povečujejo pa se vrednosti EC 50. Ker višje vrednosti EC 50 predstavljajo nižjo antioksidativno sposobnost, je mogoče sklepati, da imajo čokolade z višjim

odstotkom kakava višjo skupno vsebnost fenolov (ki jo predstavljajo višje vrednosti TPC v grafu) in višjo antioksidativno zmogljivost, kar kaže na inverzno razmerje med vrednostmi EC 50 in vrednostmi TPC ter na pozitivno korelacijo med vrednostmi TPC in antioksidativno kapaciteto.

## 5.2. Zaključek

Rezultati te raziskave podpirajo ugotovitve ostalih raziskav in teoretične osnove. V eksperimentu je bila dokazana močna korelacija med tako antioksidativno kapaciteto in totalno vsebnostjo polifenolov ter odstotki kakava v temni čokoladi. Ker se število polifenolov in njihova antioksidativna aktivnost v čokoladah razlikujeta glede na kvaliteto in kvantiteto sestavin, ki jih uporabljajo različna podjetja, je težko posplošiti vrednosti skupne vsebnosti polifenolov in antioksidativne kapacitete na ostale raziskave, saj število med njimi močno variira. V podobnih raziskavah sem za skupno vsebnost polifenolov našla vrednosti med 1 in nekaj tisoč mg/100 g, za EC 50 pa vrednosti med 10 in približno 200 g/100 ml. Te rezultate primerjam z mojo raziskavo: dobljene vrednosti so 196.68, 246.71 in 302.57 mg/100 g za skupne vsebnosti polifenolov ter 27.75, 22.34 in 18.85 g/100 ml za EC50 (za uporabljeni povprečno koncentracijo). Podobna raziskava da Silva Medeiros et al. (2015) je raziskovala skupno vsebnost polifenolov kot tudi antioksidativno kapaciteto z enakimi metodami. Ugotovitve moje raziskave podpirajo raziskavo da Silva Medeiros et al.(2015), saj so bile pridovljene podobne vrednosti TPC in EC50, vendar je moja raziskava zasnovana bolje, saj za razliko od da Silva Medeiros et al. (2015) variira med odstotki kakava v temni čokoladi.

## 5.3. Prednosti in slabosti

Za eksperiment izračunane vrednosti TPC in EC50 niso bile ključne, saj se je raziskava osredotočila na trende, ki jih je mogoče opaziti med čokoladami z različnim odstotkom kakava. To pomeni, da če rezultati te raziskave ne bi bili podobni rezultatom drugih raziskav, temveč le teoretičnim vrednostim, bi bili **trendi**, katere smo lahko opazili (in so vključevali povečanje skupne vsebnosti polifenolov in antioksidativne kapacitete ob povečanju odstotkov kakava v čokoladi), **zadostni za podporo hipotez**.

Tako vrednosti EC 50 kot tudi TPC nakazujejo, da so bile **metode uporabljene v študiji uspešne in natančne**, saj so se moji rezultati ujemali z teoretičnimi vrednostmi.

Druga prednost eksperimenta je njegova **uporabnost**, saj se tematika vsebine hrane pogosto pojavlja v našem življenju. Čeprav obstajajo omejitve pri razširitvi rezultatov na druge tipe čokolad (razložene kasneje v slabostih), lahko opažene trende posplošimo. Ker smo zasledili višjo skupno vsebnost polifenolov v čokoladah z višjo vsebnostjo kakava, lahko sklepamo, da bi bile **čokolade z višjo vsebnostjo kakava boljše za naše zdravje**. Razlog zato so polifenoli, ki imajo številne koristi za zdravje, vključno z antioksidativnimi lastnostmi (ki so bile v eksperimentu tudi izračunane) in ščitijo naše celice pred prostimi radikali ter s tem igrajo pomembno vlogo pri preprečevanju bolezni srca, raka in drugih bolezni.

Kljud temu, da bi lahko pomislili na vzročno zvezo med polifenoli in njihovimi koristmi za zdravje, obstajajo številni dejavniki, ki prispevajo k hranilni vrednosti čokolade in so razširjeni čez celoten proces izdelave čokolade (taki dejavniki so na primer lokacije farm kakava, kakovost ostalih sestavin itd.), kar pomeni, da med polifenoli in koristi, ki naj bi jih imeli za zdravje **ne moramo vzpostaviti vzročne zveze**; lahko pa predvidevamo korelacijski odnos med njima. Vsaka čokolada ni narejena na enak način, zato je kot take ne bi smeli obravnavati.

Pomembno je poudariti, da ugotovitve te študije **ni mogoče razširiti na vse čokolade** (oziora moramo rezultate razširjati z rezervo), saj uporabljajo različna čokoladna podjetja različne sestavine, zaradi česar se posledično čokolade razlikujejo po skupni vsebnosti polifenolov in antioksidativnem delovanju. Te študije prav **tako ni mogoče uporabiti za druge tipe čokolad** (na primer belo, rubin, mlečno itd.), saj so te čokolade narejene iz različnih sestavin. Za razširjanje rezultatov na druge snovi je potrebno opraviti dodatne raziskave.

Metode, uporabljene v eksperimentu, lahko uporabimo tudi pri raziskovanju skupne vsebnosti polifenolov in antioksidativne kapacitete v drugih snoveh, vendar **rezultatov ni mogoče razširiti na druge snovi** (kot so različne rastline in zdravila itd.).

Eksperiment je bil narejen z **dolgim postopkom dela**, ki je bil sestavljen iz začetnih vzorcev in vzorcev narejenih iz njih, zato **postopek ni bil ponovljen večkrat** (na dodatnih vzorcih). Zaradi tega ni mogoče izračunati merskih napak glede različnih variacij vzorca, kar poveča možnosti naključnih napak. Za replikacijo vzorcev bi bilo potrebno uporabiti več začetnih vzorcev (kar pomeni, da bi bila vsaka meritev najmanj dvakrat daljša in kemikalij mnogo več). Za natančnejše rezultate bi bil lahko poskus ponovljen vsaj petkrat za vsako odstotno vrednost čokolade (za vsako odstotno vrednost bi torej morali izmeriti skupno vsebnost polifenolov ter antioksidativno kapaciteto).

#### **5.4. Razširitve ter predlogi za nadaljnje delo**

Možne razširitve bi lahko zajemale merjenje celotne vsebnosti flavonoidov, reduksijsko moč, kvantitativno določanje proantocianinov itd. pri enakih odstotkih kakava v čokoladah, da bi lahko ugotovili, če obstajajo tudi odvisnosti med drugimi lastnosti čokolade.

Tako skupna vsebnost polifenolov kot tudi antioksidantna kapaciteta sta bili izmerjeni z izbranimi metodama, vendar obstaja vrsta drugih metod, s katerimi ju lahko izmerimo (take so na primer TEAC, FRAP, CUPRAC test za merjenje antioksidativne kapacitete in UPLC ter Sommersova metoda za skupno vsebnost polifenolov). Za nadaljnje raziskovanje bi lahko ovrednotili tudi ostale metode.

Lokalne čokoladnice bi lahko svoje čokoladne izdelke testirale glede na vsebnost polifenolov in raziskale antioksidativne značilnosti (pri podprtju rezultatov ter postopku dela bi si lahko pomagale z mojo raziskavo) ter z rezultati izboljšali svoje tržne strategije.

Glede na to, da čokolade niso edine, ki vsebujejo polifenole in imajo antioksidativne lastnosti (drugi izdelki vključujejo na primer vino, borovnice itd.), bi bilo zanimivo raziskati še druga živila (in rastline) in ugotoviti, če se izsledki te raziskave povezujejo z njimi.

## 6. VIRI IN LITERATURA

Aprotosoaie, A.C., Luca, S.V. and Miron, A. (2015). Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products-An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, [online] 15(1), pp.73–91.

Pridobljeno 18. 11. 2021 s: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12180>

Barchan, A., Bakkali, M., Arakrak, A., Pagán, R. and Laglaoui, A. (2014). The effects of solvents polarity on the phenolic contents and antioxidant activity of three *Mentha* species extracts.

*International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, [online] 3(11), pp.399–412.

Pridobljeno 18. 11. 2021 s:

[https://www.researchgate.net/publication/272825677\\_The\\_effects\\_of\\_solvents\\_polarity\\_on\\_the\\_phenolic\\_contents\\_and\\_antioxidant\\_activity\\_of\\_three\\_Mentha\\_species\\_extracts](https://www.researchgate.net/publication/272825677_The_effects_of_solvents_polarity_on_the_phenolic_contents_and_antioxidant_activity_of_three_Mentha_species_extracts)

da Silva Medeiros, N., Koslowsky Marder, R., Farias Wohlenberg, M., Funchal, C. and Dani, C. (2015). Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Types of Chocolate, Milk, Semisweet, Dark, and Soy, in Cerebral Cortex, Hippocampus, and Cerebellum of Wistar Rats. *Biochemistry Research International*, [online], pp.1–9. Pridobljeno 18. 11. 2021 s:

<https://doi.org/10.1155/2015/294659>

Do, Q.D., Angkawijaya, A.E., TranNguyen, P.L., Huynh, L.H., Soetaredjo, F.E., Ismadji, S. and Ju, Y.-H. (2013). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, [online] 22(3), pp.296–302.

Pridobljeno 18. 11. 2021 s: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1021949813001348>

Eppendorf (2019). *Basics in Centrifugation*. [online] Pridobljeno 18. 11. 2021 s: <https://handling-solutions.eppendorf.com/sample-handling/centrifugation/safe-use-of-centrifuges/basics-in-centrifugation/>

Geremu, M., Tola, Y.B. and Sualeh, A. (2016). Extraction and determination of total polyphenols and antioxidant capacity of red coffee (*Coffea arabica* L.) pulp of wet processing plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, [online] 3(1), p.25. Pridobljeno 18. 11. 2021 s:

<https://doi.org/10.1186/s4053801600771>

Grassi, D., Desideri, G., Necozione, S., Lippi, C., Casale, R., Properzi, G., Blumberg, J.B. and Ferri, C. (2008). Blood Pressure Is Reduced and Insulin Sensitivity Increased in GlucoseIntolerant, Hypertensive Subjects after 15 Days of Consuming HighPolyphenol Dark Chocolate. *J Nutr*, [online] 138(9), pp.1671–1676. Pridobljeno 12. 12. 2021 s: <https://doi.org/10.1093/jn/138.9.1671>

Krämer, A., Engel, A., Kadow, D., Ali, N., Umaharan, P., Kroh, L.W. and Schulz, H. (2015). Fast and neat – Determination of biochemical quality parameters in cocoa using near infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, [online] 181, pp.152–159. Pridobljeno 18. 11. 2021 s:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814615002745>

Lugavere, M. and Grewal, P. (2018). *Genius foods: become smarter, happier, and more productive while protecting your brain for life*. New York, Ny: Harper Wave.

Malta, L.G., Liu, R.H. and Alfen, V. (2014). Analyses of Total Phenolics, Total Flavonoids, and Total Antioxidant Activities in Foods and Dietary Supplements. In: N.K. Van Alfen, ed., *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*. [online] Oxford: Academic Press, pp.305–314. Pridobljeno 18. 11. 2021 s: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444525123000589>

Maungchanburee, S., Phongseeput, S., Thongsri, O., Majuy, M. and Chaithada, P. (2020). Study of antioxidant activities, total phenolic content and total flavonoid content of the extracts of Monochoria vaginalis and Cissus repens Lamk. using different solvents - ProQuest.

[www.proquest.com](http://www.proquest.com), [online] 12(3), pp.356–359. Pridobljeno 18. 11. 2021 s:

<https://www.proquest.com/openview/6f325c799b94a0ab8566ae794ce01e0c/1?pq-origsite=gscholar&cbl=54977>

Molyneux, P. (2003). The use of the stable radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, [online] 26(2), pp.211–219. Pridobljeno 18. 11. 2021 s:

[https://www.researchgate.net/publication/237620105\\_The\\_use\\_of\\_the\\_stable\\_radical\\_Diphenylpicrylhydrazyl\\_DPPH\\_for\\_estimating\\_antioxidant\\_activity](https://www.researchgate.net/publication/237620105_The_use_of_the_stable_radical_Diphenylpicrylhydrazyl_DPPH_for_estimating_antioxidant_activity)

Övet, B. (2015). *Investigation of antioxidant capacity and phenolic contents of chocolates in the Turkish market*. Pridobljeno 18. 11. 2021 s: <https://open.metu.edu.tr/handle/11511/24658>

Piluzza, G. and Bullitta, S. (2011). Correlations between phenolic content and antioxidant properties in twentyfour plant species of traditional ethnoveterinary use in the Mediterranean area. *null*, [online] 49(3), pp.240–247. Pridobljeno 18. 11. 2021 s:

<https://doi.org/10.3109/13880209.2010.501083>

Rajbhar, K., Dawda, H. and Mukundan, U. (2014). Polyphenols: methods of extraction. *Scientific Reviews & Chemical Communications*, [online] 5(1), pp.1–6. Pridobljeno 18. 11. 2021 s:  
[https://www.researchgate.net/publication/312554206\\_Polyphenols\\_methods\\_of\\_extraction](https://www.researchgate.net/publication/312554206_Polyphenols_methods_of_extraction)

Ravishankar, G.A. and Ambati, R.R. (2019). *Handbook of Algal Technologies and Phytochemicals ; Volume I Food, Health and Nutraceutical Applications*. Boca Raton Fl: Crc Press.

Rubio, C.P., Hernández-Ruiz, J., Martinez-Subiela, S., Tvarijonaviciute, A. and Ceron, J.J. (2016). Spectrophotometric assays for total antioxidant capacity (TAC) in dog serum: an update. *BMC Veterinary Research*, [online] 12(1), p.166. Pridobljeno 18. 11. 2021 s:  
<https://doi.org/10.1186/s1291701607927>

Pečar, S., Mravljak, J., Anderluh, M., Gašperlin, M., Grubič, Z., Krbavčič, A., Plesničar B. and Štrukelj B. (2015). *Šumi življenja ali Radikali in druge reaktivne snovi v telesu*. Ljubljana: Slovensko Farmacevtsko Društvo.

Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S., LuximonRamma, A., Aruoma, O.I. and Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Inflammation, cellular and redox signalling mechanisms in cancer and degenerative diseases*, [online] 579(1), pp.200–213. Pridobljeno 18. 11. 2021 s:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0027510705002587>

Wollgast, J. and Anklam, E. (2000). Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, [online] 33(6). Pridobljeno 18. 11. 2021 s:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996900000685>

### **Viri slik:**

Afoakwa, E. (2010). Nutritional and Health Benefits of Cocoa and Chocolate Consumption. In: *Chocolate Science and Technology*. [online] Blackwell Publishing, p.91100. Pridobljeno 10. 12. 2021 s:  
<https://doi.org/10.1002/9781444319880.ch6>

Ford, L., Theodoridou, K., Sheldrake, G.N. and Walsh, P.J. (2019). A critical review of analytical methods used for the chemical characterisation and quantification of phlorotannin compounds in brown seaweeds. *Phytochemical Analysis*, [online] 30(6), pp.587–599. Pridobljeno 18. 11. 2021 s:  
Available at: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pca.2851>

Övet, B. (2015). *Investigation of antioxidant capacity and phenolic contents of chocolates in the Turkish market*. Pridobljeno 18. 11. 2021 s: <https://open.metu.edu.tr/handle/11511/24658>

Wikipedia. (2021). *Phenols*. [online]. Pridobljeno 18. 11. 2021 s:  
<https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Phenols&oldid=1029567071>