

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA KRAMBERGER

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA KRAMBERGER

**VPLIV IZBRANIH IZVLEČKOV ESTRAKCIJE S SUPERKRITIČNIM
OGLJIKOVIM DIOKSIDOM, DODANIH LANENEMU OLJU, NA NJEGOVO
PEROKSIDNO IN ANIZIDINSKO ŠTEVILO**

**EFFECT OF SELECTED SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE EXTRACTS
ADDED TO LINSEED OIL ON ITS PEROXIDE AND ANISIDINE VALUE**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani na Katedri za farmacevtsko biologijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Nine Kočever Glavač, mag. farm.

Zahvala

V prvi vrsti se iskreno zahvaljujem svoji mentorici za usmerjanje in pomoč med praktičnim delom ter za svetovanje pri snovanju naloge. Hvala vam za prijaznost, dostopnost in proaktivnost. Hvala tudi izr. prof. dr. Damjanu Janešu, mag. farm., za izvedbo GC-MS meritev.

Posebna zahvala gre mojima staršema, ki sta mi omogočila brezskrben študij, me vzpodbujala in mi stala ob strani, ko je bilo naporno.

Hvala tudi tebi, Tadej, za nasvete in pomoč pri oblikovanju te naloge, predvsem pa za potrpežljivost v zadnjih mesecih.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Nine Kočever Glavač, mag. farm.

Katja Kramberger

Predsednik komisije: prof. dr. Danijel Kikelj

Mentorica: izr. prof. dr. Nina Kočever Glavač

Članica komisije: asist. dr. Nanča Čebren Lipovec

Ljubljana, 2018

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1. UVOD.....	1
1.1. Laneno olje	1
1.1.1. Pridobivanje in uporaba.....	1
1.1.2. Kemijska sestava olja in semena	3
1.1.3. Esencialne maščobne kisline in njihov vpliv na zdravje	4
1.2. Oksidativna nestabilnost rastlinskih olj	6
1.2.1. Mehanizem avtooksidacije in vloga antioksidantov.....	7
1.2.2. Fotooksidacija.....	8
1.2.3. Žarkost rastlinskih olj in vpliv na zdravje	9
1.2.4. Načini preprečevanja in zaviranja oksidacije	9
1.3. Rastlinski izvlečki.....	10
1.3.1. Rastlinski izvlečki kot antioksidanti.....	10
1.3.2. Ekstrakcija s superkritičnimi tekočinami	11
1.4. Vrednotenje oksidativnega stanja rastlinskih olj	12
2. NAMEN DELA	13
3. MATERIALI IN METODE	14
3.1. Materiali.....	14
3.1.1. Vzorci olja z dodanimi rastlinskimi izvlečki.....	14
3.1.2. Reagenti in topila	15
3.1.3. Aparature in laboratorijska oprema.....	16
3.2. Metode	17

3.2.1.	Pospešeni preizkusi oksidativne stabilnosti	17
3.2.2.	Peroksidno število	17
3.2.3.	Anizidinsko število.....	18
3.2.4.	Totoks število	20
3.2.5.	Analiza rastlinskih izvlečkov s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektroskopijo.....	20
4.	EKSPERIMENTALNO DELO.....	22
4.1.	Priprava vzorcev za staranje	22
4.2.	Peroksidno število.....	22
4.3.	Anizidinsko število	25
4.4.	GC-MS analiza rastlinskih izvlečkov	27
5.	REZULTATI IN RAZPRAVA	28
5.1.	Peroksidno število.....	28
5.2.	Anizidinsko število	41
5.3.	Totoks število.....	44
5.4.	Analiza z GC-MS.....	45
6.	SKLEP	48
7.	LITERATURA	49
8.	PRILOGE	55

KAZALO SLIK

<i>Slika 1: Tipi maščobnih kislin in njihovo oštevilčevanje, prirejeno po (9) in (10): maščobne kisline ločimo glede na prisotnost in število dvojnih vezi na nasičene in nenasičene maščobne kisline, ki so lahko enkrat (ENMK) ali večkrat (VNMK) nenasičene (9). Večkrat nenasičene maščobne kisline razdelimo nadalje na ω-3 in ω-6. Pri večkrat nenasičenih maščobnih kislinah ω-3 je prva dvojna vez na tretjem ogljikovem atomu, gledano z metilnega konca verige ogljikovodikov, pri ω-6 pa na šestem (11).</i>	1
<i>Slika 2: Metabolne poti pretvorbe linolne in α-linolenske kisline pri sesalcih in rastlinah, prirejeno po (27).</i>	5
<i>Slika 3: Shema avtooksidacije in mehanizem delovanja antioksidantov, prirejeno po (15, 34, 35, 37).</i>	8
<i>Slika 4: Fazni diagram ogljikovega dioksida, prirejeno po (62).</i>	12
<i>Slika 5: Shema reakcije p-anizidina z nenasičenim aldehydom, prirejeno po (35).</i>	19
<i>Slika 6: Shema naprave GC-MS, prirejeno po (77).</i>	21
<i>Slika 7: Delovni pult za ugotavljanje peroksidnega števila (reagenti, vzorci in pribor). ...</i>	25
<i>Slika 8: Delovni pult za ugotavljanje anizidinskega števila (reagenti, vzorci in pribor). ...</i>	26
<i>Slika 9: Graf časovne odvisnosti peroksidnega števila za vzorce navadnega regrata (vzorec 2) različnih koncentracij in olja brez izvlečka.</i>	28
<i>Slika 10: Graf časovne odvisnosti peroksidnega števila za vzorce šentjanževke (vzorec 3) različnih koncentracij in olja brez izvlečka.</i>	29
<i>Slika 11: Graf časovne odvisnosti peroksidnega števila za vzorce gloga (vzorec 4) različnih koncentracij in olja brez izvlečka.</i>	30
<i>Slika 12: Graf časovne odvisnosti peroksidnega števila za vzorce peščenega smilja (vzorec 5) različnih koncentracij in olja brez izvlečka.</i>	31
<i>Slika 13: Graf časovne odvisnosti peroksidnega števila za vzorce oljke (vzorec 8) različnih koncentracij in olja brez izvlečka.</i>	31
<i>Slika 14: Graf časovne odvisnosti peroksidnega števila za vzorec črnega bezga CV3 (vzorec 12) različnih koncentracij in olja brez izvlečka.</i>	32
<i>Slika 15: Graf časovne odvisnosti peroksidnega števila za vzorce vitamina E različnih koncentracij in olja brez izvlečka.</i>	33
<i>Slika 16: Primerjava vrednosti PV za sveže vzorce, ugotovljene takoj po pripravi.</i>	34
<i>Slika 17: Vrstični grafikon prikazuje čas v dnevih, ko PV doseže vrednost 15 mEq/kg. Vrednosti smo odčitali z osnovnih grafov in jih združili za vzorce z enakimi rezultati.</i>	36
<i>Slika 18: Spreminjanje barve vzorca olja (brez izvlečka) med titracijo: a) olje v topilu, b) olje po 1 minuti dodatka KI, c) olje med dodajanjem tiosulfata, d) olje po dodatku škrobovice, e) po ekvivalentni točki.</i>	38
<i>Slika 19: Spreminjanje barve vzorca olja z izvlečkom oljke (0,5 %) med titracijo: a) vzorec v topilu, b) vzorec po 1 minuti dodatka KI, c) vzorec med dodajanjem tiosulfata, d) vzorec po dodatku škrobovice, e) po ekvivalentni točki.</i>	38

<i>Slika 20: Barvni preskoki med standardizacijo natrijevega tiosulfata: a) Po dodatku KI, b) proti skorajšnji nevtralizaciji joda, c) po dodatku škrobovice.</i>	38
<i>Slika 21: Histogram prikazuje skupen doprinos k anizidinskemu številu. Z modro barvo so podane vrednosti p-AV na začetku, z zeleno pa ob koncu staranja.</i>	42
<i>Slika 22: Histogram prikazuje končne vrednosti totoks števila – po enomesečnem staranju.</i>	45

KAZALO PREGLEDNIC

<i>Preglednica I: Sestava lanenega olja, prirejeno po (3, 6, 15). Okrajšave za maščobne kisline: Ln – linolenska, L – linolna, O – oleinska, P – palmitinska, S – stearinska.</i>	4
<i>Preglednica II: Proučevane rastline oz. izvlečki, njihove sestavine z antioksidativnim delovanjem in njihovi učinki, dokazani v in vitro in in vivo raziskavah ali privzeti iz tradicionalne medicine.</i>	11
<i>Preglednica III: Proučevani rastlinski izvlečki in olje.</i>	14
<i>Preglednica IV: Sestava vitamina E.</i>	15
<i>Preglednica V: Deklarirana sestava olja (68).</i>	15
<i>Preglednica VI: Priporočene natehte vzorcev glede na pričakovano peroksidno število (72).</i>	24
<i>Preglednica VII: Seznam spojin, identificiranih v izvlečkih, ki bi lahko bile odgovorne za antioksidativno delovanje, njihov delež in sprememba v sestavi po staranju 2 tedna. Podajamo tudi delež neidentificiranih spojin v posameznem vzorcu. Deleži so podani v relativnih % površine (površina pod krivuljo vrha/površina pod vsemi krivuljami vrhov × 100).</i>	47

KAZALO PRILOG

<i>Priloga 1: Rezultati metode ugotavljanja peroksidnega števila v meq O₂/kg olja in RSD-ji treh meritev v %.</i>	55
<i>Priloga 2: Rezultati metode ugotavljanja peroksidnega števila (meq O₂/kg olja) za izbrane sveže pripravljene vzorce (tri ponovitve). Z rdečo barvo so označene vrednosti, ki so večje kot pri kontroli.</i>	56
<i>Priloga 3: Rezultati metode ugotavljanja anizidinskega števila na začetku staranja (vrednosti nimajo enote). Podane absorbance so povprečje treh meritev, M – modificiran postopek. Z rdečo barvo so označene vrednosti, ki so večje kot pri kontroli.</i>	56
<i>Priloga 4: Rezultati metode ugotavljanja anizidinskega števila po koncu staranja (vrednosti nimajo enote). Podane absorbance so povprečje treh meritev, M – modificiran postopek. Z zeleno barvo so označene vrednosti, ki so manjše kot pri kontroli.</i>	57
<i>Priloga 5: Vrednosti totoks števila na začetku in na koncu staranja.</i>	58

POVZETEK

Laneno olje je zaradi zelo velike vsebnosti esencialne α -linolenske kisline pogosta sestavina nutricevtikov za ohranjanje zdravega srca. Visoka stopnja nenasičenosti ga dela občutljivega za oksidacijo, zato je neustrezno shranjevano laneno olje hitro podvrženo kvarjenju. Za podaljšanje roka uporabnosti mu je med proizvodnjo smiselno dodati antioksidante. Običajno uporabljeni sintezni antioksidanti lahko ob dolgotrajni uporabi izkazujejo toksične učinke, zato so številne raziskave usmerjene v iskanje učinkovitih in bolj varnih naravnih antioksidantov.

Namen naloge je bil raziskati vpliv rastlinskih izvlečkov, pridobljenih z ekstrakcijo s superkritičnim ogljikovim dioksidom, na oksidativno stabilnost lanenega olja. Uporabili smo izvlečke navadnega regrata, šentjanževke, gloga, peščenega smilja, oljke in črnega bezga. Za primerjavo nam je kot uveljavljen antioksidant služil vitamin E. Vzorce olja z dodanimi izvlečki v štirih koncentracijah smo starali pri 40 °C v temi in na sobni temperaturi, nezaščitene pred svetlobo in zrakom. Metodi za ugotavljanje oksidativnega stanja sta bili peroksidno število, kot kazalec primarnih razpadnih produktov, in anizidinsko število, ki ponazarja razpad primarnih in nastanek sekundarnih produktov oksidacije. S seštevkom obeh vrednosti v obliki totoks števila smo ocenili celoten obseg oksidacije. Nadalje smo z metodo plinske kromatografije, sklopljene z masno spektroskopijo, opazovali sestavo izvlečkov in spreminjanje le-te s staranjem.

Najboljše celokupne rezultate smo dobili za vzorce črnega bezga in peščenega smilja, ki so upočasnili kvarjenje lanenega olja, izvlečki črnega bezga celo boljše kot vitamin E. Ostali izvlečki niso izkazali pomembnega vpliva na povečanje oksidativne stabilnosti olja. Izvlečki šentjanževke, oljke in gloga so celo pospešili kvarjenje.

V bodoče bi morali proučevanim izvlečkom določiti popolno fitokemijsko sestavo in opraviti dodatne teste antioksidativne aktivnosti za najbolj obetavne izvlečke.

Ključne besede

Laneno olje, lipidna oksidacija, peroksidno število, anizidinsko število, rastlinski izvlečki

ABSTRACT

Linseed oil is a common component of nutraceuticals for preserving heart health due to its very high content of α -linolenic acid. The high degree of unsaturation makes this oil susceptible for oxidation, which leads under improper storage conditions to deterioration. Addition of antioxidants to linseed oil to prolong its shelf-life is therein reasonable approach. However, frequently used synthetic antioxidants can show toxic effects during long-term use, therefore research has been increasingly seeking to find effective and safer natural antioxidants.

The aim of the study was to investigate the effect of supercritical carbon dioxide plant extracts on the oxidative stability of linseed oil. Extracts of common dandelion, St. John's wort, hawthorn, sandy everlasting, olive tree and black elder were used. Generally established antioxidant vitamin E was used for comparison. Oil samples with added extracts in four concentrations were aged at 40 °C in the dark and at room temperature, unprotected from light and air. Methods for oxidative state determination were peroxide and anisidine value. The former served as a marker of primary oxidation products and the latter as a primary decay and secondary oxidation product formation marker. Afterwards total oxidation range was estimated with summation of both values in the form of the totox value. Composition of extracts and its alteration during aging were observed with gas chromatography coupled with mass spectrometry.

The best conclusive results were obtained for the samples of black elder and sandy everlasting, which slowed down deterioration of linseed oil, black elder extracts were even better than vitamin E. Other studied samples did not show any significant effect on enhancing oxidative stability of the oil. Extracts of St. John's wort, olive tree and hawthorn have even accelerated deterioration.

In the future, total phytochemical composition of the studied extracts should be determined, and additional tests for determination of antioxidative activity should be carried out.

Key words

Linseed oil, lipid oxidation, peroxide value, anisidine value, plant extracts

SEZNAM OKRAJŠAV

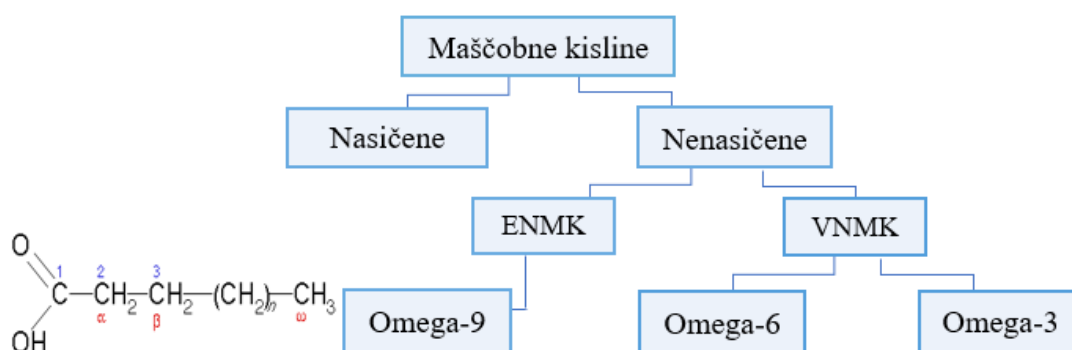
ADHD	Motnja pozornosti s hiperaktivnostjo (ang. <i>Attention deficit hyperactivity disorder</i>)
AOAC	Združenje analitskih skupnosti (ang. <i>Association of Analytical Communities</i>)
AOCS	Ameriško združenje kemikov za olja (ang. <i>American Oil Chemists' Society</i>)
BHA	Butilhidroksianizol
BHT	Butilhidroksitoluen
DGF	Nemško združenje za maščobna olja (nem. <i>Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft</i>)
DHA	Dokozaheksaenojska kislina
ENMK	Enkrat nenasičene maščobne kisline
EPA	Eikozapentaenojska kislina
GC-MS	Plinska kromatografija, sklopljena z masno spektroskopijo (ang. <i>Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry</i>)
ISO	Mednarodna organizacija za standardizacijo (ang. <i>International Organization for Standardization</i>)
IUPAC	Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo (ang. <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
LC-MS	Tekočinska kromatografija, sklopljena z masno spektroskopijo (ang. <i>Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry</i>)
p. a.	Za analizo (lat. <i>Pro analysis</i>)
p-AV	<i>Para</i> -anizidinsko število (ang. <i>p-anisidine value</i>)
Ph. Eur.	Evropska farmakopeja (lat. <i>Pharmacopoeia Europaea</i>)
PV	Peroksidno število (ang. <i>Peroxide value</i>)
RSD	Relativna standardna deviacija
TV	Totoks število (ang. <i>Totox value</i>)
VNMK	Večkrat nenasičene maščobne kisline

1. UVOD

1.1. Laneno olje

1.1.1. Pridobivanje in uporaba

Navadni lan (*Linum usitatissimum* L.) velja za eno najstarejših kultiviranih poljščin, ki raste na različnih delih sveta, saj je dobro prilagojen na toplo in hladno podnebje (1, 2). V letu 2016 so pridelali 2,9 milijona ton semen, od tega 23 % v Rusiji in 20 % v Kanadi (3, 4). Lan ima zelo raznoliko uporabo, kar je razvidno že iz njegovega imena, saj »usitatissimum« v latinščini pomeni »zelo uporaben« (5). Sprva so ga gojili predvsem kot vir vlaken za izdelavo lanenega platna, uporabnega v tekstilni industriji ali za izdelavo papirja, dandanes pa je večina pridelanega lana namenjena izdelavi olja (3, 6, 7). Čeprav je lan del človeške prehrane že tisočletja, so njegovo olje prvenstveno uporabljali v industrijske namene: v proizvodnji barv, lakov in premazov za površine, linoleja za talne obloge, kot tesnilno sredstvo za okna, zaščitno sredstvo proti rji in za aglomeracijo oglja (1, 3, 6). Laneno olje, kot tudi seme samo, je jedilno in ga zadnje čase vse bolj cenimo zaradi velike vsebnosti α -linolenske kisline, ki spada med esencialne nenasičene maščobne kisline ω -3 (slika 1), in njenih ugodnih učinkov na zdravje (1, 3, 8). Nizko razmerje med ω -6 in ω -3 ga dela še dodatno privlačnega za uporabo kot funkcionalno živilo in pripravo nutricevtikov (1).



Slika 1: Tipi maščobnih kislin in njihovo oštevilčevanje, prirejeno po (9) in (10): maščobne kisline ločimo glede na prisotnost in število dvojnih vezi na nasičene in nenasičene maščobne kisline, ki so lahko enkrat (ENMK) ali večkrat (VNMK) nenasičene (9). Večkrat nenasičene maščobne kisline razdelimo nadalje na ω -3 in ω -6. Pri večkrat nenasičenih maščobnih kislinah ω -3 je prva dvojna vez na tretjem ogljikovem atomu, gledano z metilnega konca verige ogljikovodikov, pri ω -6 pa na šestem (11).

Hrana ali zdravilo?

S staranjem prebivalstva in sodobnim načinom življenja se povečuje pojavnost kroničnih bolezni, med katerimi izstopajo debelost, srčno-žilne bolezni, rak, osteoporoza in artritis. Čeprav ima veliko vlogo pri nastanku teh bolezni genetika, lahko številne izmed zgoraj naštetih bolezni preprečimo ali zmanjšamo s pravilno prehrano in zdravim načinom življenja (12). Z novimi dognanji raziskav in posledičnim povečevanjem zanimanja za zdravo prehrano, so se pojavili številni pojmi, kot so nutricevtiki, funkcionalna, dizajnerska, farma in medicinska živila. Vsi ti pojmi opisujejo živila oz. živilske proizvode, ki jih tržijo s sporočilom koristi za zdravje in se z vidika učinkov nahajajo med živili in zdravili (12, 13). Nutricevtik je skovanka besed »nutrition« (prehrana) in »pharmaceutical« (zdravilo), pomeni pa katero koli snov, ki je lahko hrana ali njena sestavina in vpliva na zdravje na način preprečevanja in zdravljenja bolezni. Po drugi definiciji pa veljajo nutricevtiki za izdelke, ki vsebujejo koncentrirano obliko bioaktivne snovi, pridobljene iz hrane, in se nahajajo v obliki klasičnih farmacevtskih oblik, kot so tablete ali praški (12, 14). S pojmom funkcionalna hrana označujemo posebno kategorijo živil, ki ne oskrbuje organizma samo z osnovnimi hranili, ampak tudi preprečuje bolezni in prispeva k boljšemu zdravstvenemu stanju (13). Funkcionalna živila so po izgledu podobna običajni hrani, vendar imajo znanstveno ovrednotene zdravilne učinke (12–14). Police supermarketov in specializiranih trgovin z zdravo prehrano ponujajo velik nabor tovrstnih živil; zajemajo lahko vse od sadja in zelenjave, ki sta naravno bogata z antioksidanti in vlakninami, do obogatenih izdelkov, kot so pomarančni sok s kalcijem, kosmiči z vitamini in minerali, športne pijače in energijske tablice (3, 12, 13). Med funkcionalna živila uvrščamo tudi laneno seme oz. olje, ki ga kupimo v steklenicah in sami dodamo v preliv za solate ali druge hladne jedi, lahko pa je že sestavina živilskih produktov v mleku, jogurtu, sladoledu ali namazih za kruh (1, 15). V obliki mehkih kapsul je kot zgoščen vir esencialnih maščobnih kislin na voljo v lekarnah in specializiranih prodajalnah (1). Kot tako naj bi preprečevalo nastanek rakavih bolezni in vplivalo na vnetne procese (14).

Pridobivanje olja

Jedilno laneno olje pridobivamo s hladnim stiskanjem ali predstiskanjem, ki mu sledita ekstrakcija z organskimi topili in rafiniranje (1). Hladno stiskano olje je po definiciji nerafinirano olje, pridobljeno izključno s pomočjo mehanskega procesa brez uporabe toplote. V postopku pridobivanja ga lahko prečistimo le s spiranjem z vodo, dekantiranjem,

usedanjem in filtriranjem (16). S postopkom rafiniranja odstranimo nečistote in kontaminante, ki negativno vplivajo na stabilnost in s tem rok uporabe olja. Rafiniranje vključuje predvsem odstranitev prostih maščobnih kislin, fosfatidov, rastlinskih pigmentov, vode, kovin in oksidacijskih produktov (17, 18). Hladno stiskanje daje manjše izkoristke, kar pomeni, da se hkrati izluži tudi manj antioksidantov, po drugi strani pa se med rafiniranjem poleg škodljivih snovi znebimo tudi neumiljivega dela, ki ima pomembno vlogo pri zaviranju kvarjenja olj (1, 19). Hladno stiskano olje velja z vidika prehranske vrednosti za bolj kakovostno ravno zaradi prisotnosti bioaktivnih komponent, ki so pomembne za človeški organizem (9). Po stiskanju olja dobimo laneno pogačo ali grobo mleto moko, ki jo navadno uporabljajo kot hrano za živino, saj spodbudi nastajanje konjugirane linolne kisline v mleku. Tudi jajca, ki jih znesejo kokoši, krmljene z laneno moko, so obogatena z maščobnimi kislinami ω -3 in veljajo za »premium« izdelke (3). Prednost lanenega olja je višja biološka uporabnost α -linolenske kisline v primerjavi z laneno moko ali celimi semeni (20).

1.1.2. Kemijska sestava olja in semena

Olje je glavna sestavina lanenega semena, njegov delež se giblje med 35 in 45 %, glede na genetske dejavnike, podnebje in zrelost semena (1, 15). Preostali del lanenega semena predstavljajo skoraj v enakem deležu proteini (28 do 30 %) in vlaknine (35 %), nekaj odstotkov pa vlaga in pepel (po sežigu) (6, 21). Eksokarp lanenega semena je tudi bogat vir lignanov, ki imajo pomembno antioksidativno in protirakavo delovanje, vendar v olju navadno niso prisotni, saj jih zaradi njihove polarnosti z običajnimi postopki pridobivanja (hladno stiskanje, ekstrakcija z organskimi topili) ne moremo izvleči (22, 23). Surovo jedilno laneno olje, pridobljeno s hladnim stiskanjem, sestoji predvsem iz triacilglicerolov (nad 95 %), vsebuje pa tudi manjše količine mono- in diacilglicerolov, fosfolipidov, glikolipidov in prostih maščobnih kislin (do 2 %). Preostalo so bioaktivne komponente, t. i. neumiljivega dela, katerega delež se giblje med 0,4–1,3 %. Te spojine so fitosteroli, tokoferoli, fenoli, rastlinski pigmenti in skvalen (preglednica I) (1–3). Posebnost olja je zelo velika vsebnost α -linolenske kisline v triacilglicerolih, med 45 in 63 % (oz. 22 do 24 % mase zrelega semena), zaradi česar velja za njen najbolj bogat in hkrati najbolj dostopen vir α -linolenske kisline (15, 24). Olje čije (*Salvia hispanica* L.) in olje črne koprive (*Perilla frutescens* (L.) Britton) imata primerljivo vsebnost α -linolenske kisline, a sta veliko manj razširjeni (24, 25). Večkrat nenasičene maščobne kisline predstavljajo kar 73 % vseh maščobnih kislin, enkrat

nenasičene 18 %, nasičene pa le 9 % (21). Običajno razmerje med α -linolensko in linolno kislino v lanenem olju je 4,3–2,3 : 1 (1). Obstajajo tudi sorte lana z zelo majhno vsebnostjo α -linolenske in veliko vsebnostjo linolne kisline, kot je npr. Linola™ – ta vsebuje 3 % α -linolenske in 75 % linolne kisline v triacilglicerolih (22).

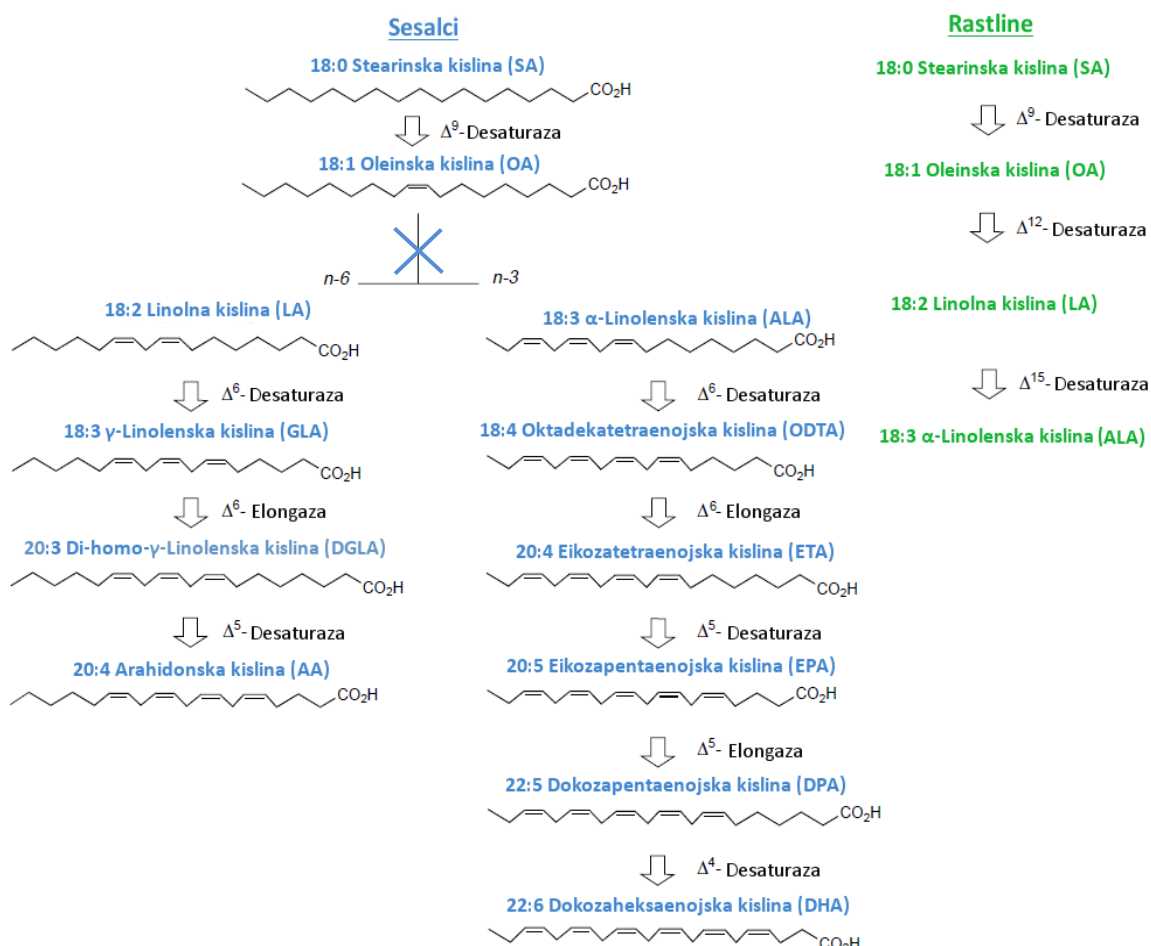
Preglednica I: Sestava lanenega olja, prirejeno po (3, 6, 15). Okrajšave za maščobne kisline: Ln – linolenska, L – linolna, O – oleinska, P – palmitinska, S – stearinska.

Sestavina	Delež	Sestavina	Delež
Nevtralni lipidi	g/100 g semen	Maščobne kisline	% v olju
Triacilgliceroli	36,0–40,7	Palmitinska (C16:0)	5,5–6,5
Monoacilgliceroli	0,5–0,9	Stearinska (C18:0)	2,2–4,1
Diacilgliceroli	0,9–2,6	Oleinska (C18:1 ω 9)	13,4–22,2
Proste maščobne kisline	0,1–3,4	Linolna (C18:2 ω 6)	15,2–17,4
Steroli, sterolni estri, ogljikovodiki	0,5–2,9	α -Linolenska (C18:3 ω 3)	51,8–60,4
Kompleksni lipidi	g/100 g semen	Trigliceridi	% v olju
Glikolipidi	1,0–2,9	LnLnLn	22–35
Fosfolipidi	0,1–2,3	LLnLn	~14
Ostali	0,4–1,8	OLnLn	~15
Tokoferoli	mg/100 g semen	SLnLn	~10
Alfa	0,0–1,2	SLLn	~10
Beta	2,4	PLnLn	~6
Gama	8,5–39,5	PLLn	~5
Delta	0,2–1,1	Fitosteroli	% fitosterolov
Plastokromanol-8	11,9–13,9	Brazikasterol	1
Rastlinski pigmenti	mg/kg semen	Kampesterol	27
β -Karoten	0,4–1,6	Stigmasterol	8
Lutein	27,7	β -Sitosterol	50
Klorofil	0,7–2,0	Δ^5 -Avenasterol	10

1.1.3. Esencialne maščobne kisline in njihov vpliv na zdravje

Zaradi odsotnosti oleat- Δ^{12} -desaturaze telo ne more proizvesti večkrat nenasičenih maščobnih kislin z 18 in več ogljikovimi atomi (slika 2), ki jih nujno potrebuje za vzdrževanje celične homeostaze, zato jih moramo zaužiti s hrano. α -Linolenska (ω -3) in linolna (ω -6) kislina sta pravi esencialni maščobni kislini (21, 26, 27). V telesu se s pomočjo encimov desaturaze in elongaze pretvorita do dolgoverižnih večkrat nenasičenih maščobnih kislin, te pa naprej do eikozanoidov; prostaglandinov (PG), levkotrienov (LT) in tromboksanov (TX), ki uravnavajo vazodilatacijo, agregacijo trombocitov in krvni tlak (27). Linolna kislina se pretvori do γ -linolenske in arahidonske kisline, α -linolenska kislina pa do EPA in DHA (21). Iz arahidonske kisline nastanejo predvsem TXA_2 , LTB_4 in PGE_2 , ki so močni dejavniki vnetja, medtem ko so TXA_3 , LTB_5 in PGI_3 , nastali iz EPA in DHA,

eikozanoidi s protivnetnim delovanjem. Ti namreč preprečijo agregacijo trombocitov in vazokonstrikcijo, kar znižuje tvorbo aterosklerotičnih plakov in strdkov ter poškodbe endotelija (28). α -Linolenska kislina pomembno zavira nastanek ω -6 metabolitov, saj z linolno kislino tekmujeta za enake encimske sisteme (20).



Slika 2: Metabolne poti pretvorbe linolne in α -linolenske kisline pri sesalcih in rastlinah, prirejeno po (27).

V sodobni prehrani so maščobne kisline ω -6 veliko bolje zastopane (sončnično in koruzno olje) in je razmerje od priporočenega 4 : 1 ali manj pomaknjeno proti 20–30 : 1 v prid ω -6 (11, 14, 21). Sesalci niso zmožni pretvorbe ω -6 v ω -3, tako da je edini način za zagotovitev dobrega razmerja vnos z živili, kot je laneno olje (11, 21). Delež pretvorbe zaužite α -linolenske kisline do višjih večkrat nenasičenih maščobnih kislin je v telesu skoraj neznan (5 % za EPA in 1 % za DHA), tako da njeni učinki najverjetneje niso samo posledica pretvorbe do dolgoverižnih maščobnih kislin ω -3. α -Linolenska kislina namreč tudi sama po sebi vpliva na kronične bolezni, a njena vloga še ni v celoti pojasnjena (28, 29). Učinki EPA in DHA so bolj kardioprotektivni, α -linolenska kislina pa ima večje antitrombotične učinke.

Prav tako naj bi α -linolenska kislina močnejše zniževala umrljivost zaradi kroničnih bolezni in pomembno zavirala metastaziranje raka dojke (29). Uživanje lanenega olja je pri bolnikih z metaboličnim sindromom privedlo do pomembnega znižanja krvnega tlaka in kazalcev oksidativnega stresa (30). Opisali so tudi protivnetno delovanje lanenega olja v povezavi z revmatoidnim artritisom, luskavico in ulceroznim kolitisom (31). Vpliv maščobnih kislin ω -3 na celost membran in zniževanje nevrogenega vnetja je pomemben za ohranjanje duševnega zdravja. α -Linolenska kislina zavira nastanek dušikovega oksida, ki ga povezujejo z depresijo in anksioznostjo. Učinkovitost lanenega olja za zniževanje poporodne depresije je na podganjem modelu bila primerljiva s fluoksetinom (32). Nadalje je uživanje lanenega olja znatno izboljšalo tudi motnje pozornosti s hiperaktivnostjo (ADHD) pri otrocih (31).

Fitosteroli, vitamin E in karotenoidi

Fitosteroli učinkovito znižujejo raven serumskega holesterola, tako da zmanjšujejo obseg absorpcije le-tega (11). Lahko vplivajo tudi na stabilnost olja, saj lipidni radikali reagirajo s fitosteroli, pri čemer se tvori stabilni terciarni radikal, ki zaustavi lipidno oksidacijo (1).

Tokoferoli oz. tokotrienoli so učinkoviti maščobotopni antioksidanti, prisotni v štirih izomerih (α , β , γ , δ), ki se razlikujejo po aktivnosti (23). Najbolj učinkovit naj bi bil α -tokoferol, najmanj pa δ . Plastokromanol-8, ki je derivat γ -tokoferola z dvakrat daljšo stransko verigo, ima 1,5-krat višjo aktivnost od α -tokoferola (1, 33). Tokoferoli preprečujejo tudi oksidativni stres *in vivo* in nastanek bolezni (17).

Karotenoidi so rumenordeči pigmenti in prekursorji vitamina A. So tudi dokazani lovilci singletnega kisika (1, 34).

Za pravilno prehranjenost z maščobami ni dovolj, da poskrbimo le za ustrezno količino in sestavo v prehrani – potrebno je tudi varovanje maščob pred oksidacijo in njenimi posledicami (11).

1.2. Oksidativna nestabilnost rastlinskih olj

Laneno olje je zaradi velike vsebnosti večkrat nenasičenih maščobnih kislin močno podvrženo oksidaciji med proizvodnjo in shranjevanjem, ki ima za posledico izgubo njihovih bioloških lastnosti (1). Posledica oksidacije je tudi *žarkost* olja, ki se ne odraža samo v neprijetnem vonju in okusu, ampak tudi v toksičnosti nastalih produktov, kar pomeni, da

so takšni izdelki za uživanje neprimerni (34, 35). Eden izmed glavnih izzivov v predelovalni industriji olj je torej zagotavljanje kakovosti tudi po obdelavi, do uporabe s strani kupcev (19). Glavni soudeleženci v vseh reakcijah oksidacij so nenasičene maščobne kisline in kisik (19, 34). Oksidacijo lipidov katalizirajo:

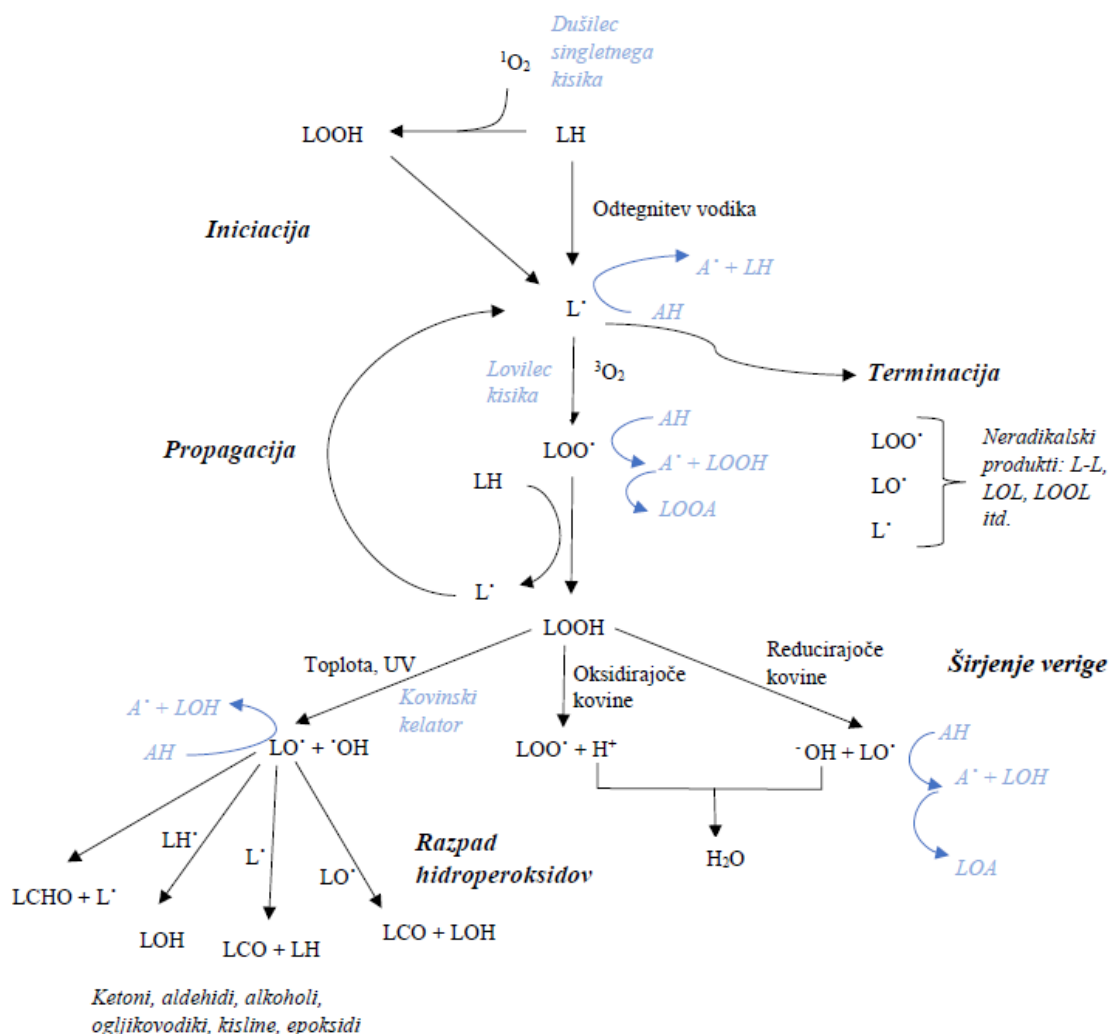
- Svetloba in ionizirajoče sevanje;
- Toplota;
- Kovine (Fe^{2+} , Cu^{2+}) in metaloproteini;
- Encimi in mikroorganizmi.

Izpostavljenost navedenim dejavnikom privede do kompleksnih procesov avto-, foto- in termooksidacije ter encimske oksidacije, ki kot intermediate vključujejo radikale in druge reaktivne zvrsti (34, 35).

1.2.1. Mehanizem avtoooksidacije in vloga antioksidantov

Avtoooksidacija je spontana reakcija lipidov z atmosferskim kisikom, ki jo lahko pospeši temperatura (t. i. termooksidacija). Večkrat nenasičene maščobne kisline ob prisotnosti iniciatorjev izgubijo vodikov atom in tvorijo radikale (34). Ta proces je nujen za začetek verižne reakcije ali *iniciacijo* lipidne oksidacije. Kisik iz zraka je navadno prisoten v obliki tripleta $^3\text{O}_2$, ki vsebuje dva nesparjena elektrona v osnovnem stanju in reagira z nestabilnimi radikali maščobnih kislin (19). To privede do nastanka peroksi radikalov, ti pa napadejo nove lipidne molekule in jim odtegnejo vodikov atom. To fazo imenujemo *propagacija*. Rezultat je nastanek hidroperoksidov ali primarnih produktov oksidacije. Na začetku je nastanek peroksidov počasen, pozneje pa hitro naraste. Čas do porasta peroksidov imenujemo indukcijska doba. Od tu dalje se hitrost oksidacije povečuje eksponentno, dokler ne zmanjka vira vodikov ali se veriga prekine npr. z dodatkom antioksidantov (19, 34). Primarni antioksidanti donirajo vodikov atom in se sami spremenijo v radikal, ki pa je stabilen zaradi delokalizacije po fenolnem obroču. Ta lahko naprej ulovi nov lipidni radikal in tako nastane neradikalska zvrst (34). Antioksidanti so torej snovi, ki preprečijo širjenje oksidacije z »nevtraliziranjem« radikalov, keliranjem kovinskih ionov ali stabilizacijo singletnega kisika (36). Hidroperoksidi so nestabilni in razpadejo dalje na aldehide, ketone, alkohole, ogljikovodike, hlapne organske kisline in epoksi spojine – sekundarne produkte oksidacije. Med razpadom hidroperoksidov nastanejo tudi alkoksi ($\text{LO}\bullet$), peroksi ($\text{LOO}\bullet$), hidroksi ($\bullet\text{OH}$) in novi lipidni radikali ($\text{L}\bullet$), ki sodelujejo pri širjenju procesa oksidacije. Sekundarni produkti se lahko dalje oksidirajo do organskih kislin in drugih terciarnih

produktov oksidacije. Radikalna reakcija se zaključi s sklapljanjem radikalov in nastankom stabilnih neradikalskih produktov v fazi *terminacije* (34). Spodnja shema prikazuje opisane poti avtooksidacije in mesta delovanja antioksidantov, označena z modro barvo.



Slika 3: Shema avtooksidacije in mehanizem delovanja antioksidantov, prirejeno po (15, 34, 35, 37).

1.2.2. Fotooksidacija

Fotooksidacija za razliko od avtooksidacije, ki je spontan proces, vključuje vzbujanje senzibilizatorja, ki se lahko aktivira s pomočjo svetlobe in kot tak reagira z maščobnimi kisljinami, pri čemer nastane lipidni radikal (34). Aktiviran senzibilizator lahko tudi reagira s tripletnim kisikom in tvori $^1\text{O}_2$, ki neposredno reagira z dvojno vezjo v maščobni kisljini in to kar 1500-krat hitreje kot $^3\text{O}_2$. Kvarjenje olj ob prisotnosti svetlobe torej poteka zelo hitro, brez faze indukcije. Ker pri drugem tipu ni tvorbe radikalov, dodatek antioksidantov oksidacije ne more preprečiti (19).

1.2.3. Žarkost rastlinskih olj in vpliv na zdravje

Za žarkost so odgovorni hlapni sekundarni produkti oksidacije, ki imajo zelo nizek prag zaznavnosti. Iz α -linolenske kisline nastanejo velike količine propanala in (*E,E*)-2,4-heptadienala, ki ju navadno zaznamo že na začetku oksidacije (19). Sekundarnih produktov oksidacije se znebimo s postopkom odstranjevanja vonja v okviru rafiniranja (38). Na pojav žarkosti vplivajo dejavniki, kot so stopnja nenasičenosti maščobnih kislin, dostopnost kisika, površina olja, vlažnost, prisotnost prooksidantov ter vrsta in koncentracija antioksidanta (35). Hitrost oksidacije za stearinsko, oleinsko, linolno in α -linolensko kislino narašča v razmerju 1 : 100 : 1200 : 2500. Pomemben pa je tudi položaj nenasičene maščobne kisline v trigliceridu – položaj na drugem mestu v glicerolnem skeletu velja za sterično najbolj oviranega in zato maščobne kisline na tem mestu težje oksidirajo (34). Laneno olje ima zaradi velikega deleža nenasičenih maščobnih kislin rok uporabe nekje od 5 tednov do 3 mesece, če ga shranjujemo v hladilniku (1).

Oksidirane maščobne kisline izgubijo svojo biološko vrednost in prispevajo k povišanju oksidativnega stresa v telesu (39). Radikali poškodujejo celične membrane in ireverzibilno reagirajo z DNA in proteini, nastali sekundarni produkti oksidacije pa tudi izkazujejo citotoksične učinke, ki vodijo v staranje ter srčno-žilne in rakave bolezni (38, 40–42).

1.2.4. Načini preprečevanja in zaviranja oksidacije

Kvarjenje se lahko začne že med neprimernim shranjevanjem semen, kljub zaščiti maščobnih kislin z endogenimi antioksidanti in omejenim dostopom kisika skozi eksokarp semena (8). Omejiti je potrebno količino vlage v semenih, saj lahko razrast mikrobov povzroči encimsko hidrolizo triacilglicerolov (33). Z razvojem transgenih vrst lana so dosegli povečanje nastajanja fenilpropanoidov (lignanov, flavonoidov, fenolnih kislin) in terpenoidov (plastokromanola-8, tokoferolov in luteina), ki se nato v zadostnih količinah lahko izločijo v olje (8). Poleg tega, da vplivajo na žarkost, lahko te spojine skupaj z večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami zmanjšujejo tveganje za številne bolezni (22). Na kakovost lanenega olja vpliva tudi način ekstrakcije. Olje, pridobljeno s superkritičnimi tekočinami, ima manjše peroksidno število, ker poteka ekstrakcija pri nižji temperaturi in odsotnosti zraka ter daje večje vsebnosti fenolov (23). Pri mehanski ekstrakciji je važno število stiskanj – optimalno je dvakratno, saj dobimo največje vsebnosti α -linolenske kisline in fenolov (43). Obrabljeni materiali opreme za ekstrakcijo lahko tudi odpuščajo kovinske

ione (34). Pomembno je omejiti vpliv prooksidantov med shranjevanjem tako, da so olja v temnih steklenicah in v hladilniku (1, 22).

Najbolj (ekonomsko) učinkovit način za nadziranje lipidne oksidacije rastlinskih olj je dodatek antioksidantov (34). Pomembno se je zavedati, da antioksidanti ne morejo izboljšati kakovosti že oksidiranih olj, zato jih je potrebno izdelkom dodati čim prej (44). Med najbolj pogosto uporabljanimi antioksidanti v industriji sta sintezni spojini butilhidroksianizol (BHA) in butilhidroksitoluen (BHT), ki sta sicer zelo učinkovita, vendar lahko ob daljši uporabi izkazujeta hepatotoksične učinke in povečujeta tveganje za raka. Iz tega razloga so številne raziskave usmerjene v iskanje učinkovitih antioksidantov naravnega izvora, saj je zahteva po bolj varnih in naravnih sestavinah v prehrani vse večja tudi s strani kupcev (36, 45, 46).

1.3. Rastlinski izvlečki

1.3.1. Rastlinski izvlečki kot antioksidanti

Veliko rastlinskih izvlečkov izkazuje antioksidativne lastnosti, zato so v številnih raziskavah podrobneje proučevali njihovo sestavo, učinkovitost in možnost uporabe v prehrani, kozmetiki in farmaciji (34, 47). Spojine, odgovorne za antioksidativno delovanje, so večinoma polifenoli. To so rastlinski sekundarni metaboliti z zelo različno strukturo – od enostavnih fenolov, fenolnih kislin, antocianinov do kompleksnih polimerov, kot so lignani in tanini (41, 48). Rastlinam dajejo barvo, imajo protimikrobno delovanje, jih varujejo pred poškodbami zaradi UV sevanja in radikalov, nastalih med fotosintezo, ter kelirajo kovinske ione (48). Metoda ekstrakcije in izbira izhodnega materiala sta ključna dejavnika, ki vplivata na količino in vrsto pridobljenih polifenolov, ki imajo lahko zelo različno antioksidativno aktivnost (41, 46). Boljši antioksidanti so polifenoli z več OH skupinami in metilnimi skupinami na orto in para mestu, v obliki glikozidov pa so lahko še bolj učinkoviti (1, 33). V raziskavah sojinih polifenolov, dodanih lanenemu olju, so ugotovili, da je sestava izvlečka oz. vrsta fenolov, celo bolj pomembna od koncentracije le-teh (41). V spodnji preglednici navajamo rastline in rastlinske dele, katerih izvlečke smo proučevali v magistrski nalogi, spojine z antioksidativnim delovanjem, ki jih glede na literaturne vire ti izvlečki vsebujejo, in delovanje izvlečkov kot posledica njihove antioksidativne aktivnosti.

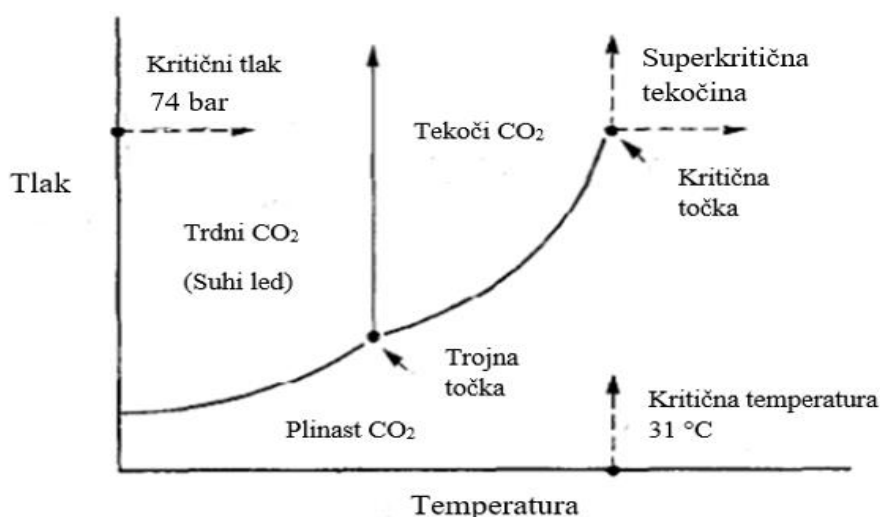
Preglednica II: Proučevane rastline oz. izvlečki, njihove sestavine z antioksidativnim delovanjem in njihovi učinki, dokazani v in vitro in in vivo raziskavah ali privzeti iz tradicionalne medicine.

Rastlina (del)	Spojine z antioksidativnim delovanjem	Farmakološko in/ali kozmetično delovanje
Navadni regrat (cvet)	• Derivati hidroksicimetne kisline (klorogenska, cikorna kislina) (49) • Karotenoidi (lutein, zeaksantin) (50)	• Antiaterogeno delovanje • Zaščita pred lipidno oksidacijo – zaviranje tvorbe $\cdot\text{OH}$ (49)
Šentjanževka (cvetoča zel)	• Katehinski tanini 6,5–15 % (procianidin B₂) • Flavonoidi 2–4 % (hiperozid, kvercitrin, izokvercitrin, rutin, t-flavanon) (50, 51). • Naftodiantroni 0,1–0,15 % (hipericin, psevdohipericin) • Derivati floroglucinola 2–4 % (hiperforin) (51, 52)	• Antiaterogeno (zniževanje lipidne peroksidacije) • Zniževanje celokupnega holesterola, trigliceridov in LDL • Nevroprotektivno • Nootropično • Imunosupresivno delovanje (52)
Glog (cvet)	• Flavonoidi 4,8 % (kemferol, kvercetin, apigenin, luteolin, rutin, hiperozid, glikozidi viteksina in orientina) • Katehinski tanini (proantocianidini in procianodini) • Fenolkarboksilne kisline (kavna, klorogenska) (50, 51)	• Izboljšanje srčne funkcije • Zniževanje krvnega tlaka in zdravljenje ateroskleroze • Zdravljenje kašlja • Sedativno delovanje (53) • Zaščita kože pred oksidativnim stresom (51)
Peščeni smilj (cvet)	• Flavonoidi (apigenin, luteolin, naringenin in njihovi glikozidi helihrizin A in B) (51)	• Hepatoprotektivno delovanje, varuje pred toksini • Zaščita pred lipidno oksidacijo (54)
Oljka (list)	• Sekoiridoidi (oleuropein 5–9 %, oleozid) • Flavonoidi (luteolin, kempferol, krizoeriol, apigenin in glikozidi) • Fenolne spojine (kumarna, kavna, ferulna, vanilinska kislina, tirozol in hidroksitirozol) • Kumarini (eskuletin, skopoletin, eskulin) (51, 55, 56)	• Zniževanje oksidacije LDL • Zaščita tkiv pri diabetičnih zapletih • Antiaritmično, kardioprotektivno, hipotenzivno, protivnetno, spazmolitično delovanje – zaščita pred oksidativnim stresom (55)
Črni bezeg (cvet)	• Flavonoidi do 3 % (kvercetin, rutin, izokvercetin, kempferol, astragalin, nikotiflorin, hiperozid) • Fenolkarboksilne kisline (ferulna, kavna, <i>p</i>-kumarna, klorogenska) (57)	• Protivnetno delovanje – preprečevanje oksidativnega izbruha preko nevtrofilcev in nekaterih drugih faktorjev vnetja (57) • Za izdelavo krepčilnih pijač (58) • Zaščita kože pred oksidativnim stresom (51)

1.3.2. Ekstrakcija s superkritičnimi tekočinami

Ekstrakcija s superkritičnimi tekočinami je napredna ekstrakcijska metoda, ki izpolnjuje več kriterijev idealne separacijske metode v primerjavi s klasično ekstrakcijo z organskimi topili (59). Superkritične tekočine imajo visoko sposobnost raztapljanja – ker so nizkoviskozne in

močno difuzne, lažje prodrejo v porozne snovi kot klasične tekočine. Moč raztapljanja lahko kontroliramo s spreminjanjem temperature in tlaka, kar privede do izboljšane selektivnosti. Superkritične tekočine med ekstrakcijo tudi nenehno tečejo skozi vzorec in omogočajo popolnejšo ekstrakcijo. Zaostanka topil ni, saj superkritična tekočina preide v plinasto stanje ob znižanju tlaka, pridobljeni izvlečki pa so tudi zelo koncentrirani. Izmed vseh topil najpogosteje uporabljamo CO₂, saj ima ugodne kritične konstante ($T_c = 31,1\text{ °C}$ in $P_c = 73,8\text{ bar}$; slika 4), je netoksičen, nevnetljiv in cenovno dostopen. Dobro raztaplja nepolarne snovi (triacilglicerole, eterična olja, maščobotopne vitamine), za ekstrakcijo polarnih snovi pa dodamo organske modifikatorje, kot sta etanol ali metanol (60, 61). Rastlinski material vsebuje spojine z različnimi lastnostmi, a navadno v majhnih koncentracijah, zato je takšna metoda, ki je dobro selektivna in daje visoke izkoristke zelo uporabna (61).



Slika 4: Fazni diagram ogljikovega dioksida, prirejeno po (62).

1.4. Vrednotenje oksidativnega stanja rastlinskih olj

Kakovost in stabilnost jedilnih olj sta glavna dejavnika, ki določata sprejemljivost in tržno vrednost olj (39). Ugotavljanje stabilnosti olja v dejanskih razmerah shranjevanja je zamudno, zato se poslužujemo pospešenih preizkusov, ki potekajo pri povišani temperaturi (19). Za bolj zanesljivo oceno oksidativnega stanja je potrebno določiti tako primarne kot sekundarne produkte oksidacije (63). Pogosta metoda za ugotavljanje prvih je metoda peroksidnega števila, za določanje slednjih pa metoda anizidinskega števila. Vsoto obeh ponazarja totoks število (64).

2. NAMEN DELA

Namen te magistrske naloge bo raziskati oksidativno stabilnost lanenega olja med pospešenim staranjem ter vpliv dodatka rastlinskih izvlečkov. Spremljali bomo nastanek primarnih produktov oksidacije na podlagi tedenskega merjenja peroksidnega števila po farmakopejski metodi B. Na začetku in koncu staranja vzorcev lanenega olja bomo ugotavljali tudi *p*-anizidinsko število in s tem ocenili obseg razpada hidroperoksidov do sekundarnih oksidacijskih produktov.

Olju bomo dodali rastlinske izvlečke, pridobljene z ekstrakcijo s superkritičnim CO₂, in izvleček vitamina E v štirih različnih koncentracijah (0,5, 0,1, 0,05 in 0,01 w/w %). Pri nekaterih izvlečkih bomo uporabili več zbirnih frakcij ekstrakcije in opazovali vpliv sestave izvlečka iste rastline na stabilnost olja. S plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektroskopijo, bomo ugotovili sestavo rastlinskih izvlečkov ter spremembo v sestavi na koncu staranja glede na začetno sestavo. Uporabili bomo izvlečke:

- Navadnega regrata (*Taraxacum officinale* L.);
- Šentjanževke (*Hypericum perforatum* L.);
- Gloga (*Crataegus* sp. L.);
- Peščenega smilja (*Helichrysum arenarium* L.) (2 frakciji);
- Oljke (*Olea europaea* L.) (2 frakciji);
- Črnega bezga (*Sambucus nigra* L.) (4 frakcije).

Vzorci bomo pripravili v steklenicah iz prozornega stekla in jih starali pri temperaturi 40 °C in na zraku. S tem bomo pokrili večino dejavnikov, ki pospešujejo oksidacijo (kisik, svetloba in temperatura).

Kot glavni cilj naloge bomo določili najbolj primeren rastlinski izvleček z antioksidativnimi lastnostmi za zaviranje oksidativnega kvarjenja rastlinskih olj in njegovo optimalno koncentracijo.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Materiali

3.1.1. Vzorci olja z dodanimi rastlinskimi izvlečki

Rastlinske izvlečke (preglednica III) so pridobili z ekstrakcijo s superkritičnim CO₂ na napravi Waters Bio-Botanical Extraction System 2.0 v podjetju IME Insol, d.d. (65, 66).

Preglednica III: Proučevani rastlinski izvlečki in olje.

Oznaka vzorca	Slovensko in latinsko ime rastline	Rastlinski del	Ekstrakcijske razmere
1 Kontrola	Laneno olje (<i>Linum usitatissimum</i> L.)	Seme	Hladno stiskanje
2	Navadni regrat (<i>Taraxacum officinale</i> L.)	Cvet	Ekstrakcija: 250 bar, 50 °C Zbiranje: 130 bar, 45 °C
3	Šentjanževka (<i>Hypericum perforatum</i> L.)	Cvetoča zel	Ekstrakcija: 230 bar, 40 °C Zbiranje: 130 bar, 45 °C
4	Glog (<i>Crataegus</i> sp. L.)	Cvet	Ekstrakcija: 300 bar, 40 °C Zbiranje: 130 bar, 45 °C
5 Smilj	Peščeni smilj (<i>Helichrysum arenarium</i> L.)	Cvet	Ekstrakcija: 230 bar, 40 °C Zbiranje: 130 bar, 45 °C
6 Peš. smilj	Peščeni smilj (<i>Helichrysum arenarium</i> L.)	Cvet	Ekstrakcija: 230 bar, 40 °C Zbiranje: 130 bar, 45 °C
7 CV1	Oljka (<i>Olea europaea</i> L.)	List	Ekstrakcija: 97 % CO ₂ in 3 % etanola Zbiranje: 120 bar, 40 °C
8 CV2	Oljka (<i>Olea europaea</i> L.)	List	Ekstrakcija: 97 % CO ₂ in 3 % etanola Zbiranje: 82 bar, 40 °C
9	Črni bezeg (<i>Sambucus nigra</i> L.)	Cvet	Ekstrakcija: 300 bar, 45 °C Zbiranje: 130 bar, 45 °C
10 CV2	Črni bezeg (<i>Sambucus nigra</i> L.)	Cvet	Ekstrakcija: 250 bar, 45 °C Zbiranje: 72 bar, 35 °C
11 CV3 03.2017	Črni bezeg (<i>Sambucus nigra</i> L.)	Cvet	Ekstrakcija: 250 bar, 45 °C Zbiranje: 50 bar, 30 °C
12 CV 3	Črni bezeg (<i>Sambucus nigra</i> L.)	Cvet	Ekstrakcija: 250 bar, 45 °C Zbiranje: 50 bar, 30 °C

- Vitamin E: 30-odstotna zmes tokoferolov v sončničnem olju (preglednica IV), All organic Treasures GmbH (Kempten, Nemčija).

Preglednica IV: Sestava vitamina E.

Tokoferoli	Vsebnost (mg/g)
α-tokoferol	< 140
β-tokoferol	< 70
γ-tokoferol	350 – 490
δ-tokoferol	70 – 210

- Jedilno nerafinirano in nefiltrirano laneno olje (preglednica V), hladno stiskano neposredno pred začetkom raziskave, Oljarna Pečarič (Metlika, Slovenija), poreklo lanenih semen: Poljska (67).

Preglednica V: Deklarirana sestava olja (68).

Maščobe (100 g)	Vsebnost (g)
Nasičene	10
Enkrat nenasičene	17
Večkrat nenasičene	73
Omega-3	57
Omega-6	16

3.1.2. Reagenti in topila

Peroksidno število (metoda B):

- Kalijev jodid, p. a., Merck (Darmstadt, Nemčija)
- Natrijev tiosulfat pentahidrat, p. a., $\geq 99,5$ %, Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)
- Škrob, p. a., Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)
- Salicilna kislina, p. a. $\geq 99,0$ %, Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)
- Izooktan, p. a., Merck KGaA (Darmstadt, Nemčija)
- Ocetna kislina, glacialna, 100 %, p. a., Merck (Darmstadt, Nemčija) in J. T. Baker (Schwerte, Nemčija)
- Prečiščena voda, Fakulteta za Farmacijo, Univerza v Ljubljani (Slovenija)
- Kalijev bromat, p. a., Merck (Darmstadt, Nemčija)
- Koncentrirana (37 %) klorovodikova kislina, p. a., Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, Francija)
- Aceton za spiranje, p. a., Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, Francija)

Anizidinsko število:

- *p*-Anizidin , > 99 %, Aldrich (Steinheim, Nemčija)
- Izooktan, p. a., Merck (Darmstadt, Nemčija)
- Ocetna kislina, glacialna, 100 %, p. a., Merck (Darmstadt, Nemčija) in J. T. Baker (Schwerte, Nemčija)
- Aceton za spiranje, p. a., Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, Francija)

GC-MS:

- n-Heksan SupraSolv®, pro g. c., Merck (Darmstadt, Nemčija)

3.1.3. Aparature in laboratorijska oprema

- Komora za segrevanje SP-120 C Easy, Kambič (Semič, Slovenija), 40 °C
- Komora za segrevanje S-285 C, Kambič (Semič, Slovenija), 60 °C
- Precizna tehtnica 350-3, Kern & Sohn, PCB (Balingen, Nemčija)
- Precizna tehtnica 3500-2, Kern & Sohn, PCB (Balingen, Nemčija)
- Analizna tehtnica XS205 Dual Range, Mettler Toledo (Greifensee, Švica)
- Ultrazvočna kadička Bandelin Sonorex Digitec (Berlin, Nemčija), 0–20 °C, 1–5 min
- Spektrofotometer Nanocolor® UV/VIS, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Nemčija), 350 nm
- Analizator GCMS: GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu Corp. (Kyoto, Japonska)
- Kolona: nepolarna kapilarna, Rxi-5Sil MS, 30 m × 0,25 mm, df = 0,25 µm, SF: 1,4-bis(dimetilsiloksi)fenilendimetilpolisiloksan, Restek (Bellefonte, ZDA)
- Računalniški program: GCMS Solution 4.2, Shimadzu Corp. (Kyoto, Japonska)
- Podatkovni knjižnici: FFNSC 3 in NIST 14, Shimadzu Corp. (Kyoto, Japonska)
- Avtomatska pipeta Kemomed Edvotek® (Washington, ZDA): 100 – 1000 µL in Biohit (Helsinki, Finska): 1000 – 5000 µL
- Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali klasično laboratorijsko opremo: erlenmajerice, čaše, merilne bučke, merilne valje, merilne in polnilne pipete, bireto, pateno in pestilo, lije, epruvete, viale, tehtnice, steklene palčke, kapalke, plastične kartice, kovinsko pinceto in žličke.

3.2. Metode

3.2.1. Pospešeni preizkusi oksidativne stabilnosti

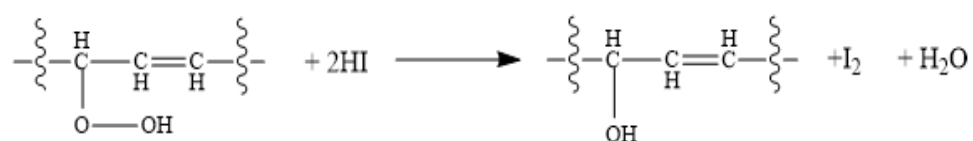
Vzorci smo segrevali v sušilniku z vročim zrakom pri 40 °C, da razmere niso bile preostre, saj laneno olje hitro oksidira (68). Čez dan (šest do osem ur) so bili vzorci odprti na zraku in izpostavljeni dnevni svetlobi, popoldne pa smo jih zaprli z zamaškom in dali v sušilnik za 16 do 18 ur. Nato smo jih pred odvzemom vzorcev za analizo temeljito premešali, saj se je s časom predvsem pri večjih koncentracijah na dnu steklenic nabrala usedlina. Vzorce smo premešali še enkrat, preden smo jih vrnili v sušilnik.

3.2.2. Peroksidno število

Ugotavljanje peroksidnega števila je najpogostejše uporabljan postopek za merjenje vsebnosti začetnih produktov oksidativnega razpada rastlinskih olj – tj. peroksidov in hidroperoksidov. To so spojine brez vonja in okusa, ki nakazujejo neizbežno senzorično spremembo olja in pojav žarkosti (19, 35). Metoda za ugotavljanje peroksidnega števila temelji na oksidaciji jodidnega iona, ki jo povzročijo hidroperoksidi v kislem mediju (37, 69). Vir jodida je kalijev jodid, ki v prvi fazi reagira z očetno kislino, pri čemer nastaja vodikov jodid (jodovodik) (70):



Vodikov jodid nato reagira s kisikom, vezanim v peroksidih lipida, in se oksidira do joda. Količina joda, ki pri tem nastane, je sorazmerna koncentraciji peroksidov v olju (19, 70):



V zadnji stopnji nastali jod titriramo z raztopino natrijevega tiosulfata do skorajšnjega razbarvanja. Nato sledi dodatek škrobovice, ki z jodom tvori modro do črno raztopino. Nadaljujemo s titracijo do ekvivalentne točke, ko se celotni jod reducira do jodida in raztopino razbarva (70):



Kisel medij tudi zagotavlja, da ne poteče stranska reakcija, pri kateri nastaja sulfat (71):



Peroksidno število nam torej pove količino peroksida v 1000 g preiskovanega rastlinskega olja, izraženo v miliekvivalentih (meq) aktivnega kisika (72, 73). Vrednost lahko izrazimo tudi v milimolih aktivnega kisika na kilogram, pri čemer 1 meq O₂ ustreza 0,5 mmol O₂ ali 1 mmol peroksidov (19, 73).

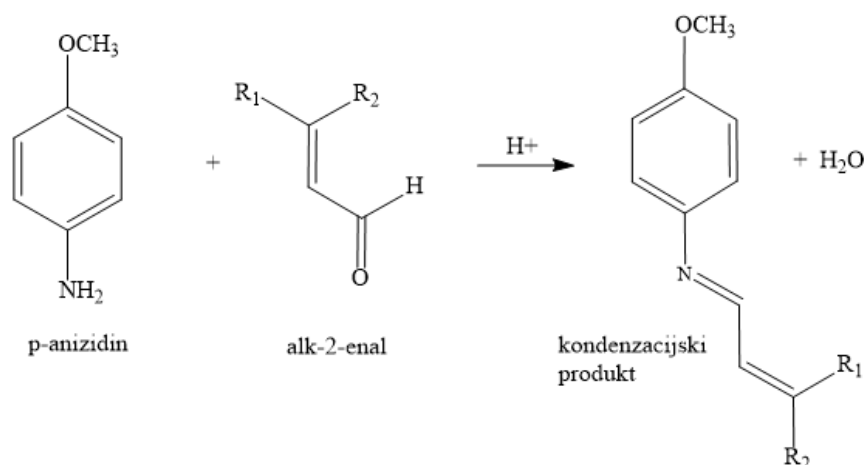
Korelacija med peroksidnim številom in senzoričnim vrednotenjem ni kvantitativno ovrednotena, zato samo na podlagi peroksidnega števila težko opredelimo izdelek kot neprimeren za uporabo. Poleg tega hidroperoksidi s časom razpadajo, hkrati pa v določeni časovni točki nehajo nastajati, tako da dobimo v takem primeru neustrezno oceno oksidativnega stanja. Zato moramo uporabiti dodatne metode, s katerimi ugotavljamo prisotnost sekundarnih produktov (npr. anizidinsko število, podpoglavje 3.2.3.).

V nekaterih državah so meje za peroksidno število rastlinskih olj določene; v Nemčiji velja meja 10 meq O₂/kg olja za deviška in 5 meq O₂/kg za rafinirana olja in masti (19). V Uradnem listu RS (Pravilnik o kakovosti jedilnih rastlinskih olj, jedilnih rastlinskih masteh in majonezi) navajajo manj strogo mejo – 7 mmol O₂/kg za hladno stiskana in rafinirana rastlinska olja ter 10 mmol O₂/kg za nerafinirana (16). Ph. Eur. navaja v monografiji o lanenem olju mejo 15 meq O₂/kg (74).

Čeprav je metoda ugotavljanja peroksidnega števila med najpogosteje uporabljanimi, ima številne pomanjkljivosti. Je izkustvena in močno odvisna od izvedbe poskusa. Je tudi časovno precej potratna in delovno zahtevna ter proizvede velike količine odpadnih topil. Da se izognemo napakam in da dobimo zanesljive rezultate, se je potrebno držati predpisanih pogojev in jih nadzorovati med celotnim časom analize (19, 37). Metodo so standardizirale različne mednarodne organizacije (AOCS Cd 8b-90, IUPAC 2.501, ISO 3960:2007, AOAC 965.33). Postopki se med seboj rahlo razlikujejo, predvsem v masi vzorca in uporabljenem topilu – bodisi kloroformu ali manj toksičnemu izooktanu (69). Pri našem delu smo upoštevali farmakopejski predpis 2.5.5, metodo B.

3.2.3. Anizidinsko število

Najbolj pogost način ugotavljanja prisotnosti sekundarnih produktov oksidacije je metoda anizidinskega števila, ki temelji na reakciji kondenzacije konjugiranih dienalov, alk-2-enalov in 2,4-dienalov (α,β -nenasičenih aldehydov) s *p*-anizidinom (slika 5) (35, 75). Produkt reakcije je rumenkasto obarvan in absorbira svetlobo pri 350 nm (19, 37).



Slika 5: Shema reakcije *p*-anizidina z nenasičenim aldehidom, prirejeno po (35).

Metoda je standardizirana (IUPAC 2.504 in ISO 6885:2016) ter prisotna v različnih zbirkah metod (AOCS Cd 18b-90, Ph. Eur. 2.5.36) (19, 35). Potek reakcije in zanesljivost rezultatov sta odvisna od strogega upoštevanja zahtev metode, kot so mase vzorcev, reakcijski čas in mešanje raztopin (19).

Po definiciji je anizidinsko število 100-kratna vrednost (povečanja) absorbance raztopine, ki vsebuje 1 g preiskovane snovi (rastlinskega olja) v 100 mL zmesi izooktana in *p*-anizidina v ledocetni kislini, izmerjeni pri 350 nm v enocentimetrski kiveti pod testnimi pogoji. Vrednost nima enote (19, 35, 37, 75).

Preizkus je bolj občutljiv za nenasičene kot nasičene aldehide, saj ti štiri- do petkrat močneje absorbirajo svetlobo. Kljub nizki specifičnosti vrednosti anizidinskega števila dobro sovpadajo s celokupnim številom hlapnih spojin in senzoričnimi ocenami žarkosti na podlagi vonja oz. okusa. Zaradi tega je anizidinsko število dober pokazatelj kakovosti olja in pomembno dopolnjuje peroksidno število (19, 35, 37). Posebej dobro pokaže zgodovino olja, saj je s standardnimi postopki predelave olj sekundarne produkte oksidacije, za razliko od primarnih produktov, težje odstraniti. Tako se po rafiniranju oljem peroksidno število zmanjša praktično na nič, anizidinsko pa naraste. Olja, stisnjena iz svežih in nepoškodovanih izhodnih rastlinskih materialov, imajo majhno peroksidno in anizidinsko število, medtem ko so vrednosti anizidinskega števila znatno večje za olja, pridobljena iz materialov slabe kakovosti (19). Nekateri avtorji menijo, da je anizidinsko število primerljivo samo med olji, pridobljenimi iz materiala iste rastlinske vrste, saj se začetne vrednosti pri oljih različnih vrst močno razlikujejo. Olja z velikim deležem večkrat nenasičenih maščobnih kislin imajo namreč navadno večja anizidinska števila že, ko so sveža (37).

3.2.4. Totoks število

Totoks ali celokupno oksidacijsko število vključuje primarne in sekundarne produkte oksidacije, in ga izrazimo kot vsoto dvakratnika peroksidnega in anizidinskega števila:

$$TV = 2 \cdot PV + p \cdot AV$$

Opisuje torej stopnjo oksidacije v začetni in poznejši fazi oz. dejansko oksidativno stanje rastlinskega olja. Pomen totoks števila je torej večji kot pomen peroksidnega ali anizidinskega števila (19, 37). Nekateri avtorji se ne strinjajo z dajanjem večje prednosti primarnim produktom oksidacije, saj zanesljive korelacije med zmanjšanjem peroksidnega števila in hkratnim zvečanjem anizidinskega števila niso dokazali, ali pa so celo mnenja, da je totoks število slab kazalec, ker združuje vrednosti z nezdržljivimi enotami in podaja manj informacij kot samo peroksidno ali anizidinsko število (19, 35).

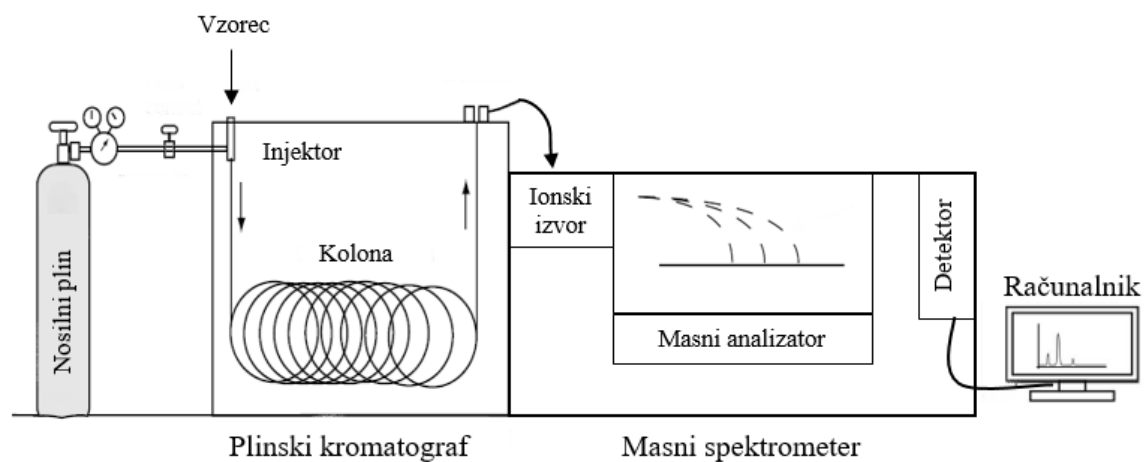
Čeprav totoks število pogosto uporabljamo, trenutno še noben uradni standard ni definiral meje, ki zagotavlja kakovost jedilnih olj. Nemško društvo za maščobne znanosti (DGF, *Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft*) je za mejo rafiniranih in deviških rastlinskih olj predlagalo vrednost totoks števila, manjšo od 20 (19).

3.2.5. Analiza rastlinskih izvlečkov s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektroskopijo

Plinska kromatografija, sklopljena z masno spektroskopijo (GC-MS), je metoda za kvalitativno in kvantitativno ugotavljanje hlapnih spojin v kompleksnih vzorcih (76). V injektorju, kamor se vnese vzorec, je temperatura dovolj visoka, da se spojine iz raztopljenega vzorca hitro uplinijo in prenesejo preko kolone do masnega spektrofotometra s pomočjo inertnega nosilnega plina. Ločitev poteka na principu različne afinitete spojin do stacionarne faze in posledičnega zadrževanja spojin v njej. Analite nato, po vrsti kot prihajajo iz kolone, »obstrelijo« elektroni v vakuumu znotraj masnega spektrometra, pri tem pa nastanejo pozitivni ali negativni molekularni ioni. Nastali ioni se v elektromagnetnem polju ločijo glede na razmerje med maso (m) in nabojem (z), detektor nato zazna intenziteto signala ionov z različnimi vrednostmi m/z in odziv pretvori v električni signal (76, 77).

Tako dobimo masni spekter za vsako spojino, ločeno na kromatografski koloni. Masni spektri, dobljeni z elektronsko ionizacijo pri 70 eV, so med različnimi laboratoriji dobro primerljivi, zato so za veliko število spojin shranjeni v podatkovnih knjižnicah. Neznane

spojine v vzorcu lahko primerjamo z referenčnimi spektri in to je velika prednost metode GC-MS (77). Spodnja slika prikazuje shemo aparature.



Slika 6: Shema naprave GC-MS, prirejeno po (77).

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1. Priprava vzorcev za staranje

V 3-litrski čaši smo združili vsebini dveh litrskih steklenic lanenega olja, da smo preverili prisotnost usedline (ki ni bila zaželeno) in zagotovili homogenost. 50 steklenic za vzorce smo predhodno sprali z acetonom in posušili v sušilniku.

Izbrane izvlečke, pridobljene z ekstrakcijo s superkritičnim CO₂, smo v originalnih vsebnikih najprej dobro premešali, saj se je ponekod nabrala na površju tekočina in tanka rahlo zasušena plast. Posamezen izvleček smo raztopili v lanenem olju v štirih različnih koncentracijah (0,5, 0,1, 0,05 in 0,01 m/m %). Pri raztapljanju smo si pomagali z ultrazvokom in močnim ročnim stresanjem. Pri izvlečku gloga, peščenega smilja in oljke petminutna obdelava z ultrazvokom ni bila uspešna, zato smo te izvlečke natehtali v pateno, jih s pestilom vtrli v olje in nato kvantitativno prenesli v steklenico. Pripravili smo tudi vzorce vitamina E in lanenega olja brez dodanega ekstrakta.

4.2. Peroksidno število

Prvo izvedbo postopka za ugotavljanje peroksidnega števila lanenega olja brez dodanega izvlečka smo izvedli ob času nič, nato pa na vsakih sedem dni. V približno enakomernih časovnih intervalih smo izvajali meritve tudi za vse ostale vzorce. Vsak vzorec smo titrirali v treh ponovitvah. V primeru prevelikega odstopanja peroksidnega števila (RSD več od 10 %) smo izvedli še četrto ponovitev. Vsaj enkrat dnevno smo izvedli slepo titracijo za zagotovitev ustreznosti reagentov ter preverili še ustreznost kalijevega jodida posebej. Točno koncentracijo natrijevega tiosulfata smo določili s standardizacijo s kalijevim bromatom.

Priprava reagentov (po Ph. Eur.):

- 0,01 M natrijev tiosulfat, Na₂S₂O₃: 0,1 M natrijev tiosulfat smo pripravili tako, da smo zatehtali 25 g natrijevega tiosulfata pentahidrata, ga kvantitativno prenesli v litrsko merilno bučko in dopolnili s prekuhano prečiščeno vodo do oznake. 100 mL tako pripravljene raztopine, smo prenesli v novo litrsko merilno bučko in dopolnili s prekuhano prečiščeno vodo do oznake.

Standardizacija: 10,0 mL kalijevega bromata smo odmerili s polnilno pipeto in prenesli v erlenmajerico s širokim vratom, dodali 40 mL prekuhane in prečiščene vode, 10 mL raztopine kalijevega jodida in 5 mL klorovodikove kisline R1. Nato smo titrirali z natrijevim tiosulfatom do skorajšnjega razbarvanja in dodali 1 mL škrobovice. Nadaljevali smo s titriranjem po kapljicah do razbarvanja, tj. ekvivalentne točke. Titrirali smo v treh ponovitvah in za volumen tiosulfata vzeli povprečje treh meritev. Pravo koncentracijo natrijevega tiosulfata smo izračunali po sledeči enačbi:

$$c(\text{tiosulfat}) = \frac{6 \times c(\text{bromat}) \times V(\text{bromat})}{V(\text{tiosulfat})}$$

$$c(\text{bromat}) = 0,033 \text{ M}$$

$$V(\text{bromat}) = 10,0 \text{ mL}$$

$$V(\text{tiosulfat}) \dots \text{poraba pri titraciji}$$

Reagente za standardizacijo smo pripravili po sledečih postopkih:

- Na analizni tehtnici smo zatehtali 0,5567 g kalijevega bromata, ga prenesli v 100-mililitrsko merilno bučko, ga raztopili v prečiščeni vodi in dopolnili z vodo do oznake.
- Na precizni tehtnici smo zatehtali 16,6 g kalijevega jodida, ga prenesli v 100-mililitrsko merilno bučko, raztopili v prečiščeni vodi in dopolnili do oznake.
- Na tehtnici smo v 100-mililitrsko merilno bučko, ki je vsebovala že nekaj prečiščene vode, natehtali 70 g koncentrirane klorovodikove kisline ter dopolnili z vodo do oznake.
- *Nasičen KI R:* Natehtali smo 296 g kalijevega jodida (topnost pri 25 °C je 148 g/100 mL vode) in ga s pomočjo lijaka prenesli v 300-mililitrsko erlenmajerico z obrusom. Dodali smo 200 mL prekuhane in ohlajene prečiščene vode in erlenmajerico pretresli. Po stresanju so bili prisotni neraztopljeni kristali KI, kar pomeni, da je raztopina nasičena. Erlenmajerico smo zavili v aluminijasto folijo in jo shranili v hladilniku.
- *Škrobovica R1:* V 250-mililitrsko čašo smo zatehtali 1,0 g v vodi topnega škroba in ga raztopili v manjši količini mrzle prečiščene vode. Dodali smo 200 mL prekuhane in ohlajene prečiščene vode in 0,25 g salicilne kisline. To raztopino smo vreli in mešali še približno 3 minute, da se je salicilna kislina raztopila. Ohlajeno škrobovico smo prelili v bučko, zavili v aluminijasto folijo in shranili v hladilniku.
- *Mešanica izooktana R in ledocetne kisline R (v razmerju 2 : 3, V/V):* Dvolitrski merilni valj smo do oznake napolnili z izooktanom in ga prenesli v 5-litrsko merilno

bučko. Nato smo odmerili še 3 L ledocetne kisline in jo dodali k izooktanu. Bučko smo zamašili in vsebino dobro pretresli.

- Pripravili smo tudi manjšo količino prekuhane in prečiščene vode R v čaši.

Postopek (metoda B):

Titracije smo izvajali v digestoriju (slika 7). V erlenmajerico s širokim vratom smo zatehtali 2,0 g vzorca lanenega olja s pomočjo pipete, saj smo pričakovali vrednost peroksidnega števila med 0 in 12 (preglednica VI). Vzorcju smo dodali 50 mL zmesi izooktana in ledocetne kisline. Ko se je vzorec dobro raztopil, smo dodali 0,5 mL nasičenega kalijevega jodida in močno stresali 60 ± 1 s. Nato smo hitro dodali 30 mL prečiščene vode in titrirali z natrijevim tiosulfatom, dokler ni intenzivna rumena barva začela bledeti. Takrat smo dodali 0,5 mL škrobovice in nadaljevali s titracijo po kapljicah do razbarvanja oz. do obarvanja na začetno barvo vzorca. Potrebno je bilo močno mešati, posebej v bližini ekvivalentne točke, da se je ves jod sprostil iz plasti topila. Slepo titracijo smo izvedli po enakem postopku, le brez dodanega vzorca (poraba natrijevega tiosulfata ni smela preseči 0,1 mL). Peroksidno število smo izračunali po naslednji enačbi (72):

$$PV = \frac{1000 \times (V_1 - V_0) \times c}{m}$$

V_1poraba tiosulfata pri titraciji vzorca (mL)

V_0poraba tiosulfata pri titraciji slepega preizkusa (mL)

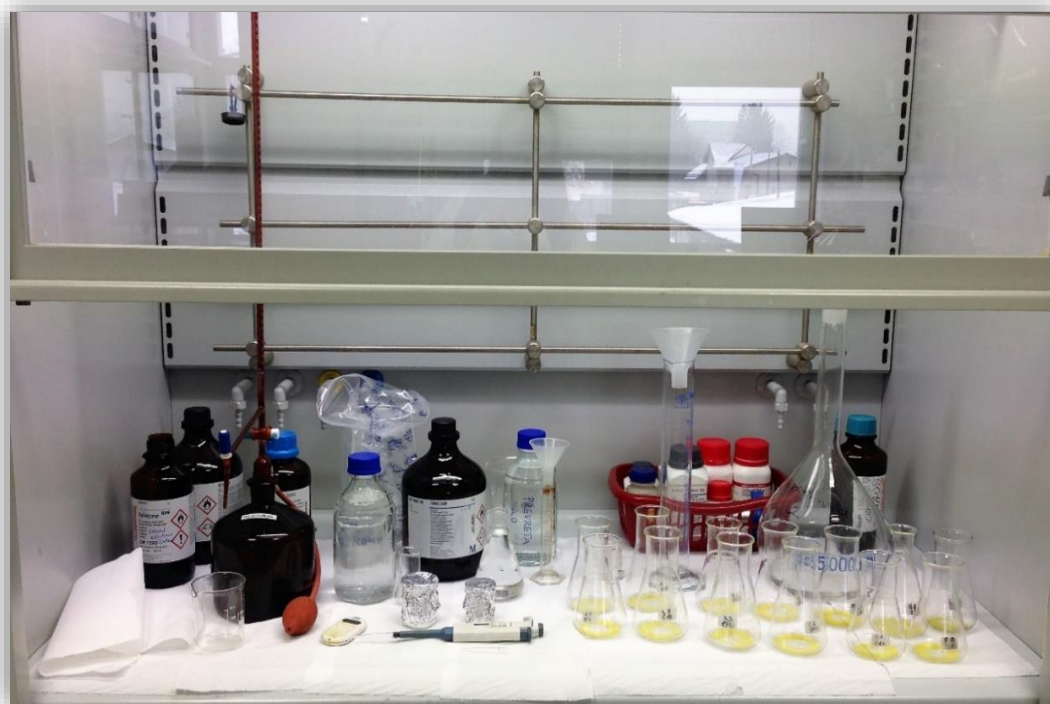
ckoncentracija Na-tiosulfata (mol/L)

mmasa vzorca (g)

Preglednica VI: Priporočene natehte vzorcev glede na pričakovano peroksidno število (72).

Pričakovana vrednost peroksidnega števila	Masa preiskovanega vzorca (g)
0–12	2,00–5,00
12–20	1,20–2,00
20–30	0,80–1,20
30–50	0,500–0,800
50–90	0,300–0,500

Ustreznost nasičenega KI smo preverjali tako, da smo k 0,5 mL KI v 30 mL zmesi ledocetne kisline in izooktana dodali dve kapljici škrobovice. V primeru modrega obarvanja in potrebne več kot ene kapljice natrijevega tiosulfata za razbarvanje raztopina ni bila več ustrezna in je bilo potrebno uporabiti svežo iz hladilnika (73).



Slika 7: Delovni pult za ugotavljanje peroksidnega števila (reagenti, vzorci in pribor).

4.3. Anizidinsko število

Meritve anizidinskega števila smo izvedli na začetku in po koncu staranja vzorcev, tj. po približno enem mesecu. Vzorce, ki jih nismo uspeli v enem dnevu pomeriti, smo shranili v hladilniku. Delovni pult prikazuje slika 8. Osnovni postopek je povzet po Ph. Eur.

Priprava anizidinskega reagenta s koncentracijo 2,5 g/L:

V steklen čolniček smo natehtali 0,25 g *p*-anizidina in ga kvantitativno prenesli v 100-mililitrsko stekleno bučko. Nato smo dopolnili bučko do oznake z ledocetno kislino in dobro premešali, da se je *p*-anizidin raztopil. Barva reagenta je bila rahlo rožnata.

Priprava vzorčne raztopine A:

Zatehtali smo približno 0,500 g posameznega vzorca olja v 25-mililitrsko merilno bučko, ga raztopili v izooktanu in dopolnili do oznake.

Priprava vzorčne raztopine B in standardne raztopine:

K 5,0 mL vzorčne raztopine A smo dodali 1,0 mL anizidinskega reagenta, premešali in zavili epruveto v alufolijo. Standardno raztopino smo pripravili po enakem postopku, le da smo 1,0 mL anizidinskega reagenta dodali k 5,0 mL izooktana.

Merjenje absorbance:

Najprej smo pomerili absorbance vzorčnih raztopin A in čistega izooktana kot slepe raztopine. Nato smo točno deset minut po pripravi pomerili absorbance vzorčnih raztopin B, umerjene glede na standardno raztopino. Vse meritve absorbanc smo izvedli pri valovni dolžini 350 nm in trikratnih ponovitvah posamezne meritve. Anizidinsko število smo izračunali po sledeči enačbi (78):

$$AV = \frac{[25 \times (1,2 \cdot A_1 - A_2)]}{m}$$

A_1absorbanca vzorčne raztopine B
 A_2 ...absorbanca vzorčne raztopine A
 mmasa preiskovanega vzorca (g)

Modifikacija postopka:

Absorbance, ki smo jih dobili za vzorčne raztopine A, so bile ponekod precej večje kot absorbance za vzorčne raztopine B. Menimo, da je postopek zasnovan neustrezno in da je potrebno upoštevati tudi doprinos ledocetne kisline. Zato smo k 5,0 mL izooktana dodali 1,0 mL ledocetne kisline in to raztopino uporabili za slepo. Prav tako smo odvzeli 5,0 mL vzorčne raztopine A in ji dodali 1,0 mL ledocetne kisline. Modificirana enačba za izračun anizidinskega števila je sledeča:

$$AV = \frac{[25 \times 1,2 \times (A'_1 - A'_2)]}{m}$$

A'_1absorbanca modificirane vzorčne raztopine B
 A'_2 ...absorbanca modificirane vzorčne raztopine A
 mmasa preiskovanega vzorca (g)



Slika 8: Delovni pult za ugotavljanje anizidinskega števila (reagenti, vzorci in pribor).

4.4. GC-MS analiza rastlinskih izvlečkov

Priprava vzorcev:

V 10-mililitrske steklene vialle smo zatehtali posamezne vzorce rastlinskih izvlečkov, pridobljenih z ekstrakcijo s superkritičnim CO₂, in jih izpostavili enakim razmeram staranja kot vzorce olja. Starane in sveže izvlečke (iz hladilnika) smo tik pred analizo zatehtali v 2-mililitrske vialle (približno 10 mg) in jih raztopili v 990 µL n-heksana. Nekateri izvlečki so bili slabo topni, zato smo jih položili v ultrazvočno kadičko za 2 do 5 minut.

Kromatografske razmere:

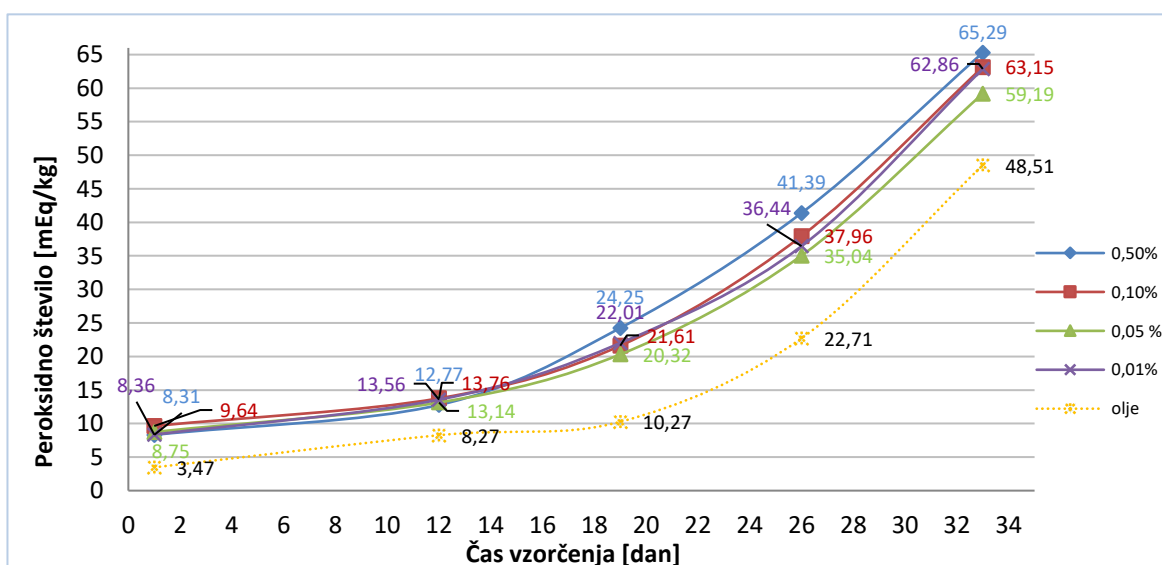
- Nosilni plin: helij
- Pretok plina: 1 mL/min (linearna hitrost)
- Način injiciranja: »split« 1 : 100
- Temperaturni program: 40→300 °C (3 °C/min), 300 °C (5 min)
- Temperatura injektorja: 250 °C
- Temperatura ionskega izvora: 200 °C
- Temperatura vmesnika: 300 °C
- Volumen injiciranja: 1 µL
- Napetost na detektorju: 1 kV
- Način ionizacije: EI
- Energija ionizacije: -70 eV
- Frekvenca zajemanja podatkov: 5 Hz
- Območje merjenja relativne molekulske mase (m/z): 40–400
- Celoten čas analize: 91,7 min (začetek snemanja pri 5,0 min).

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. Peroksidno število

S spremljanjem količine hidroperoksidov kot funkcije časa lahko določimo, v kateri fazi kvarjenja se lipid nahaja (37). V fazi indukcije peroksidno število (PV) narašča počasi, nato pa eksponentno. PV med avtooksidacijo doseže maksimum, ki mu sledi padec, saj se hidroperoksidi razgradijo naprej do sekundarnih produktov oksidacije (79). Spodnji grafi (slike 9–14) prikazujejo spreminjanje PV med pospešenim staranjem lanenega olja z dodanimi rastlinskimi izvlečki znotraj enega meseca. Na posameznem grafu so združene vrednosti za vse koncentracije dodanega rastlinskega izvlečka, rumena črtkana krivulja pa predstavlja vrednosti PV olja brez dodanega izvlečka. Zaradi velikega števila vzorcev, vsem ni bilo mogoče pomeriti PV še isti dan po pripravi, torej ob času 0. V graf so vnešene meritve ob dejanskih časovnih točkah glede na pretečeni čas od priprave vzorca. Ponovljivost rezultatov (RSD) navajamo skupaj z vsemi rezultati v [prilogi 1](#).

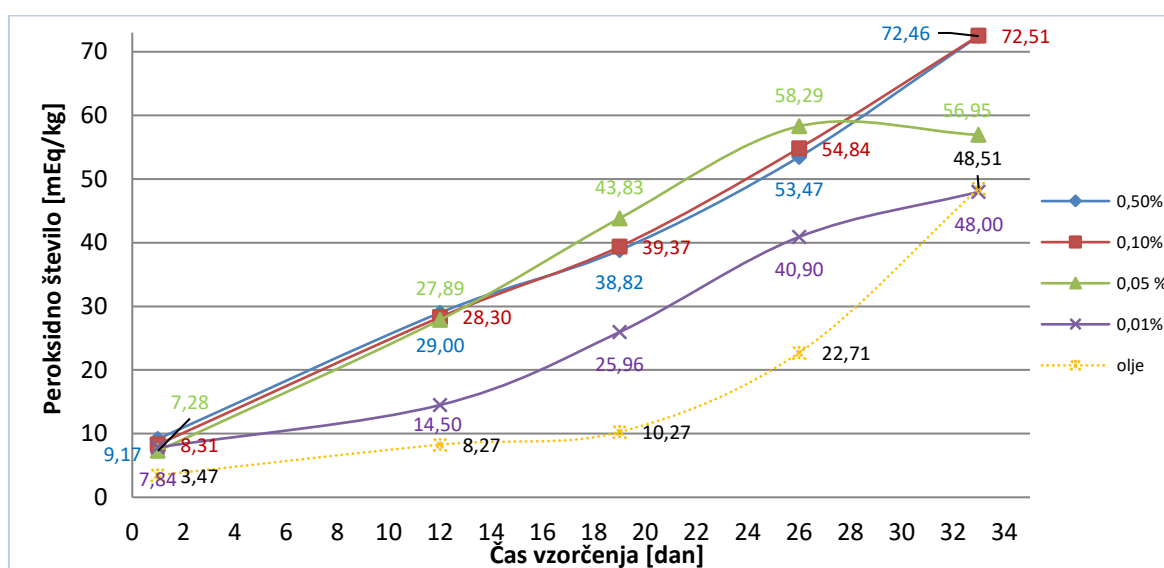
Vzorci navadnega regrata v vseh koncentracijah so imeli precej podobne vrednosti PV. Kot vidimo na sliki 9, krivulje niso naraščale ves čas z enakimi nakloni, ampak so se med seboj prepletale. Na začetku in po prvem tednu smo najmanjše vrednosti ugotovili za 0,5-odstotno koncentracijo (8,31 oz. 12,77 mEq/kg), nato pa največje, s končno vrednostjo 65,29 mEq/kg. Koncentracija 0,05 % je imela ob zadnjih treh meritvah najmanjše PV, s končno vrednostjo 59,19 mEq/kg. Vrednosti so bile v vseh točkah večje kot pri kontroli in po štirih tednih so še zmeraj naraščale pri vseh vzorcih.



Slika 9: Graf časovne odvisnosti peroksidnega števila za vzorce navadnega regrata (vzorec 2) različnih koncentracij in olja brez izvlečka.

Povzamemo lahko, da deluje izvleček navadnega regrata prooksidativno, in sicer v vseh proučevanih koncentracijah, saj poveča nastanek peroksidov glede na kontrolni vzorec olja brez izvlečka.

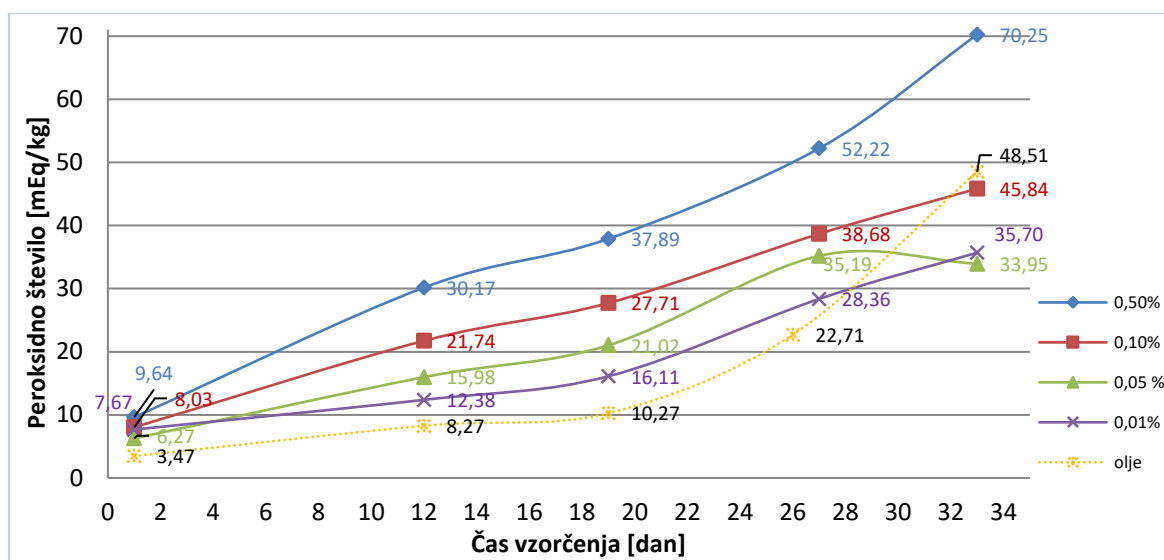
Pri vzorcih šentjanževke (slika 10) so se krivulje PV tudi prepletale, 0,05-odstotna koncentracija je dala sprva najmanjše vrednosti (7,28 mEq/kg), nato pa v 2. in 3. tednu največje (43,83 in 58,29 mEq/kg). Izstopal je vzorec koncentracije 0,01 %, ki je imel najmanjše vrednosti – na koncu celo manjše kot kontrola (48,00 mEq/kg). Za vzorca z 0,1- in 0,5-odstotno koncentracijo so si bile vrednosti v vseh točkah zelo podobne. Tudi na koncu so še naraščale, medtem ko so pri vzorcih z manjšima koncentracijama že začele upadati.



Slika 10: Graf časovne odvisnosti peroksidnega števila za vzorce šentjanževke (vzorec 3) različnih koncentracij in olja brez izvlečka.

Ekstrakt šentjanževke tudi ni primeren za zaščito lanenega olja proti oksidativnemu kvarjenju, saj pospešuje proces kvarjenja, zlasti v večjih koncentracijah. Krivulja 0,01-odstotne koncentracije je zanimiva, saj ne narašča eksponentno, v zadnjem tednu se naklon že precej zmanjša.

Pri vzorcih gloga so vrednosti PV do zadnje meritve naraščale sorazmerno s koncentracijo, profili naraščanja so bili skoraj vzporedni (slika 11). Krivulja je bila najbolj strma na začetku, in sicer najbolj pri največji koncentraciji. Čeprav so za vse vzorce PV večji kot pri kontroli, pa so pri zadnji meritvi že pod 48,51 mEq/kg, razen pri vzorcu z 0,5 % izvlečka. PV pri slednjem še kar strmo narašča, medtem ko se pri vzorcih z 0,01- in 0,1-odstotno koncentracijo le malo povečuje, pri 0,05-odstotni koncentraciji pa opazimo celo upad.

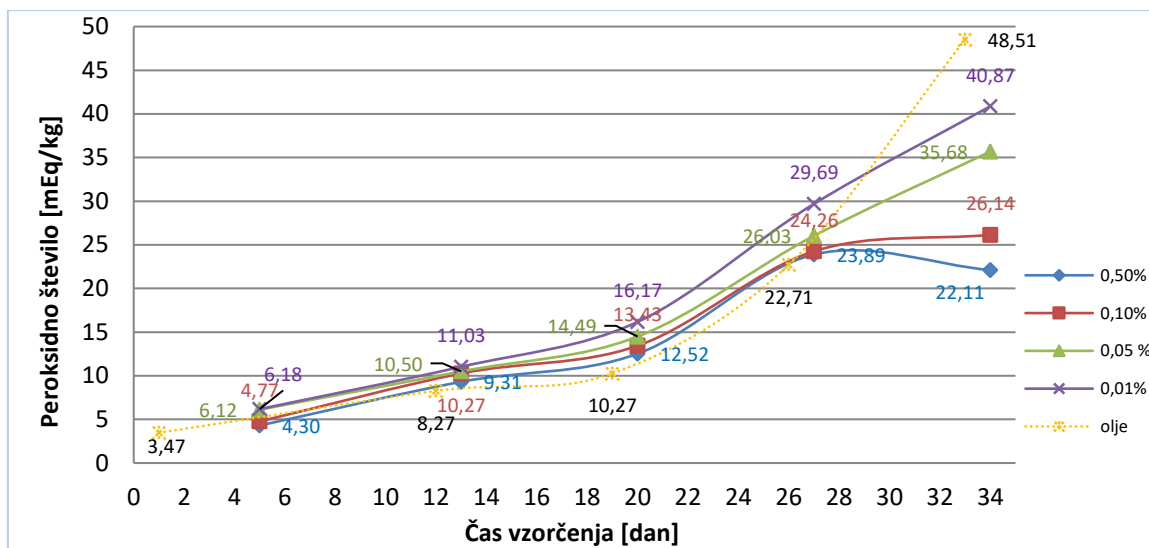


Slika 11: Graf časovne odvisnosti peroksidnega števila za vzorce gloga (vzorec 4) različnih koncentracij in olja brez izvlečka.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko povzamemo, da izvleček gloga tudi pospešuje oksidativno kvarjenje lanenega olja, vendar je njegov vpliv premo sorazmerno odvisen od koncentracije.

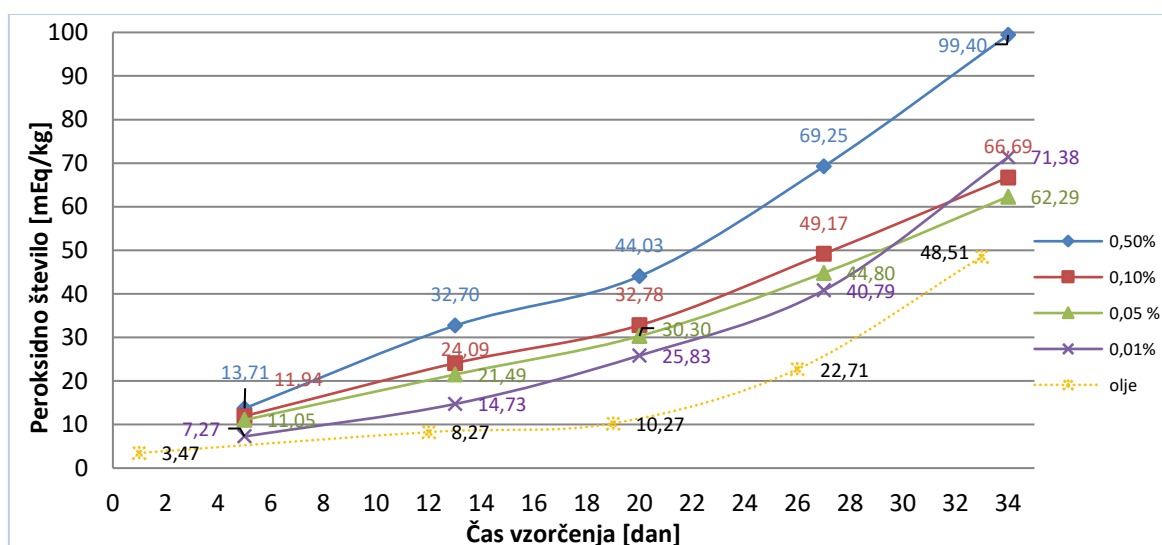
Analizirana vzorca izvlečkov peščenega smilja sta imela zelo podobne časovne profile PV, pri prvem (vzorec 5) so bile vrednosti nekoliko boljše in jih predstavljamo z grafom (slika 12), za peščeni smilj (vzorec 6) pa so rezultati zbrani v [prilogi 1](#). Zanimivo je, da je najmanjše vrednosti dajal vzorec 0,5-odstotne, največje pa vzorec 0,01-odstotne koncentracije. Vrednosti so bile v prvi polovici staranja kar blizu skupaj – od 4,30–6,18 mEq/kg v začetni točki meritev do 12,52–16,17 mEq/kg po treh tednih, naraščale so po vrsti glede na koncentracijo in njihove krivulje se ne prepletajo. So rahlo večje kot pri kontroli (za največji koncentraciji celo nekoliko manjše), vendar pri zadnji meritvi upadejo in so manjše od kontrole. Za vzorec z 0,5-odstotno koncentracijo je PV v zadnji točki celo dvakrat manjše.

Izvlečki peščenega smilja bi lahko bili obetavni za zniževanje oksidativnega kvarjenja lanenega olja, saj dve krivulji po štirih tednih dosežeta maksimum s PV okoli 25 mEq/kg. Učinek je odvisen od koncentracije, vendar obratno sorazmerno.



Slika 12: Graf časovne odvisnosti peroksidnega števila za vzorce peščenega smilja (vzorec 5) različnih koncentracij in olja brez izvlečka.

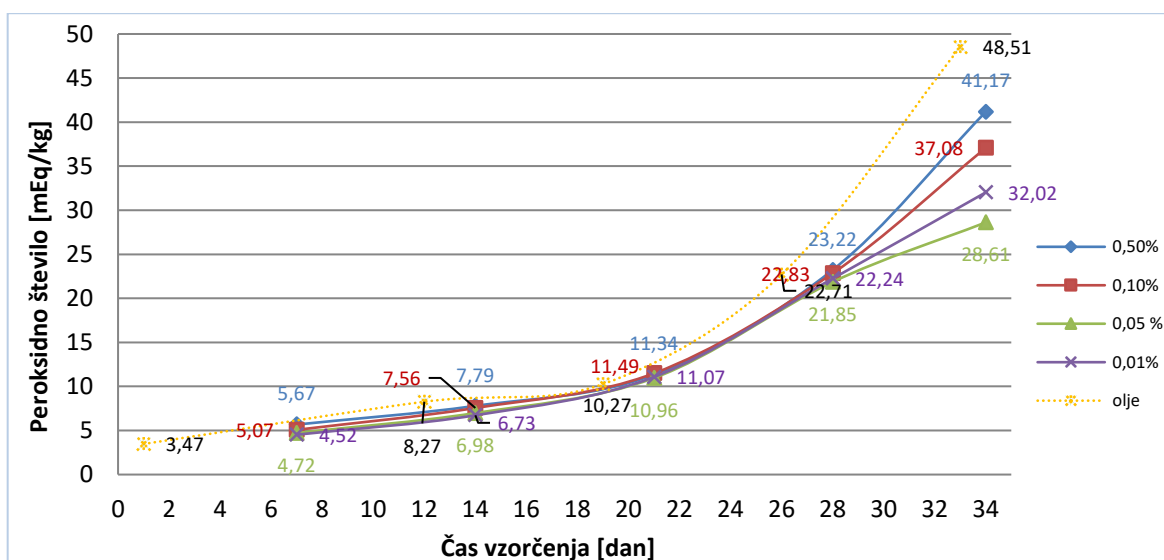
Oba vzorca izvlečkov oljke sta imela podobne profile časovne odvisnosti PV, manjše vrednosti pa je dajal vzorec CV2 (slika 13). Podatki za CV1 (vzorec 7) so zbrani v [prilogi 1](#). Pri oljki smo opazili bistveno povečanje PV (v primerjavi s kontrolnim vzorcem), ki je bilo odvisno od koncentracije, že pri začetni meritvi. Vrednosti vseh meritev so bile precej večje kot pri kontroli. Največja koncentracija je imela največje PV (13,71 mEq/kg na začetku in 99,40 mEq/kg na koncu), najmanjša pa najmanjše, razen v zadnji točki. Krivulje se, razen za to točko, niso prepletale. Pri zadnji meritvi se je namreč PV pri vzorcu 0,01-odstotne koncentracije povečala tako, da je prekoračila PV za vzorca 0,05- in 0,1-odstotne koncentracije. Pri drugem vzorcu ekstrakta oljke CV1 (vzorec 7) koncentracije 0,01 % se to ni zgodilo ([priloga 1](#)).



Slika 13: Graf časovne odvisnosti peroksidnega števila za vzorce oljke (vzorec 8) različnih koncentracij in olja brez izvlečka.

Zaključimo lahko, da izvleček oljke tudi deluje prooksidativno, z večanjem koncentracije pa se ta učinek še povečuje.

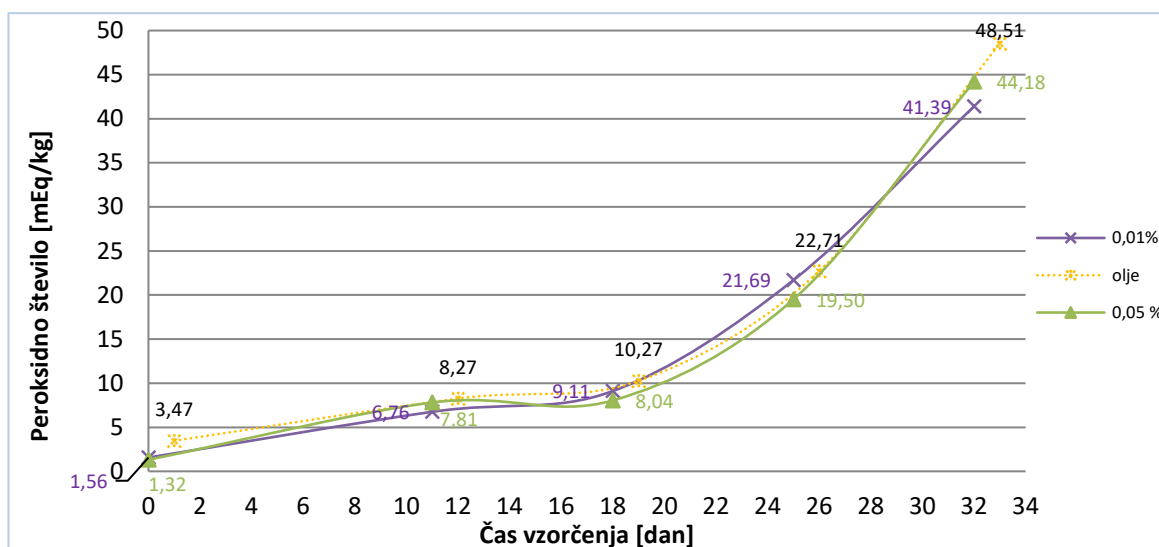
Vzorci izvlečkov črnega bezga so bili kar štirje, grafično predstavljamo vzorec CV3 (vzorec 12), s katerim smo dobili najmanjše vrednosti PV (ostale podrobneje predstavljamo le v [prilogi 1](#)). Pri vzorcu ekstrakta črnega bezga CV3 so bile vrednosti PV (slika 14) ves čas manjše kot za kontrolni vzorec. Bile so le rahlo odvisne od koncentracije, saj se krivulje razen v zadnji točki praktično pokrivajo. V točkah meritev 2, 3 in 4 nekoliko izstopa vzorec 0,05-odstotne koncentracije z manjšimi vrednostmi kot pri vzorcu 0,01-odstotne koncentracije. Po štirih tednih je hitrost naraščanja PV začela upadati, najmanj za 0,5- in najbolj za 0,05-odstotno koncentracijo. Te vrednosti so bile že precej manjše kot pri kontroli, za koncentracijo 0,05 % skoraj dvakrat.



Slika 14: Graf časovne odvisnosti peroksidnega števila za vzorec črnega bezga CV3 (vzorec 12) različnih koncentracij in olja brez izvlečka.

Glede na največji nabor vzorcev z izvlečkom črnega bezga, lahko zaključimo, da je črni bezeg zelo obetaven za preprečevanje oksidativnega kvarjenja, saj so bile krivulje (z izjemo 0,5-odstotne koncentracije pri vzorcih 9, 10 in 11) za vse frakcije nižje ležeče glede na kontrolni vzorec.

Pri vitaminu E (slika 15), ki nam je kot že uveljavljen antioksidant služil za primerjavo, so bile vrednosti PV pri vseh koncentracijah malo manjše od kontrole, razen za meritev ob 25. dnevu za 0,01-odstotno koncentracijo. Krivulji se prepletata, sta podobne oblike kot kontrola, a imata nekoliko bolj izrazit plato med približno 10. in 18. dnevom.



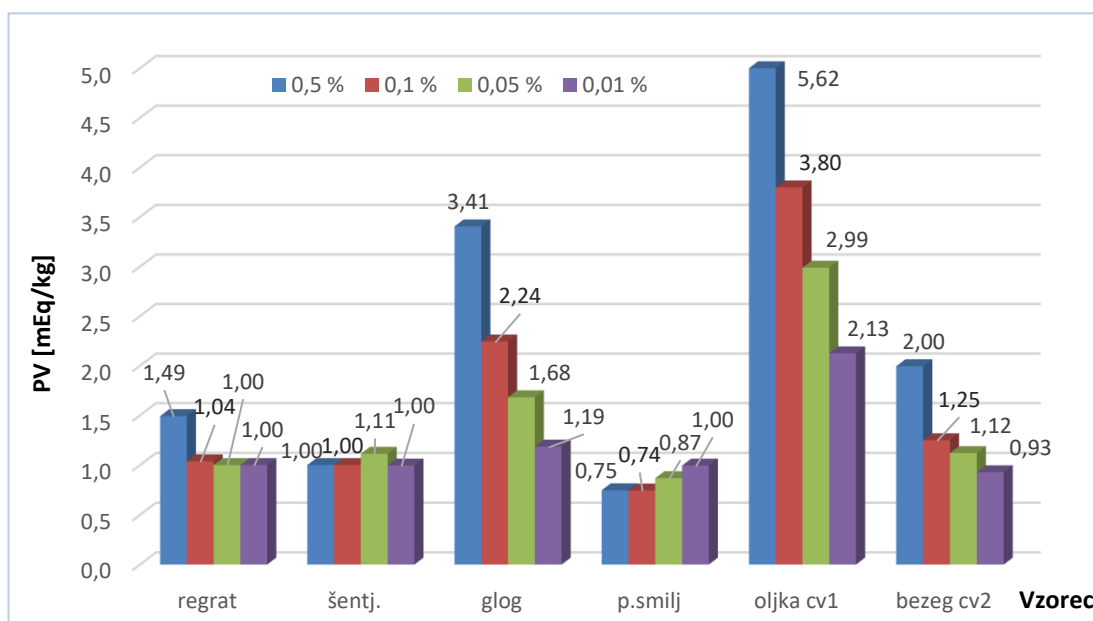
Slika 15: Graf časovne odvisnosti peroksidnega števila za vzorce vitamina E različnih koncentracij in olja brez izvlečka.

Vitamin E se je v proučevanih koncentracijah izkazal za zmerno aktivnega pri preprečevanju oksidativnega kvarjenja lanenega olja, saj vrednosti PV niso bistveno manjše. Razlog, zakaj nismo pripravili štirih koncentracij vzorcev vitamina E, je ugotovitev iz predhodnih poskusov, da vitamin E v koncentracijah 0,1 in 0,5 % deluje prooksidativno (80).

Zaradi ugotovitve, da je prišlo do velikega povečanja PV pri vzorcih oljke že v začetnih meritvah, smo preverili PV tudi takoj po pripravi, torej ob času nič (začetne meritve za vzorce smo namreč zaradi njihovega velikega števila izvedli ob različnih časih, večinoma znotraj petih dni). Izbrali smo samo en izvleček oz. frakcijo izvlečka za posamezno rastlinsko vrsto, in sicer tistega, ki je pri prvih meritvah dajal največje vrednosti PV. Vzorce smo ponovno pripravili v enakih koncentracijah (z isto serijo olja) in pomerili PV takoj ob pripravi. Žal smo bili omejeni s količino olja, zato smo pripravili manjše količine vzorcev, po 50 mL, in sicer v 50-mililitrskih steklenicah ali erlenmajericah s steklenimi zamaški. To se nam sprva ni zdelo sporno, saj smo nameravali pomeriti PV samo ob času nič. Ker pa so bili dobljeni rezultati PV s svežimi vzorci veliko manjši, smo se odločili, da jih bomo še dva tedna starali.

Začetne vrednosti PV so bile pri vseh na novo pripravljenih vzorcih precej manjše (slika 16) kot pri predhodnih meritvah, vrednost PV za kontrolo (laneno olje brez izvlečka) je znašala 0,74 mEq/kg. Vrednosti pri vzorcih izvlečkov regrata, šentjanževke, smilja in bezga za 0,01–0,1-odstotno koncentracijo se niso bistveno razlikovale od kontrolne vrednosti. Večja odstopanja opazimo pri 0,5-odstotni koncentraciji izvlečkov regrata in bezga. Izstopali so vsi vzorci izvlečkov oljke (2,13–5,62 mEq/kg) in gloga (1,19–3,41 mEq/kg). Vrednosti PV

so z večanjem koncentracije naraščale – najbolj izrazito ravno pri izvlečkih gloga in oljke, edino pri izvlečku peščenega smilja je bilo PV najmanjše za vzorec z 0,5-odstotno koncentracijo.



Slika 16: Primerjava vrednosti PV za sveže vzorce, ugotovljene takoj po pripravi.

Na podlagi teh rezultatov zaključujemo, da spojine v proučevanih izvlečkih oljke in gloga najverjetneje stopajo v interakcijo z reagenti titracije. Zato bi bilo smiselno ugotoviti, kolikšno vrednost peroksidnega števila dajeta ta dva izvlečka kot slepi kontroli.

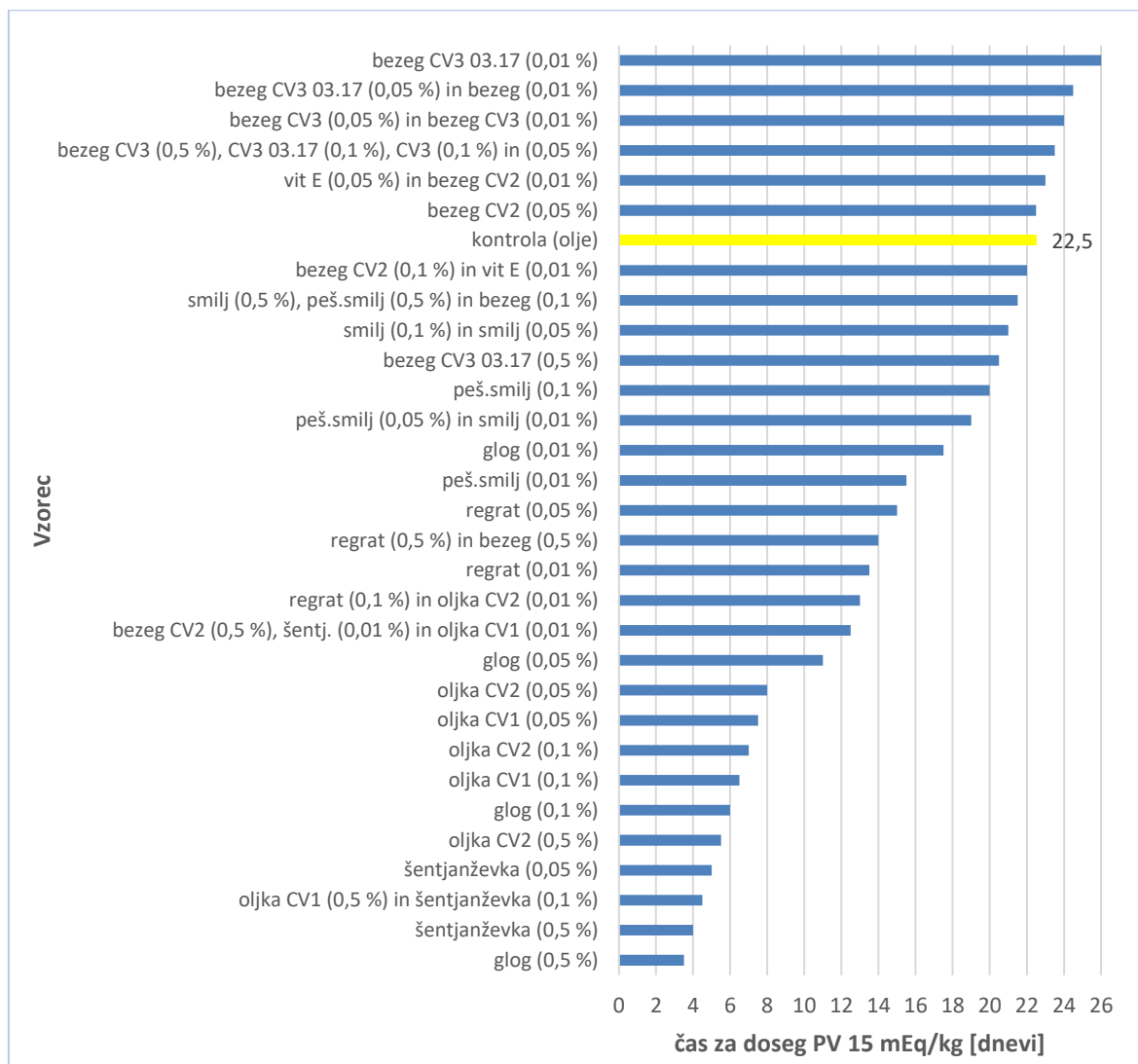
Pri dvotedenskem staranju so bile vrednosti PV za vse vzorce izvlečkov regrata, peščenega smilja in šentjanževke ter vzorce z 0,01 % izvlečka gloga in 0,1 % izvlečka bezga manjše kot pri kontroli. Le vzorec z izvlečkom oljke je v vseh koncentracijah dajal večje vrednosti ([priloga 2](#)). Pri vzorcu z izvlečkom regrata so krivulje vseh koncentracij blizu skupaj, vendar je opaziti pravilno odvisnost PV od koncentracije. Vrednosti PV namreč z večanjem koncentracije padajo, kar je ravno obratno kot pri prvotno pripravljenih vzorcih regrata. Po dveh tednih je vrednost za vzorce z 0,5 % izvlečka 11,29 mEq/kg, za kontrolo pa 15,71 mEq/kg. Pri vzorcih izvlečka šentjanževke ni opaziti takšnega pravilnega naraščanja – največje vrednosti je dajal vzorec s koncentracijo 0,05 %, najmanjše pa 0,01 %. Po nekje desetih dneh so vrednosti za koncentraciji izvlečka 0,1 in 0,5 % močnejše narasle in prekrizale krivuljo 0,05-odstotne koncentracije. Za koncentraciji izvlečka 0,05 in 0,01 % sta PV po dveh tednih manjši kot pri kontroli. Pri vzorcu z izvlečkom gloga krivulja za koncentracijo 0,5 % močno izstopa – je najvišje ležeča z vrednostjo PV 27,45 mEq/kg po dveh tednih, krivulji za koncentraciji 0,1 in 0,05 % se prekrivata in ležita rahlo nad kontrolo, krivulja za

koncentracijo 0,01 % pa pod njo. Prekrivanja in odstopanj pri prvotnih vzorcih nismo opazili. Pri vzorcu z izvlečkom peščenega smilja so krivulje vzporedne – najvišje ležeča je krivulja za koncentracijo 0,01 % nato 0,1 %, 0,05 % in najnižje ležeča je krivulja za koncentracijo 0,5 % z vrednostjo PV 12,65 mEq/kg po dveh tednih. Pri vzorcu z izvlečkom oljke so krivulje čisto vzporedne, PV naraščajo s koncentracijo. Močno izstopa vzorec s koncentracijo izvlečka 0,5 %, kjer se vrednosti povečujejo nelinearno in dosežejo po dveh tednih 51,24 mEq/kg. Pri vzorcu z izvlečkom bezga izstopa vrednost za koncentracijo 0,1 %, ki je najnižje ležeča, se povečuje skoraj linearno in po dveh tednih doseže vrednost 14,92 vzorcu z izvlečkom. Krivulje ostalih treh koncentracij se prekrivajo in prepletajo, povečujejo najprej bolj, nato pa manj strmo kot krivulja za koncentracijo 0,1 %.

Na podlagi slabe primerljivosti rezultatov staranja lanenega olja med prvo in drugo serijo meritev smo ugotovili, da je metoda peroksidnega števila zelo občutljiva na spremembe eksperimentalnih pogojev. Na potek lipidne oksidacije trigliceridov vpliva: količina olja v vsebnikih in velikost stične površine med oljem in zrakom ter izpostavljenost zraku oz. kisiku iz zraka in svetlobi. Večja napolnjenost steklenic pomeni manjšo prisotnost zraka in manjšo stično površino olja z zrakom (steklenice so pri grlu ožje). Olje količine 200 mL (predhodni poskusi v laboratoriju) se je kvarilo počasneje kot 100 mL in 100 mL počasneje kot 50 mL. Kisik iz zraka in svetloba imata pomembnejši vpliv na oksidacijo kot (povišana) temperatura, saj smo sveže pripravljene vzorce še isti dan po pripravi izpostavili 40 °C in so bile vrednosti PV po sedmih dneh primerljive z vrednostmi prvotnih meritev vzorcev, ki smo jih začeli starati pri 40 °C šele po nekaj dnevih od priprave. To smo potrdili še s preizkusom spreminjanja PV samemu lanenemu olju, nalitemu v manjšo čašo na sobni temperaturi. Opazili smo skoraj linearno povečevanje z vmesnim kratkim platojem, vrednosti so bile le nekoliko manjše kot pri segrevanih vzorcih. Zaprt vzorec samega lanenega olja na sobni temperaturi je imel linearno povečanje brez platoja in malo manjše vrednosti PV kot vzorec v čaši.

Za lažjo primerjavo učinkovitosti izvlečkov z vidika zaščite lanenega olja pred oksidativnim kvarjenjem smo določili čas, ko PV doseže vrednost 15 mEq/kg, ki jo definira Ph. Eur. v monografiji o lanenem olju. Na grafikonu skupnih rezultatov (slika 17) vidimo, da večina izvlečkov ne preprečuje oksidativnega kvarjenja lanenega olja. Za najslabše so se izkazali izvlečki gloga (0,5–0,05 %), šentjanževke (0,5–0,05 %), oljke CV1 (0,5–0,05 %) in oljke CV2 (0,5–0,05 %). Nekoliko krajši čas za doseg mejne vrednosti PV v primerjavi s kontrolo

so imeli vzorci izvlečkov bezga CV2 (0,1 %), bezga (0,1 %), smilja (0,5–0,1 %), peščenega smilja (0,50–0,1 %) ter bezga CV3 03.17 (0,5 %). Enajst (tj. ena četrтина) vzorcev z rastlinskimi izvlečki je imelo rezultate, ki so bili boljši v primerjavi s kontrolo. To so bili vsi vzorci z izvlečkom bezga v koncentracijah 0,1–0,01 %, bezga CV3 pa tudi v 0,5-odstotni koncentraciji. Za najboljšega izmed vseh se je izkazal izvleček bezga CV3 03.17 (0,01 %). Navedeni vzorci izvlečkov bezga so bili v preprečevanju oksidativnega kvarjenja tudi bolj učinkoviti od vitamina E v obeh koncentracijah (0,05 in 0,01 %).



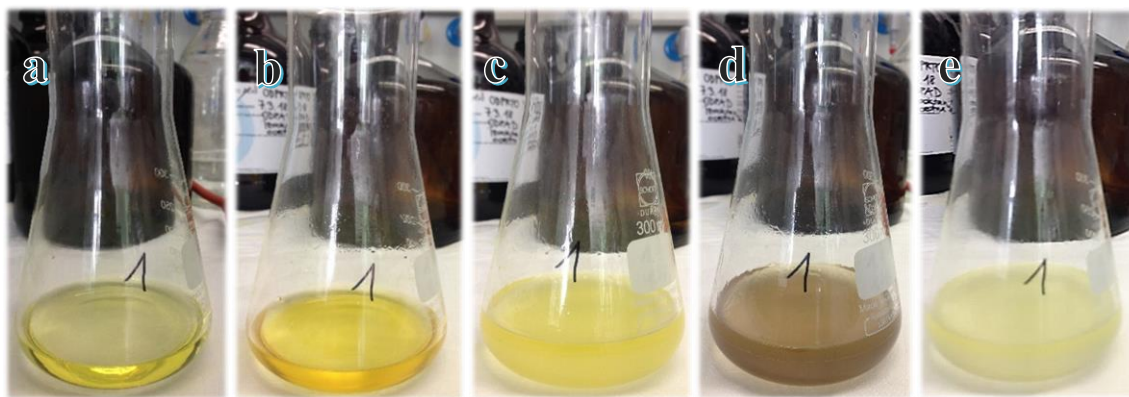
Slika 17: Vrstični grafikon prikazuje čas v dnevih, ko PV doseže vrednost 15 mEq/kg. Vrednosti smo odčitali z osnovnih grafov in jih združili za vzorce z enakimi rezultati.

Razlaga poteka dela in možnih napak:

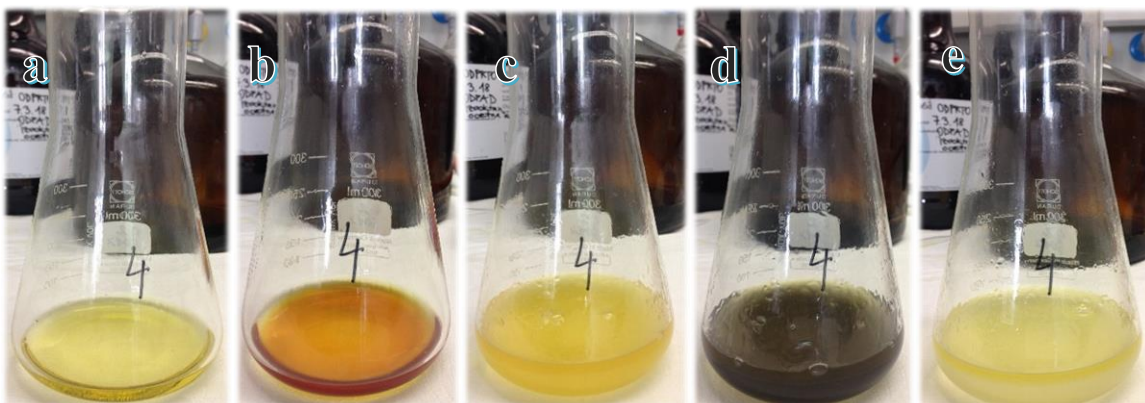
Zaradi velikega števila vzorcev meritev PV nismo mogli izvesti po prvotno zastavljenem načrtu: ničelna meritev takoj ob pripravi posameznega vzorca in nato na vsakih sedem dni

med staranjem. Do prve analize PV so tako nekateri vzorci stali v zaprtih vsebnikih na sobni temperaturi. Vzorce bi morali takoj po pripravi shraniti v hladilniku do izvedbe prvih analiz PV. Za izvedbo tedenske serije analiz vseh vzorcev smo potrebovali tri dni, pri čemer smo v nekaj časovnih točkah zaradi lažje organizacije dela analize vzorcev zamaknili preko vikenda na začetek naslednjega tedna (od tod daljši razmak med ničto in prvo meritvijo pri vzorcih 2–4 oz. zamik prve meritve pri vzorcih 5–12).

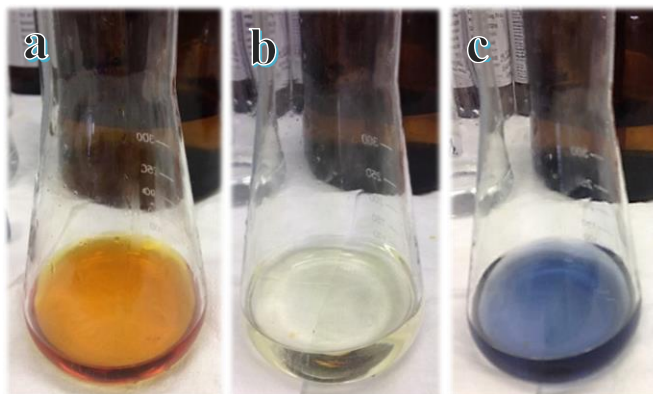
Določanje ekvivalentne točke pri metodi PV je bilo težavno, saj je laneno olje rumene barve, zato ob dodatku kalijevega jodida vsaj pri manjših PV ni prišlo do izrazitega rumenega obarvanja. Ob dodatku škrobovice se je vzorec obarval rjavo, barvni preskok pa ni bil očiten, saj je barva bledela postopoma. Včasih je ob dodatku škrobovice nastala emulzija (predvsem kadar smo natrijev tiosulfat dodajali zelo počasi) ali pa so ostali drobni koščki škroba, ki jih nismo mogli raztopiti. Ugotovili smo še, da obstaja poseben škrob za jodometrijo, ki razvije globoko modro barvo ob prisotnosti joda, za razliko od vodotopnega, ki je včasih ne, saj lahko veže tudi jodidni ion (81). Mi smo uporabljali slednjega. Dodatno težavo so predstavljali močno obarvani vzorci z izvlečki v največjih koncentracijah. Izvlečka gloga in oljke sta dala zeleno barvo, šentjanževke in regrata pa intenzivno rumeno. Pri ostalih opazne razlike v barvi glede na slepi vzorec ni bilo. Pri vzorcu z izvlečkom regrata smo velikokrat prepozno dodali škrobovico ali reakcijsko zmes pretitrirali, saj smo si intenzivno barvo napačno razlagali kot posledico prisotnosti joda. Opazili smo tudi, da se ob dodatku škrobovice preveč blizu ekvivalentne točke, raztopina ni več obarvala, in smo mislili, da smo jo pretitrirali. Ko smo v drugi ponovitvi dodali škrobovico nekoliko prej, pa je bila poraba večja kot prvič, tako da očitno ekvivalentne točke še nismo dosegli. Naslednje opažanje je bilo, da pozneje kot dodamo škrobovico (oz. bolj kot je obarvanje šibko), hitreje se vzorec razbarva. Če pa dodamo škrobovico prehitro, ne dobimo razbarvanja pri enaki porabi. Sliki 18 in 19 prikazujeta barvne preskoke med titracijo za samo laneno olje in olje z dodanim izvlečkom oljke, ki je bil za določanje najbolj problematičen. Za primerjavo so prikazane tudi spremembe barve med standardizacijo natrijevega tiosulfata, kjer je opazno izrazito modro obarvanje po dodatku škrobovice, do katerega ob prisotnosti olja nikoli ni prišlo (slika 20). Zaključimo lahko, da klasična izvedba metode ugotavljanja PV, kot jo prepisuje Ph. Eur., zahteva dobro izurjenega analitika z izkušnjami s tovrstnimi titracijami. Kot najboljšo rešitev za navedene težave predlagamo uporabo škroba za jodometrijo in kolorimetrično ali potenciometrično določanje ekvivalentne točke (19).



Slika 18: Spreminjanje barve vzorca olja (brez izvlečka) med titracijo: a) olje v topilu, b) olje po 1 minuti dodatka KI, c) olje med dodajanjem tiosulfata, d) olje po dodatku škrobovice, e) po ekvivalentni točki.



Slika 19: Spreminjanje barve vzorca olja z izvlečkom oljke (0,5 %) med titracijo: a) vzorec v topilu, b) vzorec po 1 minuti dodatka KI, c) vzorec med dodajanjem tiosulfata, d) vzorec po dodatku škrobovice, e) po ekvivalentni točki.



Slika 20: Barvni preskoki med standardizacijo natrijevega tiosulfata: a) Po dodatku KI, b) proti skorajšnji nevtralizaciji joda, c) po dodatku škrobovice.

Z namenom zmanjšanja porabe topil smo v drugem delu eksperimentov predpisano količino 50 mL zmesi očetne kisline in izooktana nadomestili s 30 mL. Ugotovili smo, da se vzorec olja z izvlečkom (2 g) enako dobro raztopi, barvni prehod pa je veliko bolj jasen in ni nastala emulzija. Ker smo imeli največ težav pri določanju ekvivalentne točke za vzorec z izvlečkom oljke v največji koncentraciji, smo naredili primerjavo za ta vzorec, raztopljen v 50 mL oz.

v 30 mL. V prvem primeru smo določili porabo 13,5 mL natrijevega tiosulfata (kar pomeni PV 66,5 mEq/kg), v drugem pa le 11,2 mL (56,0 mEq/kg).

Pri sami izvedbi metode je pomembno upoštevati tudi naslednje: PV je dinamični parameter, katerega vrednost je odvisna od zgodovine proučevanega rastlinskega olja in zatehtane mase olja, hkrati pa je ugotavljanje PV zelo izkustveno (73). PV, ki ga določimo pri večji masi, je lahko za 30–50 % manjši kot pri manjši zatehti. Razlog za to je večanje napake zaradi raztopljenega kisika, ki povečuje oksidacijo maščobnih kislin (69, 73). Razlike v (uradnih) predpisih glede zateht so razlog za neprimerljivost med rezultati različnih raziskovalcev (69). Pri izvedbi naših preizkusov smo v skladu z zahtevo postopka po Ph. Eur. uporabili zatehto 2,0 g, kar bi bilo ustrezno do 20 meq O₂/kg, naprej pa bi morali zatehto zmanjšati na 0,8–1,2 g ([preglednica VI](#), poglavje 4.2). Šele pri zadnji meritvi smo zmanjšali zatehto na 0,5 g (primerno za vrednosti 30–90 mEq/kg) za vse vzorce razen za vzorec z izvlečkom bezga, kjer smo zatehtali 1 g, saj smo pričakovali manjše vrednosti (72). Pri sveže pripravljenih vzorcih smo zatehto povečali na 4 g (še znotraj predpisa Ph. Eur.), da smo bolj natančno titrirali, saj bi bile sicer porabe natrijevega tiosulfata zelo majhne. Opazili smo, da je pri manjših zatehtah barvni prehod bil veliko lepši, zaradi manjše količine obarvanega vzorca.

Nekateri standardizirani postopki navajajo, da je treba dostop kisika čimbolj omejiti. Tako naj bi bili vsi reagenti in topila preprihani z inertnim plinom, vzorec za analizo pa zatehtan v erlenmajerico z obrusom in takoj zaprt z zamaškom (73, 82). Raztopljeni kisik iz zraka namreč lahko oksidira jodidne ione (35). Uporabe inertnega plina pri pripravi reagentov nismo upoštevali, saj postopek po Ph. Eur. tega ni navajal.

ISO nadalje navaja, da je potrebno reagente (KI, škrobavico in 0,01 M natrijev tiosulfat) pripravljati dnevno sveže, predvsem stabilnost 0,01 M natrijevega tiosulfata je omejena (73). Po postopku AOCS je škrobavica stabilna v hladilniku 2–3 tedne, saj služi salicilna kislina kot konzervans (81). Pri našem delu smo se držali pravila, da ob nastanku rumenkastega obarvanja kalijev jodid zavržemo. Poleg tega smo dnevno opravljali slepi poizkus, pri čemer je bila poraba natrijevega tiosulfata večja od 0,1 mL (tj. prevelika) samo ob koncu dneva, če nismo uporabili svežega kalijevega jodida ali pa če ta ni bil ovit v aluminijasto folijo.

Komentar rezultatov:

Rezultati meritev peroksidnega števila za vzorce lanenega olja z dodanimi rastlinskimi izvlečki so bili višji, kot smo pričakovali, večina izvlečkov torej ni zaščitila olja pred oksidativnimi spremembami. Izjema so bili izvlečki črnega bezga, ki so dajali manjše vrednosti PV od kontrole.

Profili za PV v odvisnosti od časa naj bi bili teoretično sprva zelo položni, nato pa izrazito eksponentno naraščali. Tak profil vidimo pri kontrolnem vzorcu samega lanenega olja, za večino vzorcev z izvlečki pa nismo dobili hitrega preskoka naraščanja PV. Vrednosti so bodisi že od začetka hitro naraščale (vzorci 3, 7 in 8) bodisi eksponentnega porasta PV ni bilo (vzorci 5 in 6). Vzorci so bili odprti in izpostavljeni svetlobi in je najverjetneje poleg avtooksidacije potekala tudi fotooksidacija. Pri fotooksidaciji lahko kvarjenje poteka brez faze indukcije. Najbolj strmo naraščanje je opaziti ravno pri bolj obarvanih vzorcih, tako da lahko sklepamo, da so bili rastlinski pigmenti odgovorni za senzibilizacijo. Listi oljke vsebujejo namreč veliko klorofila, cvetovi regrata pa lutein. Lutein ima prooksidativne učinke pri povišani temperaturi, saj je nestabilen in med segrevanjem razpade na spojine, ki pospešujejo oksidacijo (8). Šentjanževka prav tako vsebuje nestabilne spojine, npr. hiperforin, ki je lipofilen in se ob izpostavljenosti toploti ali svetlobi hitro oksidira do ortoforina (50, 60). Znano je, da antioksidanti v velikih koncentracijah lahko delujejo kot prooksidanti. Tokoferoli lahko povečajo nastanek primarnih produktov oksidacije, ker donirajo vodik peroksilnemu radikalu, pri čemer nastane lipidni hidroperoksid, hkrati pa zmanjšujejo nastanek sekundarnih produktov oksidacije (63). Ta fenomen se kaže kot povečana hitrost oksidacije med fazo indukcije, kljub podaljšanju le-te. To je opazno zlasti za α -tokoferol kot tudi za ostale izomere. Tokoferoli so torej učinkoviti, če jih uporabimo v dovolj majhnih koncentracijah. Optimalna koncentracija za α -tokoferol pri 40 °C v temi je 100 ppm (83). V naši raziskavi je bila optimalna vrednost 500 ppm, vendar pa mi nismo uporabili izoliranih izomerov, ampak njihovo zmes. Posamični izomeri so namreč bolj učinkoviti kot zmes (84). Tokoferoli naj bi bili bolj učinkoviti pri povišani temperaturi, a hkrati tudi hitreje razpadejo (8). Po drugi strani pa so polifenoli, ki lahko oksidirajo ali hidrolizirajo, bolj temperaturno obstojni. V številnih raziskavah so se izkazali tudi za bolj učinkovite od sinteznih BHA in BHT (85). Polifenoli so hidrofilne spojine, zato je njihova topnost v hidrofobnem mediju omejena in posledično njihov antioksidativni potencial (40). Po drugi strani pa so v *in vitro* eksperimentih dokazali, da so hidrofilne fenolne spojine pri

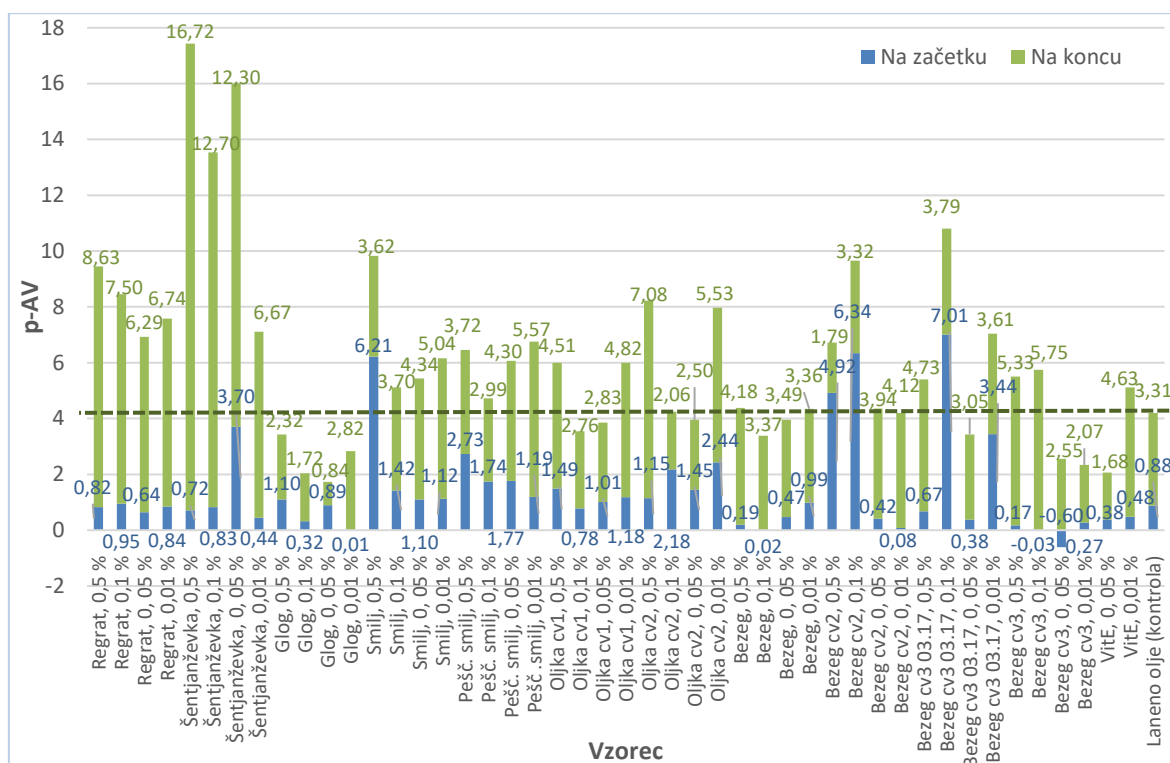
preprečevanju oksidacije maščobnih kislin v olju bolj učinkovite kot hidrofolbni tokoferoli. Polarne spojine se namreč razporedijo po površini asociacijskih koloidov, ki jih tvorijo hidroperoksidi in aldehidi (8). Učinkovitost fenolnih antioksidantov razlagajo tudi s kopičenjem le-teh na površini olja, kjer tvorijo zaščitno plast in otežujejo dostop kisiku, nasprotno se bodo nepolarni antioksidanti enakomerno porazdelili po oljni fazi, zato bo koncentracija na površju manjša (46, 86). Najbolj smiselna je uporaba polarnih in nepolarnih antioksidantov v kombinaciji, saj delujejo sinergistično – fenoli lahko stabilizirajo tokoferole, tokoferoli pa lahko zaščitijo in regenerirajo karotenoide (8). Koncentracija polifenolov in tokoferolov v rastlinskem olju s časom pada, povišana temperatura pa izgubo še povečuje (87).

V nadaljevanju raziskave bi morali proučiti fitokemijsko sestavo izvlečkov, na podlagi česar bi lahko določili posamezne spojine, ki prispevajo k antioksidativni ali prooksidativni aktivnosti izvlečkov na staranje lanenega olja. Prav tako bi bilo smiselno izvesti titracijo s samimi izvlečki (brez lanenega olja), da bi ugotovili, ali so prisotne spojine, ki vstopajo v reakcije z reagenti in kakšen je njihov doprinos k PV.

Ph. Eur. predpisuje mejo PV za deviško laneno olje 15,0 mEq/kg po metodi A. Mi smo uporabili metodo B, ker smo se želeli izogniti uporabi kloroforma. Ta meja je bila dosežena za laneno olje brez dodanega izvlečka nekje po treh tednih od priprave (22,5 dni). Takrat je PV začelo bolj strmo naraščati, kar naznanja pojav žarkosti. Vzorci so bili izpostavljeni obremenilnim razmeram, zato lahko trdimo, da bi ta čas pri sobnih pogojih in v temi bil precej daljši – en dan izpostavljenosti pri 60 °C naj bi bil enak enemu mesecu pri 20 °C (88). Za natančno napoved učinkovitosti izbranih izvlečkov na oksidativno kvarjenje lanenega olja v določenih razmerah shranjevanja bi bilo potrebno ločeno določiti vpliv posameznega obremenilnega dejavnika (temperatura, svetloba, zrak) na vrednost PV.

5.2. Anizidinsko število

V spodnjem histogramu (slika 21) so prikazani rezultati meritev anizidinskega števila (*p*-AV) po modificiranem postopku. Rezultati nemodificiranega postopka so zbrani v [prilogi 3](#) in [4](#). Nismo jih prikazali grafično, ker so številne vrednosti *p*-AV na začetku negativne in smo sprejeli modificirani postopek za pravilnejši. Olivno zelena vodoravna črtkana črta prikazuje vrednost skupnega doprinosa (vrednosti *p*-AV na začetku je prišteta vrednost *p*-AV na koncu staranja) k *p*-AV za kontrolni vzorec (laneno olje brez ekstrakta).



Slika 21: Histogram prikazuje skupen doprinos k anizidinskemu številu. Z modro barvo so podane vrednosti p -AV na začetku, z zeleno pa ob koncu staranja.

Kar precej vzorcev je pod kontrolno mejo: vsi vzorci z izvlečkom gloga, oljke CV1 (0,1 in 0,05 %) ter oljke CV2 (0,05 %), bezga (0,1 in 0,05 %), bezga CV3 03.17 (0,05 %) in bezga CV3 (0,05 in 0,01 %) ter vitamina E (0,05 %). Zanimivo je, da smo ponekod izmerili zelo velike vrednosti že na začetku: pri vzorcih z izvlečki šentjanževke (0,05 %), smilja (0,5 %) in peščenega smilja (0,5 %), bezga CV2 (0,5 in 0,1 %) ter bezga CV3 03.17 (0,1 in 0,01 %). Izstopajo samo nekateri vzorci pri posameznih izvlečkih in to različnih koncentracij, zato sklepamo, da je prišlo do napake v meritvi. V splošnem so bile vrednosti na začetku večje kot pri kontroli, razen pri vzorcih bezgov (z izjemo tistih vzorcev z izstopajočimi velikimi vrednostmi). Dokaj nizke začetne vrednosti sta imela tudi izvlečka gloga in šentjanževke, regrat pa skoraj enake kot kontrola. Končne p -AV vrednosti pri nekaterih izvlečkih (bolj ali manj sorazmerno) padajo s padajočo koncentracijo, pri nekaterih pa naraščajo. Padajo pri vzorcih z izvlečki regrata, gloga, bezga CV3 03.17 (do 0,05 %), šentjanževke (pri koncentraciji 0,01 % so dvakrat manjše kot pri 0,05 %) in bezga CV3. Pri vzorcu z izvlečkom bezga (vzorec 9) so vrednosti za koncentracije 0,1, 0,05 in 0,01 % praktično enake. Pri vzorcih z izvlečki oljke so vrednosti za skrajni (0,5 in 0,01 %) koncentraciji precej večje kot za koncentraciji 0,05 in 0,01 %. Pri obeh vzorcih z izvlečki smilja pa vrednosti s koncentracijo naraščajo, tako kot je to bilo opaziti tudi za vrednosti PV. Vrednosti naraščajo

tudi pri vzorcu z izvlečkom bezga CV2. Zaključimo lahko, da rezultati niso premo sorazmerni s koncentracijo izvlečkov, kar je lahko posledica nahajanja zunaj linearnega območja za absorbanco.

Največji porast *p*-AV na koncu staranja so imeli vzorci z izvlečki šentjanževke in regrata, pa tudi oba vzorca izvlečka smilja 0,01 %, oljke CV2 0,5 %, bezga 0,5 %, bezga CV2 0,05 in 0,01 %, bezga CV3 0,5 in 0,1 % ter vitamina E 0,01 %. Najmanjšega so imeli vzorci z izvlečki gloga 0,5–0,05 %, peščenega smilja 0,5 in 0,1 %, oljke CV2 0,1 in 0,05 %, bezga CV3 0,01% in vitamina E 0,05 %.

Razlaga poteka dela in možnih napak:

Pri tej metodi smo imeli težave pri merjenju absorbance, saj je le-ta s časom padala. Ko smo po nekaj meritvah ponovno pomerili slepi vzorec, je bila absorbanca včasih negativna, morala pa bi ostati blizu ničle. Vrednost za kontrolo na začetku staranja se ujema z vrednostmi, dobljenimi v raziskavi Tánskejeve za hladno stiskano laneno olje (0,56–1,07) (1).

Reagent, topila in vzorci ne smejo vsebovati več kot 0,10 % vode, saj med *p*-anizidinom in aldehidi nastaja voda, zato prisotnost vlage povzroči nepopoln potek reakcije in ugotovljene manjše vrednosti. Posebej higroskopska je ledocetna kislina, zato je potrebno preverjati vsebnost vode s Karl-Fisherjevo metodo ali vsakič uporabiti sveže nalito iz steklenice (89). Ker v enem dnevu nismo mogli pomeriti vseh vzorcev, smo meritve nadaljevali naslednji dan in uporabili ledocetno kislino, nalito v erlenmajerico z zamaškom. Pri merjenju smo imeli težave, saj se vrednosti nikakor niso hotele ustaliti. Ko smo uporabili svežo ledocetno kislino, se je težava razrešila, zato smo vzrok težav pripisali ledocetni kislini.

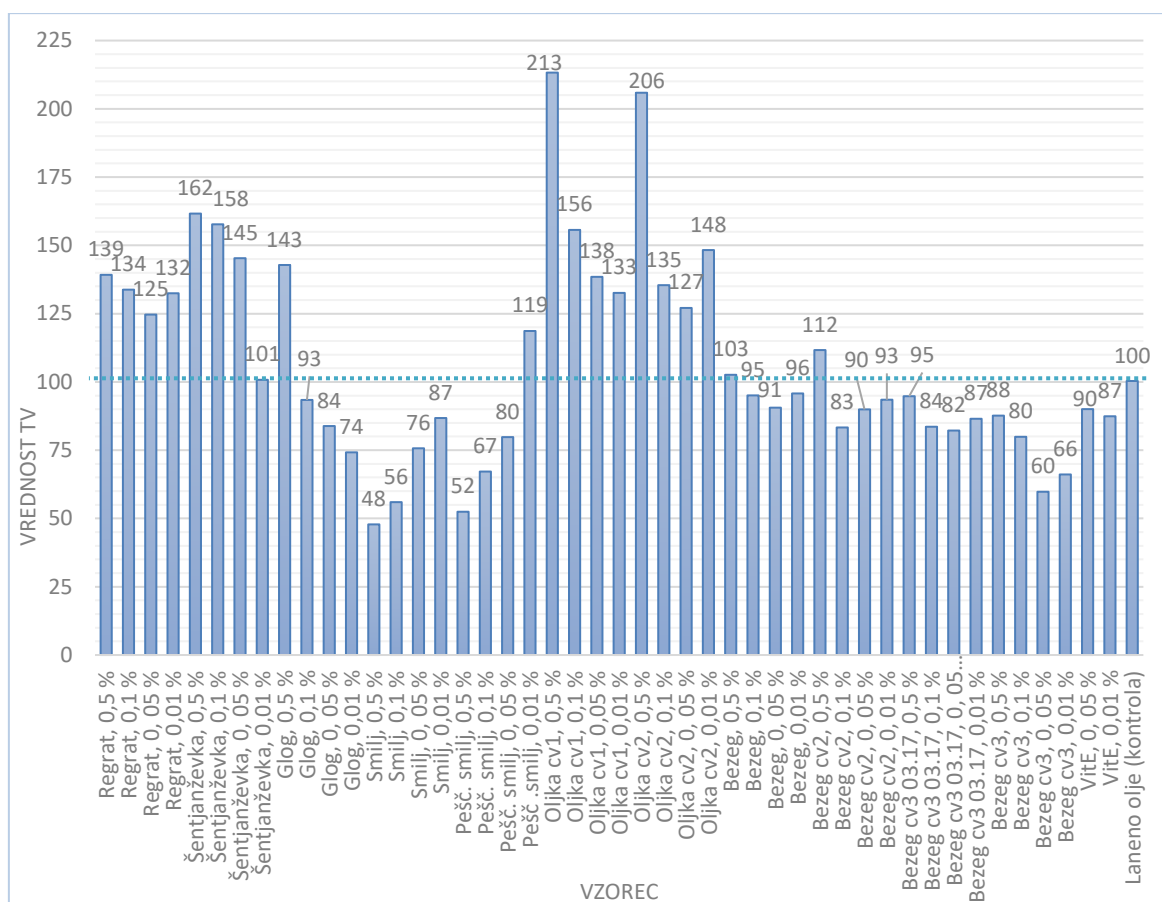
Pri proučevanju postopka izvedbe ugotavljanja *p*-AV smo prišli do naslednjih dejavnikov, ki pomembno vplivajo na rezultate, vendar jih farmakopejski postopek ne omenja. *p*-Anizidin je nestabilen, zato je priporočljivo pripraviti čim manjše količine reagenta in vsakič sveže. Raztopina *p*-anizidina ne sme biti roza ali sivo obarvana, v tem primeru je potrebno *p*-anizidin reducirati z natrijevim sulfitom ob prisotnosti aktivnega oglja. Rekristalizirani *p*-anizidin posušimo in znova pripravimo reagent. Absorbanca reagenta v izooktanu ne sme biti večja od 0,2. Prav tako je potrebno prilagoditi zatehto vzorca, če dobimo absorbance za vzorčne raztopine B zunaj območja 0,2–0,8 (75). Naš reagent je bil roza obarvan, a nismo izvedli prej navedenega postopka čiščenja. Poleg tega ne vemo, kakšna je bila absorbanca

reagenta v izooktanu, saj smo reagent v izooktanu pomerili kot slepo raztopino. Absorbance (čeprav pomerjene glede na reagent v topilu) so bile pri veliki večini vzorcev izven navedenega območja. Verjetno bi morali povečati zatehto vsaj za manjše koncentracije izvlečkov. Še bolj pravilno pa bi bilo narediti umeritveno krivuljo in določiti linearnost območja. Reagent je bil sveže pripravljen za analize na koncu staranja vzorcev, ne pa svež za vsak dan meritev. V hladilniku je zaradi ledocetne kisline zamrznil in se zelo počasi odtajal na sobni temperaturi. Odtajanje smo zato pospešili z gretjem, kar bi tudi lahko prispevalo k nestabilnosti reagenta.

Po izvedbi farmakopejskega postopka ugotavljanja *p*-AV smo dobili ponekod negativne vrednosti *p*-AV, saj je bila meritev za vzorec brez reagenta zelo visoka. Ta postopek ne upošteva doprinosa ledocetne kisline k absorbanci. Mi smo naredili primerjavo po modificiranem postopku, kjer so bi odzivi precej manjši in posledično vrednosti *p*-AV pozitivne, kar je bolj smiselno. Postopek, kjer vzorčni raztopini A dodamo 1 mL ledocetne kisline, je opisan tudi v navodilih ISO 6885, vendar pa način merjenja absorbanc ni čisto enak, kot smo ga izvedli mi (75). V tem postopku navajajo, da pomerimo izooktan kot ozadje in nato absorbance za vzorčno raztopino A z dodanim 1 mL ledocetne kisline, vzorčno raztopino B ter *p*-anizidin v izooktanu. Od absorbance vzorčne raztopine B računsko odštejemo preostali dve absorbanci. Mi smo pomerili absorbance za vzorčne raztopine A glede na izooktan v očetni kislini in vzorčne raztopine B glede na reagent v izooktanu.

5.3. Totoks število

Totoks število (TV) smo določili računsko po [enačbi](#) (poglavje 3.2.4., stran 20). Spodnji histogram (slika 22) prikazuje vrednosti TV ob koncu staranja (vrednosti na začetku ne moremo primerjati med seboj, saj nimamo PV ob času nič). Z modro vodoravno črtkano črto je predstavljena vrednost kontrole. Večina vzorcev je pod to mejo, nad njo pa so vzorci z izvlečki regrata, šentjanževke, oljk, gloga 0,5 %, peščenega smilja 0,01 %, bezga 0,5 % in bezga CV2 0,5 %. Večji poudarek pri izračunu je na doprinosu PV, zato izrazito izstopata vzorca z izvlečkom oljke, ki *p*-AV nista imeli veliki, PV pa največji. Obratno je pri vzorcih z izvlečkom smilja, ki so imeli vrednosti PV majhne in vrednosti *p*-AV med dokaj velikimi, vrednosti TV pa so majhne.



Slika 22: Histogram prikazuje končne vrednosti totoks števila – po enomesečnem staranju.

Glede na rezultate obeh metod lahko zaključimo, da je izmed vseh izvlečkov najbolj obetaven izvleček črnega bezga CV3 koncentracije 0,05 %, saj je bil najbolj učinkovit pri manjši koncentraciji. Oba vzorca CV3 imata zelo dobre rezultate PV, a so vrednosti p -AV za CV3 manjše kot za CV3 03.17, zato je v širšem oziru vzorec CV3 nekoliko boljši antioksidant za laneno olje. Izpostavili bi tudi vzorce z izvlečkom peščenega smilja, ki so sicer dajali najmanjše rezultate TV, vendar v obratnem vrstnem redu glede na koncentracije – najboljše vrednosti smo dobili za 0,5-odstotni izvleček. Poudariti moramo, da vrednosti p -AV za te vzorce niso med najboljšimi, vrednosti PV pa so izrazito upadle šele ob zadnji meritvi (samo te smo upoštevali v izračunu TV).

5.4. Analiza z GC-MS

Z GC-MS smo ugotavljali vsebnost hlapnih snovi v proučevanih rastlinskih izvlečkih: terpene in terpenoide, aromatske kisline, alkohole in estre ter alifatske ogljikovodike. Precej spojin program ni identificiral, vendar gre večinoma za pozneje eluirane spojine z večjo molekulsko maso, ki najverjetneje ne prispevajo k antioksidativni aktivnosti. Polifenolov z

GC-MS ne moremo zaznati, saj niso dovolj hlapni. Pred analizo bi bilo vzorce potrebno pretvoriti v hlapne in termostabilne derivate, kot so etri ali estri (90).

Rezultate analize prikazujemo v preglednici VII, in sicer za vzorce ob začetku staranja in po dveh tednih staranja pri istih razmerah, kot smo starali vzorce lanenega olja. Navajamo samo spojine (predvsem mono- in seskviterpeni), za katere smo v literaturi zasledili podatek, da imajo potencialno antioksidativno delovanje ali pa so jih navedli kot sestavine eteričnih olj, ki so jim dokazali dobre antioksidativne lastnosti. V skoraj vseh izvlečkih je bil prisoten tudi fitol, ki je prekurzor vitamina E in ima prav tako antioksidativno delovanje. Skvalen kot prekurzor fitosterolov tudi izkazuje šibke antioksidativne lastnosti, saj z maščobnimi kislinami tekmuje za oksidacijo, katere hitrost se posledično zmanjša (91).

Največjo raznolikost v sestavi smo ugotovili za oba izvlečka smilja, izvleček bezga CV3 in izvleček šentjanževke. Ti so dajali dobre rezultate tudi v poskusih ugotavljanja peroksidnega in anizidinskega števila, le izvleček šentjanževke je pri tem negativno izstopal. To lahko razložimo z nestabilnostjo, ki jo nakazuje tudi analiza GC-MS. Nastali so številni derivati, prisoten je bil tudi (*E*)- β -farnezen, ki je nestabilen in na zraku oksidira. Že pri tehtanju starih izvlečkov za pripravo vzorcev za analizo z GC-MS smo ponekod opazili spremembo v barvi in konsistenci. Večinoma so vzorci potemneli, izvleček peščenega smilja je spremenil barvo iz rumenooranžne v rdečerjavo, izvlečki bezga so pa postali bolj svetli. Sprememba barve lahko nakazuje nastanek radikalov iz rastlinskih pigmentov (83). Tudi pri nekaterih drugih izvlečkih (smilj, oljka) so se s staranjem pojavili drugi izomeri ali derivati. Njihovi deleži so se večinoma zmanjšali, vendar je to lahko tudi posledica spremenjenega deleža drugih spojin. Pri izvlečkih gloga, bezga, bezga CV2 in bezga CV3 03.17 nismo zaznali nobenih hlapnih spojin. Ker so ti vzorci dajali v drugih preizkusih dobre rezultate, lahko sklepamo, da z GC-MS identificirane spojine niso glavne nosilke antioksidativnega delovanja.

Rezultati za izvleček vitamina E so skladni s proizvajalčevo deklarirano vsebnostjo: največ je γ -tokoferola, nato δ -tokoferola in α -tokoferola. β -Tokoferola nismo zaznali, smo pa zaznali fitosteroles, ki verjetno izvirajo iz sončničnega olja. Delež vseh tokoferolov je s staranjem upadel, nastale so neidentificirane spojine. Delež posameznih fitosterolov se je zmanjšal le v manjšem obsegu. Čeprav so fitosteroli tudi nagnjeni k oksidaciji, jih lahko dodatek tokoferolov stabilizira (92).

Povzamemo lahko, da smo z metodo GC-MS dobili osnovne informacije o sestavi izvlečkov, za določitev kemizma aktivnih spojin pa bi morali izvesti analizo z LC-MS.

Preglednica VII: Seznam spojin, identificiranih v izvlečkih, ki bi lahko bile odgovorne za antioksidativno delovanje, njihov delež in sprememba v sestavi po staranju 2 tedna. Podajamo tudi delež neidentificiranih spojin v posameznem vzorcu. Deleži so podani v relativnih % površine (površina pod krivuljo vrha/površina pod vsemi krivuljami vrhov $\times 100$).

Izvleček	Spojina s potencialnim antioksidativnim delovanjem (%)	Sprememba v sestavi staranega izvlečka (%)
Regrat	(E)-kariofilen (0,02), fitol (0,11), skvalen (0,04), neidentificirane spojine (98,38)	(Z)-kariofilen (0,2), fitol (1,21), skvalen (0,44), neidentificirane spojine (68,48)
Šentjanževka	α -Pinen (0,32), (E)-kariofilen (1,06), derivat kariofilena (2,35), germakren D (0,44), kadinen γ in δ (0,21 in 0,2), spatulenol (0,25), fitol (1,37), skvalen (0,45), neidentificirane spojine (56,05)	α -Pinen ni več, (E)-kariofilen (0,38), derivati kariofilena (0,9), germakren D (0,2), kadinen γ in δ (0,09 in 0,08), spatulenol (0,16), fitol (0,65), prisoten alo-aromadendren oksid (0,16), neidentificirane spojine (73,22)
Glog	Samo alkani C23-C31, neidentificirane spojine (36,46)	Samo alkani C23-C31, trije dodatni, neidentificirane spojine (5,72)
Smilj	α -Pinen (0,23), cis-geranil acetat (0,74), (E)-kariofilen (0,6), γ in α -kurkumen (2,81 in 0,64), β in α -selinen (1,04 in 0,71), derivati selinena (0,50), rosifoliol (0,18), neidentificirane spojine (48,4)	α -Terpineol (0,14), cis-geranil acetat (0,77), (Z)-kariofilen (0,48), γ in α -kurkumen (0,76 in 0,87), β in α -selinen (1,04 in 0,66), rosifoliol (0,26), prisotna še kopaborneol (0,17) in neo-intermedeol (0,32), neidentificirane spojine (55,45)
Peščeni smilj	α -Pinen (0,62), cis-geranil acetat (0,46), α -cis in trans-bergamoten (0,09 in 0,24), (E)-kariofilen (0,48 %), γ in α -kurkumen (1,9 in 0,39), β in α -selinen (0,56 in 0,32), neidentificirane spojine (55,83)	α -Pinen (0,44), prisotna še nerol (0,12) in α -kopaen (0,22), cis-geranil acetat (0,72), α -cis in trans-bergamoten (0,15 in 0,19), (Z)-kariofilen (0,77), γ in α -kurkumen (2,55 in 0,93), β in α -selinen (0,9 in 0,57), prisotna še kopaborneol (0,21) in rosifoliol (0,22), neidentificirane spojine (41,31)
Oljka CV1	Fitol (3,84), skvalen (1,95), neidentificirane spojine (46,72)	Fitol (2,26), prisoten še fitol acetat (0,99), skvalena ni več, neidentificirane sp. (48,24)
Oljka CV2	α -Pinen (0,37), skvalen (1,84), neidentificirane spojine (28,03)	Prisoten fitol (0,23), pinena in skvalena ni več, neidentificirane spojine (17,64)
Bezeg	Skvalen (4,01), ostalo samo alkani C23-C31, neidentificirane spojine (85,63)	Skvalen (2,2), enaki alkani kot na začetku, neidentificirane spojine (86,98)
Bezeg CV2	Skvalen (2,31), ostalo samo alkani C23-C31 in ester palmitinske kisline, neidentificirane spojine (86,87)	Skvalen (0,98), ostale prisotne spojine so enake kot na začetku, neidentificirane spojine (86,47)
Bezeg CV3 03.2017	Skvalen (7,55), ostalo samo alkani C23-C31, neidentificirane spojine (77,22)	Skvalen (0,98), neidentificirane spojine (86,47)
Bezeg CV3	α -Pinen (0,01), sabinen (<0,01), mircen (0,01), limonen (<0,01), cis in trans-piran linaloloksid (0,13 in 0,01), evgenol (0,01), (E)-kariofilen (0,01), skvalen (3,81), fitol in fitolacetat (0,1 in 0,13), neidentificirane spojine (68,99)	Prisotna samo še cis-piran linaloloksid (0,15) in skvalen (9,9), ostalo so estri maščobnih kislin in alkani C19-C31, neidentificirane spojine (36,15)
Vitamin E	δ -Tokoferol (19,64), γ -tokoferol (65,92), α -tokoferol (10,33), kampesterol (0,41), stigmasterol (0,17), γ -sitosterol (0,97), skvalen (1), neidentificirane spojine (1,26)	δ -Tokoferol (16,32), γ -tokoferol (54,01), α -tokoferol (8,46), kampesterol (0,37), stigmasterol (0,18), γ -sitosterol (0,67), skvalen (0,78), neidentificirane spojine (18,96)

6. SKLEP

V magistrskem delu smo raziskovali vpliv rastlinskih izvlečkov na oksidativno stabilnost lanenega olja. Uporabili smo več analiznih metod: peroksidno število, anizidinsko število, totoks število in GC-MS. Najpomembnejši so rezultati analize peroksidnega števila, saj smo s tem preizkusom izvedli največ meritev in opazovali spremembe v lanenem olju na tedenski ravni. Izmed dvanajstih proučevanih izvlečkov se je za najboljšega izkazal izvleček črnega bezga frakcij CV3 in CV3 03.17 v manjših koncentracijah. Tudi ostali vzorci črnega bezga manjših koncentracij so podaljšali čas do pojava žarkosti lanenega olja glede na kontrolo. Bili so tudi boljši od vitamina E. Za dobre so se izkazali tudi izvlečki peščenega smilja, ki so imeli naraščajočo učinkovitost z večanjem koncentracije. Ostali izvlečki niso izkazali pomembnejših vplivov na povečanje oksidativne stabilnosti olja, nekateri so, zlasti v večjih koncentracijah, celo delovali prooksidativno. Takšni so bili izvlečki šentjanževke, oljke in gloga. Navedeni vzorci so bili izrazito obarvani, zato smo sklepali, da so problematični rastlinski pigmenti, ki lahko predstavljajo vir nestabilnosti ob izpostavljenosti svetlobi. Pomen izbire optimalne koncentracije je opazen pri večini izvlečkov, najbolj pa pri izvlečkih črnega bezga, kjer 0,5-odstotna koncentracija pospešuje kvarjenje, 0,1- ali 0,05-odstotna pa le-to zavira.

Ugotovili smo še, da je sestava izvlečka pomembna, saj so bili rezultati različnih frakcij izvlečka iste rastline drugačni. Najbolj različne profile je dajal bezeg frakcije CV3. Za ta izvleček smo tudi z analizo z GC-MS zaznali največ spojin s potencialnim antioksidativnim delovanjem. Učinkovite so bile tudi druge frakcije črnega bezga, pri katerih nismo zaznali veliko aktivnih spojin. Na podlagi tega lahko zaključimo, da so nosilci antioksidativne aktivnosti tudi spojine, ki jih z GC-MS nismo zaznali.

Natančno načrtovanje poskusa je zelo pomembno, da zmanjšamo napake, ki bi lahko vplivale na zanesljivost rezultatov. Vsi vzorci bi morali biti pripravljeni na enak način in do prve meritve počakati v hladilniku. Izvlečkom bi morali pomeriti peroksidno število v odsotnosti olja, da bi dobili podatek o vstopanju spojin, prisotnih v izvlečkih, v reakcije z reagenti te metode. Nadalje bi bilo potrebno tudi izboljšati metodo anizidinskega števila: očistiti reagent, pripraviti umeritveno krivuljo in validirati modifikacijo farmakopejskega postopka. V nadaljnjih raziskavah bi bilo smiselno določiti kemijsko sestavo izvlečkov črnega bezga in peščenega smilja ter podrobneje raziskati njihovo antioksidativno aktivnost.

7. LITERATURA

1. Tańska M, Roszkowska B, Skrajda M, Dąbrowski G: Commercial Cold Pressed Flaxseed Oils Quality and Oxidative Stability at the Beginning and the End of Their Shelf Life. *J. Oleo Sci.* 2016; 65: 111–21.
2. Shahidi F: Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Vol.2 Edible Oil and Fat Products: Edible Oils, 6th edition, Wiley, Hoboken, 2005: 281–92.
3. Gunstone F: Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses. Wiley, Chichester, 2011: 306–9.
4. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>.
5. <http://www.pomurske-lekarne.si/tocka-zdravja/lan-navadni-linum-usitatissimum>.
6. Thompson LU, Cunnane SC: Structure, Composition, and Variety Development of Flaxseed, v *Flaxseed in Human Nutrition*, 2nd ed., AOCS Press, Champaign, 2003.
7. Ganorkar P: Flaxseed - A nutritional punch. *Int. Food Res. J.* 2013; 20: 519-525.
8. Hasiewicz-Derkacz K, Kulma A, Czuj T, Prescha A, Żuk M, Grajzer M, Łukaszewicz M, Szopa J: Natural phenolics greatly increase flax (*Linum usitatissimum*) oil stability. *BMC Biotechnol.* 2015; 15.
9. Zielińska A, Nowak I: Fatty acids in vegetable oils and their importance in cosmetic industry. *Chemik* 2014; 68: 103–10.
10. <https://medicinenewbie.blogspot.com/2014/06/revision-lipid-metabolism-1-july-2014.html>.
11. Zvonar A: Funkcionalni lipidi kot nutricevtiki in prehranska dopolnila, v *Prehranska dopolnila II: strokovno izobraževanje*, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010: 32-41.
12. Wildman REC: Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods. 2nd ed. CRC/Taylor&Francis, Boca Raton, 2007: 1-23.
13. Raspor P: Definicije funkcionalnih živil in varnostni vidik funkcionalne prehrane, v *Prehranska dopolnila II: strokovno izobraževanje*, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010: 101-21.
14. Lockwood B: Nutraceuticals: A Guide for Healthcare Professionals, 2nd ed, Pharmaceutical Press, Greyslake, 2007: 1-17, 29-34.
15. Wanasundara PK, Shahidi F: Process-induced compositional changes of flaxseed, v *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol 434, Plenum Press, New York, 1998: 307–25.
16. Pravilnik o kakovosti jedilnih rastlinskih olj, jedilnih rastlinskih masteh in majonezi, 2009, Uradni list Republike Slovenije, št.79, 10635-37.
17. Czaplicki Sylwester, Ogrodowska Dorota, Derewiaka Dorota, Tańska Małgorzata, Zadernowski Ryszard: Bioactive compounds in unsaponifiable fraction of oils from unconventional sources. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2011; 113: 1456–64.
18. Glover TT: Formularium Slovenicum 3.3: Slovenski Dodatek k Evropski Farmakopeji, tretje dopolnilo k tretji izdaji, Javna agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke, 2014: 91-92.

19. Matthäus B: Oxidation of edible oils, v *Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Woodhead Publishing, Cambridge, 2010: 183-238.
20. Rodriguez-Leyva D, Bassett CM, McCullough R, Pierce GN: The cardiovascular effects of flaxseed and its omega-3 fatty acid, alpha-linolenic acid. *Can. J. Cardiol.* 2010; 26: 489–96.
21. Kajla P, Sharma A, Sood DR: Flaxseed-a potential functional food source. *J. Food Sci. Technol.* 2015; 52: 1857–71.
22. Łukaszewicz M, Szopa J, Krasowska A: Susceptibility of lipids from different flax cultivars to peroxidation and its lowering by added antioxidants. *Food Chem.* 2004; 88: 225–31.
23. Khattab RY, Zeitoun MA: Quality evaluation of flaxseed oil obtained by different extraction techniques. *LWT - Food Sci. Technol.* 2013; 53: 338–45.
24. Thompson LU, Cunnane SC: Dietary Sources and Metabolism of α -Linolenic Acid, v *Flaxseed in Human Nutrition*, 2nd ed., AOCS Press, Champaign, 2003.
25. Kočevar Glavač N, Janež D: Masla in olja, v *Sodobna kozmetika: sestavine naravnega izvora*, Širimo dobro besedo, Velenje, 2015: 115-17.
26. Shahidi F: Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Vol 1 Edible Oil and Fat Products: Chemistry, Properties, and Health Effects, 6th ed., Wiley, Hoboken, 2005: 577-606.
27. Napier JA: Plumbing the depths of PUFA biosynthesis: a novel polyketide synthase-like pathway from marine organisms. *Trends Plant Sci.* 2002; 7: 51–54.
28. Anderson BM, Ma DW: Are all n-3 polyunsaturated fatty acids created equal? *Lipids Health Dis.* 2009; 8: 33.
29. Thompson LU, Cunnane SC: Functions Attributable to α -Linolenic Acid Itself, v *Flaxseed in Human Nutrition*, 2nd ed., AOCS Press, Champaign, 2003.
30. Akrami A, Nikaein F, Babajafari S, Faghieh S, Yarmohammadi H: Comparison of the effects of flaxseed oil and sunflower seed oil consumption on serum glucose, lipid profile, blood pressure, and lipid peroxidation in patients with metabolic syndrome. *J. Clin. Lipidol.* 2017; v tiskanju.
31. Oomah BD, Sitter L: Characteristics of flaxseed hull oil. *Food Chem.* 2009; 114: 623–28.
32. El Tanboully N, El Sayed AM, Ali ZY, Abdel Wahab S, El Gayed SH, Ezzat SM, El Senousy AS, Choucry MA, Abdel-Sattar E: Antidepressant-Like Effect of Selected Egyptian Cultivars of Flaxseed Oil on a Rodent Model of Postpartum Depression. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2017; 15 strani.
33. Bozan B, Temelli F: Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils. *Bioresour. Technol.* 2008; 99: 6354–59.
34. Shahidi F, Zhong Y: Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chem. Soc. Rev.* 2010; 39: 4067–79.
35. Robards K, Kerr AF, Patsalides E: Rancidity and its measurement in edible oils and snack foods. A review. *The Analyst* 1988; 113: 213–24.

36. Dias LS, Menis MEC, Jorge N: Effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extracts on the oxidative stability and sensory acceptability of soybean oil. *J. Sci. Food Agric.* 2015; 95: 2021–27.
37. Shahidi F, Zhong Y: Lipid Oxidation: Measurement Methods, v *Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Vol 1 Edible Oil and Fat Products: Chemistry, Properties, and Health Effects*, 6th ed., Wiley, Hoboken, 2005: 357-385.
38. Nykter M, Kymäläinen H-R, Gates F: Quality characteristics of edible linseed oil. *Agric. Food Sci.* 2008; 15: 402.
39. Vidrih R, Vidakovič S, Abramovič H: Biochemical Parameters and Oxidative Resistance to Thermal Treatment of Refined and Unrefined Vegetable Edible Oils. *Czech J Food Sci* 2010; 28: 376-384.
40. Aziz S, Kermasha S: Assessment of the Antioxidant Capacity and Oxidative Stability of Esterified Phenolic Lipids in Selected Edible Oils. *J. Food Sci.* 2014; 79: H730–37.
41. Ruth S, Shaker E, A Morrissey P: Influence of methanolic extracts of soybean seeds and soybean oil on lipid oxidation in linseed oil. *Food Chem.* 2001; 75: 177–84.
42. Michotte D, Rogez H, Chirinos R, Mignolet E, Campos D, Larondelle Y: Linseed oil stabilisation with pure natural phenolic compounds. *Food Chem.* 2011; 129: 1228–31.
43. Kasote DM, Badhe YS, Hegde MV: Effect of mechanical press oil extraction processing on quality of linseed oil. *Ind. Crops Prod.* 2013; 42: 10–13.
44. Shahidi F, Wanasundara PK: Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1992; 32: 67–103.
45. Khojasteh S, Solhnejad R: Determination of Peroxide Value of Soybean Oil Containing Propolis and Without Propolis Under the Influence of Different Levels of Heat. *Tech. J. Eng. Appl. Sci.* 2012: 97–103.
46. Kozłowska M, Szterk A, Zawada K, Ząbkowski T: New opportunities of the application of natural herb and spice extracts in plant oils: application of electron paramagnetic resonance in examining the oxidative stability. *J. Food Sci.* 2012; 77: C994-999.
47. Saoudi S, Chammem N, Sifaoui I, Bouassida-Beji M, Jiménez IA, Bazzocchi IL, Silva SD, Hamdi M, Bronze MR: Influence of Tunisian aromatic plants on the prevention of oxidation in soybean oil under heating and frying conditions. *Food Chem.* 2016; 212: 503–11.
48. Mravljak J, Peterlin Mašič L: Resnice in polresnice o antioksidantih, v *Prehranska dopolnila II: strokovno izobraževanje*, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010: 7-30.
49. Committee On Herbal Medicinal Products: Assessment report on *Taraxacum officinale* Weber ex Wigg., radix cum herba, European Medicines Agency, London, 2011.
50. Kreft S, Kočevar Glavač N: Sodobna fitoterapija : z dokazi podprta uporaba zdravih rastlin. 2., dopolnjena izd., Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2013.
51. Kočevar Glavač N, Janež D et al: Izvlečki, v *Sodobna kozmetika: sestavine naravnega izvora*, Širimo dobro besedo, Velenje, 2015: 589-897.
52. Committee On Herbal Medicinal Products: Assessment report on *Hypericum Perforatum* L., herba, European Medicines Agency, London, 2009.

53. Committee On Herbal Medicinal Products: Assessment report on *Crataegus* spp., folium cum flore, European Medicines Agency, London, 2016.
54. Committee On Herbal Medicinal Products: Assessment report on *Helichrysum arenarium* (L.) Moench, flos, European Medicines Agency, London, 2016.
55. Committee On Herbal Medicinal Products: Assessment report on *Olea europaea* L., folium, European Medicines Agency, London, 2017.
56. Rafiee Z, M. Jafari S, Aalami M, Khomeiri M: Antioxidant Effect of Microwave-assisted Extracts of Olive Leaves on Sunflower Oil. *J. Agric. Sci. Technol.* 2012; 14: 1497-1509.
57. Committee On Herbal Medicinal Products: Assessment report on *Sambucus Nigra* L., flos, European Medicines Agency, London, 2009.
58. Heinrich M, Barnes J, Gibbons S, Williamson EM: *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 2nd ed, Churchill Livingstone, London, 2012: 235.
59. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR: *Supercritical Fluid Chromatography and Extraction, v Principles of Instrumental Analysis*, 6th edition, Brooks Cole, Belmont, 2006: 856-66.
60. Römpf H, Seger C, Kaiser CS, Haslinger E, Schmidt PC: Enrichment of hyperforin from St. John's wort (*Hypericum perforatum*) by pilot-scale supercritical carbon dioxide extraction. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* 2004; 21: 443-51.
61. Lang Q, Wai CM: Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies - a practical review. *Talanta* 2001; 53: 771-82.
62. J.W K: *Supercritical Fluid Technology for Lipid Extraction, Fractionation, and Reactions*. *Lipid Biotechnol.* 2002.
63. Decker EA, Warner K, Richards MP, Shahidi F: Measuring antioxidant effectiveness in food. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 4303-10.
64. Tenyang N, Ponka R, Tiencheu B, Djikeng FT, Azmeera T, Karuna MSL, Prasad RBN, Womeni HM: Effects of boiling and roasting on proximate composition, lipid oxidation, fatty acid profile and mineral content of two sesame varieties commercialized and consumed in Far-North Region of Cameroon. *Food Chem.* 2017; 221: 1308-16.
65. <http://www.ime-insol.si/>.
66. http://www.waters.com/waters/en_SI/For-SFE-extraction-and-CO2-extraction/nav.htm?cid=134826287&locale=en_SI.
67. <https://oljarnapecaric.si/izdelek/eko-laneno-olje-100-ml/>.
68. Shahidi F, Zhong Y: *Antioxidants: Science, Technology, and Applications*, v *Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Vol 1 Edible Oil and Fat Products: Chemistry, Properties, and Health Effects*, 6th ed., Wiley, Hoboken, 2005: 431-89.
69. Fiebig H-J: Peroxide value determination. *Inform* 2003; 14: 651-2.
70. Baumgartner S, Zvonar A, Gašperlin M, Planinšek O: *Kozmetični izdelki I: vaje in teoretične osnove: univerzitetni študijski program Kozmetologija, Fakulteta za farmacijo*, Ljubljana, 2013: 56-7.

71. Tomazin E: Vaje iz analize zdravil. Zavod za farmacijo in za preizkušanje zdravil, Ljubljana, 2000: 45-53.
72. Council of Europe: Methods of analysis 2.5. Assays 2.5.5 Peroxide Value, in *European Pharmacopoeia 8.0 Volume 1*, EDQM, Strasbourg, 2013: 156-7.
73. ISO 3960:2007 (E): Animal and vegetable fats and oils - Determination of peroxide value - Iodometric (visual) endpoint determination, Geneva, 2007.
74. Council Of Europe: Monograph: Linseed Oil, Virgin, v *European Pharmacopoeia 7.0 Volume 2*, EDQM, Strasbourg, 2010: 2369.
75. Quality and Standards Authority of Ethiopia (QSAE): ET ISO 6885: Animal Vegetables Fats and Oils - Determination of Anisidine Value, Ethiopian Standards Agency, Addis Ababa, 2012.
76. Christian GD, Dasgupta P (Sandy), Schug K: Mass Spectrometry, v *Analytical Chemistry*, 7th Edition, Wiley Global Education, Hoboken, 2013: 735-68.
77. Hansen S, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen K: Gas Chromatography, Mass Spectrometry, v *Introduction to Pharmaceutical Chemical Analysis*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2011: 191-209, 231-261.
78. Council of Europe: Methods of analysis 2.5. Assays 2.5.36 Anisidine Value, v *European Pharmacopoeia 8.0 Volume 1*, EDQM, Strasbourg, 2013: 169.
79. Herchi W, Bouali I, Bahashwan S, Rochut S, Boukhchina S, Kallel H, Pepe C: Changes in phospholipid composition, protein content and chemical properties of flaxseed oil during development. *Plant Physiol. Biochem.* 2012; 54: 1–5.
80. Mikek N: Vpliv izbranih rastlinskih izvlečkov na oksidativno stabilnost lanenega olja, magistrsko delo, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2018: 32.
81. AOCS Official Method Cd 8b-90: Peroxide Value Acetic Acid–Isooctane Method, AOCS, Urbana, 2003.
82. IUPAC, Paquot C, Hautfenne A eds: 2.501 Determination of peroxide value (P.V.), v *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats, and Derivatives*. 7th rev. and enl. ed., Blackwell Scientific Publications, Boston, 1987: 199-201.
83. Kamal-Eldin Afaf: Effect of fatty acids and tocopherols on the oxidative stability of vegetable oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2006; 108: 1051–61.
84. Nogala-Kalucka M, Korczak J, Dratwia M, Lampart-Szczapa E, Siger A, Buchowski M: Changes in antioxidant activity and free radical scavenging potential of rosemary extract and tocopherols in isolated rapeseed oil triacylglycerols during accelerated tests. *Food Chem.* 2005; 93: 227–35.
85. Taghvaei M, Jafari SM: Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives. *J. Food Sci. Technol.* 2015; 52: 1272–82.
86. Sekhon-Loodu S, Warnakulasuriya SN, Rupasinghe HPV, Shahidi F: Antioxidant ability of fractionated apple peel phenolics to inhibit fish oil oxidation. *Food Chem.* 2013; 140: 189–96.
87. Abramovič H, Butinar B, Nikolič V: Changes occurring in phenolic content, tocopherol composition and oxidative stability of Camelina sativa oil during storage. *Food Chem.* 2007; 104: 903–9.

88. Douny C, Razanakolona R, Ribonnet L, Milet J, Baeten V, Rogez H, Scippo M-L, Larondelle Y: Linseed oil presents different patterns of oxidation in real-time and accelerated aging assays. *Food Chem.* 2016; 208: 111–15.
89. IUPAC, Paquot C, Hautfenne A eds: 2.504 Determination of the p-anisidine value (p-A.V.), v *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats, and Derivatives*, 7th rev. and enl. ed., Blackwell Scientific Publications, Boston: 1987: 210-11.
90. Viñas P, Campillo: Gas Chromatography–Mass Spectrometry: Analysis of Polyphenols in Foods, v *Polyphenols in Plants*, Academic Press, San Diego, 2014; 103-57.
91. Psomiadou E, Tsimidou M: On the Role of Squalene in Olive Oil Stability. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47: 4025–32.
92. Tabee E, Azadmard-Damirchi S, Jägerstad M, Dutta PC: Effects of α -Tocopherol on Oxidative Stability and Phytosterol Oxidation During Heating in Some Regular and High-Oleic Vegetable Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2008; 85: 857–67.

8. PRILOGE

Priloga 1: Rezultati metode ugotavljanja peroksidnega števila v meq O₂/kg olja in RSD-ji treh meritev v %.

Vzorec	konc.	0	RSD	1	RSD	2	RSD	3	RSD	4	RSD
brez ekstrakta	0%	3,47	6,42	8,27	2,47	10,27	1,71	22,71	1,14	48,51	1,36
regrat	0,50%	8,31	6,45	12,77	0,26	24,25	4,49	41,39	0,23	65,29	2,32
šentj.		9,17	8,33	29,00	7,77	38,82	0,52	53,47	0,82	72,46	5,31
glog		9,64	5,03	30,17	1,67	37,89	0,96	52,22	1,42	70,25	4,50
smilj		4,30	9,59	9,31	1,09	12,52	2,91	23,89	2,20	22,11	4,39
p.smilj		6,33	2,40	9,85	1,02	12,15	1,07	23,51	0,97	24,37	5,39
oljka cv1		15,59	0,92	34,14	0,99	48,26	2,56	76,62	2,30	104,38	0,45
oljka cv2		13,71	5,10	32,70	2,01	44,03	1,91	69,25	4,86	99,40	0,60
bezeg		9,88	2,46	14,81	2,30	21,24	1,40	36,53	1,97	49,21	0,52
bezeg cv2		12,02	4,17	15,54	0,81	21,46	4,52	40,03	1,08	54,93	0,05
bezeg cv3 17		8,81	1,16	10,36	0,76	15,11	1,95	27,60	0,50	45,02	1,11
bezeg cv3		5,67	0,29	7,79	1,43	11,34	4,76	23,22	0,62	41,17	1,40
regrat	0,10%	9,64	1,60	13,76	3,30	21,61	2,32	37,96	1,40	63,15	2,66
šentj.		8,31	3,72	28,30	0,60	39,37	0,56	54,84	0,22	72,51	2,31
glog		8,03	3,25	21,74	0,62	27,71	3,64	38,68	1,61	45,84	4,35
smilj		4,77	3,72	10,27	3,67	13,43	1,66	24,26	0,51	26,14	2,34
p.smilj		7,32	3,80	10,99	0,39	15,07	1,68	26,95	2,25	32,09	4,92
oljka cv1		11,35	1,31	27,44	1,54	36,30	0,69	58,61	1,62	76,45	0,37
oljka cv2		11,94	0,86	24,09	0,78	32,78	0,89	49,17	1,28	66,69	0,32
bezeg		7,29	2,23	9,65	1,37	14,38	1,36	28,20	1,24	45,85	2,26
bezeg cv2		7,28	4,12	9,17	2,22	13,29	2,82	26,87	1,22	40,00	1,25
bezeg cv3 17		5,88	7,19	7,66	2,79	11,38	0,98	23,14	0,54	39,90	0,90
bezeg cv3		5,07	5,88	7,56	1,77	11,49	1,61	22,83	0,63	37,08	5,12
regrat	0,05%	8,75	4,19	13,14	3,42	20,32	0,80	35,04	1,94	59,19	0,45
šentj.		7,28	4,44	27,89	1,73	43,83	1,72	58,29	1,07	56,95	5,63
glog		6,27	5,90	15,98	0,78	21,02	0,96	35,19	3,58	33,95	1,99
smilj		6,12	9,12	10,50	0,44	14,49	2,07	26,03	1,89	35,68	6,32
p.smilj		7,45	2,41	11,19	1,54	16,23	0,26	27,30	3,68	37,74	2,22
oljka cv1		10,66	4,54	24,42	1,17	33,33	0,43	52,75	0,49	67,82	4,15
oljka cv2		11,05	2,24	21,49	0,74	30,30	0,43	44,80	0,64	62,29	2,15
bezeg		7,00	4,87	8,14	3,58	11,18	0,86	25,37	0,98	43,54	1,07
bezeg cv2		8,03	5,72	8,55	1,47	13,14	3,03	26,16	0,30	43,00	1,16
bezeg cv3 17		4,85	7,03	7,08	2,35	10,25	0,46	22,35	0,39	39,57	1,13
bezeg cv3		4,72	0,76	6,98	1,76	10,96	1,47	21,85	0,29	28,61	2,53
vitE		1,32	11,73	7,81	1,98	8,04	1,85	19,50	0,53	44,18	2,19
regrat	0,01%	8,36	8,30	13,56	2,88	22,01	0,51	36,44	2,18	62,86	1,20
šentj.		7,84	4,53	14,50	1,62	25,96	1,23	40,90	1,01	48,00	3,59
glog		7,67	8,19	12,38	2,18	16,11	0,61	28,36	1,37	35,70	2,59
smilj		6,18	1,03	11,03	1,30	16,17	0,89	29,69	2,38	40,87	3,52
p.smilj		7,45	4,08	12,69	2,73	20,37	3,77	34,97	1,57	56,54	8,24
oljka cv1		7,04	3,89	15,57	1,23	25,29	1,59	37,10	1,01	63,89	1,97
oljka cv2		7,27	7,28	14,73	1,95	25,83	1,43	40,79	1,33	71,38	2,28
bezeg		5,40	6,63	6,72	0,00	9,80	1,82	23,64	0,47	46,21	5,46
bezeg cv2		7,11	6,98	8,37	1,31	12,58	4,52	24,67	0,28	44,68	0,61
bezeg cv3 17		3,52	3,89	5,23	0,29	7,63	4,27	19,95	0,43	41,45	1,15
bezeg cv3		4,52	3,01	6,73	0,57	11,07	3,01	22,24	0,80	32,02	2,87
vitE		1,56	9,41	6,76	2,69	9,11	3,37	21,69	1,40	41,39	0,69

Opomba: Meritve vzorcev (0–4) niso bile izvedene ob enakih časovnih točkah, zato vrednosti niso neposredno primerljive med seboj in je potrebno pri vrednotenju rezultatov upoštevati grafe, prikazane v poglavju rezultatov in razprave.

Priloga 2: Rezultati metode ugotavljanja peroksidnega števila (meq O₂/kg olja) za izbrane sveže pripravljene vzorce (tri ponovitve). Z rdečo barvo so označene vrednosti, ki so večje kot pri kontroli.

Vzorec	Konc.	0	1	2	Konc.	0	1	2	Konc.	0	1	2	Konc.	0	1	2
brez eks.	0 %	0,74	10,74	15,72	0 %	1,00	7,78	12,25	0 %	1,00	7,78	12,25	0 %	1,00	7,78	12,25
regrat	0,5 %	1,49	6,70	11,29	0,1 %	1,04	7,04	11,94	0,05%	1,00	7,20	12,06	0,01%	1,00	7,78	12,25
šentj.		1,00	7,36	17,08		1,00	7,69	17,95		1,11	8,63	15,26		1,00	6,38	14,76
glog		3,41	16,92	27,45		2,24	11,41	19,08		1,68	11,54	19,45		1,19	8,91	16,11
p.smilj		0,75	5,57	12,65		0,74	7,13	14,43		0,87	6,48	13,24		1,00	7,64	15,01
oljka cv1		5,62	23,96	51,24		3,80	16,04	27,37		2,99	13,53	25,06		2,13	11,94	23,63
bezeg cv2		2,00	11,72	19,03		1,25	8,19	14,92		1,12	11,36	18,98		0,93	11,82	17,99

Priloga 3: Rezultati metode ugotavljanja anizidinskega števila na začetku staranja (vrednosti nimajo enote). Podane absorbance so povprečje treh meritev, M – modificiran postopek. Z rdečo barvo so označene vrednosti, ki so večje kot pri kontroli.

Vzorec	masa [g]	Aslepa	Aslepa- M	Avzorec	AV	AV - M
Laneno olje (kontrola)	0,806	0,046	0,026	0,050	0,411	0,88
Regrat, 0,5 %	0,792	0,149	0,081	0,103	-0,791	0,82
Regrat, 0,1 %	0,797	0,094	0,039	0,065	-0,525	0,95
Regrat, 0, 05 %	0,799	0,101	0,036	0,053	-1,170	0,64
Regrat, 0,01 %	0,771	0,088	0,030	0,052	-0,830	0,84
Šentjanževka, 0,5 %	0,783	0,154	0,075	0,093	-1,341	0,72
Šentjanževka, 0,1 %	0,782	0,097	0,046	0,067	-0,507	0,83
Šentjanževka, 0, 05 %	0,772	0,095	0,043	0,138	2,288	3,70
Šentjanževka, 0,01 %	0,792	0,077	0,035	0,046	-0,676	0,44
Glog, 0,5 %	0,788	0,114	0,063	0,092	-0,125	1,10
Glog, 0,1 %	0,894	0,099	0,058	0,067	-0,509	0,32
Glog, 0, 05 %	0,830	0,080	0,046	0,070	0,143	0,89
Glog, 0,01 %	0,787	0,067	0,041	0,042	-0,529	0,01
Smilj, 0,5 %	0,700	0,230	0,149	0,294	4,412	6,21
Smilj, 0,1 %	0,747	0,082	0,050	0,085	0,694	1,42
Smilj, 0, 05 %	0,655	0,065	0,045	0,069	0,677	1,10
Smilj, 0,01 %	0,731	0,062	0,030	0,057	0,233	1,12
Pešč. smilj, 0,5 %	0,714	0,211	0,128	0,193	0,747	2,73
Pešč. smilj, 0,1 %	0,667	0,083	0,035	0,074	0,215	1,74
Pešč. smilj, 0, 05 %	0,679	0,081	0,029	0,069	0,079	1,77
Pešč. smilj, 0,01 %	0,733	0,060	0,023	0,052	0,082	1,19
Oljka cv1, 0,5 %	0,683	0,188	0,069	0,103	-2,357	1,49
Oljka cv1, 0,1 %	0,714	0,086	0,035	0,053	-0,782	0,78
Oljka cv1, 0,05 %	0,710	0,080	0,027	0,051	-0,660	1,01
Oljka cv1, 0,01 %	0,634	0,063	0,019	0,044	-0,415	1,18
Oljka cv2, 0,5 %	0,698	0,149	0,056	0,083	-1,796	1,15
Oljka cv2, 0,1 %	0,655	0,077	0,029	0,076	0,557	2,18
Oljka cv2, 0, 05 %	0,724	0,095	0,028	0,063	-0,695	1,45
Oljka cv2, 0,01 %	0,710	0,081	0,026	0,084	0,671	2,44
Bezeg, 0,5 %	0,621	0,090	0,038	0,042	-1,592	0,19
Bezeg, 0,1 %	0,651	0,071	0,038	0,039	-0,945	0,02
Bezeg, 0, 05 %	0,570	0,069	0,030	0,039	-0,977	0,47
Bezeg, 0,01 %	0,697	0,061	0,011	0,034	-0,751	0,99
Bezeg cv2, 0,5 %	0,711	0,134	0,037	0,153	1,770	4,92
Bezeg cv2, 0,1 %	0,757	0,101	0,029	0,189	4,168	6,34
Bezeg cv2, 0, 05 %	0,721	0,102	0,027	0,037	-1,983	0,42
Bezeg cv2, 0, 01 %	0,626	0,074	0,025	0,027	-1,691	0,08
Bezeg cv3 03.17, 0,5 %	0,772	0,116	0,062	0,079	-0,687	0,67
Bezeg cv3 03.17, 0,1 %	0,723	0,110	0,036	0,205	4,700	7,01
Bezeg cv3 03.17, 0, 05 %	0,709	0,105	0,038	0,047	-1,716	0,38
Bezeg cv3 03.17, 0,01 %	0,680	0,084	0,049	0,127	2,542	3,44
Bezeg cv3, 0,5 %	0,749	0,124	0,044	0,048	-2,227	0,17
Bezeg cv3, 0,1 %	0,779	0,151	0,041	0,040	-3,282	-0,03
Bezeg cv3, 0, 05 %	0,729	0,124	0,051	0,036	-2,782	-0,60
Bezeg cv3, 0,01 %	0,733	0,103	0,025	0,032	-2,228	0,27
VitE, 0, 05 %	0,890	0,079	0,043	0,055	-0,386	0,38
VitE, 0,01 %	0,805	0,057	0,037	0,050	0,081	0,48

Priloga 4: Rezultati metode ugotavljanja anizidinskega števila po koncu staranja (vrednosti nimajo enote). Podane absorbance so povprečje treh meritev, M – modificiran postopek. Z zeleno barvo so označene vrednosti, ki so manjše kot pri kontroli.

Vzorec	masa [g]	Aslepa	Aslepa- M	Avzorec	AV	AV - M
Laneno olje (kontrola)	0,504	0,046	0,027	0,083	2,675	3,31
Regrat, 0,5 %	0,502	0,092	0,046	0,190	6,773	8,63
Regrat, 0,1 %	0,512	0,075	0,027	0,155	5,417	7,50
Regrat, 0,05 %	0,520	0,065	0,025	0,134	4,587	6,29
Regrat, 0,01 %	0,503	0,056	0,020	0,133	5,169	6,74
Šentjanževka, 0,5 %	0,513	0,097	0,042	0,328	14,454	16,72
Šentjanževka, 0,1 %	0,504	0,086	0,034	0,248	10,460	12,70
Šentjanževka, 0,05 %	0,512	0,084	0,033	0,243	10,168	12,30
Šentjanževka, 0,01 %	0,516	0,058	0,028	0,142	5,449	6,67
Glog, 0,5 %	0,513	0,068	0,046	0,086	1,732	2,32
Glog, 0,1 %	0,500	0,063	0,028	0,056	0,247	1,72
Glog, 0,05 %	0,533	0,058	0,036	0,051	0,134	0,84
Glog, 0,01 %	0,511	0,056	0,017	0,065	1,112	2,82
Smilj, 0,5 %	0,547	0,163	0,094	0,160	1,322	3,62
Smilj, 0,1 %	0,533	0,092	0,010	0,075	-0,075	3,70
Smilj, 0,05 %	0,528	0,038	0,003	0,079	2,689	4,34
Smilj, 0,01 %	0,500	0,033	0,001	0,085	3,430	5,04
Pešč. smilj, 0,5 %	0,510	0,121	0,070	0,134	1,948	3,72
Pešč. smilj, 0,1 %	0,515	0,044	0,035	0,086	2,893	2,99
Pešč. smilj, 0,05 %	0,523	0,041	0,027	0,102	3,891	4,30
Pešč. smilj, 0,01 %	0,535	0,033	0,023	0,123	5,336	5,57
Oljka cv1, 0,5 %	0,506	0,068	0,052	0,128	4,226	4,51
Oljka cv1, 0,1 %	0,529	0,032	0,029	0,078	2,927	2,76
Oljka cv1, 0,05 %	0,508	0,015	0,024	0,072	3,478	2,83
Oljka cv1, 0,01 %	0,525	0,014	0,020	0,105	5,330	4,82
Oljka cv2, 0,5 %	0,524	0,043	0,041	0,164	7,373	7,08
Oljka cv2, 0,1 %	0,530	0,020	0,024	0,060	2,456	2,06
Oljka cv2, 0,05 %	0,511	0,022	0,023	0,065	2,743	2,50
Oljka cv2, 0,01 %	0,510	0,021	0,025	0,119	5,990	5,53
Bezeg, 0,5 %	0,514	0,087	0,020	0,092	1,122	4,18
Bezeg, 0,1 %	0,508	0,082	0,016	0,073	0,259	3,37
Bezeg, 0,05 %	0,568	0,081	0,010	0,076	0,467	3,49
Bezeg, 0,01 %	0,580	0,074	0,012	0,077	0,776	3,36
Bezeg cv2, 0,5 %	0,513	0,072	0,030	0,061	0,042	1,79
Bezeg cv2, 0,1 %	0,536	0,082	0,013	0,072	0,221	3,32
Bezeg cv2, 0,05 %	0,518	0,064	0,012	0,080	1,564	3,94
Bezeg cv2, 0,01 %	0,539	0,073	0,013	0,087	1,422	4,12
Bezeg cv3 03.17, 0,5 %	0,524	0,078	0,014	0,097	1,832	4,73
Bezeg cv3 03.17, 0,1 %	0,509	0,068	0,012	0,076	1,159	3,79
Bezeg cv3 03.17, 0,05 %	0,511	0,061	0,013	0,065	0,868	3,05
Bezeg cv3 03.17, 0,01 %	0,502	0,053	0,004	0,064	1,185	3,61
Bezeg cv3, 0,5 %	0,505	0,054	0,011	0,100	3,304	5,33
Bezeg cv3, 0,1 %	0,506	0,052	0,009	0,106	3,735	5,75
Bezeg cv3, 0,05 %	0,521	0,046	0,010	0,055	0,956	2,55
Bezeg cv3, 0,01 %	0,503	0,035	0,010	0,045	0,924	2,07
VitE, 0,05 %	0,507	0,046	0,021	0,050	0,671	1,68
VitE, 0,01 %	0,505	0,041	0,016	0,094	3,574	4,63

Priloga 5: Vrednosti totoks števila na začetku in na koncu staranja.

Vzorec	Regrat, 0,5 %	Regrat, 0,1 %	Regrat, 0,05 %	Regrat, 0,01 %
Začetni TV*	17,43	20,23	18,13	17,56
Končni TV	139,21	133,79	124,66	132,46
Vzorec	Šentjanževka, 0,5 %	Šentjanževka, 0,1 %	Šentjanževka, 0,05 %	Šentjanževka, 0,01 %
Začetni TV*	19,05	17,44	18,27	16,12
Končni TV	161,64	157,71	145,30	100,77
Vzorec	Glog, 0,5 %	Glog, 0,1 %	Glog, 0,05 %	Glog, 0,01 %
Začetni TV	20,38	16,39	13,43	15,36
Končni TV	142,82	93,41	83,84	74,21
Vzorec	Smilj, 0,5 %	Smilj, 0,1 %	Smilj, 0,05 %	Smilj, 0,01 %
Začetni TV	14,81	10,96	13,34	13,48
Končni TV	47,83	55,98	75,70	86,78
Vzorec	Pešč. smilj, 0,5 %	Pešč. smilj, 0,1 %	Pešč. smilj, 0,05 %	Pešč. smilj, 0,01 %
Začetni TV	15,40	16,38	16,67	16,09
Končni TV	52,46	67,18	79,79	118,65
Vzorec	Oljka cv1, 0,5 %	Oljka cv1, 0,1 %	Oljka cv1, 0,05 %	Oljka cv1, 0,01 %
Začetni TV	32,67	23,48	22,34	15,26
Končni TV	213,27	155,66	138,48	132,60
Vzorec	Oljka cv2, 0,5 %	Oljka cv2, 0,1 %	Oljka cv2, 0,05 %	Oljka cv2, 0,01 %
Začetni TV	28,56	26,06	23,55	16,98
Končni TV	205,89	135,43	127,09	148,28
Vzorec	Bezeg, 0,5 %	Bezeg, 0,1 %	Bezeg, 0,05 %	Bezeg, 0,01 %
Začetni TV	19,96	14,59	14,47	11,79
Končni TV	102,61	95,06	90,58	95,78
Vzorec	Bezeg cv2, 0,5 %	Bezeg cv2, 0,1 %	Bezeg cv2, 0,05 %	Bezeg cv2, 0,01 %
Začetni TV	28,97	20,91	16,47	14,29
Končni TV	111,66	83,32	89,94	93,49
Vzorec	Bezeg cv3 03.17, 0,5 %	Bezeg cv3 03.17, 0,1 %	Bezeg cv3 03.17, 0,05 %	Bezeg cv3 03.17, 0,01 %
Začetni TV	18,30	18,77	10,08	10,48
Končni TV	94,77	83,59	82,19	86,51
Vzorec	Bezeg cv3, 0,5%	Bezeg cv3, 0,1 %	Bezeg cv3, 0,05 %	Bezeg cv3, 0,01 %
Začetni TV	11,52	10,12	8,83	9,32
Končni TV	87,66	79,90	59,78	66,11
Vzorec	VitE 0,05 %	VitE 0,01 %	Laneno olje (kontrola)	
Začetni TV	3,02	3,61	7,82	
Končni TV	90,04	87,42	100,34	

*Opomba: začetne vrednosti totoks števila med različnimi izvlečki niso primerljive, saj niso bile določene ob enakih oz. ničelnih časovnih točkah.