

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA MIKEK

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA MIKEK

**VPLIV IZBRANIH RASTLINSKIH IZVLEČKOV NA OKSIDATIVNO
STABILNOST LANENEGA OLJA**

**EFFECT OF SELECTED PLANT EXTRACTS ON THE OXIDATIVE STABILITY
OF FLAXSEED OIL**

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, na katedri za Farmacevtsko biologijo, pod mentorstvom doc. dr. Nine Kočever Glavač, mag. farm.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem svoji mentorici doc. dr. Nini Kočever Glavač, mag. farm., za vso pomoč in strokovno usmeritev pri izvajanju praktičnega dela in pisanju magistrske naloge.

Posebna zahvala gre moji družini za finančno in predvsem moralno podporo skozi vsa študijska leta.

Hvala tudi vsem prijateljem, ki so verjeli vame in me vzpodbujali, še posebej Ani za pomoč in dobro voljo pri lektoriranju magistrske naloge.

Izjava

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

Nina Mikek

KOMISIJA:

Predsednica: prof. dr. Julijana Kristl

Član: doc. dr. Matej Sova

Ljubljana, 2018

VSEBINA

VSEBINA.....	4
POVZETEK.....	6
ABSTRACT.....	7
SEZNAM OKRAJŠAV.....	8
1. UVOD.....	1
1.1 LANENO OLJE.....	1
1.1.2 Sestava.....	1
1.1.3 Uporaba.....	2
1.1.4 Proizvodnja.....	2
1.2 OKSIDACIJA RASTLINSKIH OLJ.....	3
1.3 ANTIOKSIDANTI.....	5
1.3.1 ANTIOKSIDANTI NARAVNEGA IZVORA.....	6
1.4 RASTLINSKI IZVLEČKI.....	7
1.4.1 Navadni hmelj (<i>Humulus lupulus</i> L.).....	7
1.4.2 Vrtni ognjič (<i>Calendula officinalis</i> L.).....	7
1.4.3 Navadni brin (<i>Juniperus communis</i> L.).....	8
1.4.4 Prava kamilica (<i>Chamomilla recutita</i> L.).....	8
1.4.5 Navadni rman (<i>Achillea millefolium</i> L.).....	9
1.4.6 Mačja meta (<i>Nepeta cataria</i> L.).....	9
1.5 PEROKSIDNO ŠTEVILO.....	9
2. NAMEN DELA.....	11
3. MATERIALI IN METODE.....	12
3.1 MATERIALI.....	12
3.1.1 Rastlinski materiali.....	12
3.1.2 Topila.....	13
3.1.3 Reagenti.....	13
3.1.4 Aparature in laboratorijska oprema.....	13
3.2 METODE.....	14
3.2.1 Ugotavljanje peroksidnega števila.....	14
4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	17
4.1 PEROKSIDNO ŠTEVILO.....	17
4.1.1 Oksidacija lanenega olja.....	17
4.1.2 Vpliv dodatka izvlečka navadnega hmelja na oksidacijo lanenega olja.....	21
4.1.3 Vpliv dodatka izvlečka vrtnega ognjiča na oksidacijo lanenega olja.....	22

4.1.4 Vpliv dodatka navadnega brina na oksidacijo lanenega olja	24
4.1.5 Vpliv dodatka prave kamilice na oksidacijo lanenega olja	26
4.1.6 Vpliv dodatka navadnega rmana na oksidacijo lanenega olja.....	28
4.1.7 Vpliv dodatka izvlečka mačje mete na oksidacijo lanenega olja	30
4.1.8 Vpliv dodatka vitamina E na oksidacijo lanenega olja	32
4.1.9. Primerjava antioksidativnega delovanja proučevanih rastlinskih izvlečkov in kontrolnih antioksidantov	35
5. SKLEP	40

POVZETEK

Rastlinska olja imajo dolgo tradicijo uporabe na področjih farmacije, medicine, kozmetike in prehrane. Glavna šibkost rastlinskih olj z velikim deležem večkrat nenasičenih maščobnih kislin je hitra pokvarljivost, ob neustreznem skladiščenju namreč oksidirajo in postanejo žarka. Poznamo več dejavnikov, ki vplivajo na kvarjenje olj. Med najbolj pogostimi sta povišana temperatura in prisotnost kisika. Primarni in sekundarni produkti kvarjenja niso samo neprijetnega okusa in vonja, temveč tudi zdravju škodljivi.

Za preprečevanje oksidacije rastlinskih olj pogosto uporabljamo sintezne antioksidante, ki dokazano izboljšujejo oksidativno stabilnost olj in tako podaljšujejo njihovo življenjsko dobo. Vprašanja o varni vsakodnevni uporabi sinteznih antioksidantov so izzvala številne znanstvenike, ki iščejo in proučujejo antioksidante naravnega izvora, s katerimi bi lahko nadomestili sintezne.

V magistrski nalogi smo se posvetili šestim rastlinskim izvlečkom, pridobljenim z ekstrakcijo s superkritičnim ogljikovim dioksidom. V štirih koncentracijah smo jih dodali lanenemu olju, ki je zaradi velikega deleža trikrat nenasičene linolenske kisline oksidativno zelo nestabilno rastlinsko olje. To so bili izvlečki navadnega hmelja, vrtnega ognjiča, navadnega brina, prave kamilice, navadnega rmana, mačje mete in vitamina E. Vzorce smo starali pri temperaturi 40° C in kisiku iz zraka. S pomočjo ugotavljanja peroksidnega števila smo spremljali njihovo oksidativno stabilnost.

Izvlečki mačje mete v koncentracijah 0,1 % in 0,01 %, vse koncentracije izvlečkov navadnega brina in prave kamilice ter izvlečki vrtnega ognjiča v koncentracijah 0,1 % in 0,5 % so povečali oksidativno stabilnost lanenemu olju. Izvlečki vrtnega ognjiča v koncentracijah 0,1 % in 0,5 %, izvleček navadnega brina v koncentraciji 0,5 % ter izvleček mačje mete v koncentraciji 0,1 % so delovali kot boljši antioksidanti v primerjavi s kontrolnim sinteznim antioksidantom BHT. S tem smo dokazali njihovo antioksidativno učinkovitost in potencialno uporabnost kot antioksidanti za izboljšanje oksidativne stabilnosti rastlinskih olj. Rezultati so pokazali, da moramo biti pri uporabi izvlečkov pozorni na prooksidativno delovanje, do katerega lahko pride prevelika koncentracija dodanega izvlečka. To smo videli pri izvlečkih vitamina E in navadnega hmelja pri vseh dodanih koncentracijah, 0,01 %, 0,1%, 0,05 % in 0,5 %.

Ključne besede: laneno olje, peroksidno število, rastlinski izvlečki, oksidativna stabilnost

ABSTRACT:

Vegetable oils have a long tradition of use in pharmacy, medicine, cosmetics and nutrition. The main weakness of vegetable oils with a high content of polyunsaturated fatty acids is their rapid oxidative deterioration. In case of inadequate storage, they quickly become rancid. There are several factors that influence oil deterioration. The most noticeable are the increased temperature and the presence of oxygen. The primary and secondary products of deterioration are not only of unpleasant taste and smell, but also harmful to health.

To prevent oxidation, synthetic antioxidants are most frequently used, which has been shown to improve the oxidative stability of the oils, thus prolonging their expiry date. Many people are asking about the safe daily use of synthetic antioxidants. This has prompted many scientists to searching for antioxidants of natural origin that could replace the synthetic antioxidants.

In the master's thesis six plant extracts were examined, which were obtained by extraction with supercritical carbon dioxide. In four different concentrations, they were added to flaxseed oil, which is a very unstable vegetable oil due to the high proportion of polyunsaturated linolenic acid (containing three double bonds). These were the extracts of *Humulus lupulus*, *Calendula officinalis*, *Juniperus communis*, *Chamomilla recutita*, *Achillea millefolium*, *Nepeta cataria* and vitamin E. The samples were aged exposed to elevated temperature and oxygen from the air. Oxidative stability was determined by the peroxide number method.

Extracts of 0.1% and 0.01% *Nepeta cataria* extract, 0.01%, 0.05%, 0.1% and 0.5% of *Juniperus communis* extract, 0.1% and 0.5% of *Calendula officinalis* extract increased the oxidative stability of linseed oil.

When adding extracts to oils, attention must be paid to the pro-oxidative action. Such effect was demonstrated for vitamin E and *Humulus lupulus* extracts. With the addition of these extracts, we caused an accelerated increase in the peroxide value.

Key words: flaxseed oil, peroxide value, plant extracts, oxidative stability

SEZNAM OKRAJŠAV

BHA	butilhidroksianizol
BHT	butilhidroksitoluen
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
Eur. Ph.	Evropska farmakopeja
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
I _p	peroksidno število
PPM	število delcev na milijon, 1 mg/kg
SD	standardna deviacija
UV	ultravijolično

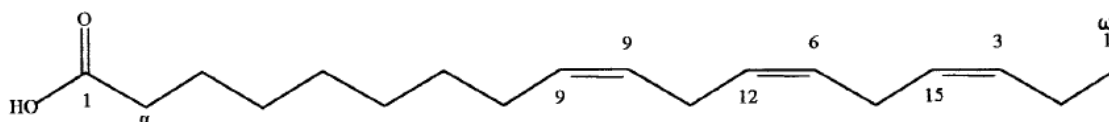
1. UVOD

1.1 LANENO OLJE

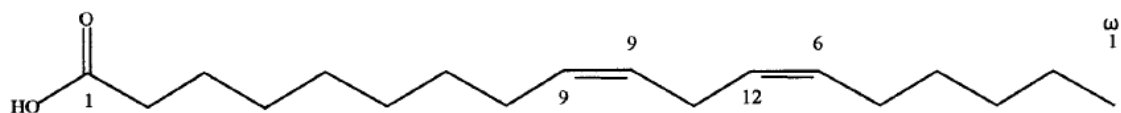
1.1.2 Sestava

Laneno olje, ki ga pridobivamo iz lanenega semena, sodi med najbolj kakovostna jedilna olja (1). To lahko pripišemo velikemu deležu α -linolenske kisline, ki predstavlja približno 60 % vseh maščobnih kislin, ki jih najdemo v trigliceridih lanenega olja. Poleg trigliceridov sestavljajo laneno olje še fitosteroli, fenoli, vitamin E in karotenoidi (1, 2). Laneno seme vsebuje tudi ciklične oktapeptide, ki se med procesom stiskanja ekstrahirajo v olje in mu dajejo značilen grenak okus.

Kljub prisotnosti vitamina E, ki se v 95 % pojavlja v obliki γ -tokoferola, je laneno olje ravno zaradi precejšnjega deleža α -linolenske kisline oksidativno nestabilno. Gre namreč za trikrat nenasičeno maščobno kislino omega-3 z 18 ogljikovimi atomi (slika 1), ki hitro oksidira (2). Spada med esencialne maščobne kisline, ki jih telo nujno potrebuje za normalno delovanje, ne more pa jih proizvesti samo, zato jih je potrebno zaužiti s hrano. Pri tem ni pomemben samo vnos maščobnih kislin omega-3, ampak tudi pravo razmerje glede na maščobne kisline omega-6. Med maščobne kisline omega-6 spada linolna kislina (slika 2), ki v lanenem olju predstavlja 14 % maščobnih kislin (1). Je dvakrat nenasičena z 18 ogljikovimi atomi (3). Idealno razmerje med omega-6 in omega-3 naj bi bilo 1 : 1 do 4 : 1, vendar se je v sodobnem svetu z današnjim življenjskim slogom in uživanjem industrijsko predelane hrane pomaknilo na 15 : 1 (Severna Evropa) ali celo 50 : 1 (Indija) (4).



Slika 1: α -Linolenska kislina (3).



Slika 2: Linolna kislina (3).

1.1.3 Uporaba

Latinsko ime za lan je *Linum usitatissimum*, ki pomeni »vsestransko uporaben«. Že ime nakazuje na širok spekter njegove uporabe. Lan je eno izmed žit z najdaljšo tradicijo pridelovanja. Njegova vlakna so uporabna v industriji, kjer iz njih pridelujejo oblačila in papir. V prehrabni industriji se lan ali laneno olje pojavljata v veliko izdelkih, kot so na primer mleko in mlečni izdelki, mesni izdelki, testenine in hrana za živali. Laneno olje se pojavlja tudi v kozmetiki in farmacevtskih proizvodih. Pripisujejo mu ugodne učinke pri zmanjšanju srčno-žilnih zapletov, raka, sladkorne bolezni, osteoporoze in artritisa. Laneno olje vgrajujejo v kozmetične izdelke predvsem za nego atopijske in k alergijam nagnjene kože (1, 5).

1.1.4 Proizvodnja

Kljub obsežni uporabi proizvodnja lanenega olja predstavlja zgolj 1,14 % pridelave rastlinskih olj, vendar ta zadnja leta narašča. Vodilne države v proizvodnji so Kanada, Kitajska, Rusija in Indija (6).

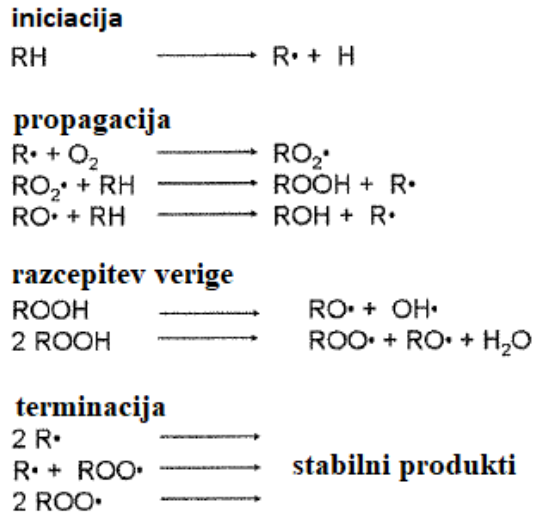
Glede na postopek pridobivanja rastlinska olja v splošnem delimo na rafinirana, nerafinirana in hladno stiskana (deviška). Z rafiniranjem olju odstranimo negliceridne (neumiljive) komponente, ki vplivajo na okus, barvo in stabilnost olja. Nerafinirana olja pridobimo s stiskanjem s predhodno toplotno obdelavo semen. Pri hladno stiskanih oljih ni dovoljena toplotna obdelava. Olje pridobimo z mehanskim stiskanjem, ki mu sledijo filtracija, sedimentacija ali centrifugiranje. Olje ima značilno barvo in okus. Čeprav v primerjavi z rafiniranim oljem produkti oksidacije in negliceridne komponente niso odstranjeni, kakovost deviškega olja ni slabša. V primeru kakovostne proizvodnje je oksidativna stabilnost deviških olj primerljiva ali celo boljša v primerjavi z rafiniranimi olji. V procesu hladnega

stiskanja se v olju namreč ohranijo tokoferoli in drugi antioksidanti, ki olju nudijo oksidativno zaščito (7).

1.2 OKSIDACIJA RASTLINSKIH OLJ

Oksidacijski procesi, ki potekajo v olju, privedejo do žarkosti olja, ki se kaže v spremenjeni gostoti, viskoznosti, barvi, neprijetnem vonju in okusu. To so posledice sekundarnih produktov oksidacije – ketonov, aldehydov, alkoholov, laktonov in drugih. Primarno pa proces oksidacije privede do nastanka hidroperoksidov, ki so brez vonja in okusa. Tako primarni kot sekundarni produkti lahko okvarijo osnovne celične funkcije, saj poškodujejo beljakovine in spremenijo strukturo membran (8). Glavna pot nastanka hidroperoksidov je avtooksidacija. Poznamo še tri druge poti, to so encimska oksidacija, fotooksidacija in ionizirajoče sevanje. Poti oksidacije se razlikujejo v načinu nastanka radikala, potrebnega za sprožitev reakcije, nato oksidacija poteka po enakem mehanizmu.

Avtooksidacija je spontana verižna reakcija, ki ima tri stopnje: iniciacija, propagacija in terminacija (slika 3). V fazi iniciacije nastane radikal maščobne kisline v prisotnosti kovin, encimov, svetlobe, visoke temperature ali sevanja (8), ki nato v fazi propagacije reagira s tripletnim kisikom. Tako nastane zelo reaktiven peroksilni radikal, ki naslednji maščobni kislini vzame vodik, pri čemer se spremeni v hidroperoksid, maščobna kislina pa v radikal. V fazi terminacije antioksidant, npr. vitamin E, odda vodikov atom peroksilnemu radikal. Nastane radikal vitamina E, ki reagira s še enim peroksilnim radikalom, pri čemer nastane neradikalni produkt (9). Avtooksidacija je proces, ki narašča eksponentno, saj vsak radikal povzroči nastanek novega radikala in enega hidroperoksida (7). Hidroperoksid nato vstopa v reakcije po treh različnih mehanizmih. Lahko pride do nastanka sekundarnih produktov, kar se kaže v spremenjenem vonju in okusu. Hidroperoksidi lahko polimerizirajo, to povzroči spremembo barve in viskoznosti olja. Poleg tega pa lahko hidroperoksidi povzročijo oksidacijo drugih komponent v olju – slednje privede do razgradnje rastlinskih pigmentov, vitaminov in proteinov (8).



Slika 3: Proces avtooksidacije (prirejeno po 7).

Različne maščobne kisline imajo različno močno vezan vodikov atom, zato je potrebno pri nekaterih več energije za odcepitev vodika in nastanek radikala. Tako je na primer pri nasičenih maščobnih kislinah moč vezi vodika 99 kcal/mol, pri linolenski kislini pa samo 40 kcal/mol (7).

Življenjska doba olja se začne že na polju, kjer semenska ovojnica ščiti seme pred vremenskimi vplivi in oksidacijo. Previdno je potrebno ravnati s semeni med samo žetvijo in kasneje pri skladiščenju, kjer naj bi bile razmere za shranjevanje 10–15 °C in 6–8 % relativne vlage. Pomembno je tudi, da pri procesu izdelave olja kontroliramo pogoje stiskanja, predvsem izpostavljenost svetlobi, zraku in temperaturi (7).

Pri skladiščenju na oksidativno stabilnost olja vpliva več dejavnikov, notranjih in zunanjih. Notranji dejavniki predstavljajo komponente olja, kot so maščobne kisline trigliceridov (predvsem je pomembna vrsta oz. nasičenost), tokoferoli, fenolne in druge spojine, ki se ekstrahirajo v olje. Na te dejavnike nimamo vpliva, saj so odvisni predvsem od vrste olja in od načina pridelave. Vplivamo lahko samo na zunanje dejavnike. Poskrbimo, da je olje skladiščeno v ustreznih razmerah, da ni neposredno izpostavljeno svetlobi, vodi, zraku, previsoki temperaturi in da čas skladiščenja ni predolg. V zadnjem času se znanstveniki osredotočajo predvsem na gensko spremenjene vrste rastlin, kjer bi dosegli spremenjeno

sestavo maščobnih kislin, predvsem z večjim deležem oleinske kisline, ki je bolj oksidativno stabilna.

Drugi način varovanja pred oksidativno razgradnjo je dodajanje antioksidantov, ki preprečijo ali prekinejo verižno reakcijo oksidacije (7).

1.3 ANTIOKSIDANTI

Po definiciji je antioksidant vsaka snov, ki upočasni, prepreči ali odstrani oksidativno poškodbo tarčne molekule (10). Antioksidanti ne morejo popolnoma ustaviti oksidacije olja, lahko le preložijo njen začetek in zmanjšajo njen obseg, s tem pa podaljšajo življenjsko dobo olja (8). Prevelika količina antioksidantov lahko deluje prooksidativno, torej pospeši oksidacijo (10).

Na podlagi topnosti antioksidante delimo na hidrofilne in lipofilne. (8). Glede na mehanizem delovanja se delijo na primarne in sekundarne. Primarni antioksidanti reagirajo s peroksilnim radikalom, preden ta reagira z nenasičenimi maščobnimi kislinami, ter ga tako stabilizirajo (11). Mednje sodijo butilhidroksitoluen (BHT), butilhidroksianizol (BHA), propilgalat (PG), *terc*-butilhidrokinon (TBHQ), tokoferoli in rastlinski fenoli (fenolne kisline, antocianidini, flavonoidi). Večina primarnih antioksidantov, ki jih najdemo v hrani, ima fenolno strukturo. Sekundarni antioksidanti imajo drugačen mehanizem delovanja (8). Vežejo kovinske ione, pretvorijo hidroperokside v neradikalne produkte, absorbirajo UV sevanje in deaktivirajo singletni kisik (11). To so karotenoidi, citronska kislina, askorbinska kislina in askorbilpalmitat. Pogosto za izboljšanje oksidativne stabilnosti uporabljamo kombinacijo primarnega antioksidanta s citronsko ali drugo kislino, saj pride do sinergizma v delovanju (12).

Upoštevajoč možne stranske učinke sinteznih antioksidantov pri večjih koncentracijah ter njihovo slabšo toplotno stabilnost, je smiselna njihova zamenjava z antioksidanti naravnega izvora. V zadnjih desetletjih so odkrili veliko rastlinskih izvlečkov z antioksidativnim delovanjem, ki so toplotno stabilnejši in učinkovitejši od sinteznih antioksidantov. To so na primer izvlečki zelenega čaja, rožmarina, oljke in sezama (13).

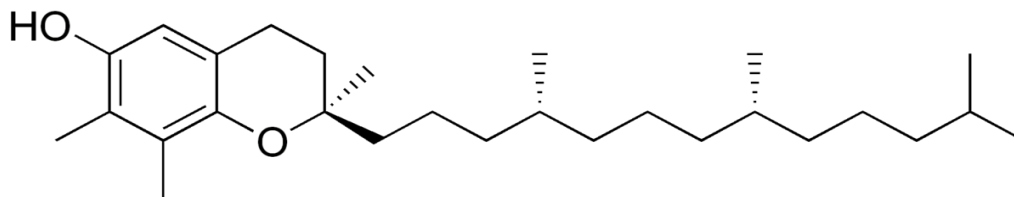
1.3.1 ANTIOKSIDANTI NARAVNEGA IZVORA

Skozi evolucijo so se v organizmih razvili obrambni mehanizmi, ki ščitijo celice pred oksidacijo. Tako najdemo v celicah živali, rastlin in mikroorganizmov številne spojine z antioksidativnim delovanjem. Večina antioksidantov naravnega izvora še vedno ni raziskana. Dokazali so antioksidativno učinkovitost pri uporabi tokoferolov, askorbinske kisline, izvlečkov rožmarina in žajblja v živilski industriji (8). V zadnjih letih poteka veliko raziskav za pridobitev antioksidantov naravnega izvora, ki bi bili učinkoviti, zdravju neškodljivi in bi lahko nadomestili sintezne antioksidante.

V večini držav je koncentracija sinteznega antioksidanta, dodanega živilu, kontrolirana, za antioksidant pa morajo opraviti toksikološke študije. Da antioksidant smatramo kot varen, mora ustrezati dvema pogojema (13). Njegov LD₅₀, odmerek, ki pri polovici preiskovanih živali povzroči smrt, ne sme biti manjši kot 1000 mg/kg telesne mase, in pri daljši uporabi pri koncentracijah, stokrat večjih, kot je dovoljeno za človeško uporabo, ne sme vplivati na rast eksperimentalnih živali. S študijami mora biti dokazano, da antioksidant ni teratogen, mutagen ali kancerogen. Mora biti učinkovit vsaj eno leto pri temperaturi od 25–30 °C. Pri dodajanju antioksidanta olju je pomembna njegova toplotna stabilnost, saj je antioksidant izpostavljen povišani temperaturi, kadar olje toplotno obdelamo (13).

1.3.1.1 Tokoferol ali vitamin E

Tokoferoli so eni izmed najpomembnejših skupin antioksidantov naravnega izvora (8). Najdemo jih kot zmes α -, β - in γ - in δ -tokoferolov in α -, β -, γ - in δ -tokotrienolov (1). Po zaužitju se njihova biološka aktivnost razlikuje. β -Tokoferoli se v rastlinah pojavljajo redko. γ -Tokoferol (slika 4) velja za najbolj učinkovitega med tokoferoli. Ugotovili so, da lahko pri večjih koncentracijah deluje prooksidativno, saj tokoferilni radikali sodelujejo v fazi propagacije, s tem ko prispevajo nov peroksilni radikal, ki nastane pri reakciji s hidroperoksidom (8, 11). Rastlinskim oljem torej naj ne bi dodajali γ -tokoferola, saj naj bi bile v olju že prisotne koncentracije dovolj za njegovo oksidativno zaščito (11). Tokoferole najdemo v rastlinskih oljih, oreščkih in polnozrnatih moki.



Slika 4: Strukturna formula γ -tokoferola (44).

1.4 RASTLINSKI IZVLEČKI

1.4.1 Navadni hmelj (*Humulus lupulus* L.)

Navadni hmelj je trajnica vzpenjalka, ki spada v družino konopljevok. V kitajski medicini ga uporabljajo za zdravljenje gobavosti in pljučne tuberkuloze, v sodobni fitoterapiji pa ga uvrščamo med zdravilne rastline z anksiolitičnim in sedativnim delovanjem (1). Že več kot 500 let hmelj uporabljamo pri varjenju piva, saj prisotne grenčine in hlapne snovi dajejo pivu značilno aromo in protimikrobno zaščito (14).

Za raziskave je še posebej zanimivo žensko socvetje navadnega hmelja, t. i. hmeljevi storžki, ki so med drugim vir derivatov floroglucinola (humulon, lupulon), preniliranih halkanov (ksantohumul), flavonoidov (katehin, kvercetin) in eteričnega olja. Te spojine kažejo protibakterijsko, protirakavo, antioksidativno in protivnetno aktivnost (1). Za antioksidativne učinke so odgovorne tudi polifenolne spojine, ki glede na raziskave ščitijo pred rakom ter srčno-žilnimi boleznimi (15). Vsebnost polifenolnih spojin je odvisna od vrste izvlečka, dela rastline in razmer gojenja rastline in znaša 40–140 mg/g (14).

1.4.2 Vrtni ognjič (*Calendula officinalis* L.)

Vrtni ognjič je enoletna rastlina, značilna za mediteransko območje. Spada v družino nebinovk. Njegove cvetove uporabljamo v številne namene. Najbolj razširjena je tradicionalna uporaba izvlečkov cvetov v obliki mazil za zdravljenje ekcemov, odrgnin, ran, opeklin in hemoroidov, saj delujejo protivnetno, vulnerarično in protibakterijsko. Antioksidativno delovanje vrtnega ognjiča je posledica prisotnosti karotenoidov (3 %), flavonoidov in fenolnih kislin (1, 17). Poleg teh spojin najdemo v izvlečkih še eterično olje

(0,2 %), triterpenske alkohole, polisaharide (15 %) in steroide (0,06–0,08 %) (1). Koncentracija fenolnih spojin v izvlečkih je odvisna od razmer rasti rastline, topila in pogojev za ekstrakcijo (18, 19). V literaturi najdemo podatek o vsebnosti tokoferolov 23 mg/100 g suhe snovi (20).

1.4.3 Navadni brin (*Juniperus communis* L.)

Navadni brin je zimzelena rastlina v obliki grma ali manjšega drevesa, ki zraste do 3 m višine. Spada v družino cipresovk. Najdemo ga v Evropi, Severni Ameriki, Afriki in Aziji, saj uspeva tako v toplem kot hladnem podnebjju. Storže navadnega brina, ki jih laično imenujemo jagode ali plodovi, uporabljamo v medicini, parfumeriji in živilski industriji (1, 21).

V različnih delih rastline najdemo različno sestavo in koncentracijo eteričnega olja. Storžki vsebujejo 39,8 % α -pinena, 9,1 % β -miricena, 8,0 % β -pinena, 4,2 % terpinen-4-ola in 3,7 % limonena. Eterično olje uporabljajo za zdravljenje ekcemov in lajšanje težav s kožo.

1.4.4 Prava kamilica (*Chamomilla recutita* L.)

Prava kamilica je zelo razširjena in dobro poznana rastlina iz družine nebinovk. Danes jo najdemo že skoraj po vsem svetu, njen izvor pa sta južna in vzhodna Evropa. V medicinske namene jo uporabljamo že na tisoče let. Po legendi naj bi predstavljala celo eno od devetih zdravilnih rastlin, ki naj bi jih Bog poslal ljudem. Uporabljamo jo kot antiflogistik, antiseptik in spazmolitik. Uporaba eteričnega olja prave kamilice sega tudi izven okvirov farmacije, v parfumski, kozmetični, živilski industriji in v aromaterapiji (23).

V izvlečkih cvetov prave kamilice najdemo veliko število terapevtsko zanimivih spojin. To so flavonoidi (5,5 %), eterična olja (0,3–1,5 %), kumarini in fenolkarboksilne kisline. Protivnetni učinek pripisujemo seskviterpenskimi laktonom, hamazulenu in α -bisabololu. Seskviterpenski laktoni lahko povzročijo alergijsko reakcijo. Flavonoidi pa dajejo pravi kamilici antioksidativne lastnosti (1).

1.4.5 Navadni rman (*Achillea millefolium* L.)

Navadni rman je trajnica, ki spada v družino nebinovk (1). Najdemo ga v Evropi, Aziji in Severni Ameriki. Ime je dobil po grškem junaku Ahilu, ki naj bi z njim zdravil rane svojim vojakom. Moderna znanost je v izvlečkih navadnega rmana odkrila preko sto biološko aktivnih spojin. Eterična olja, ki predstavljajo 0,1–1 % (hamazulen, kafra, β -pinen, 1,8-cineol), so odgovorna za protibakterijsko delovanje. Flavonoidi so pomembni predvsem za antioksidativno delovanje. Seskviterpenski laktoni, ki jih najdemo v izvlečkih, lahko pri posameznikih povzročijo alergijsko reakcijo (24, 25).

1.4.6 Mačja meta (*Nepeta cataria* L.)

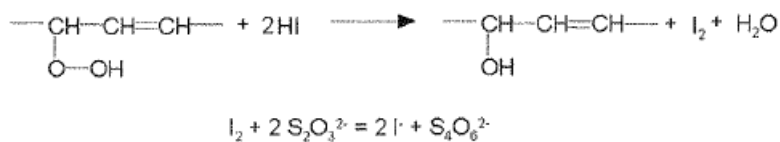
Mačja meta je trajnica iz družine ustnatic. Najdemo jo v srednji Evropi in srednji Aziji (26). Ime izvira iz latinske besede *cataria*, ki pomeni mačka. Mačja meta namreč vsebuje spojino nepetalakton, ki na mačke v rodni dobi deluje halucinogeno (27). V ljudski medicini jo uporabljajo proti krčem in razdraženemu želodcu, pospešuje znojenje in deluje pomirjevalno (26).

1.5 PEROKSIDNO ŠTEVILO

Peroksidno število je metoda za ugotavljanje primarnih produktov oksidacije rastlinskih olj, hidroperoksidov. Podamo ga kot količino hidroperoksidov v milimolih na kg olja (mmol/kg olja) ali pa kot količino miliekvivalentov aktivnega kisika v kg olja (meq O₂/kg olja) (7, 11). Metoda je primerna za spremljanje kvarjenja olja skozi čas. Po fazi indukcije, ko je sprememba v peroksidnem številu majhna, navadno opazimo hiter porast peroksidnega števila, kar dokazuje pokvarjenost olja. Pomembno je, da ima olje na začetku shranjevanja čim manjše peroksidno število. Za rafinirana olja je to pod 1 meq O₂/kg olja, za deviška pa do 3 meq O₂/kg olja (7).

Poznamo več metod ugotavljanja peroksidnega števila. Standardna je metoda po Wheelerju, ki je farmakopejska in smo jo uporabljali v tej raziskavi. Gre za jodometrično titracijo, kjer

s standardno raztopino natrijevega tiosulfata, ob prisotnosti škrobovice kot indikatorja, titriramo količino joda, ki se sprosti pri reakciji hidroperoksida s kalijevim jodidom (slika 5). Količina sproščenega joda je proporcionalna količini hidroperoksidov.



Slika 5: Reakcija lipidnega hidroperoksida z jodidom in titracija joda z natrijevim tiosulfatom (7).

Da je olje kakovostno, ne moremo zagotovo trditi samo na podlagi peroksidnega števila. Hidroperoksidi namreč s časom razpadajo, tako da lahko dobimo lažno oceno kakovosti olja (na primer že nastali hidroperoksidi razpadajo hitreje, kot nastajajo novi). Za pravilno interpretacijo peroksidnega števila moramo torej poznati razmere, v katerih smo shranjevali olje. Pri ugotavljanju kakovosti olja v širšem smislu je zato smiselno uporabiti dodatne metode, s katerimi ugotavljamo prisotnost sekundarnih produktov (npr. anizidinsko število).

2. NAMEN DELA

Rastlinska olja so široko uporabljana na različnih področjih, v farmaciji, kozmetiki, industriji in predvsem v prehranske namene. Z vidika oksidativne stabilnosti so problematična predvsem tista, ki vsebujejo veliko večkrat nenasičenih maščobnih kislin. Značilen predstavnik te skupine rastlinskih olj je laneno olje s približno 60-odstotno vsebnostjo α -linolenske kisline. Ena od možnosti, s katero izboljšamo oksidativno stabilnost takšnih olj, je dodatek antioksidantov.

V magistrski nalogi bomo ugotavljali, ali lahko z dodatkom rastlinskih izvlečkov zmanjšamo oziroma upočasnimo oksidativno kvarjenje lanenega olja. Uporabili bomo šest izvlečkov, ki jih bomo raztopili v olju v štirih koncentracijah. Uporabili bomo rastlinske izvlečke ekstrakcije s superkritičnim ogljikovim dioksidom naslednjih rastlin: navadni hmelj (*Humulus lupulus* L.), mačja meta (*Nepeta cataria* L.), navadni rman (*Achillea millefolium* L.), vrtni ognjič (*Calendula officinalis* L.), prava kamilica (*Chamomilla recutita* L.), navadni brin (*Juniperus communis* L.) ter izvleček vitamina E. Kontrolni vzorec bo laneno olje brez izvlečka, za primerjavo pa bomo izbrali še sintezni antioksidant butilhidroksitoluen (BHT).

Laneno olje z dodanimi izvlečki in kontrolnim antioksidantom bomo starali pri povišani temperaturi in na zraku. Oksidativno stabilnost bomo spremljali s pomočjo ugotavljanja peroksidnega števila po metodi B iz Evropske farmakopeje (Ph. Eur.), in sicer v štirih časovnih točkah vsakih sedem dni.

Na podlagi dobljenih rezultatov bomo določili rastlinske izvlečke, ki bi lahko bili predmet nadaljnjih raziskav v smeri izboljšanja oksidativne stabilnosti olj. Izpostavili bomo tudi snovi, ki ne bodo pripomogle k izboljšanju oksidativne stabilnosti ali celo delovale prooksidativno.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Rastlinski materiali

Uporabili smo šest različnih rastlinskih izvlečkov (preglednica I), pridobljenih z ekstrakcijo s superkritičnim ogljikovim dioksidom (CO₂). To je proces ločevanja snovi z uporabo superkritičnega CO₂ kot ekstrakcijskega topila. Takšna ekstrakcija ima več prednosti. Superkritični CO₂ lažje prodre v rastlinske celice v primerjavi s tekočimi topili. S pomočjo regulacije temperature in tlaka lahko dosežemo selektivno ekstrakcijo. Takšen ekstrakt ne vsebuje zaostankov topil, saj CO₂ popolnoma odstranimo (16).

Preglednica I: *Seznam rastlinskih izvlečkov, ki smo jih proučevali v raziskavi. Izdelali so jih v podjetju IME Insol d. d.*

Slovensko ime rastline	Latinsko ime rastline	Rastlinski del
Navadni hmelj	<i>Humulus lupulus</i>	socvetje
Vrtni ognjič	<i>Calendula officinalis</i>	cvet
Navadni brin	<i>Juniperus communis</i>	plod
Prava kamilica	<i>Chamomilla recutita</i>	cvet
Navadni rman	<i>Achillea millefolium</i>	cvetoča zel
Mačja meta	<i>Nepeta cataria</i>	zel

Pripravili smo vzorce rastlinskih izvlečkov, raztopljenih v lanenem olju, in sicer dve seriji, prvo s koncentracijama 0,1 % in 0,5 % in drugo s koncentracijama 0,01 % in 0,05 %.

Laneno olje (Oleum lini) je bilo nerafinirano in nefiltrirano, hladno stisnjeno neposredno pred začetkom raziskave (Oljarna Pečarič, Slovenija).

3.1.2 Topila

PEROKSIDNO ŠTEVILO

Izooktan in očetno kislino smo pripravili v razmerju 2 : 3 (V/V).

- izooktan, Merck, Nemčija
- brezvodna očetna kislina, Merck, Nemčija

3.1.3 Reagenti

PEROKSIDNO ŠTEVILO

- kalijev jodid, Merck, Nemčija
- natrijev tiosulfat pentahidrat, Sigma-Aldrich, Nemčija
- škrob, Sigma-Aldrich, Nemčija
- salicilna kislina, Sigma-Aldrich, Nemčija
- prečiščena voda, Fakulteta za farmacijo
- kalijev bromat, Merck, Nemčija
- 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol (BHT), Merck, Nemčija
- Tocoferol Natural (30 %), All Organic Treasures GmbH, Nemčija

3.1.4 Aparature in laboratorijska oprema

- tehnica Kern, KERN & Sohn GmbH, Nemčija
- sušilnik SP - 120C EASY, Kambič, Slovenija: 40 °C
- ultrazvočna kadička
- štoparica
- bireta, 25 mL
- avtomatska pipeta

Pri izvajanju eksperimentalnega dela smo uporabili klasično laboratorijsko opremo: erlenmajerice, steklene vsebnike za olja, čaše, steklene palčke, valje, steklene zamaške, čolničke, spatule, nastavke za avtomatsko pipeto, aluminijasto folijo.

3.2 METODE

3.2.1 Ugotavljanje peroksidnega števila

Reagente, njihovo standardizacijo in peroksidno število smo določali po postopkih, ki so predpisani v Evropski farmakopeji (Ph. Eur.) (43).

PRIPRAVA VZORCEV Z RASTLINSKIMI IZVLEČKI

Vzorci prve serije smo pripravili tako, da smo natehtali 0,2 g izvlečka v 200 g olja (koncentracija 0,1 %) ter 1,0 g izvlečka v 200 g olja (koncentracija 0,5 %).

Pri pripravi vzorcev manjših koncentracij (druga serija) smo izvlečke natehtali v 100 g olja. Natehtali smo 0,01 g izvlečka za koncentracijo 0,01 % in 0,05 g izvlečka za koncentracijo 0,05 %.

PRIPRAVA VZORCA Z DODATKOM BHT:

Za pripravo kontrolnega vzorca s sinteznim antioksidantom smo natehtali 0,02 g BHT v 200 g lanenega olja.

PRIPRAVA VZORCA Z DODATKOM VITAMINA E:

Na voljo smo imeli 30-odstotni izvleček tokoferolov v sončničnem olju, zato smo glede na deklarirano vsebnost preračunali, koliko izvlečka tokoferolov potrebujemo, da bo njegova koncentracija v našem vzorcu 0,1 % oziroma 0,5 %. Za pripravo vzorca s koncentracijo 0,1 % smo natehtali 0,66 g izvlečka tokoferolov v 200 g lanenega olja in za pripravo vzorca s koncentracijo 0,5 % 3,30 g izvlečka tokoferolov v 200 g lanenega olja.

Vse izvlečke in kontrolni antioksidant smo zatehtali v steklene vsebnike in jih raztopili v ustrezni količini lanenega olja. Pri raztapljanju izvlečkov v lanenem olju smo si pomagali z ultrazvokom.

Vsi vzorci so bili popoldne in ponoči (približno 16 do 18 h) izpostavljeni povišani temperaturi (40 °C). Zjutraj smo stekleničke vzeli iz sušilnika, jih premešali in odprli, da so bili vzorci lanenega olja z izvlečki izpostavljeni kisiku iz zraka (približno 6 do 8 ur).

PRIPRAVA REAGENTOV

0,01 M natrijev tiosulfat

Pri ugotavljanju peroksidnega števila smo uporabljali 0,01 M natrijev tiosulfat, ki smo ga pripravili z redčenjem 0,1 M natrijevega tiosulfata s prečiščeno vodo.

0,1 M natrijev tiosulfat

Za pripravo 0,1 M natrijevega tiosulfata smo v bučko natehtali 25,0 g natrijevega tiosulfata pentahidrata, dopolnili s prečiščeno vodo do oznake 1 L ter pretresli, da se je natrijev tiosulfat raztopil.

0,033 M kalijevega bromata

Za standardizacijo natrijevega tiosulfata smo na analizni tehtnici v 100-mililitrsko bučko natehtali 0,5565 g kalijevega bromata, dopolnili s prečiščeno vodo do oznake in pretresli, da se je kalijev bromat raztopil.

Pripravili smo nasičeno raztopino kalijevega jodida. V 100-mililitrsko bučko smo natehtali 16,6 g kalijevega jodida in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.

Klorovodikovo kislino smo pripravili tako, da smo v 100-mililitrsko bučko najprej nalili 20 mL prečiščene vode, nato dodali 70 g HCl in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake.

Standardizacija 0,1 M natrijevega tiosulfata

10 mL 0,033 M kalijevega bromata smo dodali 40 mL prečiščene vode, 10 mL kalijevega jodida in 5 mL HCl. Erlenmajerico smo ovili z aluminijasto folijo in pustili 10 minut. Nato smo dodali 1 mL škrobovice in titrirali nastali jod do razbarvanja. Naredili smo tri ponovitve. Povprečna poraba 0,1 M natrijevega tiosulfata je bila 19,75 mL. Po izračunu smo ugotovili, da koncentracija natrijevega tiosulfata ustreza 0,1 M.

Nasičena raztopina kalijevega jodida

Natehtali smo 148 g kalijevega jodida. Prenesli smo ga v 100-mililitrsko bučko in do oznake dopolnili s prekuhano in ohlajeno prečiščeno vodo. S prekuhavanjem prečiščene vode odstranimo raztopljeni CO₂. V bučki ostanejo neraztopljeni kristali kalijevega jodida. Bučko smo ovili v aluminijasto folijo in shranili v hladilnik.

Škrobovica

Natehtali smo 1 g škroba in ga raztopili v manjši količini mrzle prečiščene vode. Dodali smo 200 mL vrele prečiščene vode in 0,25 g salicilne kisline ter zmes vrela še 3 minute. Ohlajeno škrobovico smo prenesli v bučko in bučko zavili v aluminijasto folijo ter shranili v hladilnik.

UGOTAVLJANJE PEROKSIDNEGA ŠTEVILA

METODA B (Eur. Ph.):

V 250-mililitrsko erlenmajerico smo približno natančno natehtali 2 g vzorca (glede na pričakovano vrednost peroksidnega števila) (43). Vzorcju smo dodali 50 mL zmesi izooktana in očetne kisline (v volumskem razmerju 2 : 3) in mešali, da se je olje raztopilo. Dodali smo 0,5 mL kalijevega jodida in močno stresali 60 ± 1 sekundo. Dodali smo 30 mL prečiščene vode, premešali in po kapljicah titrirali z natrijevim tiosulfatom, do skorajšnjega izginotja rumene barve. Nato smo dodali 0,5 mL škrobovice in počasi titrirali do razbarvanja. Titrirali smo po tri ponovitve vsakega vzorca in slepi preizkus, ki ni smel preseči 0,1 mL natrijevega tiosulfata. Peroksidno število (I_P) smo izračunali po naslednji enačbi (43):

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

c ... koncentracija natrijevega tiosulfata

m ... masa natehtanega olja

V₁ ... volumen porabljenega natrijevega tiosulfata vzorca

V₀ ... volumen porabljenega natrijevega tiosulfata slepega preizkusa

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

Rezultate peroksidnega števila smo izrazili kot povprečno vrednost treh meritev. Izračunali smo še standardno deviacijo, ki je navedena pri posameznih grafih, in relativno standardno deviacijo. Slednja je bila pri vseh meritvah manjša od 10 %, kar nam je služilo kot zagotovilo za ustrezno ponovljivost; v nekaj primerih so bila odstopanja večja, kar smo navedli v preglednicah v prilogi.

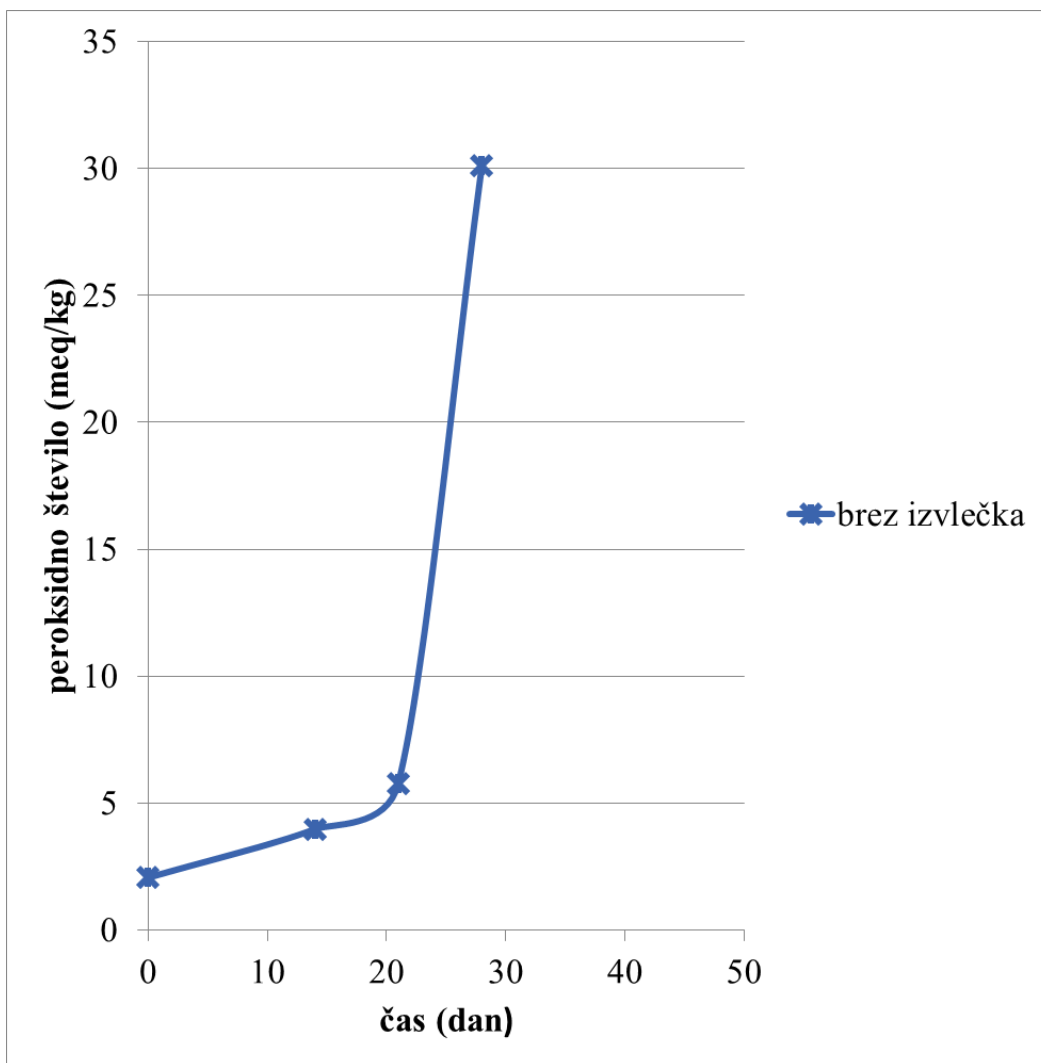
4.1 PEROKSIDNO ŠTEVILO

S pomočjo peroksidnega števila (I_P) lahko časovno spremljamo, kako narašča količina primarnih produktov oksidacije (hidroperoksidi), in določimo točko, ki olje označuje kot žarko. Zgornja meja I_P je za deviška olja 10–20 meq O_2 /kg olja in za rafinirana 5 meq O_2 /kg (7).

V prvem delu raziskave smo proučevali vzorce rastlinskih izvlečkov in vitamina E v koncentracijah 0,1 % in 0,5 %, v drugem delu pa v koncentracijah 0,01 % in 0,05 %. Sintezni antioksidant BHT smo uporabili samo v 0,01-odstotni koncentraciji. Kot kontrolo smo uporabili samo laneno olje brez izvlečka, in sicer v vsakem delu raziskave novo serijo olja. Seriji sta se razlikovali glede na I_P v začetni točki merjenja, in sicer je bilo slednje za 1. serijo 2,06 in za 2. serijo 0.

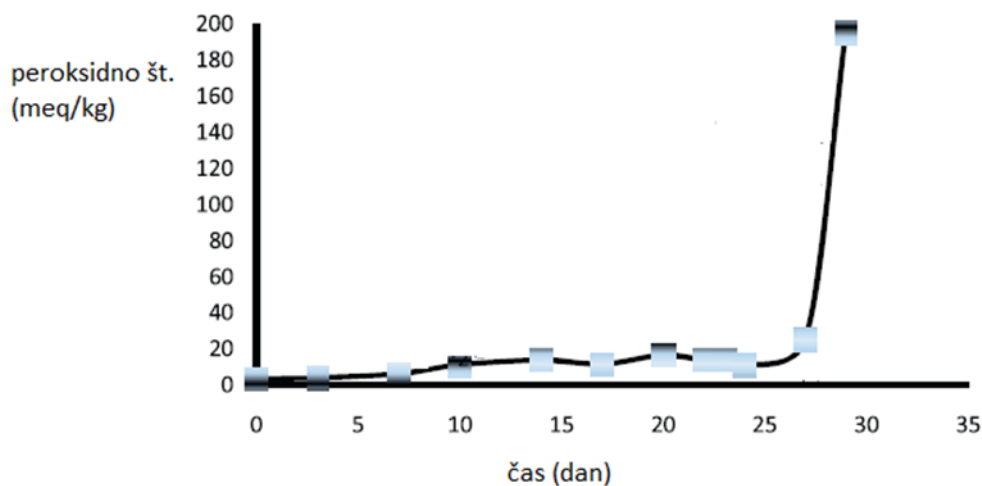
4.1.1 Oksidacija lanenega olja

Po Ph. Eur. mora biti vrednost $I_P \leq 15$ meq/kg, da ustreza zahtevam farmacevtske kakovosti (43). Literatura navaja običajne vrednosti okoli 2,4 meq/kg (29, 30). Preiskovano laneno olje je bilo deviško olje, ki je bilo stisnjeno za namene naše raziskave in smo ga do začetka našega dela (približno en mesec) shranjevali v originalni ovojnini v hladilniku. V ničti točki našega dela (prva serija proučevanih koncentracij izvlečkov) smo določili I_P 2,06 meq/kg (graf 1). S tem smo dokazali, da ustreza pogojem, ki veljajo za deviška olja, torej $I_P < 3$ meq/kg (7).



Graf 1: Peroksidno število (meq/kg) lanenega olja, staranega pri 40 °C, v odvisnosti od časa; SD= 0,1–0,24.

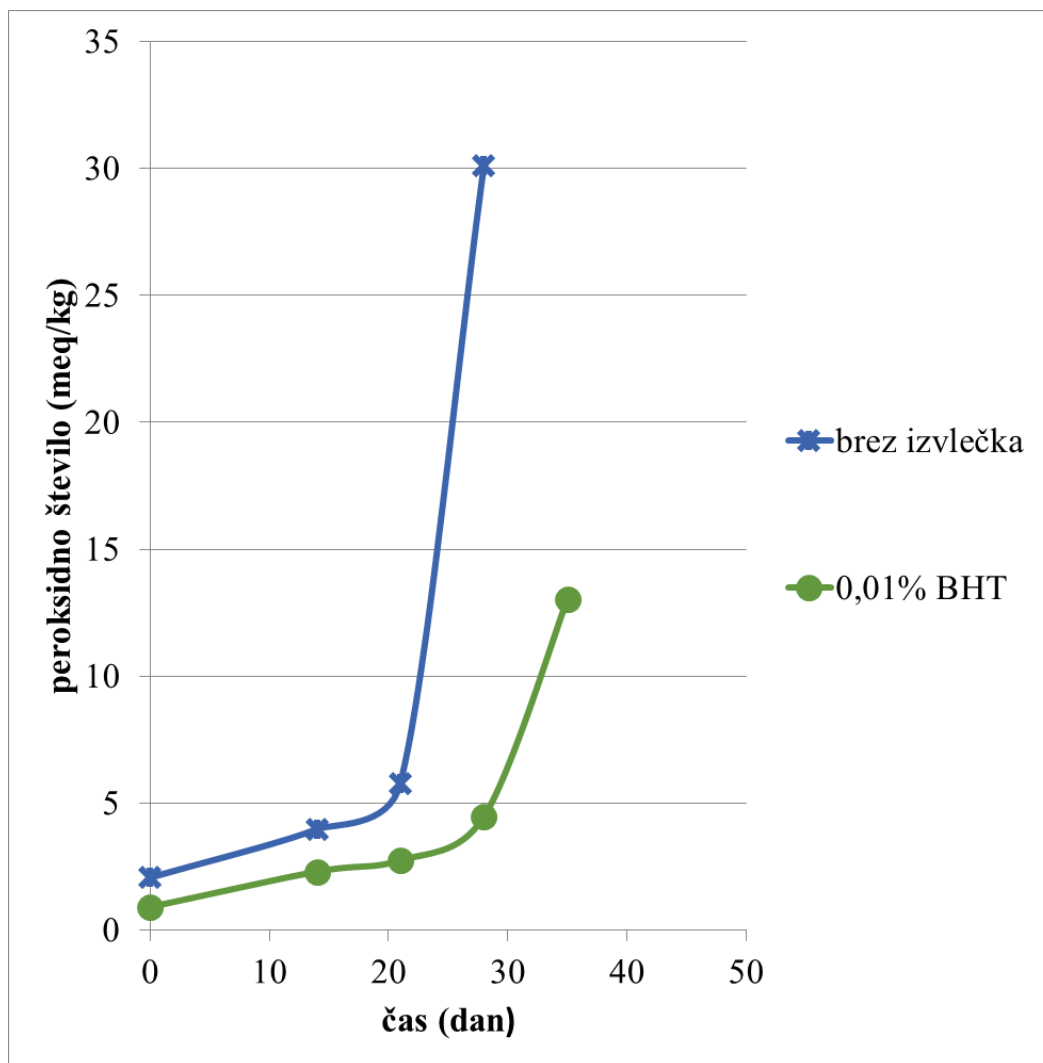
Količina hidroperoksidov v samem lanenem olju, staranem pri temperaturi 40 °C, je potem počasi naraščala do 21. dneva (5,79 meq/kg) ter se v naslednjih sedmih dnevih izrazito dvignila in 28. dan dosegla vrednost 30,1 meq/kg. Naši rezultati so primerljivi z literaturnimi, kjer so laneno olje prav tako izpostavili povišani temperaturi (40 °C) in so njihovi rezultati prikazani na grafu 2 (31).



Graf 2: Peroksidno število (meq/kg) lanenega olja staranega pri 40 °C v odvisnosti od časa (prirejeno po 31).

0,01 % BHT (2,6-di-terc-butil-4-metilfenol)

0,01 % BHT smo raztopili v lanenem olju in je služil kot kontrolni sintezni antioksidant. Z njim smo primerjali rastlinske izvlečke in tako skušali ugotoviti, kateri bi bili primerni kandidati za nadaljnje raziskave in kakšna je možnost zamenjave sinteznega antioksidanta z antioksidanti naravnega izvora. Kot vidimo na grafu 3, je BHT takoj po dodatku lanenemu olju zmanjšal I_P , in sicer z 2,06 meq/kg na 0,91 meq/kg. I_P je nato do 21. dneva naraščal enako počasi kot pri kontrolnem lanenemu olju in šele v 35. dnevju dosegel vrednost 13,0 meq/kg (zgornja meja I_P za deviška olja je 10–20 meq/kg).

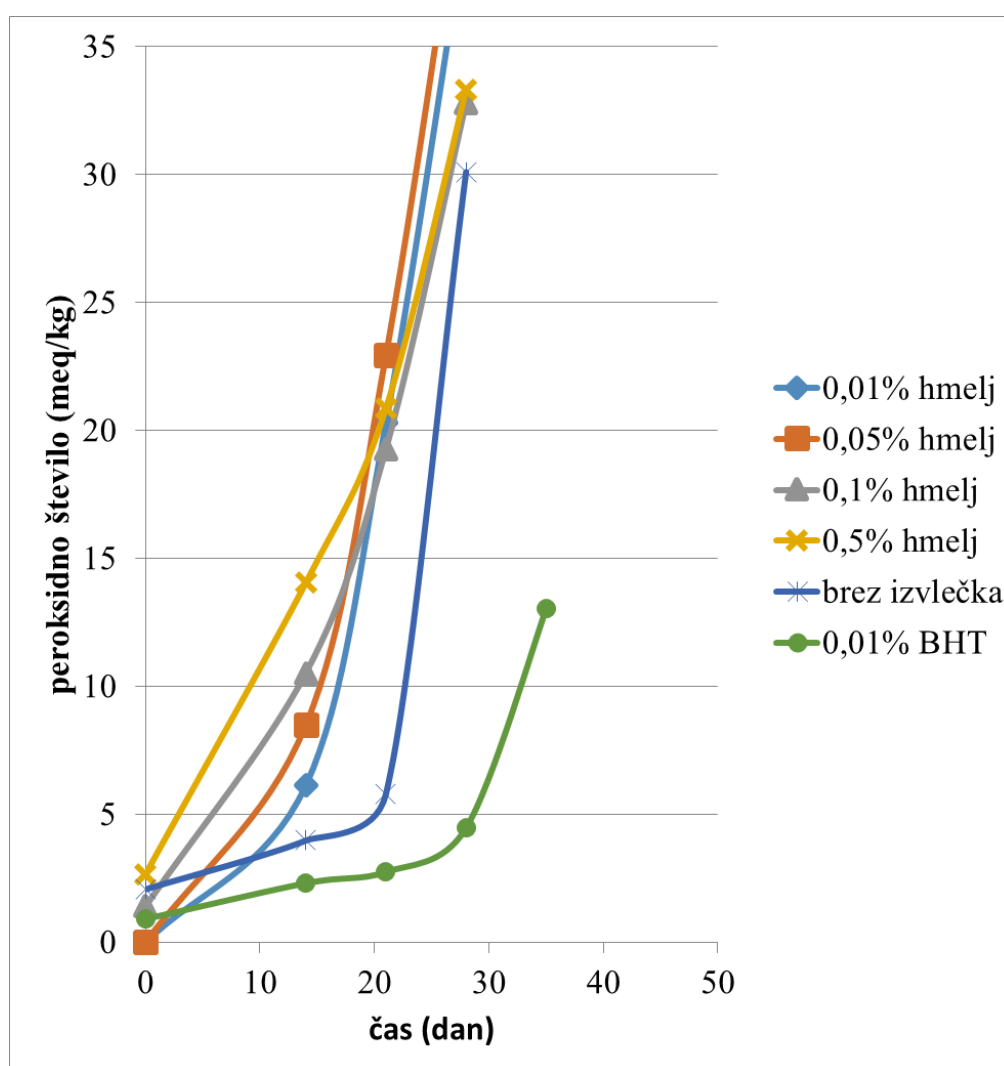


Graf 3: Peroksidno število (meq/kg) lanenega olja s sinteznim antioksidantom, staranega pri 40 °C, v odvisnosti od časa; SD= 0,01–0,23.

Z vidika uporabe za prehranske namene velja BHT za varnega v koncentracijah, dovoljenih za človeško uporabo. V Združenih državah Amerike naj njegova koncentracija ne bi presegala 50 ppm (13). Deloval naj bi celo antikancerogeno (13). Omeniti pa moramo nekatere študije, ki so pokazale, da BHT v večjih koncentracijah vpliva kancerogeno na jetra, ledvica in pljuča. Ravno potencialna toksičnost je razlog za sodobni trend zmanjševanja uporabe sinteznih antioksidantov in nadomeščanja oziroma iskanja antioksidantov naravnega izvora (13).

4.1.2 Vpliv dodatka izvlečka navadnega hmelja na oksidacijo lanenega olja

Prve meritve vzorcev z 0,01 %, 0,05 % in 0,1 % izvlečka navadnega hmelja v lanenem olju so ob času 0 pokazale antioksidativne lastnosti hmelja, saj je izvleček v teh koncentracijah zmanjšal I_p . Nasprotno pa je pri 0,5-odstotni koncentraciji prišlo do nasprotnega delovanja, ki se je nato v nadaljevanju izrazilo pri vseh vzorcih (graf 4).



Graf 4: Peroksidno število (meq/kg) lanenega olja z izvlečkom navadnega hmelja, staranega pri 40 °C, v odvisnosti od časa; $SD=0,03-1,16$.

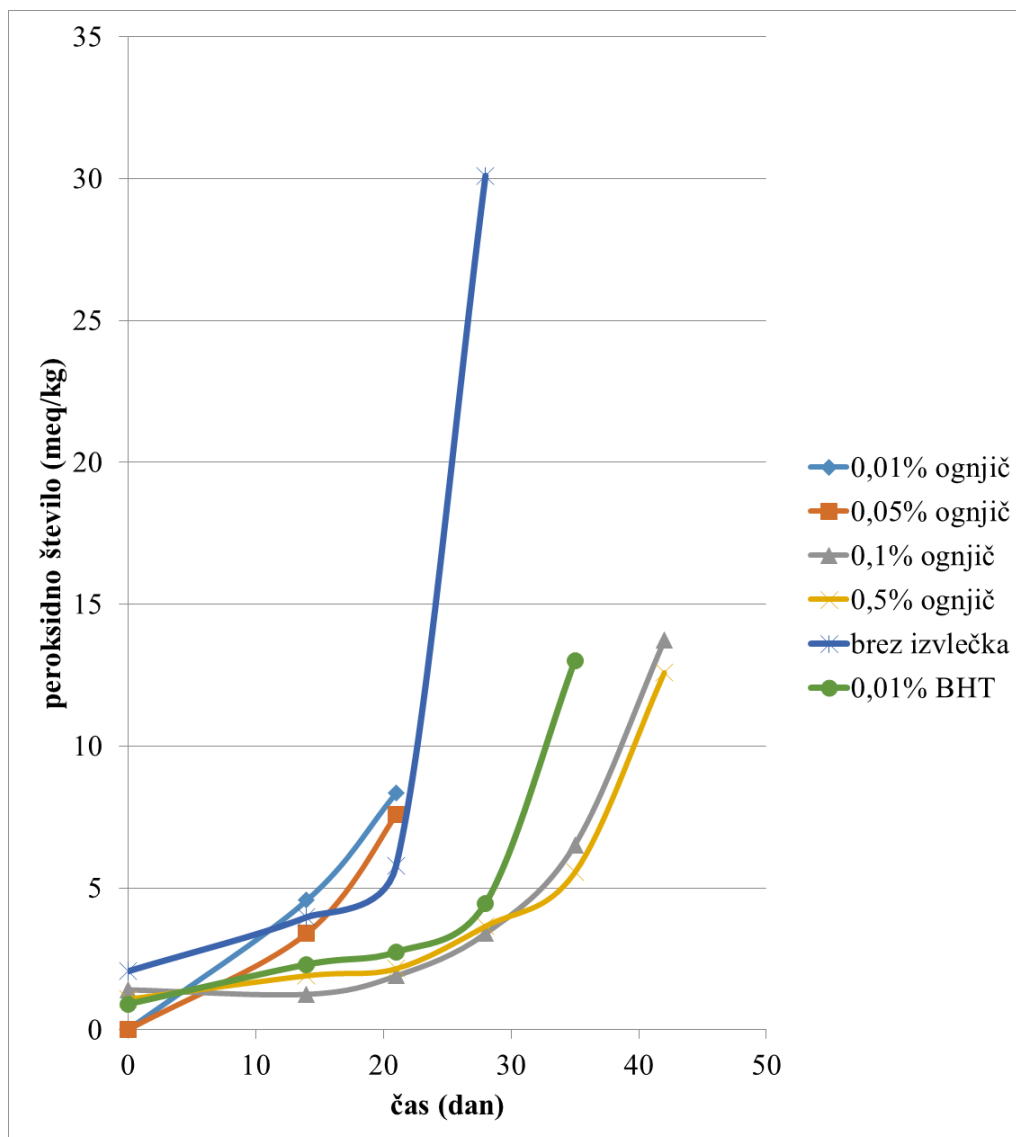
V izvlečku je bila očitno prisotna spojina (ali več spojin), ki je delovala prooksidativno. Po 14. dneh staranja olja vidimo, da je pri večji koncentraciji izvlečka v olju večje tudi I_P . Zanimivo je, da je do 14. dne I_P naraščalo približno enakomerno pri vseh koncentracijah izvlečka, pri meritvi v 21. dnevu pa je prišlo do preobrata in je I_P pri koncentracijah 0,01 % in 0,05 % naraslo hitreje ter v končni točki meritve doseglo največji vrednosti (39,8 meq/kg pri 0,01 % izvlečka in 43,1 meq/kg pri 0,05 % izvlečka).

Glede na začetno predpostavko, da izvleček navadnega hmelja vsebuje snov(i), ki deluje(jo) prooksidativno, smo pričakovali, da bo I_P z večanjem koncentracije izvlečka naraščalo. Omenjenega nepričakovanega porasta I_P pri obeh manjših koncentracijah (0,01 % in 0,05 %) ne znamo smiselno razložiti. Za iskanje vzrokov bi morali poznati kemijsko sestavo izvlečka navadnega hmelja.

Na grafu vidimo tudi, da vse krivulje koncentracij izvlečkov navadnega hmelja naraščajo precej hitro. Ni značilnega položnega dela krivulje, ki v določeni točki začne strmo naraščati, kot lahko opazimo na grafih pri ostalih izvlečkih. Razlog za to je morda v prisotnosti spojin(e) iz izvlečka navadnega hmelja, ki vstopa(jo) v interakcijo s samo reakcijo titracije in daje(jo) lažno večje vrednosti I_P . Po drugi strani pa izhodiščna meritev vzorcev z 0,01 % in 0,05 % izvlečka zavrača to teorijo, saj smo pri teh koncentracijah izmerili I_{P0} . V primeru, da bi bila v izvlečku prisotna snov, ki bi vstopala v interakcijo z reakcijo titracije, I_P ne bi bil 0, razen če je koncentracija te snovi v vzorcih manjših koncentracij na začetku merjenj premajhna. Navadni hmelj vsebuje veliko spojin, katerih delovanje še vedno ni točno definirano in je vsekakor zanimiva tema za nadaljnje raziskave.

4.1.3 Vpliv dodatka izvlečka vrtnega ognjiča na oksidacijo lanenega olja

Pri vzorcih vrtnega ognjiča v koncentracijah 0,1 % in 0,5 % vidimo počasno naraščanje I_P in dobro zaščito lanenega olja pred oksidativnimi spremembami (graf 5). Obe koncentraciji izvlečka sta imeli močnejše antioksidativno delovanje kot sintezni antioksidant. Po 42. dneh je I_P naraslo na 12,6 meq/kg (0,5 %) oziroma 13,7 meq/kg (0,1 %), kar je v primerjavi z samim lanenim oljem ($I_P = 30,1$ meq/kg) več kot pol manjše.



Graf 5: Peroksidno število (meq/kg) lanenega olja z izvlečkom vrtnega ognjiča, staranega pri 40 °C, v odvisnosti od časa; $SD=0-0,53$.

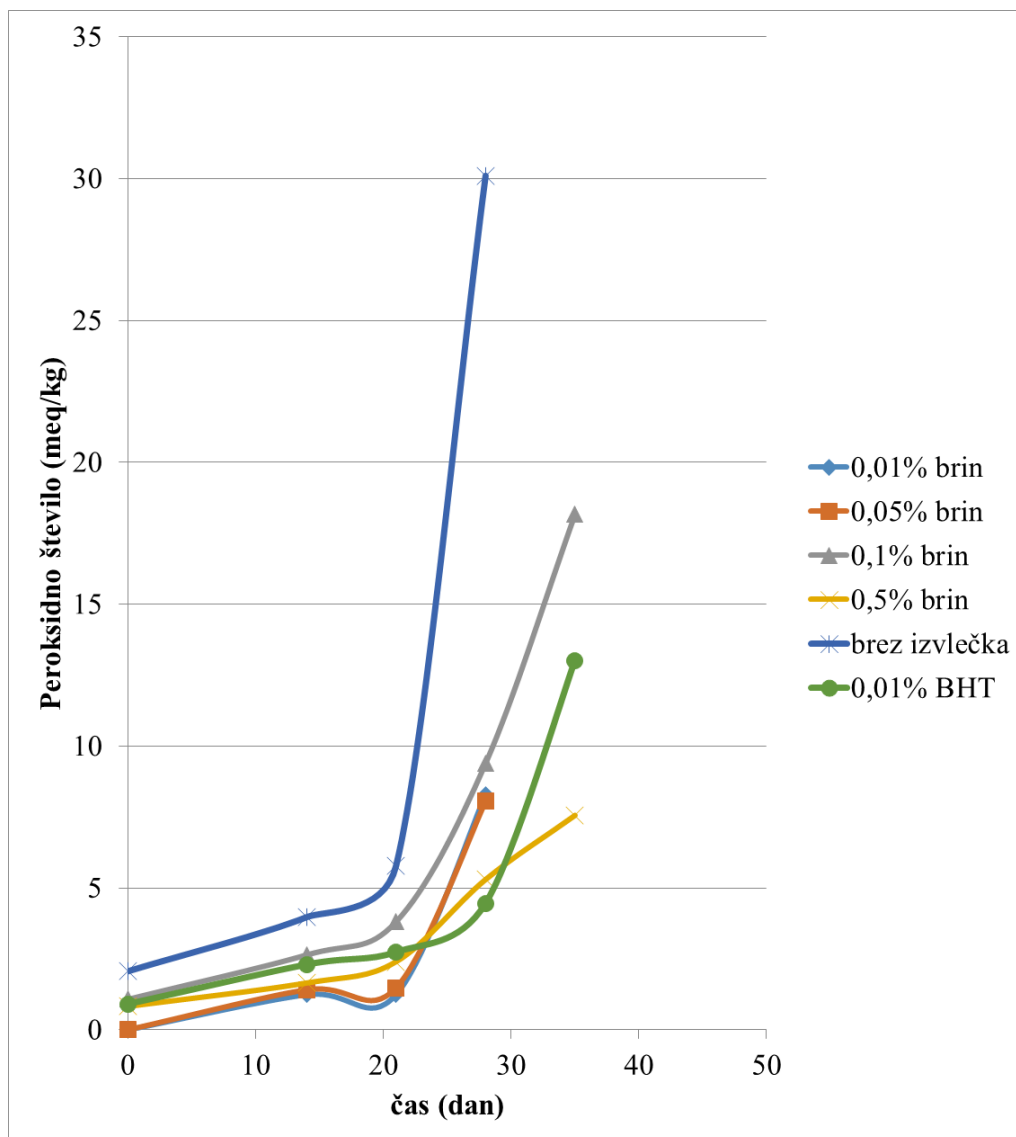
Če primerjamo I_P vzorcev obeh koncentracij v odvisnosti od časa, vidimo, da narašča s podobno hitrostjo in v približno enaki meri. Nekoliko manjšo končno vrednost doseže I_P pri vzorcu koncentracije izvlečka 0,5 %. Koncentraciji izvlečka vrtnega ognjiča 0,1 % in 0,5 % imata torej podobno antioksidativno delovanje. Zanimivo bi bilo spremljati I_P pri vzorcih s še večjimi koncentracijami izvlečka in ugotoviti, ali pride do dodatnega povečanja antioksidativnega delovanja ali do prooksidativnega učinka. Izvlečki vrtnega ognjiča namreč vsebujejo med drugim tudi tokoferole (20), za katere vemo, da lahko imajo tako antioksidativni kot prooksidativni učinek.

Pri izvlečku vrtnega ognjiča smo ugotovili, da sta bili koncentraciji 0,01 % in 0,05 % premajhni, da bi se pokazalo antioksidativno delovanje. V primerjavi s samim lanenim oljem vidimo, da je vzorcema z najmanjšima koncentracijama izvlečka I_P naraščalo celo nekoliko hitreje. Pri meritvi v 28. dnevu pa se je pojavil enak problem kot pri izvlečku navadnega rmana. Nismo mogli določiti končne točke titracije, vendar prejšnja merjenja in strmost krivulje nakazujeta na skokovito povečanje I_P .

V raziskavi iz literature (33) so z metodo HPLC v alkoholnih izvlečkih vrtnega ognjiča odkrili tri derivate kofeinske kisline in deset flavonoidov (npr. kemferol, kvercetin, izoramnetin). V primerjavi z modrim glavincem (*Centaurea cyanus* L.), vrstami šipka (*Rosa* × *damascena* Mill., *Rosa gallica* L. in *Rosa canina* L.) in sorto daliije (*Dahlia 'Mignon'*) je imel vrtni ognjič največjo vrednost flavonoidov (7,37–11,15 mg/g suhe mase) in fenolnih spojin (7,47–11,31 mg/g suhe mase) (33). V izvlečkih vrtnega ognjiča so odkrili tudi karotenoide (flavoksantin), triterpenoide in kumarine (40). Vsem tem spojinam pripisujejo antioksidativno delovanje.

4.1.4 Vpliv dodatka navadnega brina na oksidacijo lanenega olja

Pri vzorcih lanenega olja z izvlečkom navadnega brina so vse koncentracije izvlečkov izboljšale oksidativno stabilnost v primerjavi s samim lanenim oljem, vendar še vedno manj kot sintezni antioksidant (BHT)(graf 6). Pri koncentraciji 0,01 % in 0,05 % je I_P v prvih treh tednih naraščalo zelo počasi. Pri meritvi v 21. dnevu bilo I_P 1,24 meq/kg (0,01 %) oziroma 1,48 meq/kg (0,05 %). Že pri naslednji meritvi čez teden dni smo opazili hiter porast I_P na 8,29 meq/kg (0,01 %) in 8,05 meq/kg (0,05 %).



Graf 6: Peroxidno število (meq/kg) lanenega olja z izvlečkom navadnega brina, staranega pri 40 °C, v odvisnosti od časa; SD= 0–0,35.

Če primerjamo koncentraciji 0,1 % in 0,5 %, vidimo, da večja koncentracija bolj učinkovito zmanjša oksidativno kvarjenje lanenega olja. Po petih tednih je tako I_P pri 0,1 % izvlečka 18,1 meq/kg in pri 0,5 % izvlečka 7,56 meq/kg. Izpostavimo lahko tudi dejstvo, da po 35. dnevih spremljanja I_P pri vzorcu s koncentracijo izvlečka 0,5 % še vedno nismo dosegli točke, po kateri I_P skokovito naraste. To pomeni, da je antioksidativna učinkovitost izvlečka navadnega brina zelo dobra.

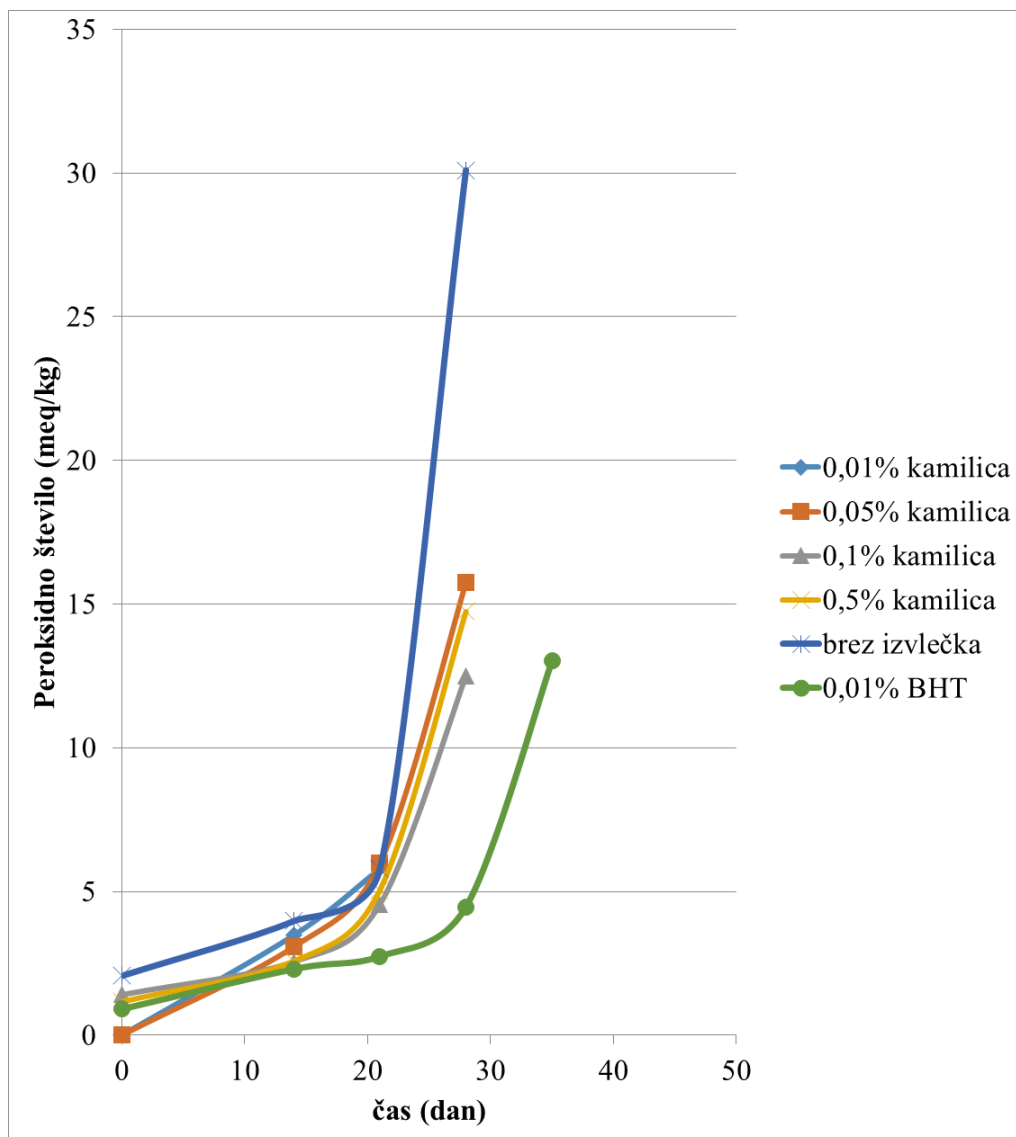
V raziskavi, kjer so primerjali vodni in etanolni izvleček navadnega brina, so ugotovili, da se z večanjem koncentracije (20–60 µg/mL) pri obeh vrstah izvlečka veča tudi antioksidativno delovanje. Antioksidativno delovanje je bilo tudi višje v primerjavi z antioksidativnim delovanjem 60 µg/ml α -tokoferola. Celotna koncentracija fenolnih spojin je pri vodnem izvlečku dosegla vrednost 16,6 µg galne kisline/g suhe snovi in pri alkoholnem 16,2 µg galne kisline/g suhe snovi. (41)

Damjanovič in sodelavci so v izvlečkih brina, pridobljenih s superkritičnim CO₂, našli v večji meri terpenoide (α -pinen (32,9 %), terpinen-4-ol (10 %)), monoterpenske ogljikovodike (55,7 %) in oksigenirane spojine (12,2 %) (21). V študiji, ki je primerjala koncentracije spojin, ekstrahiranih s superkritičnim CO₂, v primerjavi z vodno destilacijo, so ugotovili, da se hlapne snovi bolje ekstrahirajo z vodno destilacijo. Tako najdemo večji delež α -pinena in 3-karena v vodnih izvlečkih, medtem ko sta deleža α -tujona in limonena večja pri izvlečkih, ekstrahiranih s superkritičnim CO₂ (22).

Pri ugotavljanju antioksidativne aktivnosti izvlečkov navadnega brina za lovljenje vodikovega peroksida z metodo po Ruchu (41), so dokazali njihovo boljšo antioksidativno aktivnost v primerjavi s sinteznima antioksidantoma BHT in BHA ter α -tokoferolom (41).

4.1.5 Vpliv dodatka prave kamilice na oksidacijo lanenega olja

Pri vzorcih z izvlečkom prave kamilice vidimo, da se krivulje peroksidnega števila pri vseh koncentracijah izvlečka nahajajo med krivuljama olja brez izvlečka in sinteznega antioksidanta (graf 7). Izvleček kamilice je lanenemu olju oksidativno stabilnost izboljšal, vendar manj kot sintezni antioksidant. Oksidacija vzorcev z 0,1 % in 0,5 % izvlečka je časovno potekala primerljivo z vzorcem brez izvlečka in vzorcem z BHT, nekoliko hitreje pa je potekala oksidacija vzorcev z najmanjšima koncentracijama izvlečka. V končni točki merjenja v 28. dnevu je I_P samega lanenega olja skokovito naraslo (30,1 meq/kg), medtem ko se je pri vzorcih z izvlečkom gibalo od 12,5 do 15,8 meq/kg. Najmanjše I_P (12,5 meq/kg) in s tem najboljšo zaščito pred oksidativnim kvarjenjem lanenega olja smo dobili pri 0,1-odstotni koncentraciji izvlečka prave kamilice.



Graf 7: Peroksidno število (meq/kg) lanenega olja z izvlečkom prave kamilice, staranega pri 40 °C, v odvisnosti od časa; SD= 0–0,49.

Potek oksidacije lanenega olja pri koncentracijah izvlečka 0,01 % in 0,05 % je zelo podoben. Krivulji rasti peroksidnega števila sta skoraj vzporedni in 28. dan dosežeta I_p 15,8 meq/kg (0,01 %) in 15,7 meq/kg (0,05 %).

Pri pripravi vzorca, tj. pri raztapljanju izvlečka prave kamilice, se je laneno olje obarvalo rahlo modrozeleno. To je posledica hamazulena, ki daje modro barvo tudi eteričnemu olju prave kamilice (34). Ta modrozeleno barva vzorca nam je otežila ugotavljanje peroksidnega števila, saj ni prišlo do značilnega barvnega preskoka kot pri ostalih vzorcih, ki niso bili obarvani. Pri določitvi končne točke smo morali biti zelo previdni, saj se vzorec ni popolnoma razbarval. Razbarvanje smo opazili šele po določenem času, ko sta se fazi ločili.

Zaradi tega dopuščamo možnost, da smo končno točko titracije odčitali napačno (prepozno) in tako dobili preveliko vrednost peroksidnega števila.

V raziskavi, kjer so ugotavljali antioksidativno in protimikrobno učinkovitost izvlečkov prave kamilice, so določili skupno količino fenolov, ki so odgovorni za antioksidativno delovanje, in sicer 2,4–3,7 mg galne kisline/g suhe mase (35). Podatek velja za metanolne izvlečke.

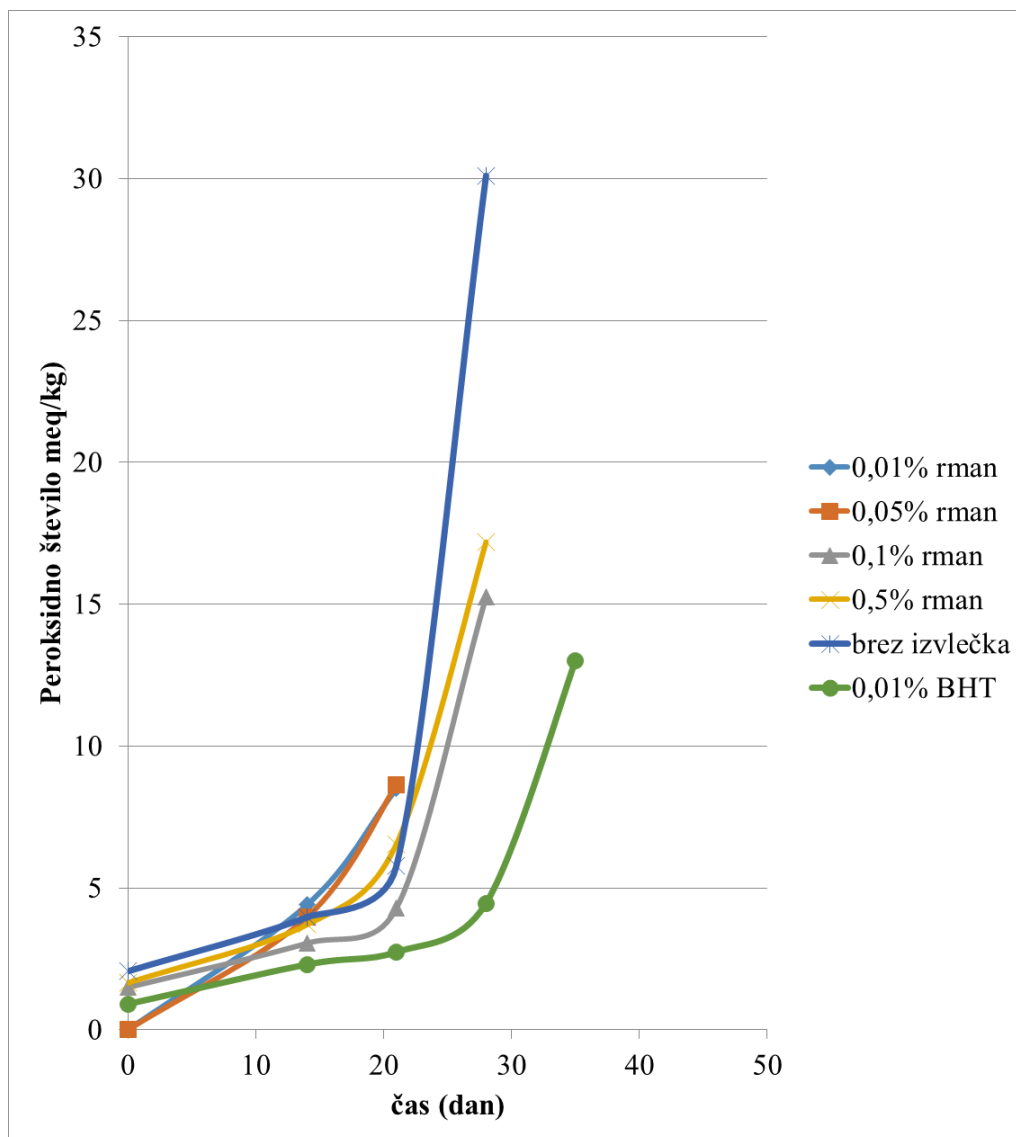
Količina ekstrahiranih fenolov se razlikuje glede na vrsto uporabljene ekstrakcije in vrste topila. Pri uporabi metanola kot topila se ekstrahira največja količina fenolov, nato si po količini ekstrahiranih snovi sledijo etanol, dietileter in heksan. Apigenin je predstavljal 7 % identificiranih spojin, kofeinska in ferulna kislina 9 % spojin in kvercetin 13 % spojin v izvlečku (35).

4.1.6 Vpliv dodatka navadnega rmana na oksidacijo lanenega olja

Izvlečki navadnega rmana so v vseh proučevanih koncentracijah izkazovali slabše antioksidativno delovanje kot BHT (graf 8). Najboljše rezultate smo dobili z vzorcem izvlečka pri koncentraciji 0,1 %.

Bistvena je končna točka meritev po 28. dneh, ko je pri samem lanenem olju I_P doseglo vrednost 30,0 meq/kg, pri 0,1-odstotnem izvlečku rmana v lanenem olju pa 15,3 meq/kg, torej je olje še vedno ustrezalo standardom za največjo dovoljeno vrednost I_P za deviška olja (10–20 meq/kg). Tudi pri koncentraciji izvlečka 0,5 % smo v končni točki (28. dan) izmerili ustrezno I_P (17,2 meq/kg).

Zanimivo je opažanje, da je I_P do 21. dneva pri obeh vzorcih naraščalo primerljivo s samim lanenim oljem, nato pa je prišlo do hitrega porasta le pri vzorcu lanenega olja.



Graf 8: Peroxidno število (meq/kg) lanenega olja z izvlečkom navadnega rmana, staranega pri 40 °C, v odvisnosti od časa; SD=0–0,42.

Glede na boljše antioksidativne lastnosti vzorcev izvlečka v 0,1-odstotni koncentraciji smo pri seriji meritev vzorcev s še manjšimi koncentracijami pričakovali dodatno zmanjšanje I_p . Pričakovanih rezultatov nismo dobili, kajti pri koncentracijah izvlečka 0,01 % in 0,05 % ni prišlo do izboljšanja oksidativne stabilnosti. Krivulji I_p za oba vzorca sta skoraj sovpadali in po 21. dneh dosegli vrednosti 8,50 meq/kg oziroma 8,63 meq/kg, kar je več kot pri lanenem olju brez izvlečka (5,79 meq/kg).

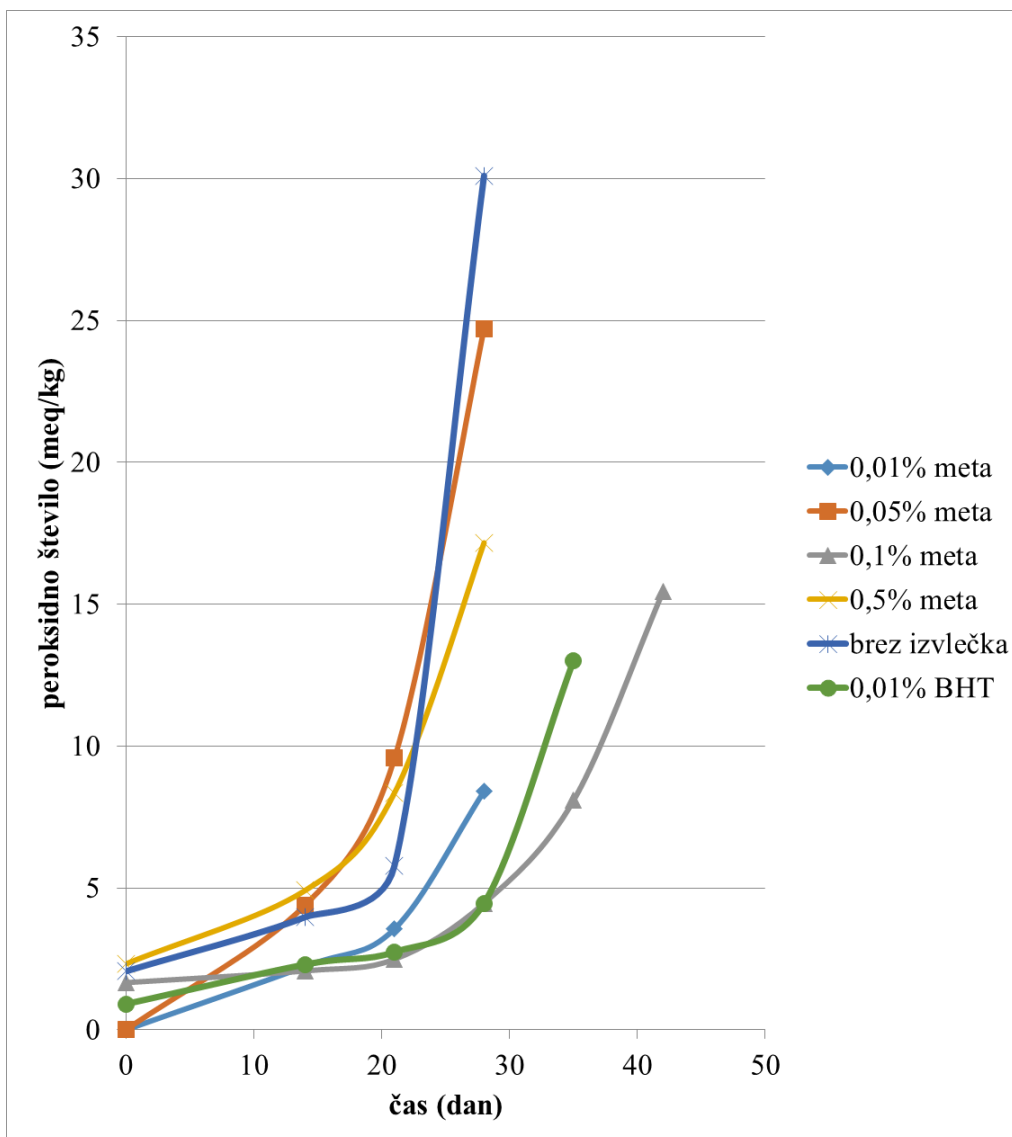
Odprto ostaja vprašanje, zakaj sta se vzorca z izvlečkom v najmanjših dveh proučevanih koncentracijah kvarila še hitreje kot olje brez izvlečka. Pomislimo lahko na snov, ki bi delovala prooksidativno ali vstopala v interakcijo z reakcijo titracije, vendar bi bila v tem primeru verjetno vidno pospešena tudi oksidacija pri večjih koncentracijah zaradi večjega deleža te snovi, do česar pa ni prišlo. Omeniti moramo tudi, da po 28. dneh titracije za koncentraciji 0,01 % in 0,05 % nismo uspeli izvesti. Po dodatku škrobovice je namreč nastala emulzija, ki se pri s titriranju z natrijevim tiosulfatom ni hotela razbarvati. Po določenem času, ko sta se fazi ločili, se je vodna faza sicer razbarvala, vendar nismo mogli odčitati končne točke titracije. Kljub več ponovitvam nam ni uspelo odkriti napake oziroma ugotoviti, kaj je vzrok.

V literaturi smo našli podatke o antioksidativnem delovanju za metanolne izvlečke navadnega rmana in njegovega eteričnega olja, katerih sestavine predstavljajo kar 90 % identificiranih spojin. Dokazali so antioksidativno aktivnost eteričnemu olju in vodotopnemu dela metanolnega izvlečka. Prevladujočim spojinam v eteričnem olju (evkaliptol, kafra, α -terpineol, β -pinen, borneol) so posamično preizkušali antioksidativno aktivnost, vendar je z nobeno metodo (lovljenje hidroksilnih radikalov, zaviranje superoksidnih radikalov, zaviranje lipidne peroksidacije in DPPH) niso uspeli dokazati. Antioksidativno delovanje eteričnega olja dokazuje sinergizem spojin v eteričnem olju, ki privede do antioksidativnega delovanja, ki se pri izoliranih spojinah ne pokaže (39).

4.1.7 Vpliv dodatka izvlečka mačje mete na oksidacijo lanenega olja

Pri vzorcih z izvlečkom mačje mete opazimo, da je bilo antioksidativno delovanje vzorca s koncentracijo 0,1 % do 28. dneva povsem primerljivo z delovanjem sinteznega antioksidanta (graf 9). V naslednjih dveh tednih je izvleček mačje mete bolj učinkovito zavrl oksidacijo lanenega olja in v zadnji točki meritev, po 42. dneh, je I_P vzorca doseglo vrednost 15,4 meq/kg.

V primerjavi z oljem brez izvlečka je bila oksidacija zmanjšanja tudi pri koncentraciji izvlečka 0,01 %, vendar od 21. dne manj učinkovito v primerjavi z BHT in koncentracijo izvlečka 0,1 %.



Graf 9: Peroksidno število (meq/kg) lanenega olja z izvlečkom mačje mete, staranega pri 40 °C, v odvisnosti od časa; SD=0–0,37.

Krivulja naraščanja I_P je pri koncentracijah izvlečka 0,05 % in 0,5 % primerljiva s krivuljo olja brez izvlečka. I_P je pri obeh vzorcih z izvlečkom sicer naraščalo nekoliko hitreje kot pri vzorcu lanenega olja brez izvlečka, vendar pa je slednji v končni točki merjenja v 21. dnevu dosegel večjo vrednost.

Na grafu vidimo, da večanje koncentracije izvlečka ne pripomore k sorazmerno večji oksidativni stabilnosti lanenega olja. Glede na rezultate bi kot optimalno in najbolj

učinkovito določili 0,1-odstotno koncentracijo izvlečka, ki ji po padajoči učinkovitosti po vrsti sledijo koncentracije 0,01 %, 0,5 % in 0,05 %.

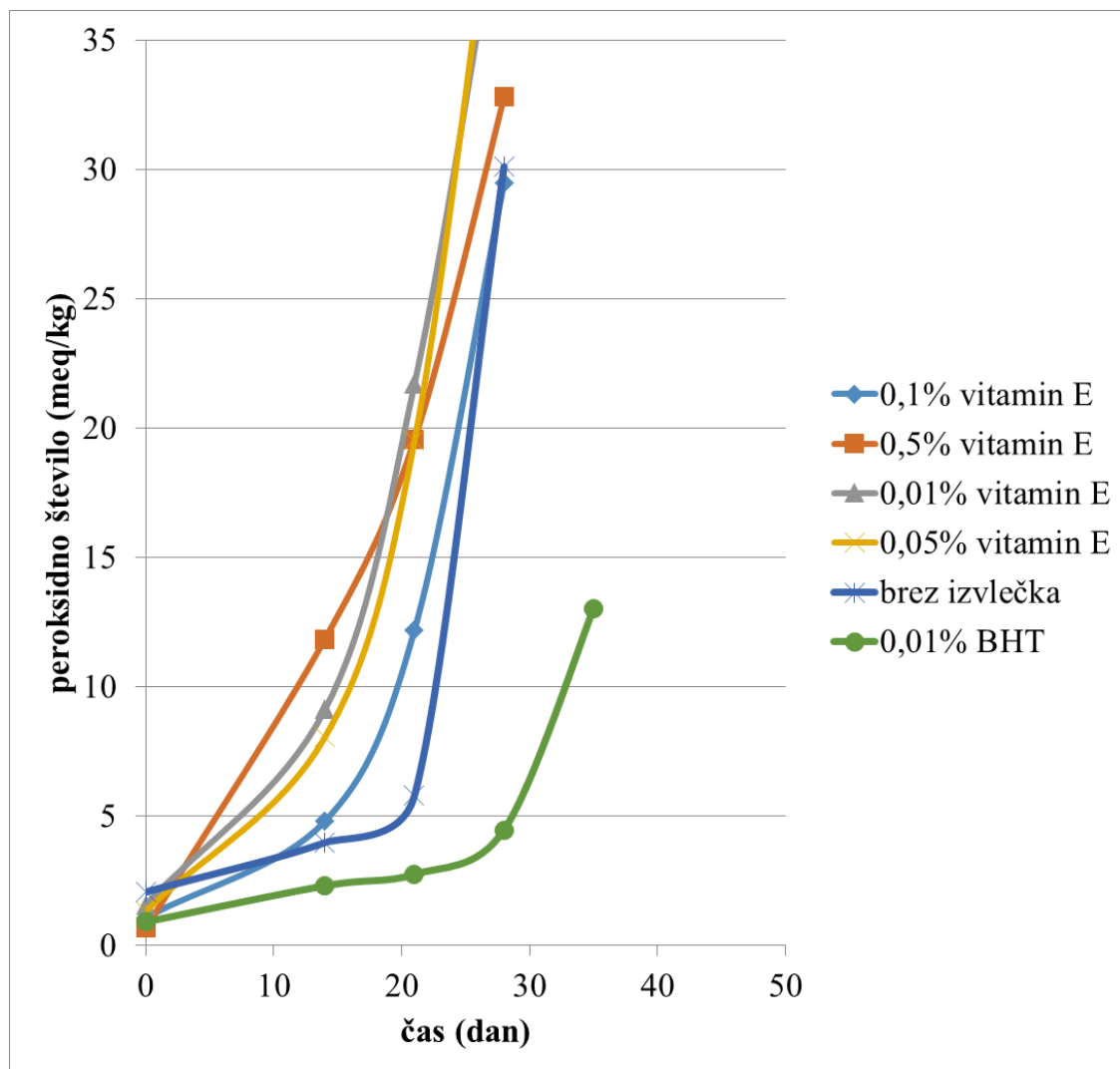
Dosedanje raziskave in podatki o antioksidativnem delovanju spojin mačje mete so precej skopi. Navajajo, da so zanj odgovorne fenolne spojine, ki se v etanolnem izvlečku nahajajo v obsegu 29,8–49,3 mg, preračunano na vsebnost galne kisline. Med polifenolne spojine, ki so jih identificirali v mačji meti, sodijo fenolne kisline in flavonoidi. Fenolni kislini, ki sta se v vseh vrstah etanolnih izvlečkov v raziskavi pojavljali v največjem deležu, sta rožmarinska in sinapinska kislina. Rožmarinska kislina je tudi dokazano ena izmed glavnih antioksidantov v mačji meti (38).

V študiji, kjer so primerjali antioksidativno delovanje alkoholnega izvlečka mačje mete in eteričnih olj mete, so ugotovili, da noben izvleček ne bi mogel nadomestiti sinteznega antioksidanta BHT. Antioksidativno aktivnost so ugotavljali s pomočjo metode DPPH. V kasnejših študijah so ugotovili, da lahko blago antioksidativno delovanje eteričnih olj mačje mete pripišemo 1,8-cineolu in linaloolu (28).

4.1.8 Vpliv dodatka vitamina E na oksidacijo lanenega olja

Za vitamin E smo dobili drugačne rezultate, kot smo jih sprva pričakovali glede na številne raziskave in dokazano antioksidativno delovanje tokoferolov. Nobena od preiskovanih koncentracij ni izboljšala oksidativne stabilnosti lanenega olja. Oksidacija in posledično I_P sta naraščala hitreje kot pri samem lanenem olju brez dodanega izvlečka.

V končni točki meritev po 28. dneh je I_P pri 0,01 % izvlečka vitamina E 41,4 meq/kg, pri 0,05 % 44,2 meq/kg, pri 0,1 % 29,5 meq/kg in pri 0,5 % 32,8 meq/kg. Strmo krivuljo naraščanja vidimo predvsem pri koncentraciji 0,5 %, kjer I_P doseže vrednost 11,8 že po 14. dneh (graf 10). Glede na to, da I_P izrazito narašča, lahko predvidevamo, da v takšni količini deluje prooksidativno.



Graf 10: Peroksidno število (meq/kg) lanenega olja z vitaminom E, staranega pri 40 °C, v odvisnosti od časa; SD=0,10–0,97.

Z manjšanjem koncentracije dodanega vitamina E smo pričakovali manjše vrednosti I_p , vendar so rezultati pokazali drugače. Pri najmanjši testirani vrednosti 0,01 % je I_p prav tako hitro naraščalo kot pri večjih koncentracijah.

Vsekakor so tokoferoli že nekaj časa predmet raziskav številnim znanstvenikom, ki skušajo razložiti njihovo antioksidativno oziroma prooksidativno delovanje. Podobne zaključke, kot smo jih dobili mi, smo zasledili tudi v nekaj drugih raziskavah. V raziskavi (44), kjer so primerjali učinek tokoferolov v razponu koncentracij od 0,01 % do 0,25 % na avtooksidacijo trigliceridov lanenega olja, v razmerah z malo kisika, niso ugotovili antioksidativnega učinka tokoferolov. Pri spremljanju nastanka primarnih produktov oksidacije s pomočjo

peroksidnega števila in nastajanja konjugiranih dienov so opazili naraščanje v odvisnosti z naraščanjem koncentracije tokoferolov. Dodani γ -tokoferol v koncentraciji 0,01 % je izrazil antioksidativno delovanje primerljivo s kontrolnim vzorcem. Pri koncentracijah, večjih od 0,01 %, je prišlo do prooksidativnega delovanja. δ -tokoferoli niso pospešili oksidacije, niti je niso upočasnili.

V nekaterih raziskavah so dobili nasprotne rezultate in so dokazali antioksidativno delovanje tokoferolov. Po dodatku tokoferolov ribjemu olju v koncentraciji približno 1000 ppm, so spremljali naraščanje peroksidnega števila in konjugiranih dienov. Vzorci so bili izpostavljeni povišani temperaturi (30 °C) Ugotovili so antioksidativno delovanje α -, β - in δ -tokoferolov, pri čemer je δ -tokoferol izrazil najboljše delovanje (45).

V raziskavi (46) so primerjali antioksidativno delovanje posameznih tokoferolov v primerjavi z zmesjo tokoferolov, dodano koruznemu olju. δ -Tokoferol je deloval antioksidativno pri koncentraciji 2000 ppm (in tudi manjših koncentracijah), z večanjem koncentracije je njegovo antioksidativno delovanje naraščalo. Glede na naraščajoče število hidroperoksidov so določili koncentracijo, ki daje največje antioksidativno delovanje: pri zmesi α - in γ -tokoferola v razmerju 1 : 1 250 ppm in pri naravni zmesi sojinih tokoferolov 500 ppm. γ -Tokoferol je pri koncentraciji 5000 ppm deloval prooksidativno. Pri koncentracijah zmesi tokoferolov, kjer je bilo α -tokoferola manj kot 130 ppm, je prišlo do antioksidativnega delovanja. Pri zmesih tokoferolov, kjer je α -tokoferol presegal 130 ppm, se je izrazilo prooksidativno delovanje (46).

Naj kot povzetek zgornjih ugotovitev poudarimo, da laneno olje že samo po sebi vsebuje tokoferole. Zato lahko z njihovim dodajanjem hitro presežemo mejo, ki loči med antioksidativnim in prooksidativnim delovanjem. Upoštevajoč začetno koncentracijo γ -tokoferola v lanenem olju (58 mg/100 g), je optimalna količina za dodatek γ -tokoferola do 100 mg/100 g olja. Večje koncentracije povzročajo prooksidativno delovanje (37).

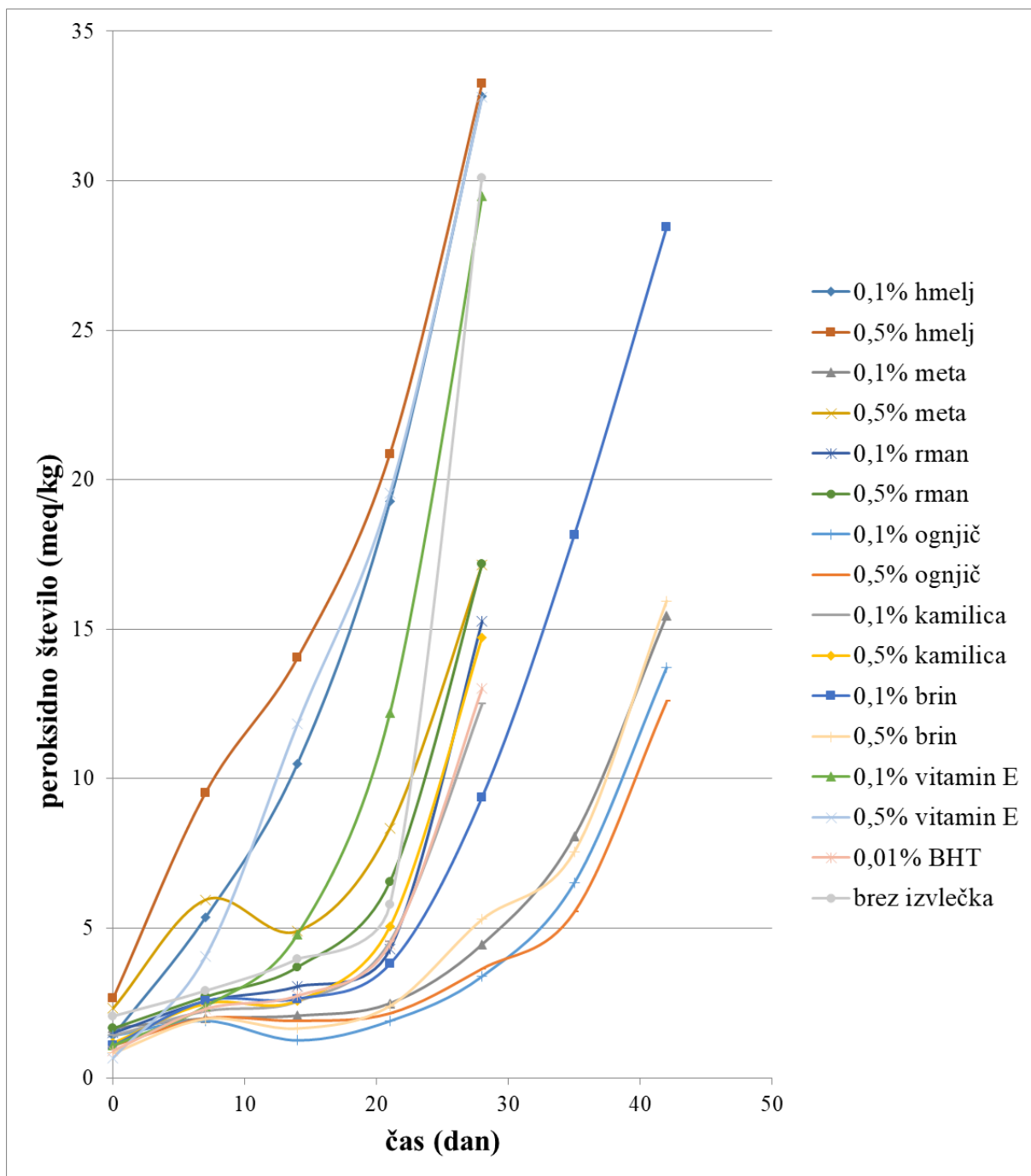
4.1.9. Primerjava antioksidativnega delovanja proučevanih rastlinskih izvlečkov in kontrolnih antioksidantov

Če primerjamo med seboj antioksidativni vpliv rastlinskih izvlečkov, dodanim lanenemu olju, ugotovimo, da se po delovanju na oksidativno stabilnost samega lanenega olja delijo na tri skupine:

- rastlinske izvlečke, ki niso izboljšali oksidativne stabilnosti lanenega olja,
- rastlinske izvlečke, ki so izboljšali oksidativno stabilnost olja, vendar so slabše aktivni kot sintezni antioksidant, in
- rastlinske izvlečke, ki so izboljšali oksidativno stabilnost lanenega olja in bi lahko nadomestili sintezni antioksidant.

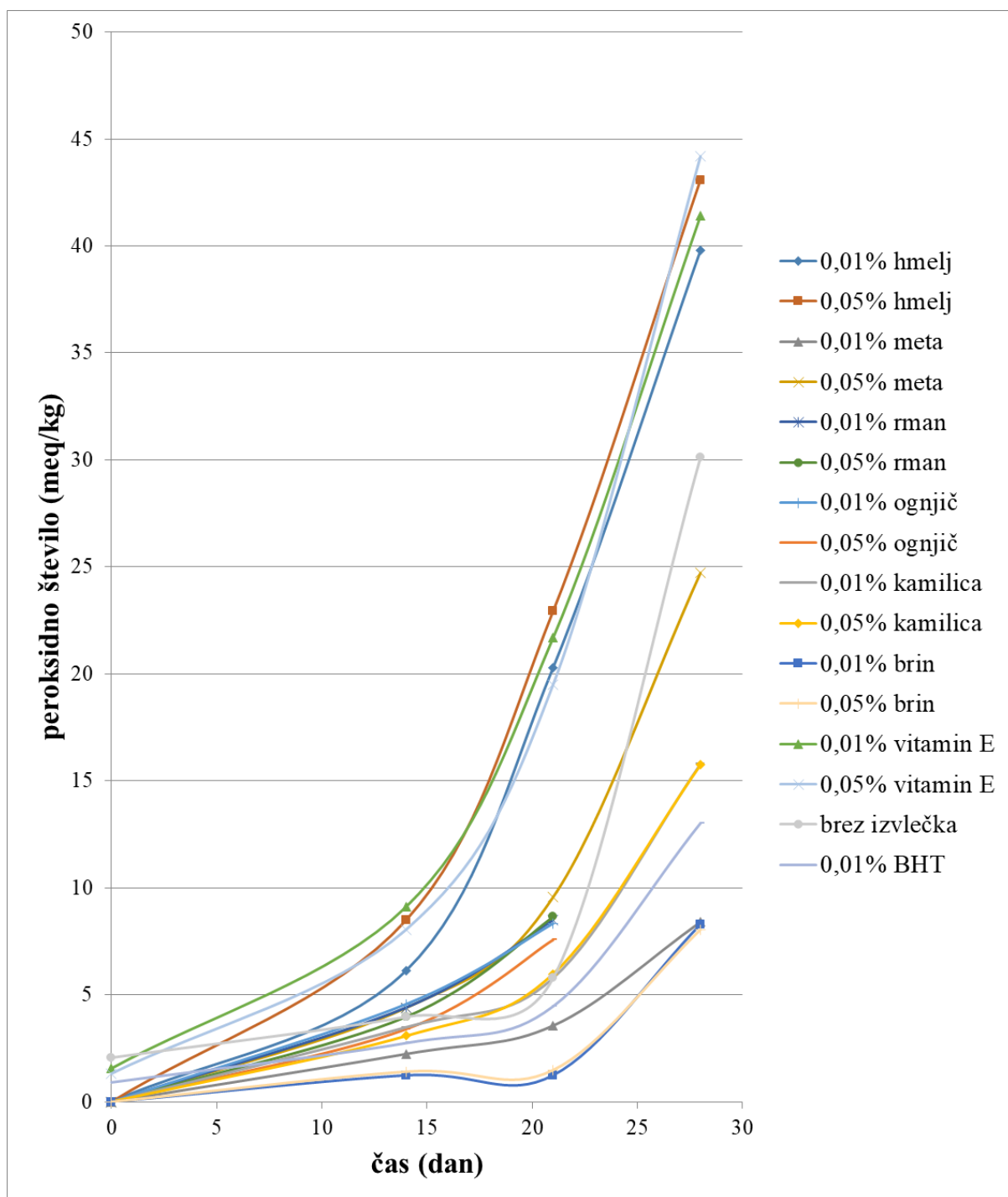
Za serijo koncentracij 0,1 % in 0,5 % smo dobili naslednje rezultate (graf 11, preglednica I v prilogi).

Izvlečki navadnega hmelja, vitamina E in mačje mete (0,5 %) niso izboljšali oksidativne stabilnosti. Izvlečki navadnega rmanain prave kamilice so izboljšali oksidativno stabilnost, vendar ne bolj kot sintezni antioksidant. Izvlečki mačje mete (0,1 %), navadnega brina in vrtnega ognjiča so izboljšali oksidativno stabilnost bolj kot sintezni antioksidant.



Graf 11: Peroksidno število (meq/kg) za vse vzorce koncentracij 0,1 % in 0,5 % v odvisnosti od časa.

Če pogledamo še skupni graf (graf 12) serije koncentracij izvlečkov 0,01 % in 0,05 %, vidimo, da se rezultati delijo na tri skupine, tako kot pri prejšnji seriji.

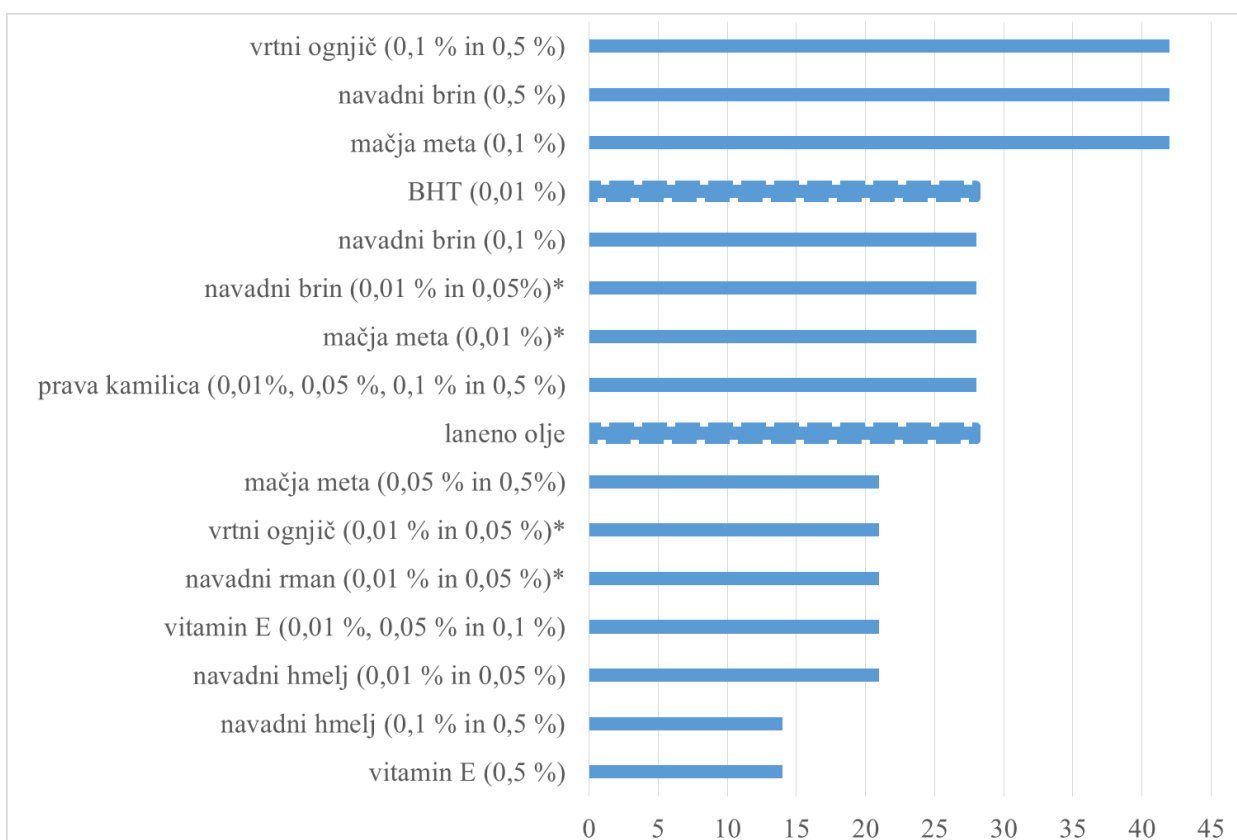


Graf 12: Peroksidno število (meq/kg) lanenega olja za vse vzorce koncentracij 0,01 % in 0,05 % v odvisnosti od časa.

Izvlečki navadnega hmelja, vitamina E, mačje mete (0,05 %), vrtnega ognjiča in navadnega rmana niso izboljšali oksidativne stabilnosti. Izvleček prave kamilice je pokazal antioksidativno delovanje, a manjše kot sintezni antioksidant. Izvlečki brina in mačje mete (0,01 %) so izboljšali oksidativno stabilnost boljše kot sintezni antioksidant (preglednica II v prilogi).

V prihodnosti bi bilo zanimivo proučiti kemijsko sestavo izvlečkov, ki so izkazali najboljšo antioksidativno dejavnost. Tako bi lažje spremljali kakovost posameznih izvlečkov med različnimi serijami. Dobili bi tudi natančno informacijo o posameznih spojinah, ki jih najdemo v izvlečku, na podlagi česar bi lahko zanesljivo proučili njihove prispevke k antioksidativnemu oziroma prooksidativnemu delovanju.

Za lažjo primerjavo rezultatov smo na skupnem grafu prikazali čas, v katerem I_p vzorcev lanenega olja doseže vrednost 10.



Graf 13: Čas (dnevi), v katerem vzorci lanenega olja dosežejo I_p 10; * prikazan je ocenjen čas (eksperimentalnih meritev nimamo)

Na grafu (graf 13) vidimo, da so se kot najboljši antioksidanti izkazali izvlečki vrtnega ognjiča (0,1 % in 0,5 %), mačje mete (0,1 %) in navadnega brina (0,5 %), medtem ko pri

izvlečkih navadnega hmelja in vitamina E (0,5 %) opazimo najizrazitejše prooksidativno delovanje.

5. SKLEP

V magistrski nalogi smo lanenemu olju dodali različne rastlinske izvlečke ali sintezni antioksidant (BHT). Laneno olje smo izbrali zaradi njegove majhne oksidativne stabilnosti. Vzorce smo starali na povišani temperaturi in izpostavljeni zraku. Določali smo peroksidno število po farmakopejski metodi. Spremljali smo časovno naraščanje peroksidnega števila in s tem žarkost lanenega olja. Skušali smo najti rastlinski izvleček, ki bi ga lahko dodali olju in povečali njegovo oksidativno stabilnost. Zanimala nas je optimalna (najmanjša) koncentracija izvlečka, ki ima antioksidativno delovanje, zato smo izvlečke dodali v različnih koncentracijah.

V primerjavi s samim lanenim oljem brez izvlečka smo ugotovili, da so oksidativno stabilnost izboljšali naslednji izvlečki: izvlečki navadnega brina in prave kamilice v vseh štirih proučevanih koncentracijah, izvlečki mačje mete v koncentracijah 0,01 % in 0,1 % ter izvlečki vrtnega ognjiča v koncentracijah 0,1 % in 0,5 %. Med vsemi proučevanimi rastlinskimi izvlečki bi izpostavili izvleček navadnega brina (0,5 %), izvleček mačje mete (0,1 %) ter izvleček pravega ognjiča (0,1 % in 0,5 %). Delovali so bolje kot sintezni antioksidant. Izmed vseh vzorcev je peroksidno število pri teh izvlečkih pri navedenih koncentracijah naraščalo najpočasneje in doseglo tudi najmanjšo končno vrednost peroksidnega števila.

Vzorci z dodatki izvlečkov navadnega hmelja in vitamina E so izrazili prooksidativno delovanje. Peroksidno število je v primerjavi s samim lanenim oljem naraščalo hitreje in doseglo večjo končno vrednost.

Nekaj težav smo imeli pri določanju peroksidnega števila za vzorce z dodatki izvlečkov navadnega rmana in vrtnega ognjiča pri koncentracijah 0,01 % in 0,05 %. Pri titraciji je nastala emulzija in končne točke titracije nismo mogli določiti.

Naše sklepne ugotovitve kažejo, da proučevani rastlinski izvlečki lahko delujejo kot učinkoviti antioksidanti. Podariti moramo, da so razmere, v katerih smo vzorce lanenega olja z dodanimi izvlečki starali, zelo obremenilne. Izboljšanje oksidativne stabilnosti za več dni v tako obremenilnih razmerah lahko namreč pri normalnih razmerah shranjevanja pomeni podaljšanje uporabnosti olja na ravni več mesecev ali celo let. Slednje je zelo pomembno z vidika velikih uporabnikov rastlinskih olj, predvsem prehranske in kozmetične industrije.

Z dodajanjem izvlečkov bi lahko izboljšali oksidativno stabilnost rastlinskim oljem na naraven način. Pri tem se moramo dotakniti vprašanja ekonomičnosti, saj je pridobitev kakovostnega in učinkovitega rastlinskega izvlečka navadno dražja od pridobitve sinteznega antioksidanta. V splošnem pa je prednost antioksidantov naravnega izvora (predvsem kadar govorimo o dobro raziskanih in skozi zgodovino široko uporabljenih rastlinskih izvlečkih) gotovo ta, da so zdravju neškodljivi in so lahko pomembna alternativa za uporabo v rastlinskih oljih, namenjenih tako farmacevtski in kozmetični kot tudi prehrabni industriji.

LITERATURA

1. Janeš D, Kočevar Glavač N (urednika): *Sodobna kozmetika*, 1. izdaja, Širimo dobro besedo, d. o. o., Velenje, 2015: 115, 511-513, 737-738, 813.
2. Berrin Bozan, Feral Temelli, Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils, *Bioresource Technology*, 99, 2008: 6354–6359.
3. Polar Foods Inc. HiOmegaTMG RAS Notification, Polar Foods, Inc, Canada, 2008: 1-156.
4. Artemis P. Simopoulos, Omega-6/Omega-3 Essential Fatty Acid Ratio and Chronic Diseases, *Food reviews international*, Vol. 20, No. 1, pp. 2004: 77–90.
5. Ankit Goyal, Vivek Sharma, Neelam Upadhyay, Sandeep Gill, Manvesh Sihag, *Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food*, Association of Food Scientists & Technologists, India, 2014.
6. Edyta Symoniuk, Katarzyna Ratusz, Krzysztof Krygier, Comparison of the oxidative stability of linseed (*Linum usitatissimum* L.) oil by pressure differential scanning calorimetry and Rancimat measurements, Association of Food Scientists & Technologists, India, 2016.
7. B. Matthaus, Max Rubner-Institute, Oxidation of edible oils, Federal Research Institute for Nutrition and food, Germany: 184-238.
8. Airidas Dapkevicius, Isolation, identification and evaluation of natural, antioxidants from aromatic, herbs cultivated in Lithuania, 2002: 1-165
9. Antonio Ayala, Mario F. Muñoz, and Sandro Argüelles, Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal, Hindawi Publishing Corporation, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014: 31.
10. Janez Mravljak, Radikali in oksidativni stres, *Farmacevtski vestnik*, št. 2, 2015: 127-132.
11. Amalia A. Carelli, Indira C. Franco and Guillermo H. Crapiste, Effectiveness of added natural antioxidants in sunflower oil, *Grasas y Aceites*, 2005: 303-310.
12. Joseph G. Sebranek, Stephen Neel, Rancidity and Antioxidants, World Food Logistics Organization, Iowa, 2008.

13. Mostafa Taghvaei, Seid Mahdi Jafari, Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives, *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52(3):1272–1282.
14. Xuping Wang, Lei Yang, Xiaolan Yanga and Yanhua Tianc, In vitro and in vivo antioxidant and antimutagenic activities of polyphenols extracted from hops (*Humulus lupulus* L.), *Journal of Science Food and Agriculture* 2014; 94: 1693–1700.
15. Ferah Cömert Önder, Mehmet AY, and Satyajit D. Sarker, Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of the Extracts of *Humulus lupulus* L. and Quantification of Bioactive Components by LC-MS/MS and GC-MS, *Journal of Agricultural and Food Chemistry UK*, 2013: 1-41.
16. Carlos R Langezaal, Amitabh Chandra, Stavros T Katsiotis, Johannes J C Scheffert and Andre B de Haans, Analysis of Supercritical Carbon Dioxide Extracts from Cones and Leaves of a *Hurnulus lupulus* L Cultivar, *Journal of Food Science and Technology* 1990,53: 455-463.
17. Clarissa A.S. Cordova, Ionara R. Siqueira, Carlos A. Netto, Rosendo A. Yunes, Ana M. Volpato, Valdir Cechinel Filho, Rozangela Curi-Pedrosa, Tânia B. Creczynski-Pasa, Protective properties of butanolic extract of the *Calendula officinalis* L. (marigold) against lipid peroxidation of rat liver microsomes and action as free radical scavenger, *Redox Report*, Vol. 7, No. 2, 2002.
18. Monica Butnariut and Cristina Zepa Coradini, Evaluation of Biologically Active Compounds from *Calendula officinalis* Flowers using Spectrophotometry, *Butnariu and Coradini Chemistry Central Journal* 2012: 6-35.
19. Leandro Danielski , Luanda M.A.S. Camposa, Louisiane F.V. Bresciani, Haiko Hense, Rosendo A. Yunes , Sandra R.S. Ferreira, Marigold (*Calendula officinalis* L.) oleoresin: Solubility in SC-CO₂ and composition profile, *Chemical Engineering and Processing* 46, 2007: 99–106.
20. María Miguel, Lillian Barros, Carla Pereira, Ricardo C. Calhelha, Pablo A. Garcia, Ángeles Castro, Celestino Santos-Buelga, Isabel C.F.R. Ferreira, Chemical characterization and bioactive properties of two aromatic plants: *Calendula officinalis* L. (flowers) and *Mentha cervina* L. (leaves), *Food and Function*, 2016.
21. Biljana M. Damjanovic, Dejan Skala, Dusanka Petrovic-Djakov & Josip Baras, A Comparison Between the Oil, Hexane Extract and Supercritical Carbon Dioxide

- Extract of *Juniperus communis* L., *Journal of Essential Oil Research*, 15:2,2003: 90-92.
22. Seied Mahdi Pourmortazavi, Parvin Baghaee and Mohammad Ali Mirhosseini, Extraction of volatile compounds from *Juniperus communis* L. leaves with supercritical fluid carbon dioxide: comparison with hydrodistillation, *Flavour and fragrance journal*,19, 2004: 417–420.
 23. Ompal Singh, Zakia Khanam, Neelam Misra, Manoj Kumar Srivastava, Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview, *Pharmacognosy Reviews*, Vol 5, 2011: 82-95.
 24. M. Bocevskaa, H. Sovova, Supercritical CO₂ extraction of essential oil from yarrow, *Journal of Supercritical Fluids* 40, 2007: 360–367.
 25. A. Barghamadi, M. Mehrdad, F. Sefidkon, Y. Yamini, M. Khajeh, Comparison of the Volatiles of *Achillea millefolium* L. Obtained by Supercritical Carbon Dioxide Extraction and Hydrodistillation Methods, *Journal of Essential Oil Research*, 21:3, 2011: 259-263.
 26. Renata Baranauskiene, Rimantas P. Venskutonis and Jan C. R. Demyttenaere, Sensory and Instrumental Evaluation of Catnip (*Nepeta cataria* L.) Aroma, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, 51: 3840-3848.
 27. Dr. James Louey, Nathan Petersen, Dennis Salotti, Heather Shaeffer, Oil of catnip by supercritical fluid extraction, *Supercritical Fluid Technologies, Inc. Three Innovation Way*, 2001.
 28. Ahmet Adiguzel, Hakan Ozer, Munevver Sokmen, Medine Gulluce, Atalay Sokmen, Hamdullah Kilic, Fikrettin Sahin, Ozlem Baris, Antimicrobial and Antioxidant Activity of the Essential Oil and Methanol Extract of *Nepeta cataria*, *Polish Journal of Microbiology* 2009, Vol. 58, No 1: 69-76.
 29. W. Herchia, S. Bahashwanb, K. Sebeia, H. Ben Salehc, H. Kallela and S. Boukhchinaa, Effects of germination on chemical composition and antioxidant activity of flaxseed (*Linum usitatissimum* L) oil, *Grasas Aceites*, 66, 2015: 0017–3495
 30. F. Anwar, Z. Zreen, B. Sultana, A. Jamil, Enzyme-aided cold pressing of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.): Enhancement in yield, quality and phenolics of the oil, *grasas y aceites*, 64, 2013: 463-471.

31. Elizabeth S. Budilarto and Afaf Kamal-Eldin, The supramolecular chemistry of lipid oxidation and antioxidation in bulk oils, *Eur. Journal of Lipid Science and Technology*. 2015, 117: 1095–1137.
32. Paola Zanolli, Manuela Zavatti, Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L., *Journal of Ethnopharmacology* 116, 2008: 383–396.
33. Tânia C.S.P. Pires, Maria Inês Dias, Lillian Barros, Ricardo C. Calhelha, Maria José Alves, M. Beatriz P.P. Oliveira, Celestino, Santos-Buelga, Isabel C.F.R. Ferreira, Edible flowers as sources of phenolic compounds with bioactive potential, *Food Research International*, 2017:4-36
34. Nanci P. Povh, Marcia O.M. Marques, M. Angela A. Meireles, Supercritical CO₂ extraction of essential oil and oleoresin from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert), *Journal of Supercritical Fluids* 21, 2001: 245–256.
35. Mohamed Hussein Hamdy Robya, Mohamed Atef Sarhana, Khaled Abdel-Hamed Selima, Khalel Ibrahim Khalela, Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.), *Industrial Crops and Products*, 2009: 1-9.
36. Hatica Han, Hasibe Yılmaz and İlhami Gülçin, Antioxidant Activity of Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) shell and Analysis of Its Polyphenol Contents by LC-MS/MS, *Records of natural products*, 12:4, 2018: 397-402.
37. Karl-Heinz Wagner, Ibrahim Elmadfa, Effects of tocopherols and their mixtures on the oxidative stability of olive oil and linseed oil under heating, *Eur. J. Lipid Science Technology* 102 2000: 624–629.
38. Dasha Mihaylova, Lidiya Georgieva, Atanas Pavlov, In Vitro Antioxidant Activity and Phenolic Composition of *Nepeta Cataria* L. Extracts, *International Journal of Agricultural Science and Technology (IJAST)* 1, 2013: 74-78.
39. Ferda Candan, Mehmet Unlu, Bektas Tepe, Dimitra Daferera, Moschos Polissiou , Atalay Sökmenc, H. Askin Akpulat, Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae), *Journal of Ethnopharmacology*, 87,2003: 215–220.
40. K.C. Preethi, Girija Kuttan, and Ramadasan Kuttan, Antioxidant Potential of an Extract of *Calendula officinalis* Flowers in Vitro and in Vivo, *Pharmaceutical Biology*, Vol. 44, No. 9, 2006: 691–697.

41. Dr. Mahfuz Elmastaş , İlhami Gülçin, Şükrü Beydemir, Ö. İrfan, Küfrevioğlu b & Hassan Y. Aboul-Enein, A Study on the In Vitro Antioxidant Activity of Juniper (Juniperus communis L.) Fruit Extracts, Analytical Letters, 39:1, 2013: 47-65.
42. Saša Baumgartner, Alenka Zvonar, Kozmetični izdelki I: vaje in teoretične osnove, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2013: 58.
43. European Pharmacopoeia 8.0, 2014: Methods of analysis: 2.5. Assays; monographs: Linseed oil virgi; Reagents.
44. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gamma-tocopherol.png> (7.3.2018)
45. Bettina Isnardy, Karl-Heinz Wagner, Ibrahim Elmadfa, Effects of α -, γ -, and δ -Tocopherols on the Autoxidation of Purified Rapeseed Oil Triacylglycerols in a System Containing Low Oxygen, Journal of Agricultural and Food Chemistry 2003, 51, 7775-7780
46. Elin Kulås, Robert G. Ackman, Different Tocopherols and the Relationship between Two Methods for Determination of Primary Oxidation Products in Fish Oil, Journal of Agricultural and Food Chemistry 2001, 49, 1724-1729
47. Shu-Wen Huang, Edwin N. Frankel, J. Bruce German, Effects of Individual Tocopherols and Tocopherol Mixtures on the Oxidative Stability of Corn Oil Triglycerides, Journal of Agricultural and Food Chemistry 1995, 43, 2345-2350

PRILOGA:

Preglednica I: Peroksidna števila (meq/kg) za 1. serijo vzorcev lanenega olja z dodatkom rastlinskih izvlečkov in BHT.

vzorec čas	Navadni hmelj				Mačja meta			
	0,1 %	RSD (%)	0,5 %	RSD (%)	0,1 %	RSD (%)	0,5 %	RSD (%)
0	1,40±0,14	9,8	2,66±0,14	5,1	1,66±0,15	9,2	2,33±0,28	12,1
7	5,36±0,18	3,5	9,52±1,16	12,2	1,99±0,23	11,8	5,95±0,28	4,7
14	10,5±0,2	1,9	14,0±0,1	0,7	2,08±0,13	6,3	4,91±0,37	7,6
21	19,3±0,13	0,7	20,9±0,2	1,0	2,49±0	0	8,35±0,31	3,7
28	32,8±0,09	0,3	33,3±0,14	0,4	4,46±0,21	4,8	17,2±0,31	1,7
35					8,08±0,14	1,8		
42					15,4±0,04	0,3		

vzorec čas	Navadni rman				Vrtni ognjič			
	0,1 %	RSD (%)	0,5 %	RSD (%)	0,1 %	RSD (%)	0,5 %	RSD (%)
0	1,50±0,01	0,6	1,65±0,15	8,8	1,41±0,15	10,5	1,08±0,14	13,3
7	2,56±0,37	14,6	2,71±0	0	1,91±0,53	27,6	1,99±0,12	0,8
14	3,05±0,13	4,2	3,71±0,42	11,3	1,25±0	0	1,91±0,16	8,6
21	4,29±0,14	3,4	6,55±0,18	2,7	1,90±0,14	7,1	2,15±0,13	6,1
28	15,3±0,31	2,0	17,2±0,09	0,5	3,39±0,36	10,5	3,65±0,14	3,9
35					6,52±0,12	1,8	5,55±0,1	1,9
42					13,7±0,06	0,5	12,6±0,14	1,1

vzorec čas	Navadna kamilica				Navadni brin			
	0,1 %	RSD (%)	0,5 %	RSD (%)	0,1 %	RSD (%)	0,5 %	RSD (%)
0	1,41±0,14	9,9	1,16±0,14	12,1	1,07±0,15	13,8	0,83±0,14	16,9
7	2,23±0,01	0,5	2,48±0,42	17,0	2,57±0,14	5,6	1,97±0,25	12,5
14	2,56±0,12	4,7	2,58±0,14	5,3	2,64±0,13	5,0	1,65±0,27	16,2
21	4,55±0,37	8,2	5,05±0,13	2,5	3,81±0,12	3,0	2,40±0,15	6,3
28	12,5±0	0	14,7±0,1	0,7	9,39±0,12	1,2	5,30±0,13	2,4
35					18,2±0	0	7,56±0,17	2,2
42					28,4±0,14	0,5	15,6±0,05	0,3

vzorec čas	Vitamin E				BHT		Brez izvlečka	
	0,1 %	RSD (%)	0,5 %	RSD (%)	0,01 %	RSD (%)		RSD (%)
0	1,08±0,14	12,9	0,66±0,14	21,4	0,91±0,14	15,5	2,06±0,14	6,9
7	2,39±0,13	5,4	4,05±0,12	3,0	2,30±0,13	5,6	2,91±0,16	5,5
14	4,80±0,13	2,7	11,8±0,23	1,9	2,75±0,01	0,3	3,97±0,24	6,01
21	12,19±0,38	3,1	19,5±0,15	0,8	4,46±0,23	5,1	5,79±0,16	2,8
28	29,5±0,15	0,5	32,8±0,19	0,6	13,0±0,1	0,7	30,1±0,1	0,3

Preglednica II: Peroksidna števila (meq/kg) za 2. serijo vzorcev lanenega olja z dodatkom rastlinskih izvlečkov in BHT.

vzorec čas	Navadni hmelj				Mačja meta			
	0,01 %	RSD (%)	0,05 %	RSD (%)	0,01 %	RSD (%)	0,05 %	RSD (%)
0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	6,13±0,14	2,2	8,48±0,12	1,4	2,24±0,01	0,3	4,39±0,16	3,6
21	20,3±0,15	0,7	22,9±0,07	0,3	3,56±0,12	3,3	9,57±0,12	1,2
28	39,8±0,03	0,1	43,1±0,14	0,3	8,40±0,17	2,0	24,7±0,07	0,3

vzorec čas	Navadni rman				Vrtni ognjič			
	0,01 %	RSD (%)	0,05 %	RSD (%)	0,01 %	RSD (%)	0,05 %	RSD (%)
0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	4,40±0,13	3,0	3,97±0,02	0,6	4,56±0,1	2,3	3,39±0,12	3,7
21	8,5±0	0	8,64±0,12	1,4	8,33±0,07	0,9	7,57±0,13	1,6

vzorec čas	Navadna kamilica			
	0,01 %	RSD (%)	0,05 %	RSD (%)
0	0	0	0	0
14	3,48±0	0	3,08±0,15	4,8
21	5,79±0,11	1,9	5,98±0,23	3,9
28	15,8±0,42	2,7	15,7±0,49	3,1

vzorec čas	Navadni brin				Vitamin E			
	0,01 %	RSD (%)	0,05 %	RSD (%)	0,01 %	RSD (%)	0,05 %	RSD (%)
0	0	0	0	0	1,56±0,15	2,7	1,32±0,16	11,7
14	1,24±0,01	0,6	1,41±0,14	9,9	9,1±0,31	3,4	8,04±0,15	1,9
21	235±0,01	0,8	1,48±0,01	0,6	21,7±0,3	1,4	19,5±0,10	0,5
28	8,29±0,18	2,2	8,05±0,35	4,4	41,4±0,29	0,7	44,2±0,97	2,2

