

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SARA GRMEK

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SARA GRMEK

**ANALIZA NEUMILJIVEGA DELA IZBRANIH
RASTLINSKIH OLJ S PLINSKO KROMATOGRAFIJO**

**ANALYSIS OF UNSAPONIFIABLE FRACTION OF
SELECTED VEGETABLE OILS BY GAS
CHROMATOGRAPHY**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko biologijo pod mentorstvom doc. dr. Nine Kočever Glavač, mag. farm.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Nini Kočever Glavač, mag. farm. in izr. prof. dr. Damjanu Janešu, mag. farm. za vse strokovne nasvete, vodenje in nesebično pomoč pri izdelavi magistrske naloge. Za koristne nasvete in sproščeno vzdušje v laboratoriju se zahvaljujem tudi ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko biologijo. Zahvaljujem se tudi Janji in Andreji, ki sta pomagali pri izvedbi eksperimentalnega dela naloge in poskrbeli za zabavne trenutke v laboratoriju.

Za temeljit strokoven pregled magistrske naloge se zahvaljujem tudi predsedniku komisije prof. dr. Danijelu Kiklju, mag. farm. in članu komisije asist. dr. Nejc Horvatu, mag. farm.

Posebna zahvala gre moji družini. Hvala za vso podporo, potrpežljivost in spodbudne besede. Hvala, ker ste verjeli vame in mi tekom celotnega študija po svojih najboljših močeh pomagali in mi stali ob strani.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice doc. dr. Nine Kočever Glavač, mag. farm.

Sara Grmek

Predsednik komisije: prof. dr. Danijel Kikelj, mag. farm.

Član komisije: asist. dr. Nejc Horvat, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

Povzetek	V
Abstract.....	VI
Seznam okrajšav	VII
1 Uvod	1
1.1 Rastlinska olja.....	1
1.2 Neumiljive snovi v rastlinskih oljih.....	2
1.2.1 Fitosteroli.....	2
1.2.2 Vitamin E.....	4
1.2.3 Fitol.....	6
1.2.4 Skvalen	7
1.3 Rastlinska olja in neumiljive snovi v prehrani.....	8
1.4 Neumiljive snovi in krvožilje	9
1.4.1 Povečane količine lipidov v krvi in ateroskleroza.....	10
1.4.2 Protektivno delovanje neumiljivih snovi na krvožilje.....	12
2 Namen in potek dela	14
3 Materiali in metode.....	15
3.1 Materiali.....	15
3.1.1 Vzorci rastlinskih olj	15
3.1.2 Kemikalije in reagenti	17
3.1.3 Aparature in laboratorijska oprema	17
3.2 Metode	19
3.2.1 Izolacija neumiljivih snovi iz rastlinskega olja	19
3.2.1.1 Predpis po Evropski farmakopeji [5]	19
3.2.1.2 Modifikacija predpisa.....	20
3.2.2 Derivatizacija neumiljivih snovi.....	21
3.2.2.1 Postopek sililiranja	22

3.2.3	Plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo.....	22
4	Eksperimentalno delo	24
4.1	Izolacija neumiljivih snovi iz rastlinskega olja.....	24
4.2	Derivatizacija neumiljivih snovi	27
4.3	Plinska kromatografija z masno spektrometrijo	28
5	Rezultati in razprava.....	30
5.1	Izolacija neumiljivih snovi.....	30
5.1.1	Celokupna masa izoliranih neumiljivih snovi	30
5.2	Analiza izoliranih neumiljivih snovi z GC-MS	34
5.2.1	Identifikacija in kvantifikacija neumiljivih snovi.....	34
5.2.2	Vrednotenje odstopanj v rezultatih.....	35
5.2.3	Sestava izoliranih neumiljivih snovi.....	36
5.3	Komentar uporabljenih metod in predlogi za nadaljnje izboljšave	45
5.4	Uporaba rastlinskih olj v prehrani	46
6	Sklep	48
7	Literatura	49

KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura primera triglicerida [prirejeno po 6].	1
Slika 2: Strukture holesterola in najpogostejših fitosterolov [prirejeno po 13].	3
Slika 3: Struktura tokoferolov in tokotrienolov [prirejeno po 25].	5
Slika 4: Struktura fitola [prirejeno po 40].	6
Slika 5: Struktura skvalena [prirejeno po 43].	7
Slika 6: Začetna in napredovana ateroskleroza [prirejeno po 56].	11
Slika 7: Mevalonatna pot biosinteze holesterola, katalizirana s HMG-CoA reduktazo [prirejeno po 61].	13
Slika 8: Saponifikacija [prirejeno po 63].	19
Slika 9: Derivatizacija [prirejeno po 64].	21
Slika 10: Shema GC-MS aparature [prirejeno po 67].	22
Slika 11: Saponifikacija rastlinskega olja [osebni arhiv].	24
Slika 12: Ekstrakcija neumiljivih snovi z dietil etrom [osebni arhiv].	25
Slika 13: Test za določanje kislin v preostanku. A: pred dodatkom NaOH, B: po dodatku NaOH [osebni arhiv].	26
Slika 14: Neumiljive snovi, izolirane iz vzorcev rastlinskih olj [osebni arhiv].	27
Slika 15: GC-MS aparatura [osebni arhiv].	29
Slika 16: Kromatogram derivatiziranih referenčnih spojin pri koncentraciji 1000 ppm. Po vrsti so se iz kolone eluirali cis-fitol, trans-fitol, skvalen, δ -tokoferol, γ -tokoferol, α -tokoferol, holesterol, stigmasterol in β -sitosterol.	35

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Terminologija pridobivanja in obdelave rastlinskih olj [2].....	1
Preglednica II: Razdelitev lipoproteinov [54].	10
Preglednica III: Pregled vzorcev rastlinskih olj.	16
Preglednica IV: Priprava raztopin referenčnih spojin.	28
Preglednica V: Masa izoliranih neumiljivih snovi, podana kot povprečna vrednost treh ponovitev z relativno standardno deviacijo.	30
Preglednica VI: Vsebnost tokoferolov [mg/100 g olja] v vzorcu brez dodatka standarda in v dveh ponovitvah vzorca z dodanim standardom.	36
Preglednica VII: Masa posameznih komponent neumiljivih snovi, podana v [mg NS/100 g olja]. Preglednica prikazuje podatke za olje ameriške brusnice, bezgovo olje, borečevo olje, olje črnega ribeza in konoplino olje.	37
Preglednica VIII: Masa posameznih komponent neumiljivih snovi, podana v [mg NS/100 g olja]. Preglednica prikazuje podatke za malinovo olje, olje ogrščice, orehovo olje, olje rakitovca in svetlinovo olje.....	38
Preglednica IX: Masa posameznih komponent neumiljivih snovi, podana v [mg NS/100 g olja]. Preglednica prikazuje podatke za šipkovo olje, olje španske kadulje, olje črne koprive, olje črne kumine, olje inkovske plukenecije, kivijevo olje in laneno olje.	39

POVZETEK

V zadnjem času se zanimanje za rastlinska olja vse bolj povečuje. Njihova priljubljenost narašča tako na področju kozmetične in farmacevtske industrije kot tudi v prehrani. Rastlinska olja so večinoma (od 95 do 98 %) sestavljena iz trigliceridov. V manjši količini (od 2 do 5 %) vsebujejo tudi druge lipide, kot so voski, proste maščobne kisline, mono- in digliceridi in neumiljive snovi. Neumiljive snovi predstavljajo do 2 % mase olja. Njihova sestava je pogosto kompleksna in širokega kemijskega spektra, posledično pa so neumiljive snovi frakcija rastlinskih olj, ki je tudi za analizo zelo zanimiva. Najpogostejše komponente neumiljivih snovi so ogljikovodiki, karotenoidi, steroli, tokoferoli in tokotrienoli, maščobni alkoholi in terpenoidni alkoholi.

Namen našega dela je bil ugotoviti vsebnost in sestavo neumiljivih snovi v izbranih rastlinskih oljih. Neumiljive snovi smo izolirali po modificirani farmakopejski metodi in jim določili maso. Nato smo izolirane neumiljive snovi derivatizirali in pripravili na nadaljnjo analizo s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo (GC-MS). Z GC-MS smo ugotovili vsebnost fitosterolov (stigmasterola in β -sitosterola), fitola (*cis* in *trans* izomerov), skvalena in vitamina E (α -, γ - in δ -tokoferola).

Na podlagi dobljenih rezultatov smo ugotovili, da način pridobivanja rastlinskega olja nima opaznega vpliva na vsebnost in sestavo neumiljivih snovi. Proces rafiniranja vpliva na vsebnost in sestavo neumiljivih snovi v rastlinskem olju, vendar bi za zanesljivo kvantitativno opredelitev zmanjšanja vsebnosti neumiljivih snovi potrebovali večje število vzorcev. Ugotovili smo, da je uporabljena metoda izolacije neumiljivih snovi manj primerna za določevanje vsebnosti tokoferolov v rastlinskem olju, saj ti niso dovolj stabilni, da bi prenesli razmere saponifikacije.

Preiskovana rastlinska olja lahko glede na vsebnost in sestavo neumiljivih snovi opredelimo kot živila s pomembno prehransko vrednostjo. Pri ovrednotenju rastlinskega olja kot funkcionalnega živila je potrebno poleg vsebnosti in sestave neumiljivih snovi upoštevati še druge lastnosti olja, kot sta maščobnokislinska sestava in oksidativna stabilnost olja.

KLJUČNE BESEDE:

Rastlinska olja, neumiljive snovi, funkcionalna živila, krvožilni sistem, GC-MS.

ABSTRACT

The interest in vegetable oils has been recently increasing. They have been gaining in popularity in cosmetics and pharmaceutical industry as well as in nutrition. Vegetable oils are predominantly (from 95% to 98%) composed of triglycerides. In smaller quantities (from 2% to 5%), oils also contain other lipids, for example waxes, free fatty acids, partial glycerides and unsaponifiable matter. Unsaponifiable matter comprises up to 2% of the entire oil mass. The composition of unsaponifiable matter is usually complex and of a wide chemical spectrum which makes it a fraction of vegetable oils that is very interesting for analyses. The most frequent components of unsaponifiable matter are hydrocarbons, carotenoids, sterols, tocopherols and tocotrienols, fatty alcohols and terpenoid alcohols.

The purpose of this thesis is to specify the content and the composition of unsaponifiable matter in selected vegetable oils. The unsaponifiable matter was isolated by a modified pharmacopoeia method and its mass was determined. The isolated unsaponifiable matter was then derivatized and prepared for further analysis by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). The GC-MS determined the content of phytosterols (stigmasterol and β -sitosterol), phytol (*cis* and *trans* isomers), squalene and vitamin E (α -tocopherol, γ -tocopherol and δ -tocopherol).

The results suggest that the method of vegetable oil production does not have a significant impact on the content and the composition of unsaponifiable matter. The process of refining affects the content and the composition of unsaponifiable matter in vegetable oils, however, for a more accurate quantitative definition of the unsaponifiable matter content reduction, a greater number of samples would have to be analysed. The results indicate that the method of isolation of unsaponifiable matter is less appropriate for determining the content of tocopherols in vegetable oils because they are not stable enough to resist the saponification conditions.

The analysed vegetable oils could be, considering their content and composition of unsaponifiable matter, defined as food with high nutritional value. When evaluating a vegetable oil as functional food, it is important to consider, besides the content and the composition of unsaponifiable matter, also other properties of the oil, for example fatty acid composition and oxidative stability of the oil.

KEY WORDS:

Vegetable oils, unsaponifiable matter, functional food, cardiovascular system, GC-MS.

SEZNAM OKRAJŠAV

BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamid
FDA	Zvezna agencija za hrano in zdravila (ang. <i>Food and Drug Administration</i>)
FID	plamensko ionizacijski detektor (ang. <i>flame ionization detector</i>)
GC-MS	plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo (ang. <i>gas chromatography-mass spectroscopy</i>)
HDL	lipoproteini velike gostote (ang. <i>high density lipoproteins</i>)
HMDS	heksametildisilazan
HMG-CoA	hidroksimetilglutaril koencim A
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. <i>high-performance liquid chromatography</i>)
IDL	lipoproteini srednje gostote (ang. <i>intermediat density lipoproteins</i>)
LDL	lipoproteini majhne gostote (ang. <i>low density lipoproteins</i>)
m/z	razmerje mase z nabojem
NS	neumiljive snovi
ppm	delci na milijon (ang. <i>parts per million</i>)
RSD	relativna standardna deviacija
RT	retencijski čas (ang. <i>retention time</i>)
TMCS	trimetilklorosilan
VLDL	lipoproteini zelo majhne gostote (ang. <i>very low density lipoproteins</i>)
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (ang. <i>World Health Organization</i>)

Rafiniranje je proces, s katerim spremenimo organoleptične lastnosti olja – zmanjšamo intenzivnost okusa in vonja, odstranimo nezaželeno barvo, olje zbistrimo, izboljšamo pa tudi stabilnost olja [7]. Namen rafiniranja rastlinskih olj je odstranitev nečistot in onesnažil, pri čemer želimo čim manjše poškodbe trigliceridov in minimalno izgubo olja [2]. S procesom rafiniranja se torej znebimo neželenih komponent, kot so peroksidi, razpadni produkti in pigmenti, ter rastlinska olja prilagodimo, da so primerna za želeno uporabo. Kljub temu pa rafiniranje pogosto povzroči tudi izgubo pomembnih hranilnih in funkcionalnih komponent olja, katerih del so tudi neumiljive snovi [8].

1.2 NEUMILJIVE SNOVI V RASTLINSKIH OLJIH

Neumiljive snovi predstavljajo od 0,3 do 2 % celokupne mase olja [9]. Sestava NS je pogosto kompleksna in širokega kemijskega spektra, posledično pa so NS frakcija rastlinskih olj, ki je tudi za analizo zelo zanimiva. Najpogostejše komponente NS so ogljikovodiki, karotenoidi, steroli, tokoferoli in tokotrienoli, maščobni alkoholi in terpenoidni alkoholi [9, 10].

Odvisno od rastlinske vrste, iz katere olje pridobimo, se sestava NS tako kvalitativno kot kvantitativno lahko močno razlikuje [3]. Neumiljivi del je torej specifičen za posamezno vrsto rastlinskega olja in ga lahko uporabimo kot dober pokazatelj mešanja rastlinskih olj in ponarejanja [11]. Z vse večjim zanimanjem za rastlinska olja postajata namreč sledljivost in pristnost olj ključnega pomena [10].

Sestava NS se lahko spreminja tudi v odvisnosti od agronomskih in klimatskih razmer, kakovosti rastlinskega materiala, načina pridobivanja olja in morebitne izpostavljenosti procesu rafiniranja. Do spremembe v sestavi NS lahko pride tudi med shranjevanjem olja, ko je to zaradi zunanjih vplivov lahko izpostavljeno hidrolizi, esterifikaciji in oksidaciji. Določitev sestave NS je tako bistvena za analitično oceno kakovosti, izvora, ekstrakcijske metode, procesa rafiniranja in morebitnega ponarejanja rastlinskega olja [3].

V nadaljevanju so predstavljene posamezne komponente NS, in sicer fitosteroli, vitamin E, fitol in skvalen.

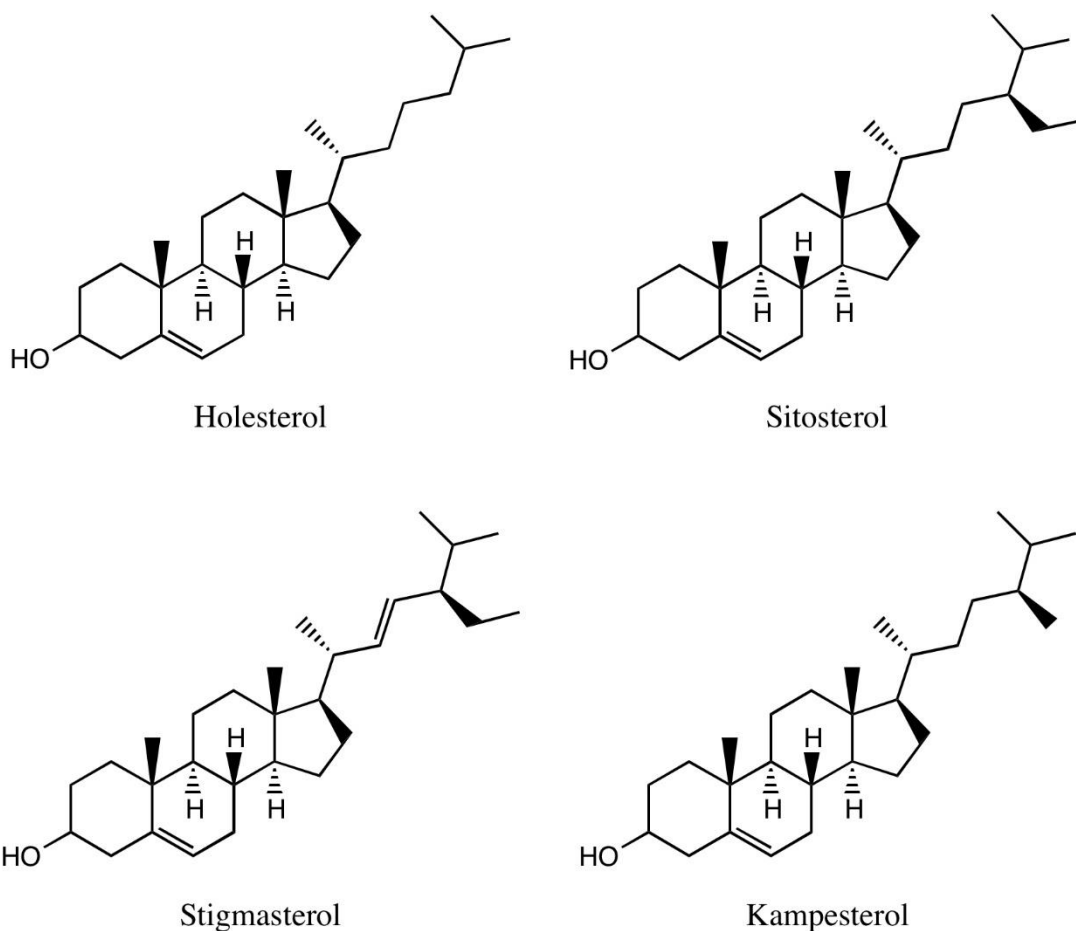
1.2.1 Fitosteroli

Fitosteroli oziroma rastlinski steroli so triterpenske komponente, strukturno podobne holesterolu. Uvrščamo jih med dimetilsterole z dvojno vezjo na mestu C5 in hidroksilno skupino na mestu C3 v steroidnem obroču. Na steroidno jedro je pripeta še stranska veriga,

ki vsebuje dodatno metilno ali etilno skupino ali dvojno vez, sestavljena pa je iz 9 do 10 ogljikovih atomov [12, 13, 14].

V rastlinah najdemo več kot 200 različnih vrst fitosterolov, najbolj pogosti pa so β -sitosterol (24- α -etilholesterol), kampesterol (24- α -metilholesterol) in stigmasterol (Δ^{22} ,24- α -etilholesterol). Strukturne formule najpogostejših fitosterolov in holesterola prikazuje slika 2. V naravi lahko najdemo proste oziroma nevezane fitosteroles ali pa njihove konjugirane oblike. Poznamo 4 oblike konjugiranih fitosterolov, pri čemer je 3β -hidroksilna skupina lahko:

- zaestrena ali z maščobno kislino ali s hidroksi cimetno kislino (kumarinsko kislino),
- glikozilirana ali s heksozo (običajno je to glukoza) ali s 6-acilheksozo, pri kateri izvira acilna skupina od maščobne kisline [13].



Slika 2: Strukture holesterola in najpogostejših fitosterolov [prirejeno po 13].

Čeprav je biosinteza fitosterolov kompleksna in naše znanje o biosintezni poti nepopolno, pa dobro poznamo njihovo vlogo. V rastlinah imajo dve pomembni funkciji – so strukturne komponente celičnih membran in opravljajo nalogo signalnih molekul [15].

Fitosteroli obsegajo večji del neumiljivih snovi in jih najdemo v skoraj vseh rastlinskih oljih [16]. Z analitičnega vidika so najbolj zanimiva komponenta NS. Sestava in razmerje fitosterolov sta dobra označevalca identitete, saj so nekateri steroli specifični za določeno vrsto, na primer brasikasterol za križnice (Brassicaceae), ali pa je njihova vsebnost značilna za določeno olje (Δ^7 -stigmasterol v sončničnem ali žafranikinem olju) [17]. Z analizo fitosterolov lahko torej določimo botanični izvor olja in odkrijemo nedovoljena ponarejanja in mešanja olj [16].

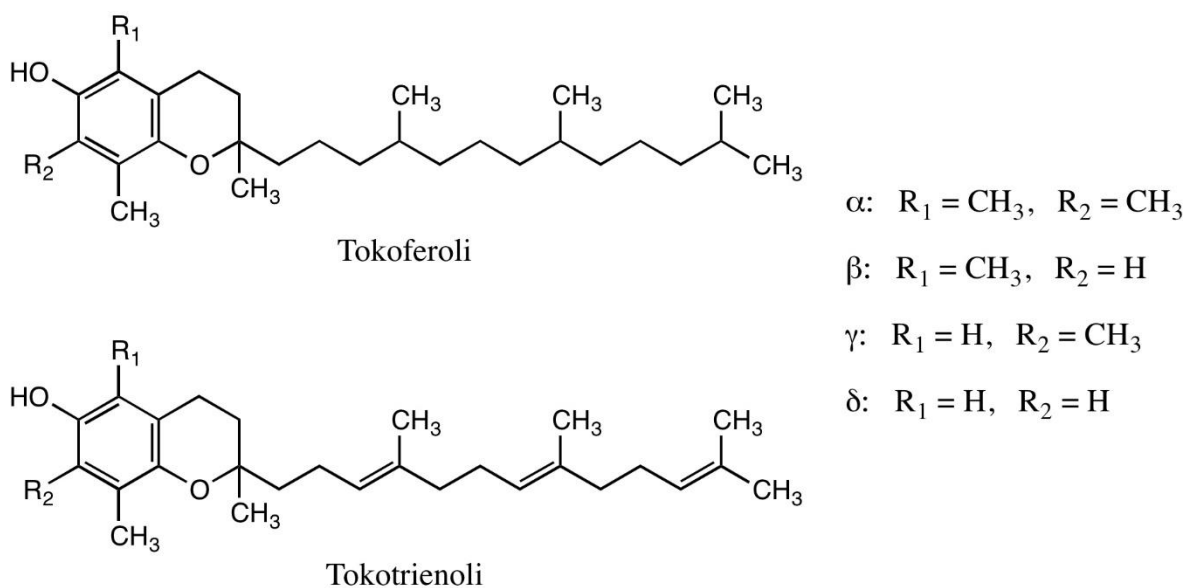
Fitosteroli so bioaktivne komponente rastlinskih olj in imajo pomemben vpliv na zdravje ljudi [13, 18]. Številne klinične študije so pokazale, da s hrano ali v obliki prehranskih dopolnil zaužiti fitosteroli znižujejo raven holesterola v serumu. Številni avtorji pišejo o zaščitni funkciji fitosterolov na srčno-žilni sistem, in sicer naj bi tveganje za srčni napad znižali za 15 do 45 % [15]. Tako v in vitro študijah kot tudi v študijah na podganah so opazili tudi njihovo protitumorsko delovanje, zlasti opazen je bil njihov vpliv na tumorsko celično linijo debelega črevesa [19]. V študijah na živalih so izkazali protivnetno, protibakterijsko, protiglivično in protiulkusno delovanje [20] ter ugodne učinke pri zdravljenju benigne hiperplazije prostate [21]. Iz epidemioloških študij je razvidno, da uživanje fitosterolov zmanjšuje tudi tveganje za razvoj sladkorne bolezni [22].

Fitosterole uporabljamo tudi kot surovine za sintezo hormonov in steroidnih učinkovin – to so protivnetne, imunosupresivne, diuretične, anabolne in kontraceptivne učinkovine ter učinkovine za zdravljenje hormonsko pogojenih oblik raka dojk in prostate [18, 23]. Uporabljamo jih tudi v prehranskih dopolnilih in kozmetičnih izdelkih [18].

1.2.2 Vitamin E

Vitamini so organske substance, ki so v manjših količinah prisotne v hrani in so bistvene za normalno delovanje telesa. Človeško telo večine vitaminov ne sintetizira, zato je nujna pridobitev le teh s hrano. Priporočena količina zaužitih vitaminov je odvisna od starosti, spola, fiziološkega stanja in fizične aktivnosti posameznika. Pomanjkljiv vnos vitaminov se lahko izraža v moteni rasti in razvoju ter ostalih organskih motnjah [24].

Vitamin E spada v skupino v maščobah topnih vitaminov in predstavlja skupni izraz za skupino spojin, imenovanih tokokromanoli. Te delimo v dve skupini, v tokoferole in tokotrienole, in vsako od skupin tvorijo 4 različni derivati: α , β , γ in δ . Molekule tokokromanolov so sestavljene iz polarnega kromanskega ogrodja, na katerega je pripet hidrofobni izoprenoidni rep. α , β , γ in δ komponente se med sabo ločijo po številu in položaju metilnih skupin na aromatskem obroču, medtem ko se tokoferoli in tokotrienoli razlikujejo v nasičenosti stranske ogljikovodikove verige. Tokoferoli imajo nasičeno verigo, tokotrienoli pa imajo nenasičeno verigo s tremi *trans* dvojnimi vezmi. Strukturo tokoferolov in tokotrienolov prikazuje spodnja slika [24, 25].



Slika 3: Struktura tokoferolov in tokotrienolov [prirejeno po 25].

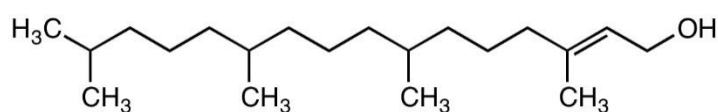
Sinteza vitamina E poteka izključno v rastlinah. Medtem ko sinteza tokoferolov poteka v vseh organizmih, ki vršijo fotosintezo, pa so tokotrienoli prisotni le v nekaterih skupinah rastlin [25]. Z namenom ugotovitve pojavnosti tokotrienolov v rastlinskih vrstah je bila narejena študija, v kateri so analizirali 80 različnih rastlinskih vrst. Tokotrienoli so bili prisotni v 24 vrstah, 16 jih je spadalo med dvokaličnice, med katerimi pa ni bilo taksonomske povezave. 8 rastlinskih vrst je spadalo med enokaličnice, od tega je bilo 6 trav (*Poaceae*), 2 pa palmovki (*Arecaceae*) [26]. Vitamin E ima v rastlinah vlogo antioksidanta, pri čemer je ključnega pomena zaščita membran kloroplastov pred reaktivnimi kisikovimi zvrstmi in s tem zagotavljanje optimalnih razmer za izvedbo fotosinteze. Poleg tega vitamin E sodeluje pri celični signalizaciji in modulaciji rastlinskih hormonov [25].

Biološko najbolj aktivna oblika vitamina E je α -tokoferol. Zaradi svoje lipofilne narave je vitamin E tesno povezan z lipidi – nenasičene lipide ščiti pred oksidacijo tako v živilih kot v bioloških sistemih. Vitamin E kot močan antioksidant zavira oksidacijo holesterola LDL in s tem zmanjšuje tveganje za srčno-žilne bolezni, kot sta ateroskleroza in koronarna bolezen [24]. Njegova vloga je povezana tudi s preventivo številnih drugih bolezni, kot so sladkorna, Parkinsonova in Alzheimerjeva bolezen, okvare vida, oslabljen imunski sistem in rakave bolezni [25]. Uživanje vitamina E ima lahko ugoden vpliv tudi na negativne učinke staranja in varuje pred upadom kognitivnih funkcij [24]. Ima tudi številne posredne učinke na regulacijo krvnih celic, rast vezivnega tkiva, vnetje in genetski nadzor celične delitve [27].

V prehranski industriji ima vitamin E kot lipidni antioksidant pomembno vlogo pri ohranjanju oksidativne stabilnosti živil in s tem njihove kakovosti. Posledice lovljenja kisikovih zvrsti so upočasnjena mikrobiološka rast ter manjše spremembe barve in okusa živil [25]. Uporaba tokoferola in njegovega estra tokoferilacetata je priljubljena tudi v kozmetični industriji. Poleg izboljšanja oksidativne stabilnosti dermalnih formulacij ima vitamin E tudi ugodne učinke na kožo [28].

1.2.3 Fitol

Fitol, s kemijskim imenom 3,7,11,15-tetrametil-2-heksadecen-1-ol, je neciklični enkrat nenasičen terpenoidni alkohol. Njegova diterpenska struktura z 20 C atomi je prikazana na spodnji sliki [29, 30].



Slika 4: Struktura fitola [prirejeno po 40].

Fitol je bioaktivna komponenta rastlinskih olj, ki je pogosto prisotna v naravi. Je sestavni del klorofila, zato ga večinoma najdemo v zelenolistni zelenjavi, prisoten pa je tudi v algah, cianobakterijah in v črevesju prežvekovalcev. V kloroplastih višje razvitih zelenih rastlin povezuje klorofil s tilakoidno membrano in služi kot intermediat v biosintezi vitamina K in vitamina E [30, 31, 32].

Fitol, vezan na klorofil, obstaja v naravi izključno v obliki *trans* izomera. Ugotovili so, da se lahko kot posledica rafiniranja v manjšem deležu v olju pojavi tudi *cis* izomer fitola,

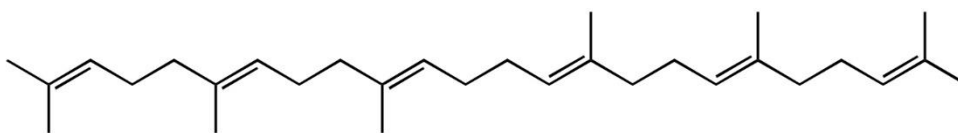
medtem ko je pri hladno stiskanem olju prisoten le *trans* izomer. To dejstvo nam lahko v kombinaciji z ostalimi markerji pomaga pri ločevanju med rafiniranimi in nerafiniranimi olji in pri oceni kakovosti analiziranega olja [32].

Fitol pogosto uporabljamo kot prehransko dopolnilo in v medicinske namene [29]. Študije so pokazale različne terapevtske aktivnosti fitola, in sicer v raziskavah na miših so opazili antikonvulzivne lastnosti [33] in protivnetno delovanje [34]. Prav tako so ugotovili, da je močan imunostimulant, ki stimulira tako prirojeno kot pridobljeno imunost [35]. V in vivo ter in vitro študijah so potrdili tudi njegovo antioksidativno [36] in protirakavo učinkovanje [37]. Fitol izkazuje protimikrobno delovanje na bakterijskih vrstah *Mycobacterium tuberculosis* (in vivo) [38] in *Staphylococcus aureus* (in vitro) [39]. Številne klinične študije so pokazale, da zmesi linearnih alifatskih alkoholov, ki se pojavljajo v rastlinskih oljih in katerih del je tudi fitol, izkazujejo več ugodnih fizioloških učinkov, kot so zmanjšanje agregacije trombocitov in endotelijskih poškodb ter zniževanje ravni holesterola. Dnevni vnos 5 do 20 mg polikozanolov (tj. zmesi linearnih alifatskih alkoholov) naj bi tako zmanjšal raven holesterola LDL za 20 do 25 % [40, 41].

Fitol je aromatična komponenta, ki jo najdemo tudi v eteričnih oljih nekaterih rastlin, zato je njena uporaba priljubljena tudi v dišavah in kozmetičnih izdelkih [29].

1.2.4 Skvalen

Skvalen, s kemijskim imenom 2,6,10,15,19,23-heksametil-2,6,10,14,18,20-tetrakozahexsan, je triterpenski večkrat nenasičen ogljikovodik. Številne dvojne vezi mu omogočajo, da se pojavlja v različnih konformacijah – raztegnjeni, naviti ali v konformaciji, ki oponaša obliko sterolov. Njegova izoprenoidna struktura, sestavljena iz 30 C atomov, je prikazana na spodnji sliki [42, 43].



Slika 5: Struktura skvalena [prirejeno po 43].

Skvalen je pogosto prisoten v naravi. Njegov najbogatejši vir je olje iz jeter morskega psa, iz katerega skvalen tudi tradicionalno pridobivamo. V rastlinskih oljih najdemo večje količine v olivnem in palmovem olju ter olju pšeničnih kalčkov in riževih otrobov. Pri ljudeh

najdemo skvalen v največji koncentraciji v sebumu, prisoten pa je tudi v maščevju. Sintetizira se v vseh tipih celic, saj je ključni intermediat v sintezi sterolov – tako v rastlinah kot živalih. Skvalen in njemu sorodne spojine so prekursorji skoraj 200 različnih triterpenov [43, 44].

Študije so pokazale, da je skvalen učinkovit lovilec singletnega kisika in posledično izkazuje antioksidativne lastnosti. Ima potencialno zaščitno delovanje proti raku, zaradi pospešenega izločanja lipofilnih ksenobiotikov iz telesa pa ga uporabljamo tudi kot protistrup pri zastrupitvah z zdravili in drugimi kemikalijami (na primer: heksaklorobifenil, heksaklorobenzen, arzen, teofilin, fenobarbital in strihnin) [42, 43, 45]. Čeprav je skvalen intermediat v biosintezi holesterola, pa njegovo uživanje ne poveča koncentracije holesterola v serumu. Celo nasprotno, redno dodatno uživanje skvalena zmanjšuje koncentracijo holesterola in ima ugodne učinke na srčno-žilni sistem – preprečuje aterosklerozo in ima antihipertenzivni učinek. V 20 tedenski študiji, v kateri so udeleženci dnevno zaužili 850 mg skvalena, so tako opazili zmanjšanje ravni holesterola za približno 17 %. Skvalen izkazuje tudi protivnetno delovanje [43].

Skvalen je priljubljena komponenta tudi v kozmetičnih in farmacevtskih pripravkih. Dermalna aplikacija zmanjšuje gube in z UV svetlobo povzročene poškodbe kože, primeren pa je tudi za zdravljenje bakterijskih in glivičnih infekcij. V lipidnih emulzijah ga uporabljamo kot podlago in dostavni sistem za zdravilne učinkovine in cepiva. Predlagali so tudi njegovo uporabo v formulacijah za zdravljenje kožnih bolezni, protirakavih zdravilih, zdravilih za zniževanje maščob v krvi in v medicinskih vsadkih [43, 44].

1.3 RASTLINSKA OLJA IN NEUMILJIVE SNOVI V PREHRANI

Pripravke, pridobljene iz rastlin, uporabljamo kot sredstvo za preprečevanje in zdravljenje bolezni že od nekdaj. »Naj bo hrana vaše zdravilo in vaše zdravilo naj bo vaša hrana.« je rek grškega zdravnika Hipokrata in danes vemo, da je povezava med hrano in zdravilom vse tesnejša, njuni vlogi pa se prepletata. To zvezo predstavlja izraz nutraceutiki, pri katerem gre za skovanko angleških besed »*nutrient*« (hranilna sestavina živila) in »*pharmaceutical*« (zdravilo). Aktualen je tudi izraz funkcionalna hrana [46, 47].

Nutraceutiki so prehranska dopolnila, ki vsebujejo koncentrirano obliko bioaktivne komponente, pridobljeno iz hrane. Aktivna snov je vgrajena v matriks, v katerem hrana ni prisotna, odmerki aktivne snovi pa presegajo količino, ki jo lahko zaužijemo z običajno

hrano. Namen uživanja nutraceutikov je krepitev zdravja. Z izrazom funkcionalna hrana pa označujemo živila, ki ob rednem uživanju povzročijo specifičen ugoden učinek na zdravje, ki presega njihove hranilne lastnosti. Čeprav meja med nutraceutiki in funkcionalno hrano ni vedno jasna, je glavna razlika med njimi oblika, v kateri zaužijemo aktivne komponente. Pri nutraceutikih so to kapsule, tablete in druge farmacevtske oblike, medtem ko je funkcionalna hrana vedno v obliki običajne hrane [46, 48].

Maščobe so ena izmed treh glavnih skupin živil, poleg beljakovin in ogljikovih hidratov [16]. Osnovni biološki funkciji maščob sta zagotavljanje energije in gradnja celičnih membran, imajo pa tudi vlogo signalnih molekul, prenašalcev elektronov, so encimski kofaktorji ter vitamini in njihovi prekurzorji [46]. Pri vse večjem zavedanju o hranilni in funkcionalni vlogi maščob v prehrani se strmo povečuje tudi zanimanje za rastlinska olja [40]. Ta so v zadnjem času zaradi svojega prijetnega okusa in številnih koristnih učinkov na zdravje izpodrinila uporabo masti in loja [16]. Pri rastlinskih oljih gre za kombinacijo funkcionalnih komponent in hranilne sestave, zato jih obravnavamo kot funkcionalno hrano [49]. Komponente neumiljivih snovi, kot so na primer fitosteroli, opredelimo kot bioaktivne komponente rastlinskih olj, dostopne pa so tudi v izolirani obliki kot nutraceutiki oziroma prehranska dopolnila [11, 49]. Fitosteroli in njihovi estri z maščobnimi kislinami so tudi ene izmed prvih komponent, ki so jih začeli dodajati običajni hrani, z namenom njene obogatitve in pridobitve dodatnega ugodnega učinka [50].

Sposobnost določene hrane, pridobljene iz rastlin, da zmanjšuje tveganje za pojav kroničnih bolezni, je vsaj deloma povezana s pojavnostjo sekundarnih metabolitov, ki sodelujejo pri širokem spektru bioloških funkcij. V splošnem imajo bioaktivne komponente, pridobljene iz hrane, šibkejšo delovanje od zdravil, vendar pa imajo ob rednem uživanju v ustreznih količinah lahko opazen dolgoročen fiziološki učinek [46].

1.4 NEUMILJIVE SNOVI IN KRVOŽILJE

Bolezni srca in ožilja, kot so koronarna bolezen, cerebrovaskularna bolezen, periferna arterijska bolezen, globoka venska tromboza in pljučna embolija, so velik zdravstveni problem moderne družbe [51]. V razvitih državah predstavljajo glavni vzrok za obolevnost odraslih in so vzrok za skoraj polovico vseh smrti. V številnih primerih je neustrezna prehrana glavni vzrok za razvoj krvožilnih bolezni, zato je pomembno, da spremembo življenjskega sloga, s poudarkom na uživanju živil z ugodnimi lastnostmi, opredelimo kot najpomembnejši pristop k zdravljenju in preprečevanju bolezni srca in ožilja [52].

V preteklih letih so zaradi svojega preventivnega in zdravlilnega delovanja na kronične bolezni pritegnile veliko pozornosti različne kemijske spojine rastlinskega izvora, med njimi tudi neumiljive snovi. Te imajo širok spekter bioloških učinkov, najbolj raziskan pa je njihov ugoden vpliv na krvožilje. Pri tem imajo ključno vlogo fitosteroli s svojo sposobnostjo zniževanja ravni holesterola v krvi [53].

1.4.1 Povečane količine lipidov v krvi in ateroskleroza

Povečane količine lipidov v krvi

Lipoproteini so makromolekulski kompleksi, sestavljeni iz lipidov in proteinov, ki po krvi prenašajo lipide, kot so holesterol, trigliceridi in v maščobah topni vitamini. Sredico lipoproteinov sestavljajo trigliceridi in holesterolni estri, zunanji del pa fosfolipidi, nekaj prostega holesterola in apolipoproteini. Lipoproteini se med sabo razlikujejo po velikosti, gostoti in deležu holesterola in trigliceridov, delimo pa jih v sledečih pet skupin: hilomikroni, VLDL, IDL, LDL in HDL. Razdelitev lipoproteinov prikazuje spodnja preglednica [54].

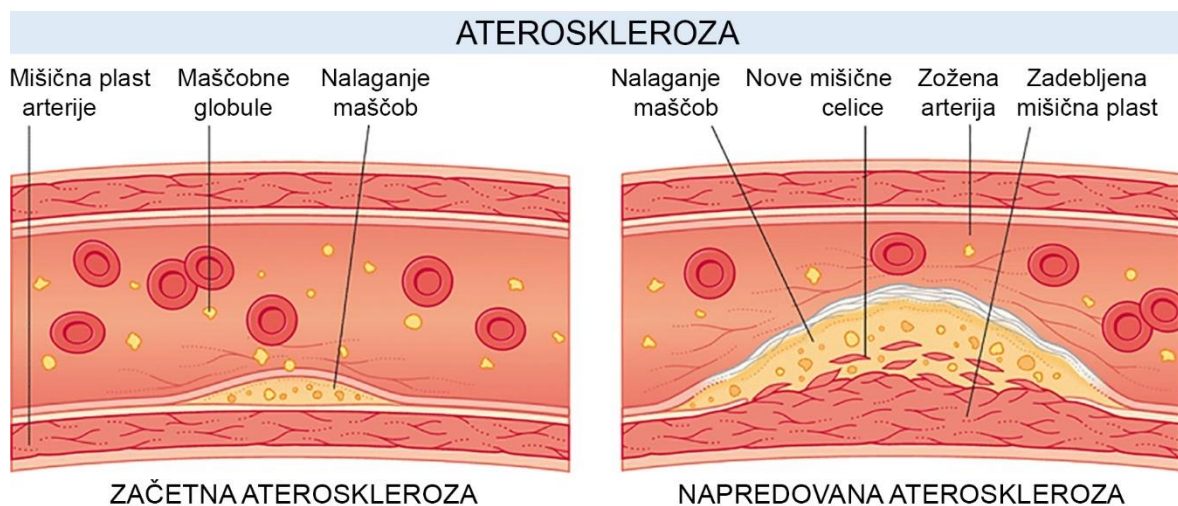
Preglednica II: Razdelitev lipoproteinov [54].

	Gostota (g/ml)	Premier (nm)	Trigliceridi (%)	Holesterol (%)
Hilomikroni	0,95	75–1200	80–95	2–7
VLDL	0,95–1,006	30–80	55–80	5–15
IDL	1,006–1,019	25–35	20–50	20–40
LDL	1,019–1,063	18–25	5–15	40–50
HDL	1,063–1,210	5–12	5–10	15–25

Tveganje za razvoj ateroskleroze in njenih zapletov je povečano pri zvečanih plazemskih koncentracijah holesterola, trigliceridov in LDL ter pri zmanjšani koncentraciji HDL. Povečano je tudi pri zmanjšanem razmerju plazemskih koncentracij HDL/LDL. Pomemben dejavnik je tudi oksidativni stres, saj oksidirana oblika LDL (oLDL) še bolj pospešuje razvoj ateroskleroze kot LDL. oLDL narašča s časom zadrževanja LDL v plazmi. Uživanje hrane, bogate s holesterolom in nasičenimi maščobnimi kislinami, zmanjša privzem LDL v hepatocite in podaljša čas zadrževanja LDL v krvi, poleg tega pa se zmanjša tudi sinteza HDL holesterola v jetrih. Odvečni LDL, ki ga jetra ne privzamejo, fagocitirajo makrofagi, ki nato ob poškodbi endotelija arterijske stene kot del normalnega odziva na vnetno reakcijo migrirajo v intimo in povzročijo razvoj ateroma. Čim večja je koncentracija obeh oblik LDL in čim daljša je njuna prisotnost v plazmi, tem več LDL se nalaga v intimi arterij in posledično narašča tveganje za nastanek aterosklerotičnega plaka [54, 55].

Ateroskleroza

Ateroskleroza je kronična bolezen velikih in srednje velikih arterij elastičnega in mišičnega tipa. Zanja je značilno progresivno kopičenje maščob, veziva, kalcijevih soli in celičnih ostankov v intimi, prisotno pa je tudi vnetje, ki poleg intime zajame še medijo in adventicijo arterijske stene. Tako nastajajo značilne aterosklerotične lehe ali ateromi, ki vodijo v zoženje svetline arterije s posledičnim zmanjšanjem pretoka krvi in ishemijo prizadetih organov. Zoženje lumna arterije pri začetni in napredovani aterosklerozi prikazuje slika 6. Klinično se ateroskleroza običajno izrazi s kroničnimi sindromi, kot je na primer stabilna angina pectoris, ali pa z akutnimi zapleti, kot sta miokardni infarkt ali možganska kap. V razvitih državah je ateroskleroza vodilni vzrok obolevnosti in posredni vzrok za skoraj polovico vseh smrti [55].



Slika 6: Začetna in napredovana ateroskleroza [prirejeno po 56].

Poznamo več teorij o nastanku ateroskleroze, med njimi pa je najširše sprejeta teorija o »odzivu na poškodbo endotelija«. Biomehanske motnje endotelija naj bi nastale zaradi turbulentnega toka krvi, še dodatno pa jih povečuje hipertenzija. Ključno vlogo v začetni fazi ateroskleroze ima tudi oksidativni stres, ki stimulira vnetni odziv in tako pripomore k okvari endotelija. Zaradi oslabele funkcije endotelija pride do pospešenega vstopanja lipoproteinov v arterijsko steno in njihove oksidacije, vstopanja monocitov in limfocitov T v arterijsko steno, proliferacije gladkomišičnih celic, povečane sinteze zunajceličnega matriksa (kolagena, elastina in proteoglikanov), prav tako pa endotelijska disfunkcija spodbuja vazokonstrikcijo ter protrombotično stanje v lumnu arterije. Aterogeneza torej ni le kopičenje vseh naštetih snovi in celic, temveč gre za aktivno spreminjanje histološke in biokemične sestave arterijske stene. Splošno sprejeto mnenje je, da je osrednji mehanizem

aterogeneze kronično vnetje, ki ga še dodatno spodbujajo dejavniki tveganja. Mednje spadajo hiperholesterolemija, kot glavni dejavnik tveganja za razvoj ateroskleroze, oksidativni stres, produkti glikacije lipoproteinov, ki so prisotni pri sladkornih bolnikih in starostnikih, ter kemični dražilci v tobačnem dimu [52, 55, 56].

1.4.2 Protektivno delovanje neumiljivih snovi na krvožilje

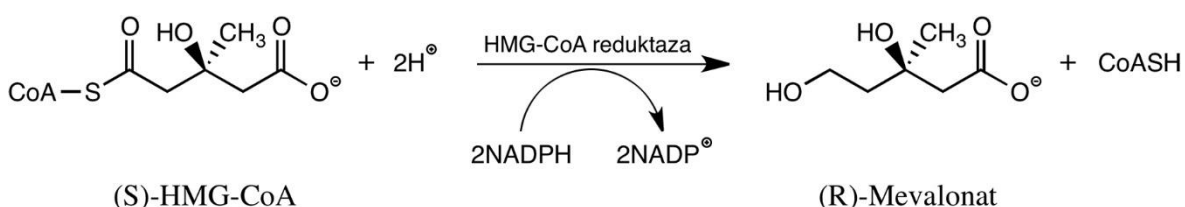
Ključno vlogo pri zaščitnem delovanju neumiljivih snovi na krvožilni sistem imajo fitosteroli s svojo sposobnostjo zniževanja ravni celokupnega in LDL holesterola v krvi. Fitosteroli inhibirajo privzem holesterola iz črevesja, pri čemer zmanjšajo tako absorpcijo holesterola, vnesenega s hrano, kot tudi endogenega holesterola, ki se z žolčem izloči v črevesje. Čeprav natančnega mehanizma inhibicije privzema ne poznamo, so predlagali več teorij. Ob prisotnosti fitosterolov v črevesju naj bi se že tako slabo topen holesterol oboril, posledično pa se holesterol v obliki oborine ne more absorbirati v krvni obtok. Druga teorija pa temelji na dejstvu, da se mora holesterol predhodno vgraditi v micele soli žolčnih kislin in fosfolipidov, da se lahko absorbira v krvni obtok. Holesterol je le delno topen v micelih, zato ga fitosteroli, ki se lažje vgradijo v micele kot holesterol, izpodrinejo in tako preprečijo njegovo absorpcijo [13].

Velik vnos fitosterolov v količini 1–2 g na dan lahko zniža absorpcijo holesterola 5- do 6-krat. Nedavne študije so pokazale, da zmanjšanje koncentracije holesterola LDL za 1 % zmanjša tveganje za razvoj srčno-žilnih bolezni tudi do 20 % [57]. Ugotovili so, da se pri bolnikih s hiperholesterolemijo, ki jih že zdravijo z zdravili, ugodni učinki fitosterolov in zdravil seštevajo. Tako naj bi dodatek fitosterolov k terapiji z ezetimibom občutno povečal učinek zdravljenja [58], prav tako pa naj bi uživanje fitosterolov ob že uveljavljeni terapiji s statini dodatno zmanjšalo raven holesterola LDL za 7 do 20 % [57]. Medicinske smernice, ki narekujejo uživanje fitosterolov z namenom zniževanja ravni holesterola v krvi in zmanjšanja tveganja za razvoj srčno-žilnih bolezni, priporočajo številne zdravstvene organizacije, med njimi tudi Zvezna agencija za hrano in zdravila (FDA) in Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) [57].

Vitamin E pripomore k zaščiti krvožilnega sistema predvsem preko svojih močnih antioksidativnih sposobnosti – preprečuje namreč oksidacijo holesterola LDL in tako zmanjša tveganje za razvoj ateroskleroze [24]. Inhibira tudi proliferacijo celic gladkega mišičja in s tem zmanjšuje zadebelitev žilne stene [25] ter preko modulacije genov zavira biosintezo holesterola [59].

Fitol deluje ugodno na krvožilni sistem in preprečuje aterosklerotične zaplete preko različnih mehanizmov. Poleg antioksidativnega delovanja ščiti endotelij pred poškodbami, preprečuje agregacijo trombocitov in deluje protivnetno. Uživanje polikozanolov znižuje tudi raven holesterola v krvi [40, 41].

Zaščitno delovanje na krvožilje izkazuje tudi skvalen, pri čemer sta ključna njegovo antioksidativno delovanje in zmožnost zniževanja ravni holesterola v krvi [44]. Čeprav so za pojasnitev mehanizma zniževanja ravni holesterola v krvi potrebne dodatne raziskave, pa so v študiji na podganah ugotovili, da uživanje skvalena zmanjša delovanje encima HMG-CoA-reduktaze [60], ki sodeluje v mevalonatni poti biosinteze holesterola (slika 7) in določa njeno hitrost. Preko inhibicije HMG-CoA-reduktaze delujejo tudi statini, trenutno najuspešnejša zdravila za zniževanje ravni holesterola v krvi [55].



Slika 7: Mevalonatna pot biosinteze holesterola, katalizirana s HMG-CoA reduktazo [prirejeno po 61].

Opisani ugodni učinki posameznih komponent neumiljivih snovi na krvožilje veljajo za izolirane komponente, vnesene v velikih količinah (tj. 1–2 g fitosterolov/dan, 850 mg skvalena/dan, 5–20 mg polikozanolov/dan) [41, 43, 57]. V rastlinskih oljih je vsebnost aktivnih snovi manjša, vendar pa neumiljive snovi zaradi svoje raznolikosti v sestavi učinkujejo preko različnih mehanizmov in tako ob rednem uživanju sinergistično ščitijo krvožilni sistem.

2 NAMEN IN POTEK DELA

Glavni namen magistrske naloge bo določiti vsebnost in sestavo neumiljivih snovi v izbranih rastlinskih oljih. Neumiljive snovi bomo izolirali po modificirani farmakopejski metodi in določili njihov masni delež v olju. Nato jih bomo derivatizirali in pripravili na nadaljnjo analizo s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo (GC-MS). Z GC-MS bomo določili vsebnost fitosterolov (stigmasterola in β -sitosterola), fitola (*cis* in *trans* izomerov), skvalena in vitamina E (α -, γ - in δ -tokoferola).

Analizirali bomo 17 različnih rastlinskih olj, in sicer: olje ameriške brusnice, bezgovo olje, borečevo olje, olje črnega ribeza, konoplino olje, malinovo olje, olje črne ogrščice, orehovo olje, olje rakitovca, svetlinovo olje, šipkovo olje, olje španske kadulje, olje črne koprive, olje črne kumine, olje inkovske plukenecije, kivijevo olje in laneno olje.

Primerjali bomo vsebnost in sestavo neumiljivih snovi v oljih različnih dobaviteljev, pridobljenih s hladnim stiskanjem ali z ekstrakcijo s superkritičnim ogljikovim dioksidom. Ugotavljali bomo tudi morebitni vpliv rafiniranja olja na vsebnost in sestavo neumiljivih snovi. Na podlagi dobljenih rezultatov in znanih lastnosti bomo olja ovrednotili in ocenili primernost uporabe dotičnih olj v prehrani oziroma v obliki prehranskih dopolnil z zaščitnim delovanjem na krvožilni sistem.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorci rastlinskih olj

Analizirali smo 17 vrst rastlinskih olj, skupaj 39 vzorcev, saj smo imeli pri večini olj na razpolago vzorce več dobaviteljev. Olja različnih dobaviteljev smo uporabili z namenom ugotoviti spremenljivost sestave neumiljivih snovi.

Uporabili smo sledeča rastlinska olja:

- olje ameriške brusnice (lat. *Vaccinium macrocarpon*),
- bezgovo olje (lat. *Sambucus nigra*),
- borečevo olje (lat. *Borago officinalis*),
- olje črnega ribeza (lat. *Ribes nigrum*),
- konopljinolje (lat. *Cannabis sativa*),
- malinovo olje (lat. *Rubus idaeus*),
- olje črne ogrščice (lat. *Brassica nigra*),
- orehovo olje (lat. *Juglans regia*),
- olje rakitovca (lat. *Hippophae rhamnoides*),
- svetlinovo olje (lat. *Oenothera biennis*),
- šipkovo olje (lat. *Rosa canina*),
- olje španske kadulje (lat. *Salvia hispanica*),
- olje črne koprive (lat. *Perilla frutescens*),
- olje črne kumine (lat. *Nigella sativa*),
- olje inkovske plukenecije (lat. *Plukenetia volubilis*),
- kivijevo olje (lat. *Actinidia chinensis*),
- laneno olje (lat. *Linum usitatissimum*).

Izbrana rastlinska olja so vsa olja z znatnim deležem linolenske kisline, ki so dostopna na trgu. Preglednica na naslednji strani prikazuje zaporedno številko vzorca, dobavitelja olja, način pridobivanja olja (če je bil ta podatek dostopen) in morebitno rafiniranost olja.

Preglednica III: Pregled vzorcev rastlinskih olj.

Rastlinsko olje	Oznaka olja	Dobavitelj olja	Način pridobivanja	Rafinirano
Olje ameriške	1	Behawe	Hladno stiskano	Ne
brusnice	2	Alexmo cosmetics	/	Ne
	3	Dragonspice Naturwaren	Hladno stiskano	Ne
Bezgovno olje	4	BaccaraRose	/	Ne
	5	Behawe	Hladno stiskano	Ne
Borečevo olje	6	Dragonspice Naturwaren	Hladno stiskano	Ne
	7	Tovarna Organika	/	Ne
	8	Caelo	/	Da
	9	Farmalabor	/	Ne
Olje črnega ribeza	10	Dragonspice Naturwaren	Hladno stiskano	Ne
	11	Behawe	Hladno stiskano	Ne
Konopljinno olje	12	Dragonspice Naturwaren	Hladno stiskano	Ne
	13	Tovarna Organika	/	Ne
	14	Manske	/	Ne
Malinovo olje	15	Tovarna Organika	/	Ne
	16	Dragonspice Naturwaren	CO ₂ ekstrakt	Ne
	17	Behawe	Hladno stiskano	Ne
Olje ogrščice	18	Behawe	Stiskano	Ne
Orehovo olje	19	BaccaraRose	Hladno stiskano	Ne
	20	Caelo	Stiskano	Da
Olje rakitovca	21	Alexmo cosmetics	Hladno stiskano	Ne
	22	Dragonspice Naturwaren	CO ₂ ekstrakt	Ne
	23	Behawe	Hladno stiskano	Ne
Svetlinovo olje	24	Dragonspice Naturwaren	Hladno stiskano	Ne
	25	Farmalabor	/	Ne
	26	Alexmo cosmetics	/	Ne
	27	Caelo	Stiskano	Da
Šipkovo olje	28	Manske	/	Ne
	29	BaccaraRose	Hladno stiskano	Ne
	30	Alexmo cosmetics	Hladno stiskano	Ne
Olje španske	31	Dragonspice Naturwaren	CO ₂ ekstrakt	Ne
kadulje	32	BaccaraRose	CO ₂ ekstrakt	Ne
Olje črne koprive	33	BaccaraRose	Hladno stiskano	Ne
Olje črne kumine	34	Caelo	/	Ne
Olje inkovske	35	Magnolija	/	Ne
plukenecije				
Kivijevo olje	36	Dragonspice Naturwaren	CO ₂ ekstrakt	Ne
Laneno olje	37	BaccaraRose	Hladno stiskano	Ne
	38	Farmalabor	/	Ne
	39	Caelo	/	Ne

3.1.2 Kemikalije in reagenti

Topila in reagenti, ki smo jih uporabili pri saponifikaciji in ekstrakciji neumiljivih snovi:

- prečiščena voda, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani,
- etanol 96%, p. a., Carlo Erba,
- kalijev hidroksid, brezvodne pelete, p. a., Sigma-Aldrich,
- dietileter, p. a., Sigma-Aldrich,
- natrijev klorid, p. a., Carlo Erba,
- kalijev jodid, p. a., Carlo Erba,
- natrijev hidroksid, brezvodne pelete, p. a., Riedel-de Haën,
- fenolftalein, Riedel-de Haën,
- argon, stisnjen, p. a., Messer.

Topila in reagenti, ki smo jih uporabili pri derivatizaciji neumiljivih snovi:

- HMDS + TMCS + piridin, 3 : 1 : 9, Supelco,
- n-heksan 95 %, p. a., Panreac.

Uporabljene referenčne spojine:

- holesterol, 99 %, Fluka,
- β -sitosterol, 80 %, Roth,
- stigmasterol, 95 %, Roth,
- fitol, 95 %, Merck,
- skvalen, 98 %, Sigma-Aldrich,
- α -tokoferol, Sigma-Aldrich,
- γ -tokoferol, Supelco,
- δ -tokoferol, Supelco.

3.1.3 Aparature in laboratorijska oprema

Aparature in laboratorijska oprema, ki smo jo uporabili pri saponifikaciji in ekstrakciji neumiljivih snovi:

- standardna laboratorijska steklovina (čase, bučke, polnilne bučke, merilni valji, liji, liji ločniki, hladilniki, epruvete, pipete, viala, zamaški),
- tehtalni pribor (spatule, žličke, čolnički),

- stojala, mufe, prižeme,
- magnetna mešala,
- aluminijasta folija,
- parafilm,
- fen,
- grelne kalote, Radleys,
- grelne in mešalne plošče, Heidolph,
- tehtnica, Mettler PC 2000,
- analizna tehtnica, Sartorius TE214S-OCE,
- rotavapor, Buchi Rotavapor R-210.

Aparature in laboratorijska oprema, ki smo jih uporabili pri derivatizaciji neumiljivih snovi (tj. referenčnih spojin in neumiljivih snovi iz vzorcev) ter pri pripravi raztopin referenčnih spojin različnih koncentracij:

- standardna laboratorijska steklovina (čase, polnilne bučke, polnilne pipete, palčke),
- tehtalni pribor (spatule, žličke),
- 1,5-mililitrske epice,
- avtomatske pipete Proline, Biohit (1000 µl, 100 µl),
- nastavki za pipete,
- viala za analizo z GC-MS,
- analitska tehtnica, Sartorius TE214S-OCE,
- vodna kopel, Kambič WB-30 STE,
- vorteks, Tehnica-Vibromix 10,
- centrifuga, Tehnica-Centric200R.

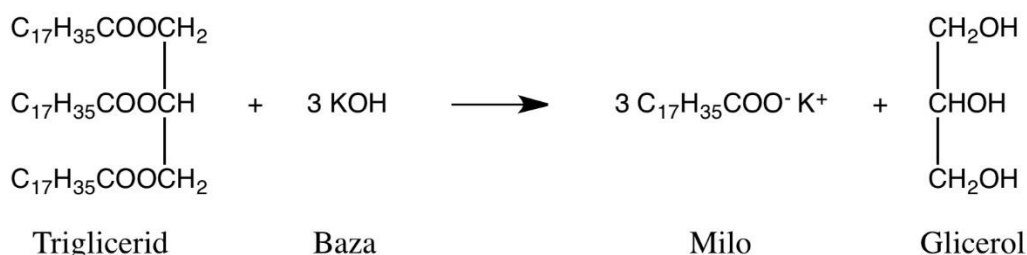
Aparatura in oprema, ki smo jo uporabili pri analizi neumiljivih snovi z GC-MS:

- Analizator GC-MS, GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu Corporation,
- Programska oprema GCMS Solution 2.3, Shimadzu Corporation,
- Podatkovni knjižnici NIST11 in FFNSC2, Shimadzu Corporation,
- Kapilarna kolona Rtx-1F&F, 100 % dimetilpolisiloksan, 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm, Restek.

3.2 METODE

3.2.1 Izolacija neumiljivih snovi iz rastlinskega olja

Rastlinska olja so sestavljena pretežno iz trigliceridov, neumiljive snovi pa so zastopane v manjšini. Za uspešno izvedbo analize NS je treba najprej odstraniti trigliceride, kar dosežemo s saponifikacijo [62]. Pri saponifikaciji gre za bazično hidrolizo trigliceridov, pri kateri pride do prekinitve estrskih vezi med glicerolom in maščobnimi kislinami. Produkti reakcije so glicerol in soli maščobnih kislin, imenovane tudi milo [63]. Shema kemijske reakcije je prikazana na spodnji sliki.



Slika 8: Saponifikacija [prirejeno po 63].

NS ločimo od glicerola in ioniziranih maščobnih kislin z ekstrakcijo z organskim topilom [5]. NS preidejo v organsko topilo, medtem ko ostale komponente (glicerol in soli maščobnih kislin) zaradi svoje hidrofilnosti ostanejo v vodni fazi.

Pri izboru metode za izolacijo NS iz olja smo izhajali iz farmakopejskega predpisa. Na podlagi ugotovitev, do katerih smo prišli pri testiranju metode, smo postopek ustrezno prilagodili in metodo modificirali.

3.2.1.1 Predpis po Evropski farmakopeji [5]

Predpisano količino preiskovane substance (m v gramih) damo v 250-mililitrsko bučko, opremljeno s povratnim hladilnikom. Dodamo 50 ml 2 M etanolne raztopine kalijevega hidroksida in na vodni kopeli ob pogostem mešanju grejemo 1 uro. Ohladimo na temperaturo pod 25 °C in prenesemo vsebino bučke v lij ločnik s 100 ml vode. Tekočino previdno stresamo s trikrat po 100 ml etra čistote »brez peroksidov«. Združimo etrne faze v drug lij ločnik s 40 ml vode, nežno stresamo nekaj minut, pustimo, da se fazi ločita, in zavržemo vodno fazo. Etrno fazo speremo z dvakrat po 40 ml vode, nato s 40 ml raztopine kalijevega hidroksida (30 g/l) in spet s 40 ml vode; postopek ponovimo trikrat. Etrno fazo večkrat speremo s 40 ml vode, dokler vodna faza ne reagira več bazično pri reakciji na fenolftalein. Etrno fazo prenesemo v starirano bučko in lij ločnik speremo z etrom. Eter odstranimo pri

znižanem tlaku in preostanku dodamo 6 ml acetona. Topilo previdno odstranimo s tokom zraka. Preostanek pri 100–105 °C posušimo do konstantne mase, pustimo, da se v eksikatorju ohladi, in stehtamo (*a* v gramih).

Izračun deleža neumiljivih snovi v olju:

$$NS = 100 a / m [\%]$$

Test za določanje kislin v preostanku

Preostanek raztopimo v 20 ml etanola in titiramo z 0,1 M etanolno raztopino natrijevega hidroksida. Če je volumen raztopine natrijevega hidroksida večji od 0,2 ml, je bila ekstrakcija nepopolna in preostanek ne predstavlja le NS. V primeru dvoma test ponovimo.

3.2.1.2 Modifikacija predpisa

Zaradi kompleksnosti metode smo se odločili, da pred samo izvedbo izolacije NS olju dodamo znano količino holesterola, ki nam bo služil kot referenca za preračunavanje izgub NS med številnimi vmesnimi koraki postopka. Podatke o vsebnosti holesterola smo uporabili pri končnem preračunavanju količine posameznih komponent v NS.

V farmakopejskem predpisu temperatura gretja, pri kateri izvajamo saponifikacijo, ni določena. Poskus smo tako s testnim oljem izvedli pri 60, 80, 100 in 120 °C in spremljali dobljeno maso NS. Masa se v odvisnosti od temperature saponifikacije ni spreminjala, zato smo se odločili za temperaturo 60 °C.

Farmakopejski postopek je z velikim številom ekstrakcij časovno zelo potraten, zato smo ga skušali skrajšati. Del, v katerem etno fazo spiramo dvakrat z vodo, enkrat z raztopino kalijevega hidroksida in nato ponovno z vodo, moramo po farmakopejskem predpisu ponoviti trikrat. Zanimalo nas je, ali bi bila lahko ekstrakcija NS vseeno uspešna, če bi omenjeni del postopka izvedli enkrat ali dvakrat. S testnim oljem smo postopek ekstrakcije izvedli v treh ponovitvah: pri prvi ponovitvi smo ekstrakcije ponovili enkrat, pri drugi dvakrat in pri tretji trikrat, ostali dejavniki so bili enaki. Nato smo na izoliranem preostanku izvedli test na prisotnost kislin. Poraba natrijevega hidroksida je bila pri prvi in drugi paraleli večja od 0,2 ml, kar pomeni, da so bile v preostanku poleg NS prisotne tudi maščobne kisline in da ekstrakcija NS ni bila uspešna. Na podlagi dobljenih rezultatov smo ugotovili, da je za uspešno izolacijo NS pomembno, da ekstrakcijskih korakov ne izpuščamo in da postopek izvedemo v celoti, kot je predpisano.

Postopek je potraten tudi z vidika porabe dietiletra, zato smo ekstrakcije na testnem olju skušali izvesti s polovičnim volumnom tega topila. Tako izvedena ekstrakcija NS ni bila

uspešna, saj se vodna in etrna faza nista dobro ločili, med fazama se je tvorila emulzija. Za izvedbo ekstrahiranj smo morali tako uporabiti celoten predpisani volumen etra. Odločili pa smo se, da bomo eter, ki ga po končanih ekstrahiranjih odparimo pri znižanem tlaku, ponovno uporabili pri nadaljnjih ekstrahiranjih.

3.2.2 Derivatizacija neumiljivih snovi

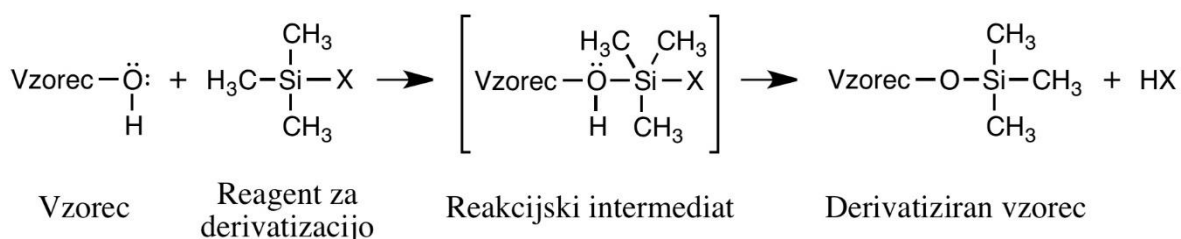
Za analizo neumiljivih snovi smo izbrali plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo. Ker so NS slabo hlapne oziroma pri 100–105 °C celo nehlapne [5], smo jih morali pred analizo pretvoriti v bolj hlapne derivate. Odločili smo se za sililiranje, ki je najpogostejše uporabljan postopek derivatizacije za analizo s plinsko kromatografijo [64]. Derivatizacijo NS smo izvedli s sililno zmesjo, sestavljeno iz heksametildisilazana (HMDS), trimetilklorosilana (TMCS) in piridina, v razmerju 3 : 1 : 9. HMDS in TMCS sta aktivna reagenta – donorja trimetilsililne skupine, piridin pa ima vlogo topila [65]. Sililni derivati nastanejo tako, da alkilsililna skupina zamenja vodikov atom v -OH, -COOH, =NH, -NH₂ ali -SH skupini izvorne spojine. Tako pridobljeni derivati so bolj hlapni, manj polarni in termično bolj stabilni [64].

Pri sililiranju gre za nukleofilni napad na silicijev atom sililne skupine, pri čemer nastane reakcijski intermediat, tako imenovano bimolekularno prehodno stanje. Skupina, ki se odcepi od sililne skupine (X), mora imeti majhno bazičnost, dobro mora stabilizirati negativni naboj v prehodnem stanju in imeti mora nizko težnjo za vezavo s silicijevim atomom [64]. Potek kemijske reakcije je prikazan na spodnji sliki.

HMDS: X = N₃Si(CH₃)₃

TMCS: X = Cl

Piridin: X = C₅H₅N



Slika 9: Derivatizacija [prirejeno po 64].

Pri snovanju postopka derivatizacije smo se opirali na smernice, podane v analiznem certifikatu reagenta za derivatizacijo, in na lastne ugotovitve, do katerih smo prišli pri testiranju metode in jih navajamo v poglavju o eksperimentalnem delu.

3.2.2.1 Postopek sililiranja

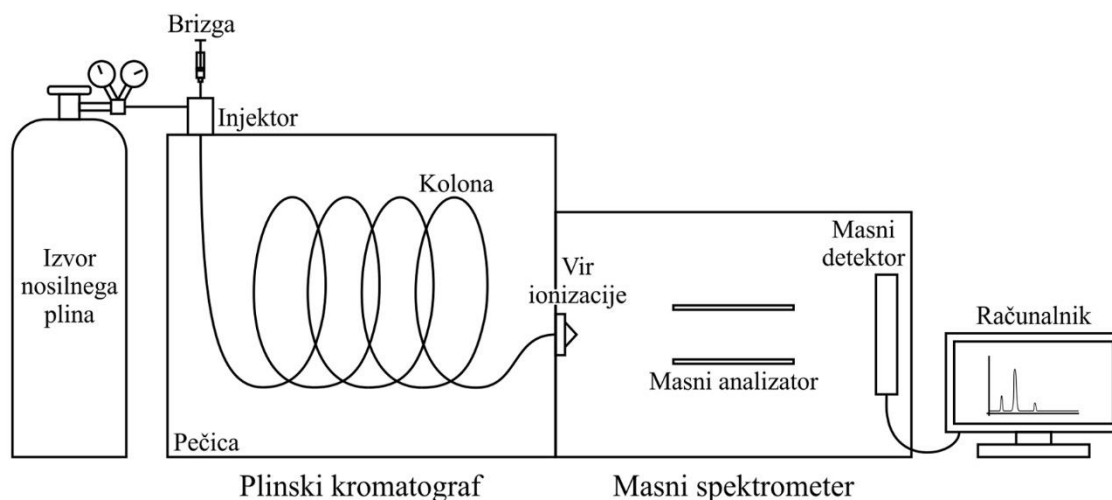
Priporočljiva masa NS za izvedbo derivatizacije je od 1 do 10 mg [64]. Zaradi manjše relativne napake pri tehtanju stremimo k izboru večje mase, ker pa pri določenih vzorcih nismo imeli na razpolago dovolj velike količine NS, smo se odločili za maso 5 mg.

Količino potrebnega reagenta za derivatizacijo preračunamo na podlagi mase NS. Molsko razmerje med NS in derivatizacijskim reagentom mora biti za uspešen potek reakcije vsaj 2 : 1 [64]. Tako smo določili, da je primerna količina dodanega reagenta 10 μ l na mg NS, v našem primeru torej 50 μ l.

Temperaturo segrevanja 60 °C smo povzeli iz literature [66]. Čas segrevanja smo določili tako, da smo izvedli testno derivatizacijo, pri kateri smo uporabili 5 testnih vzorcev. Vsakega od vzorcev smo segrevali različno dolgo – 20, 30, 40, 50 in 60 minut. Nato smo vzorce analizirali z GC-MS in primerjali odzive. Ti so bili pri vseh vzorcih enako veliki, kar pomeni, da je reakcija sililiranja potekla hitro in dolgotrajno segrevanje ni bilo potrebno. Odločili smo se za 30 minutno segrevanje.

3.2.3 Plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo

Plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo, je pogosto uporabljena metoda za analizo derivatov neumljivih snovi [3]. V splošnem je primerna za analizo hlapnih in termično stabilnih snovi oziroma snovi, ki jih lahko pretvorimo v primerne derivate [67]. GC-MS je kombinacija dveh analiznih tehnik, ki nam omogoča tako kvalitativno kot kvantitativno določitev posameznih komponent v vzorcu [3]. Shema aparature je predstavljena na spodnji sliki.



Slika 10: Shema GC-MS aparature [prirejeno po 67].

Pri plinski kromatografiji je mobilna faza inerten plin, stacionarna faza, nanesena na kromatografsko kolono, pa je lahko v trdni ali tekoči obliki. Vzorec injiciramo v vroč injektor, kjer se komponente vzorca uplinijo in nato skupaj z nosilnim plinom potujejo skozi kolono. Komponente se nato porazdeljujejo med mobilno in stacionarno fazo. Na slednji se zadržijo različno dolgo, kar je odvisno od njihove afinitete do stacionarne faze. Posamezne komponente torej izkazujejo različne retencijske čase (RT), na čemer tudi temelji kromatografska ločitev [67, 68].

S kolone eluirane frakcije se nato prenesejo do masnega spektrometra, kjer so najprej izpostavljene ionizaciji. Analiti ionizirajo in fragmentirajo in tako nastali ioni nato potujejo do masnega analizatorja, kjer se ločijo na podlagi razmerja med maso in nabojem (m/z). Na analizatorju ločene ione zazna detektor in dobljeno informacijo v obliki ustreznega signala posreduje računalniškemu sistemu [69, 70].

4 EKSPERIMENTALNO DELO

Izolacijo neumiljivih snovi smo izvedli na 39 vzorcih rastlinskih olj, za vsak vzorec po 3 ponovitve. Za podajanje celokupne mase NS smo uporabili rezultate vseh 3 ponovitev, za nadaljnjo derivatizacijo in analizo z GC-MS pa smo namenili po 1 ponovitev vsakega vzorca. Ostali 2 ponovitvi smo uporabili pri izvedbi testa za določanje kislin v preostanku.

Vse vzorce, standarde in vnaprej pripravljene reagente smo shranjevali v hladilniku. Med izvajanjem poskusov na različnih vzorcih smo vzdrževali enake delovne razmere in tako zagotovili primerljivost rezultatov med samimi vzorci.

4.1 IZOLACIJA NEUMILJIVIH SNOVI IZ RASTLINSKEGA OLJA

Vzorcem, namenjenim analizi z GC-MS, smo kot referenco za preračunavanje izgub NS med postopki ekstrakcije in derivatizacije pred začetkom saponifikacije dodali holesterol. V vialo smo natančno natehtali 1,0 mg holesterola, ga raztopili v nekaj kapljicah dietiletra in kvantitativno prenesli v 250-mililitrsko bučko. Bučko smo segrevali s fenom, dokler ni ves dietileter izhlapel, nato smo jo pustili, da se je ohladila na sobno temperaturo. S tako pripravljeno bučko smo nadaljevali postopek saponifikacije, ki ga opisujemo v nadaljevanju (slika 11).



Slika 11: Saponifikacija rastlinskega olja [osebni arhiv].

V 250-mililitrsko bučko smo s stekleno pipeto natehtali približno 5,00 g izbranega rastlinskega olja. Z merilnim valjem smo dodali 50 ml 2 M etanolne raztopine kalijevega hidroksida in v bučko položili magnetno mešalo. Bučko smo postavili na grelno in mešalno ploščo, opremljeno z grelno kaloto, in na bučko pritrdili hladilnik. Zmes smo nato ob

konstantnem mešanju (250 vrtljajev na minuto) 1 uro greti pri 60 °C. Po končanem gretju smo bučko odstavili z grelne kalote, odstranili magnetno mešalo in bučko postavili v hladno vodno kopel do ohladitve zmesi na sobno temperaturo.

Ohlajeno vsebino bučke smo prelili v 1000-mililitrski lij ločnik in v lij z merilnim valjem dodali 100 ml prečiščene vode. Nato smo z merilnim valjem dodali še 100 ml dietiletra in vsebino lija previdno stresali približno 1 minuto. Pustili smo, da se vodna in etrna faza popolnoma ločita, nato smo etrno fazo odlili v čašo in čašo pokrili z aluminijasto folijo. Vodni vazi smo nato dodali novih 100 ml dietiletra in ponovili postopek stresanja in ločevanja faz. Ko sta se fazi ponovno ločili, smo novo etrno fazo združili s prejšnjo in čašo pokrili z aluminijasto folijo. Vodni fazi smo ponovno dodali 100 ml dietiletra in postopek ponovili (slika 12). Vodno fazo smo odstranili v odpad, vse tri etrne faze pa smo združili in jih prelili v lij ločnik.



Slika 12: Ekstrakcija neumiljivih snovi z dietil etrom [osebni arhiv].

Združenim etrnim fazam smo z merilnim valjem dolili 40 ml prečiščene vode, vsebino previdno stresali približno 1 minuto in pustili, da se fazi ločita. Vodno fazo smo zavrgli, etrni fazi pa smo ponovno dodali 40 ml prečiščene vode in postopek ponovili. Nato smo etrni fazi dodali 40 ml raztopine kalijevega hidroksida (30 g/l), previdno stresali približno 1 minuto, pustili, da se fazi ločita, in vodno fazo zavrgli. Etrni fazi smo dodali še 40 ml prečiščene vode in postopek ponovili. Celoten postopek, opisan v tem odstavku, smo ponovili trikrat.

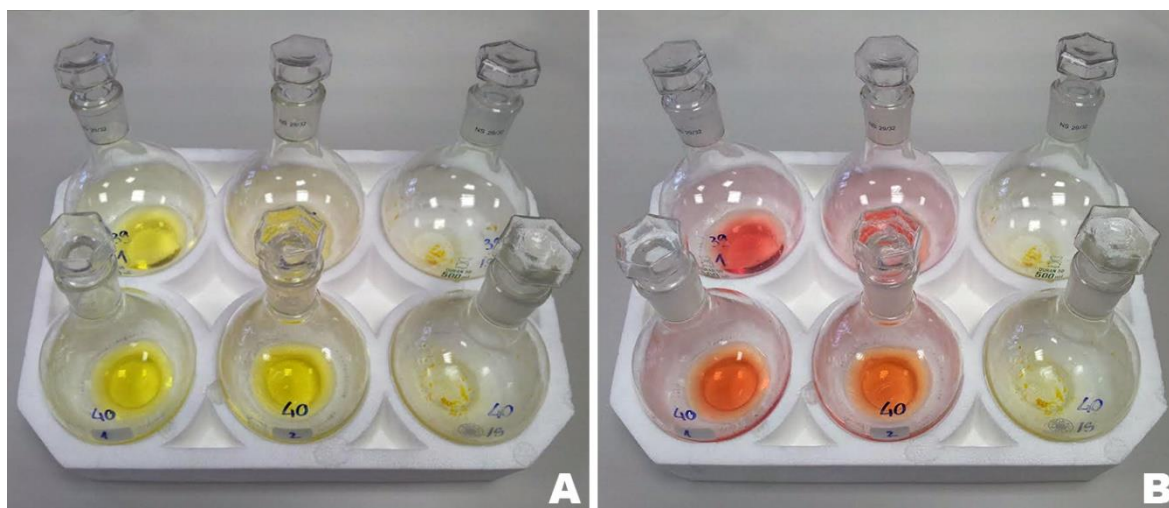
Etrno fazo smo še večkrat sprali s 40 ml prečiščene vode. Spiranje smo ponavljali, dokler vodna faza ni bila več bazična. pH vodne faze smo preverjali z indikatorjem fenolftaleinom

– ko se vodna faza ni več obarvala rožnato, smo prenehali s spiranjem. Običajno je bilo potrebnih še 3 do 5 spiranj.

Etrno fazo smo prelili v 500-mililitrsko bučko, ki smo jo predhodno stehali. Lij ločnik smo še dodatno sprali z dietiletrom in eter prenesli v bučko. Topilo smo odstranili s segrevanjem pod znižanim tlakom. Ko je večina topila izhlapela, smo postopek prekinili, topilo odlili in ga shranili za nadaljnje ekstrakcije. Nato smo pri močno znižanem tlaku (približno 10 mbar) iz vzorca odstranili še preostalo topilo – najverjetneje je bila to voda, ki je bila primešana dietiletru. Po popolni odparitvi topil smo bučko s preostankom stehali.

Test za določanje kislin v preostanku

Test za določanje kislin, ki ga prikazuje spodnja slika, smo izvedli na 2 ponovitvah. Preostanek smo raztopili v 20 ml etanola in dodali 3 kapljice raztopine fenolftaleina. Nato smo v bučko dodali 0,2 ml 0,1 M etanolne raztopine natrijevega hidroksida in opazovali spremembo barve. V primeru, da po dodatku natrijevega hidroksida ni prišlo do obarvanja, smo izolacijo smatrali kot neuspešno in celoten postopek ponovili. V primeru, da se je raztopina obarvala vijoličasto, smo izolacijo smatrali kot uspešno, preostanek pa označili kot neumiljive snovi.



Slika 13: Test za določanje kislin v preostanku. A: pred dodatkom NaOH, B: po dodatku NaOH [osebni arhiv].

Tretji preostanek smo pripravili za nadaljnjo derivatizacijo in analizo z GC-MS. Preostanek v bučki (zdaj definiran kot neumiljive snovi) smo ponovno raztopili v nekaj mililitrih dietiletra in ga kvantitativno prenesli v stekleno epruveto. Epruveto smo prepihovali z argonom, dokler ni topilo popolnoma izhlapelo, nato smo jo zaprli s steklenim zamaškom in

zaščitili s parafilmom ter tako zagotovili inertno okolje. Epruvete z NS, prikazane na sliki 14, smo do nadaljnje uporabe shranjevali v hladilniku.



Slika 14: Neumiljive snovi, izolirane iz vzorcev rastlinskih olj [osebni arhiv].

4.2 DERIVATIZACIJA NEUMILJIVIH SNOVI

Točno 5,0 mg neumiljive snovi smo s spatulo postrgali s stene epruvete in prenesli v 1,5-mililitrsko plastično epruveto. Nato smo z avtomatsko pipeto dodali 50 μ l reagenta za derivatizacijo, to je zmes HMDS, TMCS in piridina, v razmerju 3 : 1 : 9. Epico z NS in reagentom za derivatizacijo smo dobro premešali, dokler se niso raztopile vse NS. Sledilo je 5-minutno centrifugiranje s 13.000 obrati na minuto in nato 30-minutno segrevanje na vodni kopeli pri 60 °C. Po končanem segrevanju smo počakali, da se je vzorec ohladil na sobno temperaturo, in mu dodali 950 μ l n-heksana. Po dodatku topila smo reakcijsko zmes ponovno dobro pretresli. Med segrevanjem je nastala bela oborina, zato smo ponovno centrifugirali. Odpipetirali smo 300 μ l bistre raztopine nad oborino in jo z avtomatsko pipeto prenesli v stekleno vialo.

Priprava raztopin referenčnih spojin

V 1,5-mililitrsko plastično epruveto smo na analizni tehtnici natehtali po 10,0 mg vsake referenčne spojine. Zaradi večje natančnosti smo tehtali tudi referenčne spojine v tekočem agregatnem stanju (to so fitol, α -, γ - in δ - tokoferol). Derivatizacijo smo izvedli po zgoraj opisanem postopku, le da smo glede na natehtano maso referenčnih snovi dodali 800 μ l reagenta za derivatizacijo in z n-heksanom dopolnili do 1 ml. Tako pripravljeno raztopino referenčnih spojin smo prenesli v 10-mililitrsko bučko in z n-heksanom dopolnili do oznake.

Dobili smo osnovno raztopino s koncentracijo 1000 ppm. Z razredčevanjem smo dobili še druge koncentracije referenčnih spojin, kar prikazuje spodnja preglednica. Iz vsake bučke z referenčno raztopino smo odpipetirali po 300 μ l raztopine in jo prenesli v stekleno vialo.

Preglednica IV: Priprava raztopin referenčnih spojin.

Koncentracija raztopine	Postopek redčenja
1000 ppm	Osnovna raztopina.
500 ppm	5,00 ml osnovne raztopine smo prenesli v 10-mililitrsko bučko in z n-heksanom dopolnili do oznake.
250 ppm	5,00 ml raztopine koncentracije 500 ppm smo prenesli v 10-mililitrsko bučko in z n-heksanom dopolnili do oznake.
100 ppm	1,00 ml osnovne raztopine smo prenesli v 10-mililitrsko bučko in z n-heksanom dopolnili do oznake.
50 ppm	5,00 ml raztopine koncentracije 100 ppm smo prenesli v 10-mililitrsko bučko in z n-heksanom dopolnili do oznake.
25 ppm	5,00 ml raztopine koncentracije 50 ppm smo prenesli v 10-mililitrsko bučko in z n-heksanom dopolnili do oznake.
10 ppm	1,00 ml raztopine koncentracije 100 ppm smo prenesli v 10-mililitrsko bučko in z n-heksanom dopolnili do oznake.
5 ppm	5,00 ml raztopine koncentracije 10 ppm smo prenesli v 10-mililitrsko bučko in z n-heksanom dopolnili do oznake.

4.3 PLINSKA KROMATOGRAFIJA Z MASNO SPEKTROMETRIJO

Pripravljene raztopine neumiljivih snovi smo analizirali z aparaturo GC-MS (QP2010 Ultra, Shimadzu Corporation), ki jo prikazuje slika 15. Za analizo NS smo uporabili kromatografski sistem s kapilarno dimetilpolisiloksansko kolono (30 m $\times$ 0,25 mm, 0,25 μ m debelina stacionarne faze). Kromatografski pogoji so bili sledeči:

- nosilni plin: helij,
- pretok plina: 1 ml/min (konstantna hitrost),
- volumen injiciranja: 1 μ l,
- način injiciranja: »split«, 1 : 100,
- temperatura injektorja: 300 °C,
- temperaturni program:
 - začetna temperatura 200 °C,
 - naraščanje temperature do 270 °C (interval 5 °C/min),

- 56 minut pri 270 °C,
- temperatura ionskega izvora: 200 °C,
- temperatura vmesnika: 300 °C,
- napetost na detektorju: 1 kV,
- energija ionizacije: -70 eV,
- razpon snemanja relativnih molekulskih mas: 50–600,
- frekvenca zajemanja podatkov: 5 Hz,
- celoten čas analize: 70 min.



Slika 15: GC-MS aparatura [osebni arhiv].

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 IZOLACIJA NEUMILJIVIH SNOVI

Neumiljive snovi smo izolirali iz rastlinskih olj po modificirani farmakopejski metodi. Uporabili smo 39 vzorcev rastlinskih olj, za vsak vzorec smo testirali 3 ponovitve.

5.1.1 Celokupna masa izoliranih neumiljivih snovi

Rezultate izolacije NS smo podali kot povprečno maso NS [g] v 100 g olja, skupaj z relativno standardno deviacijo (preglednica V). Oblika, v kateri smo podali rezultate, to je [g NS/100 g olja], je enakovredna deležu NS v olju [%].

Preglednica V: Masa izoliranih neumiljivih snovi, podana kot povprečna vrednost treh ponovitev z relativno standardno deviacijo.

Rastlinsko olje	Oznaka olja	Proizvajalec olja	m [g NS/100 g olja]	RSD [%]
Olje ameriške brusnice	1	Behawe	1,80	6,17
	2	Alexmo cosmetics	1,86	4,86
	3	Dragonspice Naturwaren	1,60	3,43
Bezgovno olje	4	BaccaraRose	1,40	11,58
	5	Behawe	1,33	14,04
Borečevo olje	6	Dragonspice Naturwaren	1,00	0,99
	7	Tovarna Organika	1,13	8,32
	8	Caelo	0,60	1,15
	9	Farmalabor	1,07	8,93
	10	Dragonspice Naturwaren	1,40	3,12
Olje črnega ribeza	11	Behawe	1,26	7,39
	12	Dragonspice Naturwaren	0,86	10,93
	13	Tovarna Organika	0,73	12,81
	14	Manske	0,80	0,19
Malinovo olje	15	Tovarna Organika	1,80	9,15
	16	Dragonspice Naturwaren	1,46	6,28
	17	Behawe	1,66	5,66
Olje ogrščice	18	Behawe	1,20	0,16
Orehovo olje	19	BaccaraRose	0,66	11,41
	20	Caelo	0,40	0,95
Olje rakitovca	21	Alexmo cosmetics	0,93	10,15
	22	Dragonspice Naturwaren	2,20	4,94

	23	Behawe	1,06	8,74
Svetlinovo olje	24	Dragonspice	1,13	8,50
		Naturwaren		
	25	Farmalabor	0,73	12,86
	26	Alexmo cosmetics	1,33	7,16
	27	Caelo	1,20	1,89
Šipkovo olje	28	Manske	1,20	0,95
	29	BaccaraRose	1,06	8,73
	30	Alexmo cosmetics	1,00	15,42
Olje španske kadulje	31	Dragonspice	0,73	12,81
		Naturwaren		
	32	BaccaraRose	1,00	2,66
Olje črne koprive	33	BaccaraRose	0,80	0,16
Olje črne kumine	34	Caelo	0,93	10,06
Olje inkovske plukenecije	35	Magnolija	0,33	14,14
Kivijevo olje	36	Dragonspice	1,53	6,05
		Naturwaren		
Laneno olje	37	BaccaraRose	1,20	1,94
	38	Farmalabor	1,00	2,45
	39	Caelo	1,06	8,76

Kot že napisano, predstavljajo neumiljive snovi v splošnem od 0,3 do 2 % celokupne mase olja [9]. Ob pogledu na naše rezultate lahko vidimo, da so vse dobljene vrednosti znotraj omenjenega intervala. Največjo vsebnost NS ima olje rakitovca (vzorec 22), z 2,20 % NS. Preostala dva vzorca olja rakitovca vsebujeta 0,93 % (vzorec 21) in 1,06 % (vzorec 23). Vsebnost NS v olju rakitovca, podana v literaturi, znaša 1,19 % [71]. Najmanjšo vsebnost NS ima olje inkovske plukenecije (vzorec 35), z 0,33 % NS. Literaturna vrednost je nekoliko večja, in sicer znaša 0,5 % NS [72].

Olje ameriške brusnice vsebuje od 1,60 do 1,86 % NS, pri čemer ima največjo vsebnost NS olje dobavitelja Alexmo Cosmetics (vzorec 2). Literaturni podatek znaša 1,85 % NS [71], kar je primerljivo z dobljenimi rezultati. Vsebnost NS v bezgovem olju znaša od 1,33 do 1,40 %, kar je v spodnjem delu intervala, podanega v literaturi – od 1 do 3 % NS [71]. Največjo vsebnost NS ima bezgovo olje dobavitelj BaccaraRose (vzorec 4). Trije vzorci borečevega olja (vzorci 6, 7 in 9) vsebujejo od 1,00 do 1,13 % NS, medtem ko rafinirano olje dobavitelja Caelo (vzorec 8) vsebuje le 0,60 % NS. V literaturi najdemo za borečevo olje vsebnost NS od 0,7 do 1,9 % NS [72]. Rezultati, ki smo jih dobili, se, z izjemo rafiniranega olja, nahajajo ravno med obema vrednostma, podanima v literaturi. Vsebnost

NS v olju črnega ribeza znaša od 1,26 do 1,40 %, pri čemer ima največjo vsebnost NS olje dobavitelja Dragonspice Naturwaren (vzorec 10). Dobljene vrednosti so nekoliko izven intervala vsebnosti od 1,0 do 1,2 %, dostopnega v literaturi [72]. Konopljinu olje vsebuje od 0,73 do 0,86 % NS, največjo vsebnost NS ima olje dobavitelja Dragonspice Naturwaren (vzorec 12). Dobljene vrednosti so v spodnjem delu območja, podanega v literaturi – od 0,7 do 1,3 % NS [72]. Vsebnost NS v malinovem olju znaša od 1,46 do 1,80 % NS, pri čemer ima največjo vsebnost NS olje dobavitelja Tovarna Organika (vzorec 15). Vrednosti, dostopni v literaturi, znašata 2,5 % NS [72] in 0,73 % NS [71], torej se dobljeni rezultati nahajajo ravno med obema vrednostma, podanima v literaturi. Pri olju ogrščice smo imeli na razpolago olje dobavitelja Behawe, katerega vsebnost NS znaša 1,20 %. Dobljena vrednost je v skladu z literaturo, ki navaja vsebnost NS 1,5 % [72]. Vsebnost NS v orehovem olju BaccaraRose (vzorec 19) znaša 0,66 %, medtem ko je vsebnost NS v rafiniranem olju dobavitelja Caelo (vzorec 20) 0,40 %. Podatek, dostopen v literaturi, znaša 1,8 % NS [71], kar je precej več od dobljenih rezultatov. Svetlinovo olje vsebuje od 0,73 do 1,33 % NS. Kljub temu da je olje dobavitelja Caelo rafinirano (vzorec 27), je vsebnost NS v tem olju 1,20 %. Vsebnost NS v svetlinovem olju, podana v literaturi, znaša 1 % [71], drugi vir pa navaja interval od 1,5 do 2,0 % NS [72]. Šipkovo olje vsebuje od 1,00 do 1,20 % NS, pri čemer ima največjo vsebnost NS olje dobavitelja Manske (vzorec 28). Literatura navaja vsebnost 1,1 % [71] in 2,3 % NS [72]. Vrednosti, ki smo jih dobili, so primerljive z manjšo vsebnostjo, podano v literaturi. Olje španske kadulje, poznano tudi pod imenom čijevo olje, vsebuje od 0,73 do 1,00 % NS. V literaturi zasledimo interval od 0,7 do 1,7 % NS [71], dobljene vrednosti se torej v spodnjem delu vsebnosti, podane v literaturi. Pri olju črne koprive smo imeli na voljo olje dobavitelja BaccaraRose (vzorec 33), katerega vsebnost NS znaša 0,80 %. Dobljena vrednost je več kot dvakrat manjša od intervala vsebnosti od 1,4 do 1,8 % NS, podanega v literaturi [72]. Olje črne kumine dobavitelja Caelo (vzorec 34) vsebuje 0,93 % NS. V literaturi zasledimo različne vrednosti, in sicer od 0,6 do 1,8 % NS [72]. Dobljena vrednost je torej v spodnjem delu območja, podanega v literaturi. Vsebnost NS v kivijevem olju dobavitelja Dragonspice Naturwaren (vzorec 36) znaša 1,53 %, kar je nekoliko več od literaturne vsebnosti 1,3 % NS [72]. Laneno olje vsebuje od 0,997 do 1,20 % NS, pri čemer ima največjo vsebnost olje dobavitelja BaccaraRose (vzorec 37). V literaturi so dostopni različni podatki vsebnosti NS v lanenem olju, in sicer od 0,2 do 1,1 % [71, 72], kar pomeni, da so dobljeni rezultati na zgornji meji literaturnih vrednosti.

Na podlagi primerjave dobljenih rezultatov vsebnosti NS v rastlinskih oljih z literaturnimi podatki opazimo, da se pri nekaterih oljih vrednosti ujemajo, v nekaterih so dobljene vrednosti večje, v drugih spet manjše. Kot že omenjeno, je vsebnost NS odvisna od številnih dejavnikov, kot so na primer agronomske in klimatske razmere ter kakovost rastlinskega materiala [3], zato je razumljivo, da se dobljeni rezultati nekoliko razlikujejo od literaturnih, prav tako literaturni med sabo. Posledično prihaja tudi do razlik v vsebnosti NS v vzorcih istovrstnih olj različnih dobaviteljev. Pri večini olj, kjer smo imeli na razpolago olja različnih dobaviteljev, je variabilnost vsebnosti NS manjša od 15 %, izjeme so borečevo olje (37 %), orehovo olje (25 %), olje rakitovca (58 %) in svetlinovo olje (33 %). Variabilnost maščobnokislinske sestave olja, je navadno manjša, in sicer se giblje od 5 do 10 % [71]. Za primerjavo – variabilnost sestave eteričnih olj je v splošnem bistveno večja – tudi več 10% [73].

Poudariti je treba tudi, da je postopek izoliranja NS kompleksen in sestavljen iz številnih korakov, zato je težje zagotoviti ponovljivost rezultatov, zlasti ker je vsebnost NS v oljih zelo majhna. Na podlagi dobljenih relativnih standardnih deviacij (RSD) lahko vidimo, da je ponovljivost rezultatov manjša pri oljih z manjšo vsebnostjo NS. Izjema je bezgovo olje, ki ima kljub večji vsebnosti NS RSD nad 10 %. Med postopkom izolacije NS nismo opazili posebnosti, ki bi to razložile.

Na podlagi dobljenih rezultatov ni opaziti morebitne povezave med načinom pridobivanja olja (hladno stiskanje ali ekstrakcija s CO₂) in vsebnostjo NS. Pri borečevem (vzorec 8) in orehovem olju (vzorec 20) je opaziti vpliv rafiniranja na zmanjšanje vsebnosti NS v olju, vendar pa do zmanjšanja vsebnosti NS zaradi rafiniranja ni prišlo v primeru svetlinovega olja (vzorec 27). V literaturi zasledimo podatek o vplivu rafiniranja na vsebnost NS za olje riževih otrobov. Vsebnost NS v nerafiniranem olju znaša 5,4 %, v rafiniranem olju pa 2,7 % [74], kar pomeni, da se je vsebnost NS z rafiniranjem zmanjšala za 50 %. Literatura navaja tudi podatke za olje kolokinte (*Citrullus Colocynthis*), za katero znaša vsebnost NS v nerafiniranem olju 1,57 %, v rafiniranem olju pa 0,71 % (55-odstotno zmanjšanje vsebnosti NS) [75] ter za olje pongamije (*Pongamia Pinnata*), za katero znaša vsebnost NS v nerafiniranem olju 2,29 %, v rafiniranem olju pa 1,15 % (50-odstotno zmanjšanje vsebnosti NS) [75]. Čeprav je bil vpliv rafiniranja pri naših vzorcih manj očiten, lahko povzamemo, da rafiniranje vpliva na vsebnost NS v olju, vendar bi za zanesljivo kvantitativno opredelitev vpliva rafiniranja na vsebnost NS potrebovali večje število vzorcev.

5.2 ANALIZA IZOLIRANIH NEUMILJIVIH SNOVI Z GC-MS

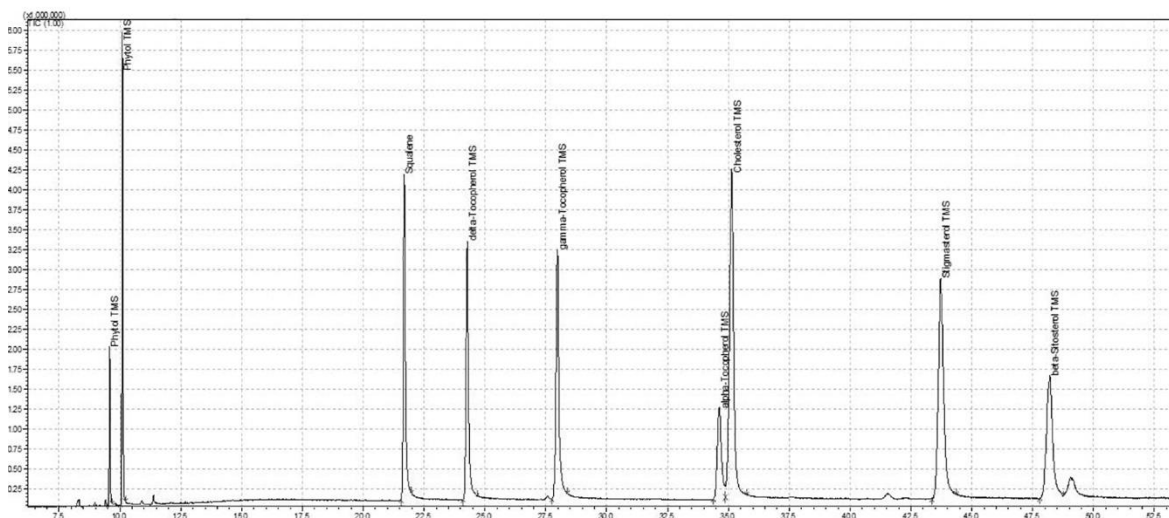
Neumiljive snovi smo analizirali s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo. Določili smo vsebnost fitosterolov (stigmaasterola in β -sitosterola), vitamina E (α -, γ - in δ -tokoferola), *cis* in *trans* izomerov fitola ter skvalena. Vse vzorce NS (izolirane iz 39 vzorcev rastlinskih olj) smo na GC-MS injicirali enkrat.

5.2.1 Identifikacija in kvantifikacija neumiljivih snovi

Posamezne komponente NS smo identificirali s primerjavo masnih spektrov vzorcev s spektri, dostopnimi v knjižnicah NIST11 in FFNSC2, ter s primerjavo s spektri referenčnih spojin. Pri identifikaciji smo si pomagali tudi s primerjavo retencijskih časov vzorčnih spojin z retencijskimi časi referenčnih spojin. Koncentracijo posameznih komponent NS smo določili tako, da smo površino pod krivuljo kromatografskih vrhov vzorcev primerjali s površino pod krivuljo vrhov referenčnih spojin znane koncentracije. Raztopine referenčnih spojin smo pripravili v različnih koncentracijah z namenom, da bi določili umeritveno krivuljo in tako natančneje izračunali koncentracijo vzorčnih spojin. Umeritvene krivulje žal nismo mogli določiti, saj se vrednosti referenčnih spojin niso ustrezno prilegale linearni funkciji – možni vzroki so navedeni v naslednjem odstavku. Na podlagi tega smo se odločili, da za preračunavanje koncentracije posameznih komponent NS uporabimo površine, dobljene pri največji koncentraciji referenčnih spojin (to je 1000 ppm), in koncentracije posameznih komponent NS vseh vzorcev preračunamo ročno. Za površine referenčnih spojin največje koncentracije smo se odločili, ker smo predpostavili, da bo tako napaka pri izračunu koncentracij posameznih komponent NS manjša, kot če bi za izračun uporabili površine večkrat redčenih raztopin referenčnih spojin. Kromatogram referenčnih spojin, koncentracije 1000 ppm, prikazuje slika 16 na naslednji strani.

Ob pregledu kromatogramov vzorcev smo opazili tudi, da so se začeli med analizami kromatografski vrhovi zamikati – retencijski časi posameznih komponent so se začeli daljšati. Imeli smo tudi nekaj težav z ločitvijo nekaterih vrhov. Med analizami je začela stacionarna faza razpadati, kar smo lahko opazili tudi z vedno večjim šumom in posledično še dodatno oteženim ločevanjem spojin. Težave smo imeli tudi z linearnostjo, kar nam je onemogočilo določiti ustrezno umeritveno premico. Zamikanje kromatografskih vrhov in razpad stacionarne faze sta najverjetneje posledica uporabe reagenta za derivatizacijo, ki je povzročil oksidacijo kovinskih delov sistema GC-MS. Kljub temu da je GC-MS pogosto uporabljena metoda za analizo neumiljivega dela rastlinskih olj, zaradi nehlapnosti NS pa

predhodna derivatizacija NS neizogibna, o zgoraj omenjenih težavah v znanstvenih člankih ne poročajo.



Slika 16: Kromatogram derivatiziranih referenčnih spojin pri koncentraciji 1000 ppm. Po vrsti so se iz kolone eluirali cis-fitol, trans-fitol, skvalen, δ -tokoferol, γ -tokoferol, α -tokoferol, holesterol, stigmasteryl in β -sitosterol.

5.2.2 Vrednotenje odstopanj v rezultatih

Postopek izolacije NS iz olja vsebuje številne korake in prenose raztopine vzorca iz enega vsebnika v drugega. Posledično obstaja velika verjetnost, da med postopkom pride do izgub vzorca. Z namenom, da bi izgube ovrednotili in določili učinkovitost ekstrakcije, smo vzorcem dodali znano količino holesterola (1 mg), ki bi nam služila kot referenca za preračunavanje izgub. Ob pregledu dobljenih rezultatov smo ugotovili, da vsebnost holesterola v vzorcih zelo variira in da so rezultati, ki smo jih dobili po tem, ko smo pri izračunu upoštevali korekcijo s standardnim dodatkom, očitno napačni. Do odstopanj v vsebnosti holesterola je najverjetneje prišlo zaradi napake v tehtanju, saj je bilo zelo težko natehtati točno 1 mg. Standardnega dodatka zato nismo vključili v izračune.

Ob pregledu rezultatov smo opazili tudi, da je vsebnost tokoferolov v vzorcih precej manjša od pričakovane in da v nobenem vzorcu ni prisoten α -tokoferol. Predpostavili smo, da je to posledica saponifikacije, med katero so bili vzorci izpostavljeni agresivnim razmeram (2M KOH, 60 °C). Da bi preverili, kolikšen je vpliv saponifikacije na vsebnost tokoferolov, smo postopek izolacije NS ponovili z orehovim oljem, le da smo tokrat vzorcem dodali znano količino α -tokoferola. Dvema ponovitvama orehovega olja dobavitelja BaccaraRose smo dodali po 5 mg α -tokoferola, izvedli izolacijo NS (z enakim postopkom kot pri ostalih vzorcih), izolirane NS derivatizirali in analizirali z GC-MS. V spodnji preglednici

prikazujemo vsebnost tokoferolov v vzorcu brez standardnega dodatka in v dveh ponovitvah istega vzorca z dodanim standardom α -tokoferola. Rezultati so podani kot masa posameznega tokoferola [mg] v 100 g olja.

Preglednica VI: Vsebnost tokoferolov [mg/100 g olja] v vzorcu brez dodatka standarda in v dveh ponovitvah vzorca z dodanim standardom.

	δ -tokoferol	γ -tokoferol	α -tokoferol
Olje brez dodatka α-tokoferola	1,75	23,6	-
Olje z dodatkom α-tokoferola 1	-	-	1,80
Olje z dodatkom α-tokoferola 2	1,02	-	-

Na podlagi rezultatov vidimo, da se tudi v vzorcih, kjer smo dodali 5 mg α -tokoferola (teoretično bi morala biti vsebnost α -tokoferola torej vsaj 100 mg/100 g olja), α -tokoferol ni ohranil. V prvem vzorcu s standardnim dodatkom je bila vsebnost α -tokoferola zgolj 1,80 mg/100 g olja, medtem ko je bila njegova vsebnost v drugem vzorcu pod mejo detekcije. Na podlagi tega lahko povzamemo, da tokoferoli niso dovolj stabilni, da bi prenesli razmere saponifikacije, dobljeni rezultati pa so posledično neustrezni. Odločili smo se, da bomo dobljene rezultate vsebnosti tokoferolov v vzorcih sicer podali (preglednice VII, VIII in IX), vendar pa se je treba zavedati, da ne ustrezajo dejanskim vrednostim (zlasti pri α -tokoferolu).

Vpliv saponifikacije na razgradnjo tokoferolov sta preiskovala tudi Czauderna in Kowalczyk. Ugotovila sta, da se izpostavljenost standardov α -, γ - in δ -tokoferola 20 minutni alkalni saponifikaciji pri 80°C izraža v zmanjšani koncentraciji vseh standardov. Po saponifikaciji se je koncentracija δ -tokoferola tako zmanjšala za 10 %, γ -tokoferola za 40 %, α -tokoferola pa za 45 % [27].

5.2.3 Sestava izoliranih neumiljivih snovi

Preglednice VII, VIII in IX prikazujejo vsebnost posameznih komponent neumiljivih snovi, podano kot masa posamezne komponente NS [mg] v 100 g olja. Določili smo vsebnosti *cis*-fitola, *trans*-fitola, skvalena, δ -tokoferola, γ -tokoferola, α -tokoferola, stigmasterola in β -sitosterola. Posamezne NS so zapisane v enakem vrstnem redu, kot so se eluirale iz kolone.

Preglednica VII: Masa posameznih komponent neumiljivih snovi, podana v [mg NS/100 g olja]. Preglednica prikazuje podatke za olje ameriške brusnice, bezgovo olje, borečevo olje, olje črnega ribeza in konopljino olje.

Proizvajalec olja	cis-fitol	trans-fitol	skvalen	δ-tokoferol	γ-tokoferol	α-tokoferol	stigmasterol	β-sitosterol
OLJE AMERIŠKE BRUSNICE								
Behawe	6,74	11,6	871	-	-	-	-	827
Alexmo cosmetics	3,48	7,79	869	-	-	-	-	309
Dragonspice Naturwaren	8,34	6,15	491	-	-	-	-	605
BEZGOVO OLJE								
BaccaraRose	29,4	11,0	11,5	-	-	-	-	645
Behawe	66,0	8,09	5,72	-	-	-	-	454
BOREČEVO OLJE								
Dragonspice Naturwaren	4,99	14,8	5,24	70,6	-	-	-	170
Tovarna Organika	-	-	10,3	119	-	-	1,23	197
Caelo	1,17	-	3,95	99,3	1,64	-	0,198	73,2
Farmalabor	-	-	2,36	117	-	-	15,7	111
OLJE ČRNEGA RIBEZA								
Dragonspice Naturwaren	425	10,6	4,02	-	-	-	-	524
Behawe	247	8,62	1,10	-	-	-	-	665
KONOPLJINO OLJE								
Dragonspice Naturwaren	23,0	4,27	1,96	-	5,41	-	1,81	489
Tovarna Organika	54,6	8,60	1,24	-	12,0	-	1,18	502
Manske	44,5	8,97	6,54	-	11,3	-	1,71	530

Preglednica VIII: Masa posameznih komponent neumiljivih snovi, podana v [mg NS/100 g olja]. Preglednica prikazuje podatke za malinovo olje, olje ogrščice, orehovo olje, olje rakitovca in svetlinovo olje.

Proizvajalec olja	cis-fitol	trans-fitol	skvalen	δ-tokoferol	γ-tokoferol	α-tokoferol	stigmasterol	β-sitosterol
MALINOVO OLJE								
Tovarna Organika	233	19,8	-	-	-	-	-	299
Dragonspice Naturwaren	333	29,1	-	-	12,9	-	-	664
Behawe	504	41,4	-	-	25,4	-	-	716
OLJE OGRŠICE								
Behawe	59,1	2,80	-	-	-	-	48,0	645
OREHOVO OLJE								
BaccaraRose	12,9	25,6	-	1,75	23,6	-	-	395
Caelo	4,77	4,94	-	1,02	3,20	-	-	235
OLJE RAKITOVCA								
Alexmo cosmetics	12,9	26,9	1,92	-	2,97	-	12,5	396
Dragonspice Naturwaren	103	6,67	-	-	-	-	-	547
Behawe	10,1	19,1	-	-	-	-	5,83	367
SVETLINOVO OLJE								
Dragonspice Naturwaren	3,75	5,82	2,77	-	-	-	-	1130
Farmalabor	8,94	-	3,11	15,8	-	-	5,72	288
Alexmo cosmetics	-	-	-	-	-	-	-	1340
Caelo	-	-	-	-	-	-	-	985

Preglednica IX: Masa posameznih komponent neumiljivih snovi, podana v [mg NS/100 g olja]. Preglednica prikazuje podatke za šipkovo olje, olje španske kadulje, olje črne koprive, olje črne kumine, olje inkovske plukenecije, kivijevo olje in laneno olje.

Proizvajalec olja	cis-fitol	trans-fitol	skvalen	δ-tokoferol	γ-tokoferol	α-tokoferol	stigmasterol	β-sitosterol
ŠIPKOVO OLJE								
Manske	-	3,90	-	-	-	-	-	631
BaccaraRose	-	5,21	1,67	-	-	-	-	562
Alexmo cosmetics	-	4,54	1,61	-	5,55	-	-	362
OLJE ŠPANSKE KADULJE								
Dragonspice Naturwaren	2,63	-	-	-	3,76	-	5,79	390
BaccaraRose	3,66	-	-	-	4,13	-	15,2	845
OLJE ČRNE KOPRIVE								
BaccaraRose	3,95	5,36	13,2	-	7,73	-	0,816	448
OLJE ČRNE KUMINE								
Caelo	4,46	5,41	-	-	-	-	7,64	103
OLJE INKOVSKKE PLUKENECIJE								
Magnolija	-	0,853	-	57,8	45,0	-	40,4	155
KIVIJEVO OLJE								
Dragonspice Naturwaren	-	-	1070	-	-	-	-	246
LANENO OLJE								
BaccaraRose	24,4	-	-	-	-	-	1,88	179
Farmalabor	30,7	-	-	-	3,62	-	19,2	241
Caelo	43,8	-	-	-	3,25	-	7,80	111

Olje ameriške brusnice

Analizirali smo NS iz olja ameriške brusnice dobaviteljev Behawe (vzorec 1), Alexmo cosmetics (vzorec 2) in Dragonspice Naturwaren (vzorec 3). Olje vsebuje velike količine skvalena (491–871 mg/100 g olja) in β -sitosterola (309–827 mg/100 g olja), pri čemer ima največjo vsebnost obeh komponent vzorec 1. Olje vsebuje tudi oba izomera fitola (*cis*-fitol: 3,48–8,34 mg/100 g olja, *trans*-fitol: 6,15–11,6 mg/100 g olja), največ *cis*-fitola vsebuje vzorec 3, največ *trans*-fitola pa vzorec 1. V literaturi zasledimo podatke za celokupno vsebnost fitosterolov (z β -sitosterolom v prevladi), ki znaša 6923 mg/kg olja, vsebnost vitamina E, ki znaša 153,3 mg/100 g olja, in vsebnost skvalena, s 671,5 mg/100 g olja [71].

Bezgovno olje

Vsebnost NS smo določali bezgovemu olju dobaviteljev BaccaraRose (vzorec 4) in Behawe (vzorec 5). V obeh vzorcih je velika vsebnost β -sitosterola (454–645 mg/100 g olja), vsebujeta pa tudi skvalen (5,72–11,5 mg/100 g olja) in oba izomera fitola (*cis*-fitol: 29,4–66,0 mg/100 g olja, *trans*-fitol: 8,09–11,0 mg/100 g olja). Največ β -sitosterola, skvalena in *trans*-fitola vsebuje vzorec 4, največ *cis*-fitola pa vzorec 5. V literaturi najdemo podatke za celokupno vsebnost tokoferolov, in sicer 13 mg/100 g olja [72], in vsebnost fitosterolov, ki znaša od 1000 do 3000 mg/100 g olja [71].

Borečevo olje

Analizirali smo NS iz borečevega olja dobaviteljev Dragonspice Naturwaren (vzorec 6), Tovarna Organika (vzorec 7), Caelo (vzorec 8) in Farmalabor (vzorec 9). Vzorci vsebujejo največ β -sitosterola (73,2–197 mg/100 g olja), vsebujejo pa tudi skvalen (2,36–10,3 mg/100 g olja) in – kljub slabi obstojnosti tokoferolov pri postopku saponifikacije [27] – precej δ -tokoferola (70,6–119 mg/100 g olja). Vzorec 6 vsebuje tudi oba izomera fitola (*cis*-fitol: 4,99 mg/100 g olja, *trans*-fitol: 14,8 mg/100 g olja), vzorec 8 pa vsebuje le *cis*-fitol (1,17 mg/100 g olja). Vzorci 7, 8 in 9 vsebujejo tudi stigmasterol (0,198–15,7 mg/100 g olja), v vzorcu 8 pa je prisotno tudi nekaj γ -tokoferola. V literaturi zasledimo podatke za celokupno vsebnost fitosterolov, ki znaša 287–292 mg/100 g olja, in celokupno vsebnost tokoferolov (med katerimi prevladuje δ -tokoferol) – 141 mg/100 g olja [72].

Olje črnega ribeza

Sestavo NS smo določali olju črnega ribeza dobaviteljev Dragonspice Naturwaren (vzorec 10) in Behawe (vzorec 11). Vzorca vsebujeta velike količine β -sitosterola (524–665 mg/100 g olja) in *cis*-fitola (247–425 mg/100 g olja), prisotna pa sta tudi *trans*-fitol (8,62–10,6

mg/100 g olja) in skvalen (1,10–4,02 mg/100 g olja). Največ β -sitosterola vsebuje vzorec 11, ostalih komponent pa je več v vzorcu 10. V literaturi dostopne vrednosti so za fitosterole (s prevladujočim β -sitosterolom) 400 mg/100 g olja, za tokoferole 123–246 mg/100 g olja, 35 mg/100 g olja za skvalen, skupna vsebnost za alifatske alkohole pa znaša 130 mg/100 g olja [72].

Konopljinolje

Analizirali smo NS iz konopljinoljnih dobaviteljev Dragonspace Naturwaren (vzorec 12), Tovarna Organika (vzorec 13) in Manske (vzorec 14). Vsi trije vzorci vsebujejo veliko β -sitosterola (489–530 mg/100 g olja), prisotna sta tudi oba izomera fitola (*cis*-fitol: 23,0–54,6 mg/100 g olja, *trans*-fitol: 4,27–8,97 mg/100 g olja), skvalen (1,24–6,54 mg/100 g olja), stigmasterol (1,18–1,81 mg/100 g olja), zaznali pa smo tudi γ -tokoferol (5,41–12,0 mg/100 g olja). Največ *cis*-fitola in γ -tokoferola vsebuje vzorec 13, največ *trans*-fitola, skvalena in β -sitosterola vzorec 14, največ stigmasterola pa vzorec 12. V literaturi zasledimo podatke za celokupno vsebnost fitosterolov (s prevladujočim β -sitosterolom), ki znaša 392–672 mg/100 g olja in celokupno vsebnost tokoferolov (s prevladujočim γ -tokoferolom) v razponu od 41 do 111 mg/100 g olja [72].

Malinovo olje

Vsebnost NS smo določali malinovemu olju dobaviteljev Tovarna Organika (vzorec 15), Dragonspace Naturwaren (vzorec 16) in Behawe (vzorec 17). Vsi trije vzorci so bogati z β -sitosterolom (299–716 mg/100 g olja) in *cis*-fitolom (233–504 mg/100 g olja). Vsi vzorci vsebujejo tudi *trans*-fitol (19,8–41,4 mg/100 g olja), v vzorcih 16 in 17 pa je prisoten še γ -tokoferol (12,9–25,4 mg/100 g olja). Vse omenjene komponente se v največji količini nahajajo v vzorcu 17. Literaturna vsebnost znaša za celokupne fitosterole 494 mg/100 g olja, za tokoferole (s prevladujočim γ -tokoferolom) 211–360 mg/100 g olja, za skvalen pa 8 mg/100 g olja [72].

Olje ogrščice

Sestavo NS smo določali olju ogrščice dobavitelja Behawe (vzorec 18). V vzorcu prevladuje β -sitosterol z vsebnostjo 645 mg/100 g olja. Prisotni so tudi stigmasterol (48,0 mg/100 g olja) in oba izomera fitola (*cis*-fitol: 59,1 mg/100 g olja, *trans*-fitol: 2,80 mg/100 g olja). V literaturi najdemo le celokupno vsebnost tokoferolov (med katerimi prevladuje γ -tokoferol), ki znaša 58,1 mg/100 g olja [71].

Orehovo olje

Analizirali smo NS iz orehovega olja dobaviteljev BaccaraRose (vzorec 19) in Caelo (vzorec 20). Oba vzorca vsebujeta precej β -sitosterola (235–395 mg/100 g olja), prisotni pa so tudi fitol (*cis*-fitol: 4,77–12,9 mg/100 g olja, *trans*-fitol: 4,94–25,6 mg/100 g olja), δ -tokoferol (1,02–1,75 mg/100 g olja) in γ -tokoferol (3,20–23,6 mg/100 g olja). Vse omenjene komponente so zastopane v večjem deležu v vzorcu 19. Literaturna vrednost znaša za sterole (s prevladujočim β -sitosterolom) 90–283 mg/100 g olja, za tokoferole (s prevladujočim γ -tokoferolom) 22–63 mg/100 g olja, za skvalen pa 0–3 mg/100 g olja [72].

Olje rakitovca

Vsebnost NS smo določali olju rakitovca dobaviteljev Alexmo cosmetics (vzorec 21), Dragonspice Naturwaren (vzorec 22), Behawe (vzorec 23). V vseh treh vzorcih prevladuje β -sitosterol (367–547 mg/100 g olja), prisoten pa je tudi fitol (*cis*-fitol: 10,1–103 mg/100 g olja, *trans*-fitol: 6,67–26,9 mg/100 g olja). Vzorca 21 in 23 vsebujeta tudi stigmasterol (5,83–12,5 mg/100 g olja), v vzorcu 21 pa sta prisotna še skvalen (1,92 mg/100 g olja) in γ -tokoferol (2,97 mg/100 g olja). V literaturi zasledimo podatke za celokupno vsebnost fitosterolov (s prevladujočim β -sitosterolom), ki znaša 772–1620 mg/100 g olja, in vsebnost tokoferolov (s prevladujočim α -tokoferolom), ki znaša 420 mg/100 g olja [72].

Svetlinovo olje

Analizirali smo NS iz svetlinovega olja dobaviteljev Dragonspice Naturwaren (vzorec 24), Farmalabor (vzorec 25), Alexmo cosmetics (vzorec 26) in Caelo (vzorec 27). Olje vsebuje velike količine β -sitosterola (288–1340 mg/100 g olja), zlasti vzorca 24 in 26. Vzorca 24 in 25 vsebujeta še *cis*-fitol (3,75–8,94 mg/100 g olja) in skvalen (2,77–3,11 mg/100 g olja), samo v vzorcu 24 pa je prisoten tudi *trans*-fitol (5,82 mg/100 g olja), v vzorcu 25 pa δ -tokoferol (15,8 mg/100 g olja) in stigmasterol (5,72 mg/100 g olja). Literaturna vrednost za celokupne sterole (s prevladujočim β -sitosterolom) znaša 660–1107 mg/100 g olja, za tokoferole (s prevladujočim γ -tokoferolom) pa 26 mg/100 g olja [72].

Šipkovo olje

Sestavo NS smo določali šipkovemu olju dobaviteljev Manske (vzorec 28), BaccaraRose (vzorec 29) in Alexmo cosmetics (vzorec 30). Vsi trije vzorci so bogati z β -sitosterolom (362–631 mg/100 g olja), največ pa ga je v vzorcu 28. Vzorci vsebujejo tudi *trans*-fitol (3,90–5,21 mg/100 g olja), vzorca 29 in 30 nekaj skvalena (1,61–1,67 mg/100 g olja), v vzorcu 30 pa je prisoten še γ -tokoferol (5,55 mg/100 g olja). V literaturi najdemo podatek

za celokupno vsebnost vitamina E (z γ -tokoferolom v prevladi), ki znaša 110 mg/100 g olja [71].

Olje španske kadulje

Analizirali smo NS iz olja španske kadulje dobaviteljev Dragonspace Naturwaren (vzorec 31) in BaccaraRose (vzorec 32). Olje vsebuje *cis*-fitol (2,63–3,66 mg/100 g olja), γ -tokoferol (3,76–4,13 mg/100 g olja), stigmasterol (5,79–15,2 mg/100 g olja) in največ β -sitosterola (390–845 mg/100 g olja). Vse omenjene komponente so zastopane v večjem deležu v vzorcu 32. V literaturi zasledimo podatke za celokupno vsebnost sterolov (s prevladujočim β -sitosterolom), ki znaša 814–1206 mg/100 g olja, vsebnost vitamina E (z γ -tokoferolom v prevladi), ki znaša 25 mg/100 g olja, in vsebnost skvalena, ki naj bi bil prisoten v sledovih [71, 72].

Olje črne koprive

Sestavo NS smo določali olju črne koprive dobavitelja BaccaraRose (vzorec 33). V vzorcu prevladuje β -sitosterol (448 mg/100 g olja), prisotni pa so tudi *cis*-fitol (3,95 mg/100 g olja), *trans*-fitol (5,36 mg/100 g olja), skvalen (13,2 mg/100 g olja), γ -tokoferol (7,73 mg/100 g olja) in stigmasterol (0,816 mg/100 g olja). V literaturi zasledimo podatek za vsebnost tokoferolov (s prevladujočim γ -tokoferolom), ki znaša 45–67 mg/100 g olja [72] in vsebnost fitosterolov, ki znaša 1800 mg/100 g olja [71].

Olje črne kumine

Vsebnost NS smo določali olju črne kumine dobavitelja Caelo (vzorec 34). Olje vsebuje oba izomera fitola (*cis*-fitol: 4,46 mg/100 g olja, *trans*-fitol: 5,41 mg/100 g olja), stigmasterol (7,64 mg/100 g olja) in največ β -sitosterola (103 mg/100 g olja). Predlagana literaturna vrednost znaša za sterole (s prevladujočim β -sitosterolom) 258–366 mg/100 g olja, za tokoferole (s prevladujočim γ -tokoferolom) pa 36–60 mg/100 g olja [72].

Olje inkovske plukenecije

Analizirali smo NS iz olja inkovske plukenecije dobavitelja Magnolija (vzorec 35). V vzorcu prevladuje β -sitosterol (155 mg/100 g olja), prisotni so tudi stigmasterol (40,4 mg/100 g olja), γ -tokoferol (45,0 mg/100 g olja), δ -tokoferol (57,8 mg/100 g olja) in nekaj *trans*-fitola (0,853 mg/100 g olja). V literaturi zasledimo podatke za vsebnost sterolov (s prevladujočim β -sitosterolom), ki znaša 247 mg/100 g olja, in vsebnost tokoferolov (s prevladujočim α -tokoferolom) ki znaša 226 mg/100 g olja [72].

Kivijevo olje

Sestavo NS smo določali kivijevemu olju dobavitelja Dragonspice Naturwaren (vzorec 36). V vzorcu prevladuje skvalen (1070 mg/100 g olja), prisoten pa je tudi β -sitosterol (246 mg/100 g olja). Literaturna vrednost za celokupne sterole (s prevladujočim β -sitosterolom) znaša 269–422 mg/100 g olja, za tokoferole (s prevladujočim γ -tokoferolom) 31 mg/100 g olja, za skvalen pa 826 mg/100 g olja [72].

Laneno olje

Vsebnost NS smo določali lanenemu olju dobaviteljev BaccaraRose (vzorec 37), Farmalabor (vzorec 38) in Caelo (vzorec 39). V vseh treh vzorcih prevladuje β -sitosterol (111–241 mg/100 g olja), prisotna pa sta tudi *cis*-fitol (24,4–43,8 mg/100 g olja) in stigmasterol (1,88–19,20 mg/100 g olja). Vzorca 38 in 39 vsebujeta še γ -tokoferol (3,25–3,62 mg/100 g olja). V literaturi zasledimo podatke za vsebnost sterolov (s prevladujočim β -sitosterolom), ki znaša 260–689 mg/100 g olja, vsebnost tokoferolov (s prevladujočim γ -tokoferolom), ki znaša 22–77 mg/100 g olja, in vsebnost skvalena, z manj kot 1 mg/100 g olja [72].

Največ fitola vsebuje malinovo olje dobavitelja Behawe (vzorec 17), in sicer je vsebnost *cis*-fitola 504 mg/100 g olja, vsebnost *trans*-fitola pa 41,4 mg/100 g olja. Največjo vsebnost skvalena smo določili v kivijevemu olju dobavitelja Dragonspice Naturwaren (vzorec 36), z vsebnostjo 1070 mg/100 g olja. Največ δ -tokoferola vsebuje borečevo olje dobavitelja Tovarna Organika (vzorec 7), z vsebnostjo 119 mg/100 g olja, največ γ -tokoferola pa olje inkovske plukenecije proizvajalca Magnolija (vzorec 35), z vsebnostjo 45,0 mg/100 g olja. α -Tokoferola nismo zaznali v nobenem vzorcu. Največ stigmasterola vsebuje olje ogrščice dobavitelja Behawe (vzorec 18), z vsebnostjo 48,0 mg/100 g olja, največ β -sitosterola pa vsebuje svetlinovo olje dobavitelja Alexmo cosmetics (vzorec 26), z vsebnostjo 1340 mg/100 g olja.

Dobljeni rezultati vsebnosti posameznih NS se v nekaterih primerih ujemajo z literaturnimi vrednostmi, v nekaterih primerih so večji, v drugih manjši. Odstopanje med rezultati je pričakovano, saj sestava rastlinskega olja, ki ga pridobimo iz določene rastline, ni vedno popolnoma enaka [71]. Zato je tudi razumljivo, da se sestava NS istovrstnih olj različnih dobaviteljev nekoliko razlikuje. Poudariti je treba tudi to, da so rezultati odvisni tudi od vrste metode, uporabljene za izolacijo NS, prav tako pa tudi od vrste metode, izbrane za detekcijo vsebnosti posameznih komponent NS. Največja odstopanja opazimo (zaradi njihove slabe obstojnosti med procesom izolacije NS [27]) pri tokoferolih, še posebej je to očitno pri α -

tokoferolu, ki ga nismo uspeli določiti v nobenem vzorcu. Med vsebnostjo posameznih komponent NS in načinom pridobivanja olja nismo opazili povezave. Prav tako ni bilo mogoče oceniti vpliva rafiniranja na sestavo NS. Za natančnejšo opredelitev vpliva rafiniranja na sestavo NS bi potrebovali večje število vzorcev. Opazovali smo tudi pojavljanje *cis* in *trans* izomerov fitola. V naravi naj bi bil namreč prisoten le *trans* izomer, kot posledica rafiniranja pa naj bi se v olju pojavil tudi *cis* izomer fitola [32]. *cis*-Fitol je bil prisoten tudi v nerafiniranih oljih, v nekaterih primerih nerafiniranih olj je prevladoval ali pa se je celo pojavil kot edini izomer. V rafiniranih oljih nismo opazili večje vsebnosti *cis*-fitola. Dobljeni rezultati torej ne kažejo povezave med razmerjem *cis* in *trans* izomerov fitola v olju in izpostavljenostjo olja procesu rafiniranja.

5.3 KOMENTAR UPORABLJENIH METOD IN PREDLOGI ZA NADALJNJE IZBOLJŠAVE

Med izvedbo eksperimentalnega dela in tudi pozneje ob pregledu in vrednotenju rezultatov, smo opazili določene slabosti in omejitve metod in postopkov, ki smo jih povzeli po literaturi in uporabili pri svojem delu. Raziskali smo potencialne vzroke za opažene težave in poiskali predloge, kako bi se omenjenim težavam v nadaljnjih analizah lahko izognili.

Med analizo vzorcev NS z GC-MS smo opazili, da so se začeli kromatografski vrhovi zamikati (retencijski časi so se začeli daljšati), šum bazne linije pa je postajal vedno večji. Opazili smo tudi, da so bile bučke, v katerih smo pripravili raztopine derivatiziranih referenčnih spojin, motne in steklo poškodovano. Na podlagi tega smo sklepali, da bi lahko reagent za derivatizacijo poškodoval tudi steklene dele v sistemu GC-MS. Poleg tega je uporabljeni reagent za derivatizacijo (zmes HMDS, TMCS in piridina) verjetno povzročil tudi oksidacijo kovinskih delov sistema GC-MS, med drugim ionskega izvora detektorja MS, kar je povzročilo zamikanje vrhov. Da bi se izognili oksidaciji detektorja, bi bilo smiselno namesto detektorja MS uporabiti detektor FID (ang. *flame ionization detector*). Glede na to, da smo imeli težave tudi z ločitvijo kromatografskih vrhov, bi bilo mogoče smiselno uporabiti drug reagent za derivatizacijo, na primer zmes BSTFA in TMCS. Derivati tega reagenta so bolj hlapni od derivatov, nastalih z uporabo reagenčne zmesi HMDS, TMCS in piridina, zaradi česar pride do manjših motenj in boljše ločitve [76]. Z uporabo omenjenega reagenta bi verjetno vplivali na ločitev kromatografskih vrhov, ne bi pa izboljšali linearnosti, saj bi oksidacija kovinskih delov aparature verjetno še vedno potekala.

V izračun rezultatov vsebnosti posameznih komponent NS nismo vključili standardnega dodatka holesterola in upoštevali izgub neumiljivih snovi med postopkom izolacije, saj je vsebnost dodanega holesterola preveč variirala. Do odstopanj v vsebnosti holesterola je najverjetneje prišlo zaradi napake v tehtanju, saj je zelo težko natehtati točno 1 mg. V prihodnje bi bilo zato smiselno natehtati večjo količino holesterola, jo raztopiti in nato vzorcem s pipeto natančno odmeriti ustrezne alikvote raztopine.

Na podlagi dobljenih rezultatov smo ugotovili, da tokoferoli (zlasti α -tokoferol) niso dovolj stabilni, da bi prenesli uporabljene reakcijske razmere saponifikacije. Pri nadaljnjih analizah tokoferolov bi bilo zato smiselno najprej določiti, pri kakšnih pogojih saponifikacije so tokoferoli še stabilni, oziroma določiti ustrezno povezavo med posameznimi dejavniki in deležem ohranjenih tokoferolov v vzorcu. Za določitev vsebnosti tokoferolov v rastlinskem olju bi se lahko poslužili tudi metode, ki ne vključuje saponifikacije, in se tako izognili morebitni izgubi tokoferolov. Olje bi brez predhodne saponifikacije ustrezno raztopili v organskem topilu ter z uporabo sistema HPLC izvedli kromatografsko ločitev. Koncentracijo posameznih tokoferolov bi določili s pomočjo spektrometrije UV-VIS [40].

Vsebnosti posameznih komponent NS v vzorcih bi bilo tudi sicer smiselno določiti še s kakšno drugo metodo (npr. HPLC) in dobljene rezultate primerjati med sabo.

5.4 UPORABA RASTLINSKIH OLJ V PREHRANI

Rastlinska olja v zadnjem času pridobivajo na priljubljenosti in njihova uporaba v prehrani narašča. Poleg tega so rastlinska olja in izolirane neumiljive snovi dostopne tudi v obliki prehranskih dopolnil (na primer olje, vgrajeno v kapsule, izolirani fitosteroli, vgrajeni v kapsule), na voljo pa imamo tudi živila z dodanimi bioaktivnimi snovmi iz rastlinskih olj (na primer margarina z dodanimi fitosteroli) [49, 50].

Uživanje rastlinskih olj ima lahko ugodne učinke na zdravje. NS imajo širok spekter bioloških učinkov, še posebej opazno pa je njihovo zaščitno delovanje na krvožilni sistem [53]. Pri rastlinskih oljih gre za kombinacijo hranilne sestave in funkcionalnih komponent, zato govorimo o funkcionalnih živilih [46]. Vsebnost in sestava bioaktivnih komponent v rastlinskih oljih sta odvisni od številnih dejavnikov, zato sta lahko precej spremenljivi. Pri prehranskih dopolnilih, ki vsebujejo rastlinska olja oziroma NS, je zato ključnega pomena zagotavljanje konstantne vsebnosti in kakovosti pripravka [46].

Preiskovana rastlinska olja lahko glede na vsebnost in sestavo NS opredelimo kot živila s pomembno prehransko vrednostjo. Med analiziranimi olji je z NS najbogatejše olje rakitovca (vzorec 22), nato olje ameriške brusnice (vzorca 2 in 1) in malinovo olje (vzorec 15). Pri ovrednotenju rastlinskega olja kot funkcionalnega živila pa je potrebno poleg vsebnosti in sestave NS upoštevati še druge lastnosti olja, kot sta maščobnokislinska sestava in oksidativna stabilnost olja.

6 SKLEP

V raziskovalnem delu smo ugotavljali vsebnost in sestavo neumiljivih snovi izbranih rastlinskih olj. Iz vzorcev rastlinskih olj različnih dobaviteljev smo po modificiranem farmakopejskem predpisu izolirali NS, jih z metodo sililiranja pretvorili v hlapne derivate in jih analizirali s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo.

Glede na literaturo predstavljajo NS od 0,3 do 2 % celokupne mase olja. Vsebnost NS v preiskovanih vzorcih se nahaja znotraj omenjenega intervala. Največjo vsebnost NS smo določili olju rakitovca (vzorec 22), 2,20 %, najmanjšo vsebnost NS pa ima olje inkovske plukenecije (vzorec 35), 0,33 %.

Največ fitola vsebuje malinovo olje (vzorec 17), in sicer je vsebnost *cis*-fitola 504 mg/100 g olja, vsebnost *trans*-fitola pa 41,4 mg/100 g olja. Največjo vsebnost skvalena smo določili v kivijevem olju (vzorec 36), 1070 mg/100 g olja. Največ δ -tokoferola vsebuje borečevo olje (vzorec 7), 119 mg/100 g olja, največ γ -tokoferola pa olje inkovske plukenecije (vzorec 35), 45,0 mg/100 g olja. α -Tokoferola nismo zaznali v nobenem vzorcu. Največ stigmasterola vsebuje olje ogrščice (vzorec 18), 48,0 mg/100 g olja, največ β -sitosterola pa vsebuje svetlinovo olje (vzorec 26), 1340 mg/100 g olja.

Način pridobivanja rastlinskega olja nima opaznega vpliva na vsebnost in sestavo NS. Proces rafiniranja vpliva na vsebnost in sestavo NS v rastlinskem olju, vendar bi za zanesljivo kvantitativno opredelitev zmanjšanja vsebnosti NS potrebovali večje število vzorcev.

Uporabljena metoda izolacije NS ni primerna za namen določevanja vsebnosti tokoferolov v rastlinskem olju, saj ti niso dovolj stabilni, da bi prenesli razmere običajne saponifikacije. Analizo tokoferolov bi bilo zato smiselno ponoviti z alternativno metodo, ki ne vključuje saponifikacije, in dobljene rezultate primerjati med sabo.

Preiskovana rastlinska olja lahko glede na vsebnost in sestavo NS opredelimo kot živila s pomembno prehransko vrednostjo. Pri ovrednotenju rastlinskega olja kot funkcionalnega živila je potrebno poleg vsebnosti in sestave NS upoštevati še druge lastnosti olja, kot sta maščobnokislinska sestava in oksidativna stabilnost olja.

7 LITERATURA

1. Nehdi I, Omri S, Khalil M I, Al-Resayesa S I: Characteristics and chemical composition of date palm (*Phoenix canariensis*) seeds and seed oil. *Ind Crop Prod* 2010; 32: 360-365.
2. Council of Europe: General monographs, Vegetable fatty oils. In *European Pharmacopoeia*, 8.0 Edition, EDQM, European Pharmacopoeia, Strasbourg, France, 2014: 775-776.
3. Cert A, Moreda W, Perez-Camino M C: Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils. *J. Chromatogr. A* 2000; 881: 131-148.
4. Christie W W. An Introduction to Lipids and Gas Chromatography: Lipid Structures. Pridobljeno iz <http://lipidlibrary.aocs.org/content.cfm?ItemNumber=39227> (dostop marec 2016).
5. Council of Europe: Methods of analysis, Unsaponifiable matter. In *European Pharmacopoeia*, 8.0 Edition, EDQM, European Pharmacopoeia, Strasbourg, France, 2014: 157.
6. Christie W W. What is a Lipid? Simple lipids. Pridobljeno iz <http://lipidlibrary.aocs.org/Primer/content.cfm?ItemNumber=39371&navItemNumber=19200> (dostop junij 2016).
7. Food and Agriculture Organization. Processing and refining edible oils. Pridobljeno iz http://www.fao.org/docrep/v4700e/V4700E0a.htm#Chapter_5:_Processing_and_refining_edible_oils (dostop junij 2016).
8. Malecka M: Antioxidant properties of the unsaponifiable matter isolated from tomato seeds, oat grains and wheat germ oil. *Food Chemistry* 2002; 79: 327-330.
9. Bruneton J: Plant Lipids: Vegetable Oils. In *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*, Lavoisier Publishing, Paris, 1999: 159-164.
10. Sakouhi F, Absalon C, Flamini G, Cioni P L, Kallel H, Boukhchina S: Lipid components of olive oil from Tunisian Cv. Sayali: Characterization and authenticity. *C. R. Biologies* 2010; 333: 642-648.
11. Tranchida P Q, Salivo S, Franchina F A, Bonaccorsi I, Dugo P, Mondello L: Qualitative and quantitative analysis of the unsaponifiable fraction of vegetable oils by using comprehensive 2D GC with dual MS/FID detection. *Anal Bioanal Chem* 2013; 405: 4655-4663.
12. Gornas P, Rudzinska M, Raczyk M, Mišina I, Soliven A, Lacis G, Segliņa D: Impact of Species and Variety on Concentrations of Minor Lipophilic Bioactive Compounds in Oils Recovered from Plum Kernels. *J. Agric. Food Chem.* 2016; 64: 898-905.
13. Lagarda M J, Garcia-Llatas G, Farre R: Analysis of phytosterols in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006; 41: 1486-1496.
14. Winkler J K and Warner K: The effect of phytosterol concentration on oxidative stability and thermal polymerization of heated oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2008; 110: 455-464.

15. Nasri N, Fady B, Triki S: Quantification of Sterols and Aliphatic Alcohols in Mediterranean Stone Pine (*Pinus pinea* L.) Populations. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55: 2251-2255.
16. Aparicio R, Aparicio-Ruiz R: Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. *J. Chromatogr. A* 2000; 881: 93-104.
17. Bruneton J: Plant Lipids: Generalities. In *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*, Lavoisier Publishing, Paris, 1999: 130-135.
18. Beveridge T H J, Li T S C, Drover J C G: Phytosterol Content in American Ginseng Seed Oil. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 744-750.
19. Awad A B, Fink C S: Phytosterols as Anticancer Dietary Components: Evidence and Mechanism of Action. *J. Nutr.* 2000; 130: 2127-2130.
20. Ling W H, Jones P J H: Dietary Phytosterols: A Review Of Metabolism, Benefits And Side Effects. *Life Sciences* 1995; 57: 195-206.
21. Wang R, Kobayashi Y, Lin Y, Rauwald H W, Fang L, Qiao H, Kuchta K: A phytosterol enriched refined extract of *Brassica campestris* L. pollen significantly improves benign prostatic hyperplasia (BPH) in a rat model as compared to the classical TCM pollen preparation Qianlie Kang Pule'an Tablets. *Phytomedicine* 2015; 22: 145-152.
22. Pegel K H: The importance of sitosterol and sitosterolin in human and animal nutrition. *SAJS* 1997; 93: 353-382.
23. Bhatti H N, Khera R A: Biological transformations of steroidal compounds: A review. *Steroids* 2012; 77: 1267-1290.
24. Pereira Souza A H, Kirie Gohara A, Rodrigues A C, Ströher G L, Silva D C, Visentainer J V, Souza N E, Matsushita M: Optimization conditions of samples saponification for tocopherol analysis. *Food Chemistry* 2014; 158: 315-318.
25. Hussain N, Irshad F, Jabeen Z, Shamsi I H, Li Z, Jiang L: Biosynthesis, Structural, and Functional Attributes of Tocopherols in *Planta*; Past, Present, and Future Perspectives. *J. Agric. Food Chem.* 2013; 61: 6137-6149.
26. Horvath G, Wessjohann L, Bigirimana J, Jansen M, Guisez Y, Caubergs R, Horemans N: Differential distribution of tocopherols and tocotrienols in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. *Phytochemistry* 2006; 67: 1185-1195.
27. Czauderna M, Kowalczyk J. Alkaline saponification results in decomposition of tocopherols in milk and ovine blood plasma. *J. Chromatogr. B* 2007; 858: 8–12.
28. Donato Gianeti M, Rigo Gaspar L, Bueno de Camargo Júnior F, Berardo Gonçalves Maia Campos P M: Benefits of Combinations of Vitamin A, C and E Derivatives in the Stability of Cosmetic Formulations. *Molecules* 2012; 17: 2219-2230.
29. Moraes J, Oliveira R N, Costa J P, Junior A L G, Sousa D P, Freitas R M, Allegretti S M, Pinto P L S: Phytol, a Diterpene Alcohol from Chlorophyll, as a Drug against Neglected Tropical Disease Schistosomiasis *Mansoni*. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2014; 8: 2-12.

30. Islam M D, Alencar M V O B, Conceição Machado K, Conceição Machado K, Carvalho Melo-Cavalcante A A, Sousa D P, Freitas R M: Phytol in a pharma-medico-stance. *Chemico-Biological Interactions* 2015; 240: 60-73.
31. Matsuda H, Gomi R, Hirai S, Egashira Y: Effect of Dietary Phytol on the Expression of α -Amino- β -carboxymuconate- ϵ -semialdehyde Decarboxylase, a Key Enzyme of Tryptophan – niacin Metabolism, in Rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2013; 77: 1416-1419.
32. Vetter W, Schröder M, Lehnert K: Differentiation of Refined and Virgin Edible Oils by Means of the trans- and cis-Phytol Isomer Distribution. *Agric. Food Chem.* 2012; 60: 6103-6107.
33. Costa J P, Ferreira P B, De Sousa D P, Jordanc J, Freitas RM: Anticonvulsant effect of phytol in a pilocarpine model in mice. *Neuroscience Letters* 2012; 523: 115-118.
34. Silva R O, Sousa F B M, Damasceno S R B, Carvalho N S, Silva V G, Oliveira F R M A, Sousa D P, Aragão K S, Barbosa A L R, Freitasb R M, Medeiros J V R: Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 2014; 28: 455-464.
35. Lim S Y, Meyer M, Kjonaas R A, Ghosh S K: Phytol-based novel adjuvants in vaccine formulation: 1. assessment of safety and efficacy during stimulation of humoral and cell-mediated immune responses. *JIBTV* 2006; 4:6: 1-11.
36. Menezes Patrício Santos C C, Salvadori M S, Mota V G, Muratori Costa L, Cardoso de Almeida A A, Lopes de Oliveira G A, Pereira Costa J, Pergentino de Sousa D, Mendes de Freitas R, Nóbrega de Almeida R: Antinociceptive and Antioxidant Activities of Phytol In Vivo and In Vitro Models. *Neuroscience Journal* 2013; 13: 1155-1165.
37. Kim C W, Lee H J, Jung J H, Kim Y H, Jung D B, Sohn E J, Lee J H, Woo H J, Baek N, Kim Y Cand, Kim S H: Activation of Caspase-9/3 and Inhibition of Epithelial Mesenchymal Transition are Critically Involved in Antitumor Effect of Phytol in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Phytother. Res.* 2015; 29: 1026-1031.
38. Saikia D, Parihar S, Chanda D, Ojha S, Kumar J K, Chanotiya C S, Shanker K, Negi A S: Antitubercular potential of some semisynthetic analogues of phytol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2010; 20: 508-512.
39. Inoue Y, Hada T, Shiraishi A, Hirose K, Hamashima H, Kobayashi S: Biphasic Effects of Geranylgeraniol, Teprenone, and Phytol on the Growth of *Staphylococcus aureus*. *AAC* 2005; 49: 1770-1774.
40. Montserrat-de la Paz S, Marín-Aguilar F, García-Giménez M D, Fernández-Arche M A: Hemp (*Cannabis sativa* L.) Seed Oil: Analytical and Phytochemical Characterization of the Unsaponifiable Fraction. *J. Agric. Food Chem.* 2014; 62: 1105-1110.
41. Viola F, Oliaro S, Binello A, Cravotto G: Policosanol: updating and perspectives. *Mediterr J Nutr Metab* 2008; 1: 77-83.

42. Ryan E, Galvin K, O'Connor T P, Maguire A R, O'Brien N M: Phytosterol, Squalene, Tocopherol Content and Fatty Acid, Profile of Selected Seeds, Grains, and Legumes. *Plant Foods Hum Nutr* 2007; 62: 85-91.
43. Spanova M, Daum G: Squalene – biochemistry, molecular biology, process biotechnology, and applications. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2011; 113: 1299-1320.
44. Naziri E, Mantzouridou F, Tsimidou M Z: Squalene resources and uses point to the potential of biotechnology. *Lipid Technology* 2011; 12: 270-273.
45. Senthilkumar S, Devaki T, Manohar B M, Babu M S: Effect of squalene on cyclophosphamide-induced toxicity. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 335-342.
46. Bernal J, Mendiola J A, Ibanez E, Cifuentes A: Advanced analysis of nutraceuticals. *J Pharma Biomed Analysis* 2011; 55: 758-774.
47. Meštrović T. What are Nutraceuticals? Pridobljeno iz <http://www.news-medical.net/health/What-are-Nutraceuticals.aspx> (dostop april 2016).
48. Kalra E K: Nutraceutical - Definition and Introduction. *AAPS PharmSci* 2003; 5: Article 25.
49. Isanga J, Zhang G N: Biologically Active Components and Nutraceuticals in Peanuts and Related Products: Review. *Food Rev Int* 2007; 23: 123-140.
50. Scholz B, Guth S, Engel K H, Steinberg P: Phytosterol oxidation products in enriched foods: Occurrence, exposure, and biological effects. *Mol. Nutr. Food Res.* 2015; 59: 1339-1352.
51. World Health Organization - WHO. Cardiovascular diseases (CVDs). Pridobljeno iz <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> (dostop junij 2016).
52. Torres N, Guevara-Cruz M, Velazquez-Villegas L A, Tovar A R: Nutrition and Atherosclerosis. *Archives of Medical Research* 2015; 46: 408-426.
53. Caligiani A, Bonzanini F, Palla G, Cirlini M, Bruni R: Characterization of a Potential Nutraceutical Ingredient: Pomegranate (*Punica granatum* L.) Seed Oil Unsaponifiable Fraction. *Plant Foods Hum Nutr* 2010; 65: 277-283.
54. Ribarič S: Hiperlipoproteinemije. V Ribarič S (ur.). *Seminarji iz patološke fiziologije*, 2. izdaja, UL MF Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2012: 137-147.
55. Bajrović F F, Šuput D: Ateroskleroza. V Ribarič S (ur.). *Temelji patološke fiziologije*, 2. izdaja, UL MF Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2011: 169-176.
56. Atherosclerosis. Pridobljeno iz <http://www.nmhi.com/a/atherosclerosis.htm> (dostop april 2016).
57. Choudhary S P, Tran L S: Phytosterols: Perspectives in Human Nutrition and Clinical Therapy. *Curr Med Chem* 2011; 18: 4557-4567.
58. Lin X, Racette S B, Lefevre M, Ma L, Anderson Spearie C, Steger-May K, Ostlund R E: Combined Effects of Ezetimibe and Phytosterols on Cholesterol Metabolism. *Circulation* 2011; 124: 596-601.

59. Valastyan S, Thakur V, Johnson A, Kumar K, Manor D: Novel Transcriptional Activities of Vitamin E: Inhibition of Cholesterol Biosynthesis. *Biochemistry* 2008; 47: 744-752.
60. Strandberg T E, Tilvis R S, Miettinen T A: Variations of hepatic cholesterol precursors during altered flows of endogenous and exogenous squalene in the rat. *Biochim. Biophys. Acta* 1989; 1001: 150-156.
61. Anderluh M: Biosinteza holesterola, hipolipemiki. *Farmacevtska kemija* 3, neobjavljeno delo, UL Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2016.
62. Zarrouk W, Carrasco-Pancorbo A, Zarrouk M, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A: Multi-component analysis (sterols, tocopherols and triterpenic dialcohols) of the unsaponifiable fraction of vegetable oils by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-ion trap mass spectrometry. *Talanta* 2009; 80: 924-934.
63. Tan H W, Abdul Aziz A R, Aroua M K: Glycerol production and its applications as a raw material: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2013; 27: 118-127.
64. Sigma Aldrich. Certificate of Analysis: HMDS + TMCS + Pyridine. Pridobljeno iz http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COFAInfo/Supelco/pdf/OFFLINE2014/33039_LC07579V.PDF (dostop februar 2015).
65. Giacometti J: Determination of aliphatic alcohols, squalene, α -tocopherol and sterols in olive oils: direct method involving gas chromatography of the unsaponifiable fraction following silylation. *Analyst* 2001; 126: 472-475.
66. Caligiani A, Bonzanini F, Palla G, Cirilini M, Bruni R: Characterization of a Potential Nutraceutical Ingredient: Pomegranate (*Punica granatum* L.) Seed Oil Unsaponifiable Fraction. *Plant Foods Hum Nutr* 2010; 65: 277-283.
67. Watson D G: Gas chromatography. In *Pharmaceutical Analysis, A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*, 2nd Edition, Elsevier - Churchill Livingstone, Edinburgh, 2005: 235-241.
68. Christie W W. An Introduction to Lipids and Gas Chromatography: Theoretical Aspects. Pridobljeno iz <http://lipidlibrary.aocs.org/content.cfm?ItemNumber=39229> (dostop marec 2016).
69. Watson D G: Mass spectrometry. In *Pharmaceutical Analysis, A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*, 2nd Edition, Elsevier - Churchill Livingstone, Edinburgh, 2005: 187-201.
70. Christie W W. A Beginner's Guide to Mass Spectrometry of Fatty Acids. Pridobljeno iz <http://lipidlibrary.aocs.org/Analysis/content.cfm?ItemNumber=39525> (dostop marec 2016).
71. Kočevar Glavač N: Rastlinska masla in olja. V Janeš D in Kočevar Glavač N (ur.). *Sodobna kozmetika*, 1. izdaja, Širimo dobro besedo, Velenje, 2015: 51-171.
72. Fontanel D: *Unsaponifiable Matter in Plant Seed Oils*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2013.

73. Kočevar Glavač N: Absoluti, eterična olja in sorodne snovi. V Janeš D in Kočevar Glavač N (ur.). Sodobna kozmetika, 1. izdaja, Širimo dobro besedo, Velenje, 2015: 443-588.
74. Van Hoed V, Depaemelaere G, Vila Ayala J, Santiwattana P, Verhé R, Greyt W: Influence of Chemical Refining on the Major and Minor Components of Rice Bran Oil. JAOCS 2006; 83: 315-321.
75. Duhan A, Duhan S, Kumari B: Effect of chemical refining on *Citrullus Colocynthis* And *Pongamia Pinnata* seed oil. AJFAND 2012, 12: 6110-6122.
76. Sigma Aldrich. Certificate of Analysis: BSTFA + TMCS, 99:1. Pridobljeno iz <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/33148?lang=en®ion=SI> (dostop april 2016).