

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJA LEVPUŠČEK

**SESTAVA MAŠČOBNIH KISLIN, NEUMILJIVEGA DELA IN
ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST LIPOVEGA OLJA**

**THE ANALYSIS OF FATTY ACID COMPOSITION,
UNSAPONIFIABLE FRACTION AND ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF
TILIA OIL**

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2016

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

Zahvala

Zahvaljujem se doc. dr. Nini Kočever Glavač, mag. farm., in izr. prof. dr. Damjanu Janešu, mag. farm., za pomoč pri izdelavi magistrske naloge.

Največja zahvala gre mojim staršem, sestri Kristini in starim staršem, saj brez njih ne bi bila, kjer sem. Hvala vam za vso nesebično podporo, ki sem je bila deležna tekom celotnega šolanja in življenja.

Izjava

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

Andreja Levpušček

Predsednica komisije: prof. dr. Julijana Kristl, mag. farm.

Član komisije: asist. dr. Tilen Kranjc, mag. farm.

Ljubljana, 2016

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	I
KAZALO PREGLEDNIC.....	II
KAZALO SLIK	III
POVZETEK.....	IV
ABSTRACT.....	V
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
1. UVOD	1
1.1 LIPA.....	1
1.1.1 Splošno.....	1
1.1.2 Uporaba.....	1
1.2 SRČNO-ŽILNE BOLEZNI.....	2
1.2.1 Ateroskleroza	2
1.2.2 Lipoproteini.....	3
1.3 MAŠČOBNE KISLINE	4
1.3.1 Splošno.....	4
1.3.2 Metabolizem maščobnih kislin.....	5
1.3.3 Vpliv strukture maščobnih kislin na sestavo plazemskih lipidov	5
1.4 FITOSTEROLI	8
1.4.1 Splošno.....	8
1.4.2 Sinteza fitosterolov v rastlinah.....	9
1.4.3 Metabolizem fitosterolov	10
1.4.4 Mehanizem delovanja	11
1.4.5 Vpliv na lipofilne antioksidante	11
1.5 SKVALEN	11
1.6 VITAMIN E.....	12
2. NAMEN DELA	13
3. MATERIALI IN METODE	14
3.1 MATERIALI.....	14
3.1.1 Rastlinski material.....	14
3.1.2 Kemikalije in reagenti	15
3.1.3 Oprema.....	16
3.2 METODE	17
3.2.1 In situ derivatizacija maščobnih kislin	17
3.2.2 Derivatizacija neumiljivih snovi	18

3.2.3 Plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo.....	18
3.2.4 Metoda DPPH za določanje antioksidativne aktivnosti	19
4. EKSPERIMENTALNI DEL	21
4.1 EKSTRAKCIJA OLJA	21
4.2 DOLOČANJE MAŠČOBNOKISLINSKE SESTAVE.....	21
4.3 EKSTRAKCIJA NEUMILJIVIH SNOVI	22
4.4 UGOTAVLJANJE NEUMILJIVIH SNOVI.....	23
4.5 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI.....	24
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	25
5.1 EKSTRAKCIJA OLJA	25
5.1.1 Optimizacija ekstrakcije olja.....	25
5.1.2 Vsebnost olja v vzorcih	27
5.2 MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA OLJ	28
5.3 SESTAVA NEUMILJIVIH SNOVI	36
5.3.1 Ekstrakcija neumiljivih snovi.....	36
5.3.2 Sestava neumiljivih snovi v vzorcih.....	36
5.4 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST	38
5.5 POVEZAVA MED ANTIOKSIDATIVNIM POTENCIALOM IN SESTAVO OLJA	39
5.6 UPORABA LIPOVEGA OLJA	41
6. SKLEP.....	42
7. VIRI IN LITERATURA	44
8. PRILOGE.....	47

KAZALO PREGLEDNIC

<i>Preglednica I: Kraj nabiranja in rastlinska vrsta pripadajočega vzorca.....</i>	<i>14</i>
<i>Preglednica II: Izkoristki posameznih vrst ekstrakcij</i>	<i>26</i>
<i>Preglednica III: Vsebnost olja v posameznih vzorcih.....</i>	<i>28</i>
<i>Preglednica IV: Maščobne kisline, ki smo jih zaznali v našem olju</i>	<i>30</i>
<i>Preglednica V (I): Delež posameznih maščobnih kislin v vzorcih</i>	<i>34</i>
<i>Preglednica V (II): Delež posameznih maščobnih kislin v vzorcih.....</i>	<i>35</i>
<i>Preglednica VI: Delež neumiljivih snovi v vzorcih</i>	<i>36</i>
<i>Preglednica VII: Sestava neumiljivih snovi</i>	<i>38</i>
<i>Preglednica VIII: Antioksidativna aktivnost olj.....</i>	<i>39</i>
<i>Preglednica IX: Podatki za lipovo olje</i>	<i>48</i>
<i>Preglednica X: Odstopanja absorbanč posameznih vzorcev, izraženih kot RSD</i>	<i>51</i>

KAZALO SLIK

<i>Slika 1: Socvetje lipovca in lipe</i>	<i>1</i>
<i>Slika 2: Linolna kislina</i>	<i>7</i>
<i>Slika 3: β-Sitosterol, kampesterol in stigmasterol.....</i>	<i>9</i>
<i>Slika 4: Shematski prikaz absorpcije holesterola in drugih neholesterolnih sterolov..</i>	<i>10</i>
<i>Slika 5: Semena lipe in lipovca</i>	<i>15</i>
<i>Slika 6: Reakcijska shema bazično kataliziranega preestrenja maščobnih kislin.</i>	<i>18</i>
<i>Slika 7: Reakcijska shema kislinsko kataliziranega preestrenja maščobnih kislin</i>	<i>18</i>
<i>Slika 8: Reakcija radikala DPPH z antioksidantom.</i>	<i>20</i>
<i>Slika 9: Vzorci lipovega olja</i>	<i>21</i>
<i>Slika 10: Analizator GC-MS, uporabljen za analizo.....</i>	<i>22</i>
<i>Slika 11: Neumiljive snovi lipovega olja.....</i>	<i>23</i>
<i>Slika 12: Sterkulinska in malvalinska kislina.....</i>	<i>29</i>
<i>Slika 13: Povprečna vsebnost maščobnih kislin v semenih lipe in lipovca.....</i>	<i>36</i>
<i>Slika 14: AOP in neumiljive snovi ter linolna kislina</i>	<i>40</i>
<i>Slika 15: Kromatogram maščobnokislinske sestave vzorca olja semen iz Sedovca po derivatizaciji</i>	<i>49</i>
<i>Slika 16: Kromatogram sestave neumiljivih snovi v vzorcu olja semen iz Sedovca po derivatizaciji</i>	<i>50</i>

POVZETEK

Rastlinska olja lahko s svojo sestavo vplivajo na koncentracijo plazemskih lipoproteinov, ki so udeleženi pri nastanku srčno-žilnih bolezni. Koncentracijo lipoproteina z majhno gostoto poleg linolne kisline zmanjšujejo tudi fitosteroli, ki predstavljajo največji del neumiljivih snovi v rastlinskih oljih. V neumiljivih snoveh najdemo še skvalen, ki je prekurzor v sintezi holesterola, vitamin E in fitol ter fenole, terpenoide in karotenoide.

V magistrski nalogi smo proučevali olje, pridobljeno iz semen dveh vrst lip (*Tilia* sp.), in sicer *Tilia cordata* (lipovec) in *Tilia platyphyllos* (lipa). Vzorce semen smo nabrali na različnih lokacijah po Sloveniji. V okviru optimizacije ekstrakcije olja se je kot najboljši način izkazala ekstrakcija s heksanom pod vplivom ultrazvoka.

Pridobljenim vzorcem olj smo nato s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektroskopijo, določili vrste maščobnih kislin, ki se v olju nahajajo. Za namen te kromatografske analize smo maščobne kisline predhodno *in situ* z derivatizacijo pretvorili v bolj hlapne metilne estre. Dokazali smo, da je v lipovem olju najbolj zastopana linolna kislina (59,63 % v semenih lipe in 53,31 % v semenih lipovca), sledita ji oleinska (22,17 % v semenih lipe in 18,22 % v semenih lipovca) in palmitinska kislina (8,55 % v semenih lipe in 8,59 % v semenih lipovca). Zaznali smo tudi sterkulinsko (0,89 % v semenih lipe in 4,71 % v semenih lipovca) in malvalinsko kislino (1,65 % v semenih lipe in 3,10 % v semenih lipovca). Sledila je ekstrakcija neumiljivih snovi po postopku iz Evropske farmakopeje. Pred analizo s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektroskopijo, smo neumiljive snovi pretvorili v bolj hlapne sililne derivate. V okviru raziskave smo proučevali stigmasterol, β -sitosterol, vitamin E (α -, δ -, γ - tokoferol), skvalen ter fitol.

Olju smo določili tudi antioksidativno aktivnost z metodo DPPH, ki temelji na padcu absorbance po reakciji vzorca z radikalom DPPH. Med antioksidativno aktivnostjo in sestavo proučevanih snovi lipovega olja nismo našli pomembnejših povezav. Nakazana je le povezava med celotno koncentracijo fitosterolov in antioksidativno aktivnostjo. Večja kot je vsebnost fitosterolov, večja je antioksidativna aktivnost.

Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da lipovo olje ni najboljši prehranski vir maščobnih kislin, saj ne vsebuje maščobnih kislin omega-3. Zaradi velikega deleža linolne kisline, prisotnosti fitosterolov, skvalena in tokoferolov pa bi lahko lipovo olje uporabljali v kozmetične namene.

Ključne besede: Lipovo olje, maščobne kisline, fitosteroli, neumiljivi del, antioksidativna aktivnost

ABSTRACT

The composition of vegetable oils may affect the concentration of plasma lipoproteins that are involved in the development of cardiovascular diseases. Low-density lipoprotein is lowered by linoleic acid and phytosterols. Phytosterols comprise the major portion of the unsaponifiable matter of vegetable oils. The unsaponifiable matter also contains squalene, which is a precursor for synthesis of cholesterol, vitamin E and phytol as well as phenols, terpenoids and carotenoids.

The present master's thesis focuses on vegetable oil derived from seeds of two lime species (*Tilia* sp.): small-leaved lime (*Tilia cordata*) and large-leaved lime (*Tilia platyphyllos*). Seed samples were collected from different locations in Slovenia. The highest yield was achieved with the ultrasound-assisted extraction.

For the obtained oil samples types of fatty acids were then determined using gas chromatography coupled with mass spectrometry. For the purpose of this chromatographic analysis, fatty acids were converted into more volatile methyl esters using preliminary *in situ* derivatization. The predominant fatty acid in lime oil is linoleic acid (59,63 % in *T. platyphyllos* and 53,31 % in *T. cordata*) followed by oleic acid (22,17 % in *T. platyphyllos* and 18,22 % in *T. cordata*) and palmitic acid (8,55 % in *T. platyphyllos* and 8,59 % in *T. cordata*). Sterculic (0,89 % in *T. platyphyllos* and 4,71 % in *T. cordata*) and malvalic (1,65 % in *T. platyphyllos* and 3,10 % in *T. cordata*) acids were also observed. Later on, the extraction of the unsaponifiable matter, based on the European Pharmacopeia procedure, was carried out. Prior to gas chromatography coupled with mass spectrometry, the unsaponifiable matter was converted into more volatile silyl derivatives. Stigmasterol, β -sitosterol, vitamin E (α -, δ -, γ - tocopherol), squalene and phytol were studied.

Antioxidative activity of oil was also determined using the DPPH method based on the decrease in absorbance after the reaction of a sample with the DPPH radical. The antioxidant activity and the composition of the studied lime oil content did not reveal any important connections. Only the connection between the total concentration of phytosterols and the antioxidative activity was indicated. The higher the total concentration of phytosterols, the greater is the antioxidative activity. The obtained results show that lime oil is not the best source of fatty acids, as it does not contain omega-3 fatty acids. However, containing a high amount of linoleic acid as well as phytosterols, squalene and tocopherols, it could be used for cosmetic purposes.

Key words: *Tilia* oil, fatty acids, phytosterols, unsaponifiable fraction, antioxidant activity

SEZNAM OKRAJŠAV

A – absorbanca

ACAT – acil holesterol acil transferaza

ACBP – vezavni protein za acil-CoA (*acyl-CoA-binding protein*)

AOP – antioksidativni potencial

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

FABP – vezavni protein za maščobne kisline (*fatty acid-binding proteine*)

GC-MS – plinska kromatografija, sklopljena z masno spektroskopijo (*gas chromatography – mass spectroscopy*)

HDL – lipoprotein visoke gostote

HDMS – heksametilsilazan

IDL – lipoprotein srednje gostote

LDL – lipoprotein nizke gostote

MMP-1 – matriks metaloproteinaza-1 (*matrix metalloproteinase-1*)

NPC1L1 – transportni protein NPC1L1 (*Niemann-Pick C1-Like1 protein*)

PPAR- α – receptor, aktiviran s proliferatorjem peroksisomov (*peroxisome proliferator-activated receptor-alpha*)

TMCS – trimetilklorsilan

VLDL – lipoprotein zelo nizke gostote

1. UVOD

1.1 LIPA

1.1.1 Splošno

Lipa je dvokaličnica, ki spada v red Malvales (slezenovci) in družino Tiliaceae (lipovke). V Sloveniji rasteta dve vrsti, in sicer *Tilia cordata* (lipovec) in *Tilia platyphyllos* (lipa). Obe podvrsti imata nepravilne srčaste, cele in spiralasto nameščene liste. Lipovec je 10 do 30 m visoko drevo z najprej stožčasto, nato pa visoko obokano krošnjo. Listi so zgoraj temnozeleni in goli, spodaj pa modrikastozeleni. Po 3 do 10 cvetov je združenih v socvetja (slika 1), ki se razvijejo od junija do julija. Cvetovi se septembra preoblikujejo v okrogle, rahlo rebraste plodove z mehko ovojnico. Lipa je 15 do 40 m visoko drevo. Krošnja ima najprej stožčasto, nato pa kroglasto obliko. Listi so na obeh straneh kratkodlakavi, dolgi od 8 do 15 cm. Na spodnji strani pa imajo za razliko od lipovca, ki ima rdečerumene dlakave žilne kote, bele dlačice v razvejitvah žil. Junija se razvije od 2 do 5 cvetov, združenih v socvetja (slika 1), ki septembra dozori v okrogle pet-rebrne plodove s trdo ovojnico. Obe vrsti rasteta po celi Evropi (1, 2).



Slika 1: Na levi strani je socvetje lipovca s 3 do 10 cvetovi, na desni strani pa socvetje lipa z 2 do 5 cvetovi.

1.1.2 Uporaba

V ljudski medicini kot rastlinsko drogo uporabljamo cvetove lipe, ki so bogati s fenolnimi spojinami. Prevladujejo tanini (galokatehini, katehini), flavonoidi (kempferol, kvercetin ter njihovi glikozidi, kot so tilirozid, rutin, kvercitrin), fenolkarboksilne kisline (kavna kislina, *p*-kumarna kislina) ter proantocianidini. Cvetovom daje značilen vonj po lesu eterično olje, ki vsebuje naslednje spojine: linalool, karvon, garmakren D, anetol, kafro, benzilalkohol, 1,8-cineol, benzaldehid, izoevgenol, menton, linalilacetat, geraniol ter druge, v manjši meri zastopane spojine. V cvetovih najdemo tudi sluzi – polisaharide, ki predstavljajo 10 %

vseh spojin. Od polisaharidov najdemo D-galaktozo, L-arabinozo, L-ramnozo in uronsko kislino (2, 3, 4).

Lipove cvetove pogosto uporabljamo v čajnih mešanicah, saj naj bi po ljudskem izročilu delovali diaforetično in tako spodbujali potenje, izboljševali naj bi tudi odpornost proti prehladu in gripi. Sluzi blažijo razdraženo sluznico pri vnetjih grla in kašlju ter tako delujejo demulcentno (naredijo zaščitno oblogo na sluznici). V ljudski medicini lipo svetujejo tudi pri boleznih ledvic in mehurja ter kot blago spazmolitično sredstvo. Proantocianidini in tanini delujejo kot adstringenti. Zunanje lahko izvlečke iz lipovih cvetov zaradi polisaharidov in flavonoidov, uporabljamo kot dodatek emolientom za nego suhe, razdražene in občutljive kože. Lipov čaj deluje tudi rahlo pomirjevalno, ki temelji na učinkih linaloola, benzilalkohola, linalilacetata in geraniola v eteričnem olju (2, 3, 4).

1.2 SRČNO-ŽILNE BOLEZNI

1.2.1 Ateroskleroza

Srčno-žilne bolezni so dandanes vodilni razlog smrti v svetu. Glavni vzrok zanje je v večini primerov ateroskleroza, ki jo definiramo kot kronično bolezen velikih in srednje velikih arterij elastičnega in mišičnega tipa, za katero je značilno progresivno kopičenje lipidov, veziva, netopnih kalcijevih soli in celičnih ostankov v intimi ter spremljajoče vnetje žilnih sten. Tako nastanejo značilne aterosklerotične lehe ali ateromi, ki so omejene zadebelitve v intimi arterije. Ateroskleroza vodi v zoženje svetline arterije s posledičnim zmanjšanjem pretoka krvi. Razvoj ateroskleroze je močno odvisen od številnih genetskih in okoljskih dejavnikov. Na njen nastanek najbolj vplivajo arterijska hipertenzija, sladkorna bolezen, kajenje ter dislipidemija (5, 6).

Dislipidemija je heterogena motnja, za katero je značilna povečana količina trigliceridov, lipoproteina z majhno gostoto (LDL) in apolipoproteina B (apoB) ter zmanjšana koncentracija lipoproteina z veliko gostoto (HDL). Pri aterosklerozi v krvi najdemo povečano količino prostih, nezaestrenih maščobnih kislin, ki se namesto, da bi se zadrževale v maščobnem tkivu vračajo v jetra. Vse to v jetrih spodbudi sintezo trigliceridov, produkcijo apoB in izločanje lipoproteinov z zelo majhno gostoto (VLDL). Izmenjava holesterolnih estrov s trigliceridi vodi do tvorbe s trigliceridi bogatega zelo aterogenega, lipoproteina LDL (7).

Lipoproteini se lahko kemično spremenijo, kar je še posebej pomembno v patogenezi ateroskleroze. Oksidacija LDL igra tu ključno vlogo. Oksidirani LDL, ki vsebujejo oksidirane apolipoproteine, holesterol, večkrat nenasičene maščobne kisline in fosfolipide, so bioaktivni. Lahko inducirajo ekspresijo in izločanje citokinov, rastnih dejavnikov in adhezijskih molekul, ki spodbujajo prilepljanje in vstopanje levkocitov (monocitov in limfocitov T) v intimo arterijske stene. Oksidirani LDL lahko tudi inhibira endotelijsko sintezo prostaciklina in dušikovega oksida (NO), dveh vazodilatatorjev in inhibitorjev agregacije trombocitov (6, 8).

1.2.2 Lipoproteini

Lipoproteini so makromolekulski kompleksi, ki po plazmi prenašajo hidrofobne lipide. Njihovo sredico tvorijo triacilgliceroli in holesterolni estri, njihov zunanji del pa fosfolipidi, apolipoproteini in majhen delež prostega holesterola. Ločimo 5 vrst lipoproteinov, ki se med seboj razlikujejo v gostoti, deležih triacilglicerolov in holesterolnih estrov in velikosti. Poznamo naslednje vrste lipoproteinov:

- Hilomikroni: nastanejo v celicah tankega črevesja iz ponovno sintetiziranih triacilglicerolov po njihovi absorpciji iz lumna črevesja. V njihovi sredici se nahajajo triacilgliceroli in zaestreni holesterol. Njihova glavna funkcija je transport eksogenih triacilglicerolov po krvi do perifernih tkiv. Po prevzemu triacilglicerolov v ta tkiva, hilomikronske ostanke prevzamejo jetra.
- VLDL (lipoprotein zelo majhne gostote): sintetizira se v jetrih. Za razliko od hilomikronov, VLDL prenaša endogene triacilglicerole do perifernih tkiv.
- IDL (lipoprotein srednje gostote): nastanejo iz ostankov VLDL po hidrolizi triacilglicerolov. Večji delci potujejo nazaj v jetra, manjši delci pa pridobijo holesterolne estre in se spremenijo v LDL.
- LDL (lipoprotein majhne gostote): nastane v krvi iz IDL. Na svoji površini ima apolipoprotein B100 s pomočjo katerega se veže na površinske receptorje celic perifernih tkiv in z endocitozo vstopi vanje. V celici pride do hidrolize holesterolnih estrov in sproščanja prostega holesterola. LDL je tako glavni vir holesterola za celice izven jeter. Velik delež LDL prevzamejo tudi jetra, njegov višek v plazmi pa makrofagi.
- HDL (lipoprotein velike gostote): sintetizira se v celicah tankega črevesa in v jetrih. Po krvi potuje »nativni« HDL (HDL-3), ki spreminja svojo sestavo, in sicer lahko privzame prosti holesterol iz celičnih membran perifernih tkiv ali pa privzame

apolipoproteine in lipide s površine hilomikronov in VLDL med lipolizo. Tako se HDL-3 pretvori v večji, okrogli HDL-2. HDL iz krvi odstranijo hepatociti, lahko pa holesterolne estre iz HDL prevzame VLDL, zato iz njega nastane IDL. HDL-2 prevzamejo triacilgliceroli iz VLDL in se pretvorijo nazaj v HDL-3. Iz nekaterih IDL nastane LDL, ki ga skupaj z IDL prevzamejo hepatociti. Ta proces imenujemo obratni transport holesterola in preprečuje preveliko koncentracijo plazemskega holesterola (9).

1.3 MAŠČOBNE KISLINE

1.3.1 Splošno

Lipidi so naravno prisotne molekule, ki vključujejo veliko število različnih organskih komponent med katerimi najdemo maščobne kisline, monoacilglicerole, diacilglicerole, triacilglicerole, fosfolipide, ekozanoide, sterole, sterolne estre, karotenoide, vitamina A in E, maščobne alkohole in voske. Klasična definicija lipidov pravi, da so to spojine, ki so topne v organskih topilih. Novejša definicija pa jih opredeli kot hidrofobne ali amfifilne majhne molekule, ki so nastale s kondenzacijo tioestrov (maščobne kisline) in/ali izoprenskih enot (steroli) (10).

Maščobne kisline v človeški prehrani predstavljajo vir energije, pomembne pa so tudi zaradi metabolne (delujejo kot signalne molekule, vpletene v regulacijo ekspresije genov) in strukturne vloge (komponente celične membrane) (11).

Maščobne kisline večinoma najdemo v obliki triacilglicerolov, kjer so na molekulo glicerola pripete običajno tri različne maščobne kisline. Sestavljene so iz sodega števila ogljikovih atomov z nerazvejeno verigo. Na eni strani verige se nahaja metilna skupina (n- ali omega (ω) konec), na drugi pa karboksilna skupina (delta (Δ) konec). V hrani so večinoma prisotne maščobne kisline s 14, 16, 18, 20 ali 22 ogljikovimi atomi. Kratkoverižne maščobne kisline, kot sta npr. propanojska in butanojska kislina nastanejo v črevesju po fermentaciji z anaerobnimi bakterijami. Maščobne kisline so razdeljene v tri razrede glede na stopnjo nasičenosti. Poznamo nasičene maščobne kisline (ne vsebujejo dvojnih vezi), enkrat nenasičene maščobne kisline (ena dvojna vez) in večkrat nenasičene maščobne kisline (vsebujejo dve ali več dvojnih vezi). Dvojna vez ima za posledico nižjo temperaturo tališča in se običajno nahaja v *cis* konformaciji. Možna je tudi *trans*

konformacija maščobnih kislin, ki pa je v naravi redka. Maščobne kisline s *trans* konformacijo srečamo v mesu in mleku prežvekovalcev ali pa nastanejo s hidrogeniranjem nenasičenih olj (10, 11, 12).

1.3.2 Metabolizem maščobnih kislin

Človek na dan poje približno 85 gramov maščob, od tega je največ triacilglicerolov. Prebava maščob se začne že v ustih in želodcu z delovanjem lipaz, vendar je omejena zaradi slabe topnosti maščob. Ko maščobe pridejo v tanko črevo, jih tam žolčne kisline emulgirajo in tako nastane večje število manjših kapljic, ki so na voljo za encimsko razgradnjo. Pankreasna lipaza razgradi triacilglicerole na proste maščobne kisline in 2-monoacilglicerol, ki se nato ponovno formirajo v micelle z žolčnimi kislinami. Miceli interagirajo z mikrovili na sluznici enterocitov. Sledi difuzija maščobnih kislin in 2-monoacilglicerola v enterocite, medtem ko žolčne kisline ostanejo v lumnu črevesja. V enterocitih se iz 2-monoacilglicerola in prostih maščobnih kislin ponovno resintetizirajo triacilgliceroli, ki se skupaj z apoB, fosfolipidi in holesterolnimi estri zapakirajo v hilomikrone, ki se izločijo v limfo in preko nje sprostijo v krvni obtok. Hilomikroni v krvnem obtoku interagirajo s HDL in od njega pridobijo dva apolipoproteina, C in E. Apolipoprotein C na tarčnih celicah aktivira lipoprotein lipazo, ki presnovi triacilglicerole v proste maščobne kisline in glicerol. Maščobne kisline vstopijo v tkiva preko proteinskih transporterjev ter služijo kot vir energije oz. skladišče maščob. Sproščeni glicerol in ostanek hilomikrona se metabolizirata v jetrih. Intracelularno se maščobne kisline prenašajo vezane na proteine FABP (*fatty acid-binding proteins*). Proste maščobne kisline se v celici aktivirajo z acil-CoA, nato pa preko proteina ACBP (*acyl-CoA-binding protein*) prenesejo v mitohondrije ali peroksisome, kjer so podvržene β -oksidaciji, med katero se tvori energija v obliki ATP in toplote. Lahko pa se prenesejo tudi v endoplazemski retikulum, kjer sledi esterifikacija v različne vrste lipidov (13, 14).

1.3.3 Vpliv strukture maščobnih kislin na sestavo plazemskih lipidov

Splošno znano je, da maščobne kisline vplivajo na raven serumskega holesterola. O tem obstajata dve hipotezi, in sicer sterolna ter maščobnokislinska. Maščobnokislinska hipoteza govori, da je sposobnost rastlinskih maščob, da spremenijo koncentracijo holesterola v serumu, odvisna od strukture maščobnih kislin, ki jih vsebujejo. Pomembni so prisotnost, pozicija, število, *cis/trans* izomerija dvojnih vezi in dolžina verige maščobne kisline.

Sterolna hipoteza pa pravi, da hrana, ki vsebuje majhne količine sterolov, lahko vpliva na raven serumskega holesterola (15).

Nasičene maščobne kisline

Glavni vir nasičenih maščobnih kislin so živalske maščobe (meso, mleko), hidrogenirana in nekatera neobdelana rastlinska olja (palmovo in kokosovo olje). Naše telo jih je sposobno samo sintetizirati iz ogljikovih hidratov preko lipogeneze. Nasičene maščobne kisline danes veljajo za slab vir prehranskih maščob, saj so dokazali, da lavrinska, miristinska in palmitinska kislina povečujejo plazemsko koncentracijo holesterola LDL. Stearinska kislina, ki je ravno tako nasičena maščobna kislina, pa na to koncentracijo nima vpliva. Priporočljivo je, da celoten vnos nasičenih maščobnih kislin ne preseže 10 % s prehrano vnesenih maščob in da zagotovimo zadosten vnos večkrat nenasičenih maščobnih kislin (11, 16).

Trans maščobne kisline

Največjo količino *trans* maščobnih kislin človek pridobi z uživanjem hidrogeniranih olj, v katerih je navadno 30 do 50 % *cis* dvojnih vezi enkrat in večkrat nenasičenih maščobnih kislin zamenjanih s *trans* konfiguracijo. Dokazali so, da *trans* maščobne kisline zvečajo LDL holesterol v večji meri kot nasičene maščobne kisline in znižajo raven HDL holesterola. Poleg naštetih učinkov pa naj bi *trans* maščobne kisline tudi zvišale raven vnetnih dejavnikov in vplivale na endotelijsko funkcijo. Izmed vseh maščobnih kislin ravno *trans* maščobne kisline predstavljajo največje tveganje za srčno-žilne zaplete, zato je priporočljiv dnevni vnos manj kot 1 % (5, 11).

Nenasičene maščobne kisline

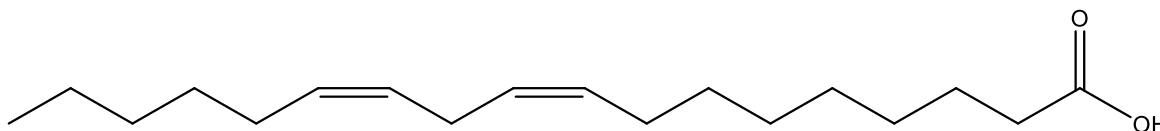
- Enkrat nenasičene maščobne kisline

Glavni viri enkrat nenasičenih maščobnih kislin so rastlinska olja, npr. olivno olje in oreški v katerih je ena izmed glavnih komponent oleinska kislina. V nekaterih literaturnih virih trdijo, da zamenjava nasičenih maščobnih kislin z enkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami, zmanjša tako koncentracijo LDL kot razmerje med celotnim in HDL holesterolom. Zamenjava ogljikovih hidratov z enkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami v prehrani naj bi zmanjšala koncentracijo VLDL in zvečala koncentracijo HDL holesterola. Količino vnosa enkrat nenasičenih maščobnih kislin izračunamo iz enačbe: enkrat

nenasičene maščobne kisline = celoten vnos maščob – nasičene maščobne kisline – večkrat nenasičene maščobne kisline – *trans* maščobne kisline. Vnos enkrat nenasičenih maščobnih kislin je tako odvisen od celotnega vnosa maščob in sestave le-teh (5, 11, 17).

- Večkrat nenasičene maščobne kisline

Večkrat nenasičene maščobne kisline imajo pomembno vlogo v vzdrževanju normalnih fizioloških funkcij v človeškem telesu. Glavna predstavnika sta linolna in α -linolenska kislina, ki sta esencialni maščobni kislini, saj ju človeško telo ne more sintetizirati. Linolna kislina (slika 2) je dvakrat nenasičena maščobna kislina, ki se lahko po zaužitju z Δ -6-desaturazo presnovi v γ -linolensko kislino, le-ta se nato z elongazo presnovi v dihomo- γ -linolensko kislino. Ta je substrat za Δ -5-desaturazo. Po metabolični pretvorbi nastane ena najpomembnejših maščobnih kislin omega-6, arahidonska kislina, iz katere nastanejo provnetni eikozanoidi. Zaradi pomanjkanja encima omega-3 desaturaze, človeško telo ne more pretvoriti linolne kisline v α -linolensko kislino, kot jo lahko rastline. α -Linolenska kislina se preko istih encimov kot linolna kislina presnovi v eikozapentaenojsko kislino, iz katere nato nastanejo protivnetni eikozanoidi. Eikozapentaenojska kislina se lahko naprej presnovi v še dve pomembni maščobni kislini, in sicer v dokozapentaenojsko kislino in preko nje v dokozahexaenojsko kislino. Dokozahexaenojska kislina ima pomembno vlogo v kognitivnih funkcijah, saj deluje nevrotrofično in nevroprotektivno. Izboljševala naj bi funkcije celičnih membran in celično signaliziranje (18, 19, 20).



Slika 2: Linolna kislina

Linolna kislina znižuje raven celokupnega in LDL holesterola. Raziskave na živalih so pokazale, da linolna kislina poveča očistek LDL holesterola preko jetrnih receptorjev in tako pride do zmanjšanja njegove sinteze. Nekatere raziskave kažejo, da uživanje maščob, bogatih z linolno kislino, tudi izboljša inzulinsko rezistenco, zmanjša pojavnost sladkorne bolezni in zmanjša krvni pritisk. Priporočljiva dnevna količina zaužitih maščobnih kislin omega-6 je od 2,5 do 9 % od celotnega vnosa kalorij (11, 18, 21).

Vendar pa ima lahko pretirano uživanje linolne kisline tudi negativne posledice. Linolna kislina se pretvori v arahidonsko kislino in ta naprej v prostanoide (prostaglandin PGE2,

prostaciklin PGI₂ in tromboksan TXA₂) s ciklooksigenazo ter z lipoksigenazo v levkotriene (LTB₄, LTC₄ in LTE₄). Nastali eikozanoidi iz arahidonske kisline so biološko aktivni že v majhnih količinah, v prevelikih količinah pa pripomorejo k večji agregaciji trombocitov, adheziji monocitov na žilne stene, dilataciji žil, večjemu krvnemu pritisku ter vnetnim in imunskim reakcijam (22).

Prisotnost α -linolenske kisline v telesu regulira sintezo derivatov linolne kisline in tako zmanjšuje prevelik vnetni odgovor z uravnavanjem razmerja med maščobnimi kislinami omega-6 in omega-3. Dokazali so, da imajo maščobne kisline omega-3 kardioprotektivno delovanje zaradi antiagregatornih, protivnetnih, antiaritmčnih in hipotrigliceremičnih učinkov. Metabolizem eikozapentaenojske kisline in dokozaheksaenojske kisline vodi do produkcije biološko manj aktivnih prostaglandinov (PGE₃, PGF₃ α), tromboksana (TXA₃) in levkotrienov (LTB₅, LTC₅ in LTE₅) in na tak način zmanjšuje vnetni odgovor. Splošno je sprejeto, da maščobne kisline omega-3 zmanjšajo koncentracijo triacilglicerolov in povečajo koncentracijo HDL holesterola (7, 19).

Ko interpretiramo sestavo različnih rastlinskih olj, je zelo pomembno upoštevati razmerje med maščobnimi kislinami omega-6 in omega-3. V današnji prehrani je to razmerje porušeno v korist maščobnih kislin omega-6 in znaša med 15 in 16,7. Ker na bolezen vpliva več dejavnikov, priporočljivo razmerje ni natančno določeno in se giblje med 1 in 4 (19).

1.4 FITOSTEROLI

1.4.1 Splošno

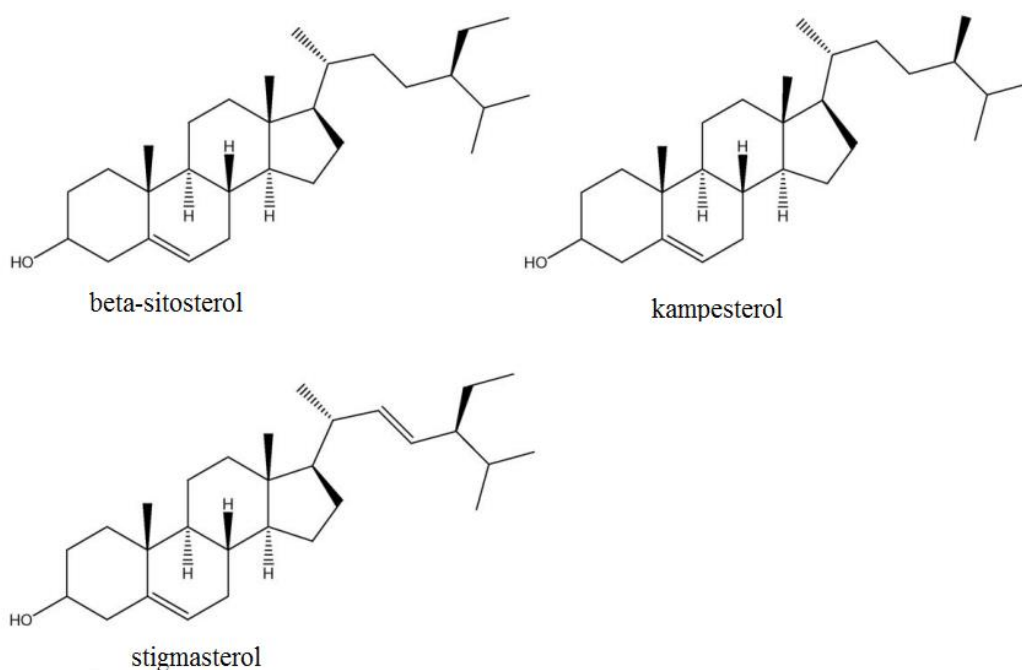
Fitosteroli predstavljajo največji del neumiljivih snovi v rastlinskih oljih. V rastlinah igrajo pomembno vlogo, saj stabilizirajo fosfolipidni dvosloj v celičnih membranah, podobno kot holesterol v živalskih celicah. Po svoji strukturi so triterpeni z 28 ali 29 ogljikovimi atomi. Stranska veriga je sestavljena iz 9 ali 10 ogljikovih atomov, vsebuje lahko dvojno vez. Delimo jih na sterole in stanole. Stanoli za razliko od sterolov nimajo dvojne vezi v obroču. V rastlinah se nahajajo v prosti obliki ali kot konjugati, pri katerih je 3 β -hidroksilna skupina zaestrena z maščobno kislino ali hidroksicimetno kislino ali glikozilirana z heksozo (običajno je to glukoza) ali z maščobnim estrom acil heksoze.

Fitosterole v obliki glikozidov najpogosteje najdemo v žitaricah, medtem ko v rastlinskih oljih najdemo predvsem prosto ter zaestreno obliko (23, 24).

1.4.2 Sinteza fitosterolov v rastlinah

Sinteza vseh triterpenov se začne z redukcijo HMG-CoA v mevalonat. Šest molekul mevalonata se nato združi v dve molekuli farnezil difosfata, ki se združita v molekulo skvalena, ki je prekursor tako holesterola kot rastlinskih sterolov. Nato sledi ciklizacija skvalena s cikloartenol sintazo do cikloartenola, ki ga najdemo le v rastlinah. Metilna skupina se na C-24 uvede z encimom sterol-metiltransferazo 1, medtem ko encim ciklopropil-sterol-izomeraza poskrbi za odprtje ciklopropanskega obroča. Nadaljnje encimske reakcije privedejo do tvorbe rastlinskih triterpenov kot so fitosteroli in triterpensi alkoholi (23, 25).

Izmed vseh fitosterolov v največjem deležu najdemo β -sitosterol (24- α -etilholesterol), ki predstavlja 90 % vseh sterolov v rastlinah ter kampesterol (24- α -metilholesterol) in stigmasterol (Δ^{22} , 24- α -etilholesterol) (slika 3) (24).

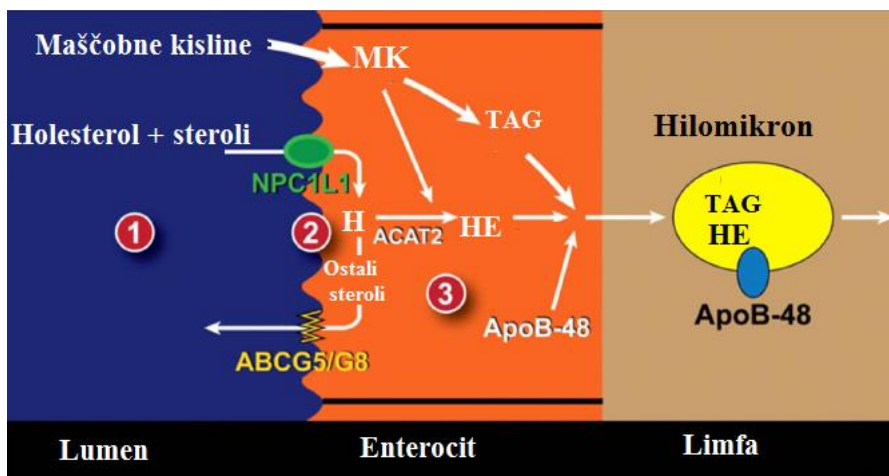


Slika 3: Trije najpogostejši fitosteroli, ki jih najdemo v rastlinah, in sicer β -sitosterol, kampesterol in stigmasterol.

1.4.3 Metabolizem fitosterolov

Najpomembnejši naravni vir fitosterolov v človeški prehrani so žitarice, nerafinirana rastlinska olja, stročnice, v zelenjavi in sadju jih je manj (24). Čeprav so fitosteroli strukturno zelo podobni holesterolu, se obseg njihove absorpcije in metabolizem zelo razlikujeta. Dnevno zaužijemo od 200 do 500 mg holesterola in od 200 do 400 mg fitosterolov. Medtem, ko se holesterol absorbira v 55 do 60 %, je absorpcija fitosterolov le 2 do 5 %. Večina absorbiranih fitosterolov se hitro izloči skozi jetra, tako da je koncentracija sterolov v krvi med 7 in 24 $\mu\text{mol/l}$, kar je petstokrat manjša koncentracija, kot je koncentracija holesterola. Absorpcija fitosterolov je odvisna od narave stranske verige na C-24, saj bolj kot je ta kompleksna, večja je hidrofobnost in manjša je absorpcija. Fitostanoli se absorbirajo v še manjšem deležu kot fitosteroli (25).

Potek absorpcije fitosterolov je podoben kot pri holesterolu. Zaradi lipofilne narave se morajo fitosteroli pred absorpcijo solubilizirati v obliki mešanih micelov, ki nato interagirajo s sčerkastim obrobkom in tako olajšajo prevzem sterolov v enterocite. Točnega mehanizma še niso v celoti pojasnili, jasno pa je, da tako holesterol kot fitosteroli za svojo absorpcijo potrebujejo transmembranski transportni protein NPC1L1 (*Niemann-Pick C1-Like1 protein*) (slika 4).



Slika 4: Shematski prikaz absorpcije holesterola in drugih neholesterolnih sterolov. Okrajšave: H – holesterol, HE – holesterolni ester, TAG – triacilglicerol. Prirejeno po (27).

Fitosteroli so slab substrat za acil holesterol acil transferazo (ACAT), zato se po absorpciji le majhen delež zaestri, zapakira v hilomikrone in izloči v limfatični sistem. Nezaestreni fitosteroli in holesterol se transportirajo nazaj v lumen črevesja z aktivnim transportom, proteinoma ABCG5 in ABCG8, ki spadata v družino proteinov ABC (*ATP-binding*

cassette). Neabsorbirani fitosteroli lahko po bakterijski transformaciji v lumnu črevesja tvorijo metabolite kot sta koprostanol in koprostanon. Po prevzemu fitosterolov v jetra, se le-ti vgradijo v VLDL ali izločijo v žolč. Zaradi manjše afinitete ACAT do β -sitosterola, ima ta večji jetrni očistek in večje izločanje kot pa kampesterol (7, 27).

1.4.4 Mehanizem delovanja

Tako steroli kot stanoli zmanjšujejo koncentracijo LDL holesterola, brez vpliva na koncentracijo HDL holesterola in triacilglicerole v krvi. Fitosteroli dokazano zmanjšajo absorpcijo tako prehranskega kot jetrnega holesterola iz intestinalnega trakta za 30 do 50 %. S holesterolom tekmujejo za vgradnjo v mešane micelle ter ga tako zamenjajo, kar vodi do zmanjšane topnosti holesterola in hidrolize holesterolnih estrov v tankem črevesju. Drugi potencialni mehanizem delovanja je, da fitosteroli inducirajo izražanje transporterjev ABC, ki pa niso sposobni razlikovati med holesterolom in steroli, kar ima za posledico povečano izločanje holesterola iz celice. Fitosteroli naj bi tudi zavirali aktivnost ACAT, zaradi česar pride do zmanjšanja privzema holesterola. Zaviranje absorpcije holesterola privede do relativnega pomanjkanja holesterola, ki ima za posledico zvišano regulacijo biosinteze holesterola in aktivnost receptorjev LDL pri prevzemanju holesterola. Raziskave so pokazale, da se pri rednem jemanju fitosterolov, biosinteza prekurzorjev holesterola poveča do 46 %, ekspresija receptorjev LDL za 25 do 45 %, produkcija VLDL v jetrih se zmanjša za 20 %, plazemska koncentracija LDL pa za 20 % (7, 28).

1.4.5 Vpliv na lipofilne antioksidante

Tako kot lahko fitosteroli zamenjajo holesterol v micelih, ravno tako lahko zamenjajo druge lipofilne molekule, kot so npr. lipofilni antioksidanti. Raziskave so pokazale, da fitosteroli zmanjšajo plazemske koncentracije β -karotena za 25 %, α -karotena za 10 % in vitamina E za 8 %. Mehanizma delovanja, ki privede do tega, še niso v celoti razjasnili, predvidevajo pa, da naj bi fitosteroli zmanjšali vgraditev teh komponent v micelle (28).

1.5 SKVALEN

Kot del neumiljive frakcije rastlinskih olj velja omeniti tudi skvalen, ki je prekurzor tako v sintezi holesterola kot rastlinskih sterolov. Je polinenasičen triterpen, ki vsebuje 6 izoprenskih enot. V naravi se v največjih količinah nahaja v olju jeter morskega psa in olivnem olju, ki lahko vsebuje do 0,7 % skvalena. Ljudje skvalen sintetiziramo v jetrih in koži (v koži predstavlja eno izmed pomembnejših komponent sebuma). Raziskave na živalih so dokazale, da skvalen inhibira HMG-CoA-reduktazo, ključni regulatorni encim v

sintezi holesterola in tako zmanjšuje njegovo koncentracijo. Po drugi strani pa raziskave na ljudeh, dajejo nejasne rezultate glede njegovega vpliva na koncentracijo lipidov v krvi (29, 30).

1.6 VITAMIN E

Vitamin E spada v družino lipofilnih antioksidantov, ki nastane z biosintezo v rastlinah. Vključuje štiri oblike tokoferolov (α -, β -, γ -, δ - oblika) in štiri oblike tokotrienolov (α -, β -, γ -, δ - oblika), ki se med seboj razlikujejo v nasičenosti stranske verige. Izmed vseh oblik je najpogostejši α -tokoferol, ki izkazuje največjo biološko aktivnost. Kot antioksidant vitamin E deluje v fosfolipidnih dvoslojnih celičnih membran, kjer preprečuje oksidacijo membranskih lipidov. Po absorpciji v prebavnem traktu se vitamin E transportira v hilomikronih po sistemskem krvnem obtoku. Pod vplivom lipoprotein-lipaze, del tokoferolov prevzamejo ekstrahepatična tkiva, ostanek pa potuje v jetra. Tu se s transportnim proteinom za α -tokoferol večina α -tokoferola vgradi v VLDL. Kljub temu, da tudi druge oblike tokoferola pridejo v krvni obtok, se le-te hitreje presnovijo in izločijo iz telesa, tako da v telesu prevladuje α -tokoferol (2, 31).

Dokazali so, da ima vitamin E zaščitno vlogo pri razvoju ateroskleroze in preprečevanju srčno-žilnih bolezni. Preprečeval naj bi oksidacijo LDL. Vpliva na različne celice, ki so vpletene v proces ateroskleroze. V nevtrofilcih zmanjša sintezo levkotrienov, zmanjša adhezijo monocitov, inhibira proliferacijo gladkomišičnih celic ter adhezijo in agregacijo trombocitov. V endotelijskih celicah poveča izražanje fosfolipaze A₂ in ciklooksigenaze. Kardioprotektivna funkcija vitamina E je tako posledica večjega sproščanja prostaglandina I₂. Zmanjša pa tudi endotelijsko ekspresijo adhezijskih molekul, inducirano z oksidiranim LDL, ter potencira sintezo prostaciklina (8, 32).

2. NAMEN DELA

Namen našega magistrskega dela bo ugotavljanje prisotnosti maščobnih kislin in neumiljivih snovi ter antioksidativne aktivnosti lipovega olja, ki ga bomo ekstrahirali iz semen lipe in lipovca. Vzorce semen bomo nabrali na različnih lokacijah po Sloveniji.

Olje iz semen bomo pridobili z ekstrakcijo z organskim topilom. Postopek ekstrakcije bomo najprej optimizirali. Maščobnokislinsko sestavo bomo določali s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo. Maščobne kisline bomo najprej pretvorili v metilne estre z *in situ* metodo derivatizacije. V nadaljevanju bomo po postopku iz Evropske farmakopeje iz olja ekstrahirali neumiljive snovi in jih pred analizo s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo, pretvorili v sililne derivate. Antioksidativno aktivnost olja bomo ugotavljali z optimizirano metodo DPPH .

Skušali bomo ugotoviti, ali se olja v analiziranih lastnostih med seboj razlikujejo glede na rastlinsko vrsto in kraj rastišča ter kolikšne so razlike. Poskušali bomo najti povezavo med antioksidativno aktivnostjo, koncentracijo tokoferolov, fitosterolov, skvalena in fitola ter deležem linolne kisline. Dobljene podatke bomo primerjali z literaturnimi podatki in poskušali ugotoviti, ali ima še katero drugo rastlinsko olje podobno sestavo kot lipovo olje. Proučili bomo tudi za kakšen namen bi lipovo olje lahko uporabljali.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Rastlinski material

Vzorce semen vrst *Tilia cordata* in *Tilia platyphyllos* smo nabrali v različnih krajih po Sloveniji (preglednica I). Vse vzorce smo nabrali oktobra 2014, jih na zraku posušili in shranili v suhem, temnem in hladnem prostoru do ekstrakcije olja. Razliko med semeni lipa in lipovca prikazuje slika 5.

Preglednica I: Kraj nabiranja in rastlinska vrsta pripadajočega vzorca

Številka vzorca	Kraj nabiranja	Rastlinska vrsta
1	Sedovec	Lipa
2	Črni Kal	Lipa
3	Litostroj (Ljubljana)	Lipa
4	Škofja Loka	Lipa
5	Ilirska Bistrica	Lipa
6	Žablje	Lipovec
7	Vrhnik 1	Lipa
8	Dravograd	Lipovec
9	Semič	Lipa
10	Vrhnik 2	Lipa
11	Brežice	Lipovec
12	Brezje	Lipovec
13	Lendava	Lipa
14	Vrhavč	Lipovec
15	Črna na Koroškem	Lipovec
16	Nova Gorica	Lipa
17	Novo mesto	Lipovec
18	Sežana	Lipovec



Slika 5: Leva slika predstavlja semena lipe s tršo ovojnico, desna slika pa semena lipovca z bolj krhko ovojnico.

3.1.2 Kemikalije in reagenti

1. Ekstrakcija lipovega olja

- Heksan, p. a., Panreac
- Izopropanol, p. a., Carlo Erba

2. Določanje maščobnokislinske sestave

- Diklorometan, p. a., Panreac
- Metanol, p. a., Gram Mol
- Natrijev hidroksid, p. a., Riedel-de Haën
- Heksan, p. a., Panreac
- 14-odstotni borov trifluorid v metanolu, p. a., Sigma-Aldrich
- Destilirana voda, p. a., Fakulteta za farmacijo
- Zmes metilnih estrov maščobnih kislin F.A.M.E. Mix C4-C24, Supelco, ZDA
- Zmes n-alkanov C7-C33, Restec

3. Določanje neumiljivih snovi

- Kalijev hidroksid, p. a., Sigma-Aldrich
- Holesterol, p. a., Sigma-Aldrich
- Natrijev klorid, p. a., Carlo Erba Reagents
- 96-odstotni etanol, p. a., Carlo Erba Reagents
- Destilirana voda, p. a., Fakulteta za farmacijo
- Fenolftalein, p. a., Riedel-de Haën
- Dietileter, p. a., Sigma-Aldrich
- N-heptan, p. a., Carlo Erba
- HMDS + TMCS + piridin (3 : 1 : 9) (Sylon), Supelco

4. Določanje antioksidativnega delovanja

- Difenilpikrilhidrazilni radikal, Fluka

- Galna kislina, Fluka
- Metanol, p. a., Gram Mol
- 2-butanon, p. a., Merck

3.1.3 Oprema

- Precizna tehtnica, Sartorius (Göttingen, Nemčija)
- Precizna tehtnica, Kern PCB (Balingen, Nemčija)
- Analizna tehtnica, Mettler Toledo (Zürich, Švica)
- Stresalnik Vibromix, Tehtnica (Železniki, Slovenija)
- Centrifuga Centric 150 in Centric 400R, Tehtnica (Železniki, Slovenija)
- Ultrazvočna kadička, Bandelin Sonorex Digitec (Berlin, Nemčija)
- Rotavapor, Büchi Rottavapor R-200 (Meierseggsstrasse, Švica); hladilnik, Julabo F250 (Seelbach, Nemčija)
- Spektrofotometer UV/VIS, Nanocolor UV/VIS, Macherey-Nagel (Düren, Nemčija)
- Analizator GC-MS, GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu Corporation (Kyoto, Japonska)
- Računalniški program: GCMS Solution 2.3, Shimadzu Corporation (Kyoto, Japonska)
- Podatkovna knjižnica: NIST11 in FFNSC2, Shimadzu Corporation (Kyoto, Japonska)
- Kolona: kapilarna kolona Rtx-1 F&F 100 % dimetilpolisiloksan, 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm
- Mlinček za semena, IKA A10 (Staufen, Nemčija)
- Bučke (25 ml, 50 ml, 100 ml)
- Mikrofilter Minisart 0,22 µm, Sartorius (Göttingen, Nemčija)
- Plastične epruvete
- Merilni valj, čase, erlenmajerice, liji
- Kiveta
- Tehtalni čolniček, spatula
- Mikroeprevete (2 ml)
- Avtomatska pipeta (10 µl, 200 µl, 1000 µl), Biohit-Proline (Helsinki, Finska)
- Nastavki za pipeto
- Vodna kopel, grelnik, kalota, magnetno mešalo, magnet

- Vodni hladilnik
- Prižema, mufa, stojalo
- Lij ločnik
- Plastični plovec

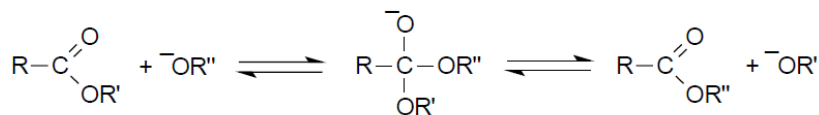
3.2 METODE

3.2.1 *In situ* derivatizacija maščobnih kislin

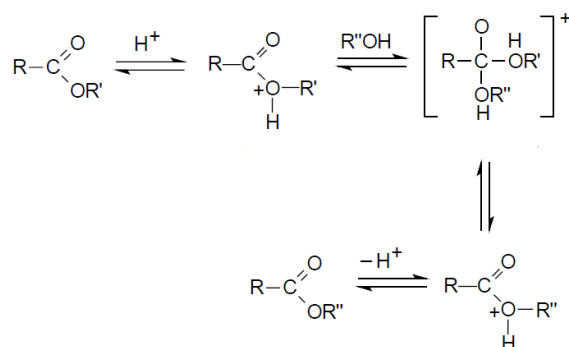
Kombinacija plinske kromatografije, sklopljene z masno spektroskopijo (GC-MS), je najbolj uporabljana metoda za analizo lipidov. Pred analizo maščobne kisline pretvorimo v derivate z nižjo temperaturo vrelišča, običajno so to metilni estri. Z derivatizacijo pa tudi povečamo resolucijo ter zmanjšamo tvorbo repov (*tailing*) (33, 34).

Metilne estre maščobnih kislin lahko pripravimo z reakcijo saponifikacije, ki ji sledi kislinsko ali bazično katalizirana reakcija estrenja. Glede na to, da je potrebno po saponifikaciji ločiti proste maščobne kisline in neumiljivi del ter da celoten postopek poteka dolgo časa, smo se odločili, da uporabimo *in situ* metodo derivatizacije maščobnih kislin po Parku in Goinsu. Gre za direktno preestrenje lipidov, kjer alkoholiza in zaestrenje poteceta v enem koraku. S tem skrajšamo čas priprave derivatov, zmanjšamo porabo topil ter povečamo izkoristek derivatizacije. Reakcija preestrenja je lahko bazično (slika 6) ali kislinsko (slika 7) katalizirana. Reagenti, ki jih običajno uporabljamo pri bazično katalizirani reakciji, so NaOCH_3 in NaOH v MeOH , pri kislinsko kataliziranem preestrenju pa HCl , H_2SO_4 ali BF_3 v MeOH . Bazično katalizirano preestrenje potече hitro pri sobni ali rahlo povišani temperaturi, medtem ko kislinsko katalizirana reakcija potrebuje več časa ter močno segrevanje (100°C). Z bazičnimi katalizatorji, za razliko od kislinskih katalizatorjev, le preestrimo že zaestrene maščobne kisline, ne pa tudi prostih (33, 34, 35).

Pri pripravi vzorcev smo najprej s CH_2Cl_2 in NaOH v MeOH preestriili že zaestrene maščobne kisline, nato pa smo dodali še BF_3 v MeOH . Poteklo je še preestrenje preostalih zaestrenih ter prostih maščobnih kislin. Poudariti velja, da pri teh reakcijah ne gre za klasično reakcijo saponifikacije, saj je voda odsotna.



Slika 6: Reakcijska shema bazično kataliziranega preestrenja maščobnih kislin. Prirejeno po (36).



Slika 7: Reakcijska shema kislinsko kataliziranega preestrenja maščobnih kislin. Prirejeno po (36).

3.2.2 Derivatizacija neumiljivih snovi

Neumiljive snovi pred analizo z GC-MS pretvorimo v sililne ali acetatne derivate. Odločili smo se za reakcijo sililiranja, saj je najpogosteje uporabljena metoda derivatizacije za analizo neumiljivih snovi. V reakciji pride do nukleofilnega napada, kjer se atom vodika v skupinah -OH, -COOH, -NH₂, -SH in =NH zamenja z alkilsililno skupino (najpogosteje trimetilsililno). Z zamenjavo atomov dobimo manj polarne, bolj hlapne in bolj temperaturno obstojne molekule ter posledično bolj simetrične in ravne vrhove. Poleg tega so sililni reagenti kompatibilni z večino detekcijskih sistemov (37).

3.2.3 Plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo

Plinska kromatografija je ena izmed separacijskih metod, kjer se molekule uparjenega analita porazdeljujejo med inertno plinsko mobilno fazo (npr. helij, dušik, vodik) in stacionarno fazo, ki je lahko v trdnem ali tekočem stanju. Najpogosteje uporabljamo tekočo stacionarno fazo, nanesejo na steno kapilarne kolone. Posledica različnega zadrževanja molekul analita na koloni, so različni retencijski časi, ki jih primerjamo z retencijskimi časi referenčnih spojin ter tako identificiramo komponente analita. Plinska kromatografija je pogosto sklopljena z masno spektrometrijo (38).

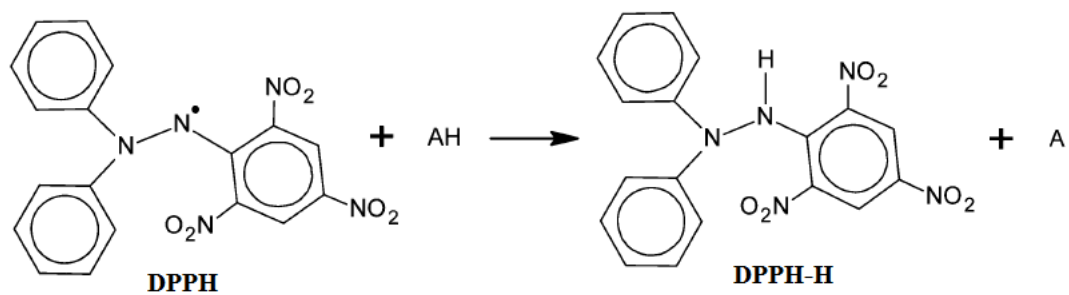
Da lahko detektiramo komponente vzorca, mora biti le-ta najprej izpostavljen ionizacijskemu viru, ki povzroči ionizacijo molekul. Vsi ioni nato potujejo do masnega analizatorja, kjer se ločijo glede na razmerje med maso in nabojem (*m/z ratio*). Glede na to,

ali je vzorec v plinastem ali tekočem oz. trdnem stanju, uporabimo različne ionizacijske tehnike. Za plinaste vzorce uporabljamo elektronsko ionizacijo (EI – *electron ionization*), kemijsko ionizacijo (CI – *chemical ionization*) in ionizacijo v električnem polju (FI – *field ionization*). Po ionizaciji molekule razpadejo na različne fragmente, ki nato potujejo skozi masni analizator. Poznamo več vrst analizatorjev, med katerimi največ uporabljamo kvadrupolni masni analizator, analizator TOF (*time of flight*) in ionsko past (*ion trap*). Ioni z določenim razmerjem m/z pripotujejo na detektor, ki jih pretvori v ustrezen signal. Kot detektor največ uporabljamo elektronsko fotopomnoževalko, ki pozitivne ione pretvori v elektrone oz. električni signal. Ojačan signal nato potuje na računalnik, kjer se obdeli, in kot končni rezultat dobimo masni spekter (39, 40).

3.2.4 Metoda DPPH za določanje antioksidativne aktivnosti

V rastlinskem materialu najdemo polifenolne molekule, karotenoide, vitamina C in E, ki imajo sposobnost lovljenja radikalov in tako delujejo antioksidativno. Metoda DPPH je ena najpogostejše uporabljenih metod za določanje antioksidativne aktivnosti, predvsem zaradi hitre, enostavne in poceni izvedbe.

Radikal DPPH ali 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil je stabilen dušikov radikal, v katerem je prosti elektron delokaliziran po celotni molekuli. Delokalizirani elektron preprečuje dimerizacijo molekule DPPH ter ji daje značilno temno-vijoličasto obarvanje z absorpcijskim maksimumom od 515 do 520 nm. Ob prisotnosti antioksidanta kot donorja vodikovega atoma, radikal DPPH pride v svojo reducirano obliko, molekulo hidrazina z blede rumeno barvo (slika 8). Večja kot je antioksidativna aktivnost, večji je padec absorbance, ki ga zaznamo spektrofotometrično. Pri reakciji zreagirata dve molekuli DPPH radikala z eno molekulo donorja vodikovega atoma. Metoda ni specifična za posamezno antioksidativno komponento, ampak nam daje podatek o celotni antioksidativni aktivnosti vzorca. Metodo DPPH lahko uporabimo v vodnih in nepolarnih organskih topilih ter tako določimo hidrofilne in lipofilne antioksidante. Kljub temu, da metodo široko uporabljamo, ni enotno validirana in standardizirana, zato tudi težko primerjamo rezultate med različnimi laboratoriji zaradi različnih inkubacijskih časov, uporabljenih topil, pH-ja in različnih standardov. Druga slabost te metode je ta, da lahko nekatere komponente vzorca, kot so npr. karotenoidi, ravno tako absorbirajo pri valovni dolžini merjenja absorbance (41, 42).



Slika 8: Reakcija radikala DPPH z antioksidantom. Po reakciji DPPH preide v reducirano, neradikalno obliko. Prirejeno po (41).

4. EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 EKSTRAKCIJA OLJA

Po začetni optimizaciji ekstrakcije smo lipovo olje pridobili na sledeč način. Glede na to, da se lipova semena nahajajo v trdi semenski lupini, smo morali najprej streti lupino s kladivom in iz nje odstraniti semena, ki smo jih nato zmleli v laboratorijskemu mlinčku. V erlenmajerico smo poleg zmletih semen dodali ustrezno količino heksana (razmerje droga : topilo = 1 : 3) ter zmes za 10 minut izpostavili ultrazvoku. Ekstrakcijsko zmes smo nato prelili v plastične epruvete ter centrifugirali 3 minute pri 1500 obratih. Supernatant smo prefiltrirali skozi 0,22-mikrometrski filter in rotavapirali, da je ves heksan odparel. Zmletim semenom smo ponovno dodali enako količino topila in celoten postopek ponovili še trikrat. Pridobljena olja iz vseh štirih ekstrakcij smo združili, prepihali z argonom ter shranili v hladilniku, da smo preprečili oksidativno kvarjenje (slika 9).



Slika 9: Vzorci lipovega olja

4.2 DOLOČANJE MAŠČOBNOKISLINSKE SESTAVE

Olja smo pred nadaljnjo obdelavo vzeli iz hladilnika, da so dosegla sobno temperaturo. V mikrocentrifugirko smo natehali 10 mg olja, dodali 10 μ l diklorometana in 200 μ l 0,5 M NaOH v MeOH, ki smo ga pripravili z raztapljanjem 0,5 g NaOH v 25 ml MeOH. Reakcijsko zmes smo 10 minut segrevali v vodni kopeli na 90 °C in jo nato ohladili. Pri nekaterih vzorcih se je pojavila bela oborina, ki pa je po dodatku 200 μ l 14-odstotnega BF₃ v metanolu izginila. Mikrocentrifugirko smo ponovno za 10 minut položili v vodno kopel. *In situ* derivatizaciji je nato sledila še ekstrakcija estrov maščobnih kislin. Ko so se vzorci ohladili na sobno temperaturo, smo v mikrocentrifugirko dodali 200 μ l destilirane vode in 1 ml heksana. 1 minuto smo zmes močno ročno stresali in nato pustili toliko časa, da sta se vodna in organska faza ločili. Vrhunjo, organsko fazo smo nato prenesli v vialo za analizo z GC-MS (slika 10).

Kromatografske razmere med analizo:

- Nosilni plin: helij
- Pretok plina: 1 ml/min (konstantna hitrost)

- Temperatura injektorja: 250 °C
- Način injiciranja: »split« (1:100)
- Volumen injiciranja: 1 µl
- Temperaturni program: začetna temperatura 160 °C, 160 °C → 250 °C (3 °C/min)
- Temperatura ionskega izvora: 200 °C
- Temperatura vmesnika: 280 °C
- Napetost na detektorju: 1 kV
- Energija ionizacije: 70 eV
- Frekvenca zajemanja podatkov: 5 Hz
- Celoten čas analize: 30 min
- Vklon filameta: pri 2 min
- Začetek snemanja: pri 2,5 min
- Razpon snemanja RMM: 35-500



Slika 10: Analizator GC-MS, uporabljen za analizo

4.3 EKSTRAKCIJA NEUMILJIVIH SNOVI

Ekstrakcijo smo izvedli po postopku iz Evropske farmakopeje (Ph. Eur. 8.0). Olje smo natehtali v 250-mililitrsko bučko in dodali 20 ml 2 M KOH. S 96-odstotnim etanolom smo razredčili do 250 ml. V reakcijsko zmes smo dodali tudi 1 mg holesterola, ki je služil kot interni standard. Zmes smo segrevali pod refluksom z mešanjem 1 uro pri temperaturi okoli 70 °C. Po 1 uri smo reakcijsko zmes ohladili na sobno temperaturo ter prenesli v lij ločnik. Bučko smo sprali s 100 ml destilirane vode ter tudi to prenesli v lij ločnik. Dodali smo 100 ml dietiletra ter počasi stresali. Vodno fazo smo odlili, etno pa zbirali v ločeno čašo. Z vodno fazo smo postopek ekstrakcije s 100 ml dietiletra ponovili še dvakrat.

Po prvi ekstrakciji z dietiletrom se je pojavila emulzija. Ker bi se fazi predolgo ločevali, smo dodali žličko natrijevega klorida in pomešali. Emulzija je izginila. Vse etne faze smo nato združili v liju ločniku, ki je vseboval 40 ml vode. Zmes smo pretresli in vodno fazo

zavrgli. Etrno fazo smo še dvakrat sprali s 40 ml vode. Nato smo etrno fazo trikrat sprali z etanolno raztopino KOH (30 g/l). Nato smo etrno fazo večkrat spirali s 40 ml vode, dokler vodna faza ni bila več alkalna na fenolftalein (preskok iz rožnate v brezbarvno). Etrno fazo smo prenesli v bučko, lij ločnik sprali z majhno količino dietiletra in z rotavapiranjem odpareli topilo. Tako pridobljene neumiljive snovi prikazuje slika 11.



Slika 11: Neumiljive snovi lipovega olja

4.4 UGOTAVLJANJE NEUMILJIVIH SNOVI

V 1,5-mililitrsko mikrocentrifugirko smo natehtali 5 mg vzorca. Dodali smo 50 μ l reagenta, ki je bil zmes HMDS, TMCS in piridina. Reakcijsko zmes smo dobro premešali in nato centrifugirali 5 minut pri 13 000 obratih. Zmes smo nato 30 minut segrevali v vodni kopeli pri 60 °C. Nato smo počakali 5 minut, da se je reakcijska zmes ohladila. Dodali smo 950 μ l heptana, ponovno dobro premešali in centrifugirali enako kot prej. Po centrifugiranju smo odpipetirali 900 μ l vzorca v vialo za analizo z GC-MS.

Kromatografske razmere med analizo:

- Nosilni plin: helij
- Pretok plina: 1 ml/min (konstantna hitrost)
- Temperatura injektorja: 300 °C
- Način injiciranja: »split« (1:100)
- Volumen injiciranja: 1 μ l
- Temperaturni program: začetna temperatura 200°C, 200 °C → 270 °C (5 °C/min), 270 °C (56 min)
- Temperatura ionskega izvora: 200 °C
- Temperatura vmesnika: 300 °C
- Napetost na detektorju: 1 kV
- Energija ionizacije: 70 eV

- Frekvenca zajemanja podatkov: 5 Hz
- Celoten čas analize: 70 min
- Vklon filameta: pri 2,5 min
- Začetek snemanja: pri 3 min
- Razpon snemanja RMM: 50-600

4.5 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

Najprej smo pripravili raztopino radikala DPPH v 50-odstotnem 2-butanonu v MeOH (0,04 mg/ml). Ker je raztopina reagenta občutljiva na svetlobo in posledično nestabilna, smo jo pripravili sveže in jo shranjevali zaščiteno pred svetlobo. Kot kontrolni vzorec smo uporabili raztopino galne kisline v 50-odstotnem 2-butanonu v MeOH. Naš slepi vzorec je bil 50-odstotni 2-butanon v MeOH. Vzorce olj za določanje antioksidativne aktivnosti smo pripravili tako, da smo v 2-mililitrsko mikrocentrifugirko natehtali 5 mg olja. Nato smo dodali 1 ml raztopine radikala in dobro premešali. Mikrocentrifugirko smo ovili v aluminijasto folijo in jo tako zaščitili pred svetlobo. Zmes smo pustili reagirati 30 minut. Odmerili smo tudi po 40 μ l topila ter raztopine galne kisline, ravno tako dodali 1 ml raztopine DPPH, dobro premešali in pustili reagirati 30 minut, zaščiteno pred svetlobo. Po pretečenem času smo pomerili absorbanco raztopin na spektrofotometru pri 517 nm. Dolžina kivete je bila 1 cm. Za vsak vzorec smo naredili tri meritve in izračunali povprečno absorbanco. Iz povprečnih absorbanc smo izračunali antioksidativne potenciale (AOP) po enačbi 1:

$$\text{AOP (\%)} = ((A_{\text{sl}} - A_{\text{vz}}) / (A_{\text{sl}} - A_{\text{kontr}})) \times 100$$

Enačba 1: Antioksidativni potencial

kjer je

- A_{sl} – absorbanca slepega vzorca (topilo),
- A_{vz} – absorbanca vzorca,
- A_{kontr} – absorbanca kontrolnega vzorca (galna kislina).

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 EKSTRAKCIJA OLJA

5.1.1 Optimizacija ekstrakcije olja

Pri optimizaciji ekstrakcije olja smo preizkušali dve različni topili, čas, način ter število ekstrakcij z namenom pridobitve čim večje količine olja po čim krajšem in enostavnem postopku. Najstarejši tehnološki postopek pridobivanja olja iz semen je mehansko stiskanje semen, kjer jih stisnemo med npr. dvema valjema in tako povečamo površino, iz katere se lahko sprosti olje. Večje izkoristke pa daje kombinacija stiskanja semen in nato ekstrakcije z organskim topilom. Na podlagi literaturnih podatkov smo se odločili, da kot ekstrakcijski topili preizkusimo heksan in zmes heksana ter izopropanola v razmerju 3 : 2. Prav tako smo želeli preveriti, kako vpliva na izkoristek ekstrakcija ultrazvok ter ekstrakcija ob klasičnem mehanskem stresanju.

Zmleta semena smo ekstrahirali v heksanu in zmesi heksana in izopropanola s pomočjo ultrazvoka v ultrazvočni kadički in s stresanjem na stresalniku. Olje smo ekstrahirali različno dolgo, in sicer 10, 20, 60 in 120 minut (preglednica II). Olje smo od topila ločili z rotavapiranjem, dokler ni vso topilo odparelo.

Največji izkoristek ekstrakcije nam je dala ekstrakcija s heksanom. Olje, ki smo ga pridobili na ta način, je bilo bistro in rumene barve. Pri zmesi heksana in izopropanola smo opazili mlečno rumeno barvo olja, kar je verjetno posledica ekstrakcije tudi drugih, bolj polarnih snovi, ki se nahajajo v semenih, saj je izopropanol bolj polarno topilo (indeks polarnosti P' znaša 3,9), kot pa heksan, ki je eno izmed bolj nepolarnih topil (indeks polarnosti P' znaša 0,1) (43).

Ugoden vpliv ultrazvočne ekstrakcije na izkoristek je bil najbolj očiten pri 60-minutni ekstrakciji z zmesjo topil. Po 60 minutah prve ekstrakcije z ultrazvokom se je v primerjavi z ekstrakcijo s stresanjem ekstrahirala skoraj dvakratna količina olja. Mehanizem delovanja ultrazvoka temelji na akustični kavitaciji. V tekoči fazi se zaradi ultrazvoka tvorijo t. i. mikro mehurčki, ki sčasoma rastejo in nato eksplozivno počijo. Kolaps mehurčkov prekine oz. fragmentira površino trdnega materiala. Posledica tega je večja difuzija oz. masni prenos snovi, ki jo ekstrahiramo (44). To je razlog za večji izkoristek ekstrakcije z ultrazvokom.

Preglednica II: Izkoristki posameznih vrst ekstrakcij

Topilo	Način ekstrakcije	Čas ekstrakcije	Zaporedna številka ekstrakcije	Izkoristek ekstrakcije (%)
heksan/izopropanol 3 : 2	ultrazvok	120 min	1.	6,60
		60 min	1.	9,20
	stresalnik	120 min	2.	4,80
			1.	7,80
		60 min	1.	4,80
			2.	3,60
heksan	ultrazvok	120 min	1.	8,00
		60 min	1.	11,00
			2.	4,00
		20 min	1.	8,00
			2.	5,20
			3.	1,80
		10 min	1.	8,40
			2.	4,80
			3.	1,80
			4.	0,80
			5.	0,60
		stresalnik	120 min	1.
	60 min		1.	7,20
			2.	5,00
	20 min		1.	7,60
2.			3,80	
3.			1,40	

Z namenom skrajšanja časa postopka in pridobitve večje količine olja smo čas posamezne ekstrakcije skrajšali s 60 na 10 minut, hkrati pa izvedli pet zaporednih ekstrakcij. Vse zaporedne ekstrakcije so trajale enak čas (10 minut). Na podlagi dobljenih rezultatov sklepamo, da se pri natehtani količini semen (5 g) uporabljena količina topila (15 ml) nasiti že po 10 minutah ekstrakcije. Bistvena za čim boljši izkoristek ekstrakcije je zato uvedba več ekstrakcij. Za nadaljnje delo smo tako izbrali štiri 10-minutne ekstrakcije z ultrazvokom.

Ob upoštevanju zgoraj navedene ugotovitve, da se topilo nasiti po približno 10 minutah ekstrakcije, moramo opozoriti na določeno mero variabilnosti izkoristka (od 7,2 do 11 %). Pri vseh ekstrakcijah smo sicer uporabili semena istega vzorca (vzorec 1), a smo jih za posamezne ekstrakcije mleli sproti, ne pa naenkrat večje količine semen. Razlog za opaženo variabilnost izkoristka je lahko variabilnost rastlinskega materiala. Glede na to, da smo ekstrakcije izvajali le v eni ponovitvi, pa gre lahko tudi za tehnično variabilnost, saj

tekem postopka naredimo napako. To bi lahko dokazali, če bi naredili več ponovitev ekstrakcij.

5.1.2 Vsebnost olja v vzorcih

Z ekstrakcijo s heksanom pridobljena olja so bila svetlorumene do temnorumene barve, razen olji semen iz Brežic in Sežane, ki sta bili rjave barve. Vsi vzorci so bili takoj po ekstrakciji bistri, pri nekaterih pa je med shranjevanjem na dnu steklenega vsebnika nastala bela oborina, olja pa so bila motna. Razlog za motnost je lahko prisotnost voskov in drugih snovi.

Edini literaturni vir o vsebnosti olja v posušenihih semenih lipovca navaja vrednost 27,9 % (45). Vsebnost olja, pridobljenega iz naših vzorcev, je različna in se giblje med 9,10 % in 21,67 % (preglednica III). Najmanj olja so vsebovala semena lipovca iz Sežane (9,10 %) in Brežic (9,33 %), ki so bila že vizualno videti majhna. Največ olja so vsebovala semena lipovca iz Dravograda (21,67 %) in lipe iz Lendave (21,16 %). V povprečju vsebujejo več olja semena lipe (19,22 %) kot pa lipovca (14,10 %). Podatki o pridobljeni masi olj so predstavljeni v prilogi 1 (preglednica IX).

Proučili smo tudi povprečno vsebnost olja po pokrajinah. Med seboj so si primerljivi le vzorci semen iz Ljubljane in okolice (Litostroj, Vrhnika 1 in 2), pri katerih povprečna vsebnost olja v semenih znaša 20,74 %. Zanimiva je precejšnja razlika v vsebnosti olja vzorcev semen iz Koroške: izmed vseh vzorcev vsebujejo največ olja semena iz Dravograda (21,67 %), medtem ko semena iz Črne na Koroškem vsebujejo le 12,48 % olja. Vzorcev iz ostalih pokrajin z vidika vsebnosti ne moremo primerjati med seboj, saj se preveč razlikujejo in tako lahko zaključimo, da so razlike med njimi naključne oz. odvisne od okoljskih dejavnikov (geografske lege rastišča, vremenskih razmer).

Lipova semena niso prav bogata z oljem, če jih npr. primerjamo s semeni, ki jih najpogosteje uporabljamo za pridobivanje jedilnih olj. Sončnična semena vsebujejo 50 % olja, bučna semena pa 40 do 50 % olja. Vsebnost lipovega olja je primerljiva npr. z vsebnostjo olja iz sojinih (20 %) in koruznih semen (15 %) (2).

Zaradi premajhne količine semen, ki smo jih imeli na voljo, in posledično majhne količine pridobljenega olja, smo tako ekstrakcijo kot nadaljnje analize (maščobnokislinska sestava

in določanje neumiljivih snovi) izvajali le v eni ponovitvi (samo enkrat smo vzorce injicirali na GC-MS, samo enkrat smo ekstrahirali neumiljive snovi). Zaradi napak, ki jih med postopkom naredimo, bi morali za večjo zanesljivost rezultatov, analize večkrat ponoviti.

Preglednica III: Vsebnost olja v posameznih vzorcih

Številka vzorca	Vzorec	Rastlinska vrsta	Vsebnost olja (%)
1	Sedovec	Lipa	17,89
2	Črni Kal	Lipa	15,68
3	Litostroj	Lipa	20,95
4	Škofja Loka	Lipa	19,32
5	Ilirska Bistrica	Lipa	19,41
6	Žablje	Lipovec	15,55
7	Vrhnika 1	Lipa	20,94
8	Dravograd	Lipovec	21,67
9	Semič	Lipa	19,12
10	Vrhnika 2	Lipa	20,34
11	Brežice	Lipovec	9,33
12	Brezje	Lipovec	15,14
13	Lendava	Lipa	21,16
14	Vrhavč	Lipovec	14,67
15	Črna na Koroškem	Lipovec	12,48
16	Nova Gorica	Lipa	17,42
17	Novo mesto	Lipovec	14,89
18	Sežana	Lipovec	9,10

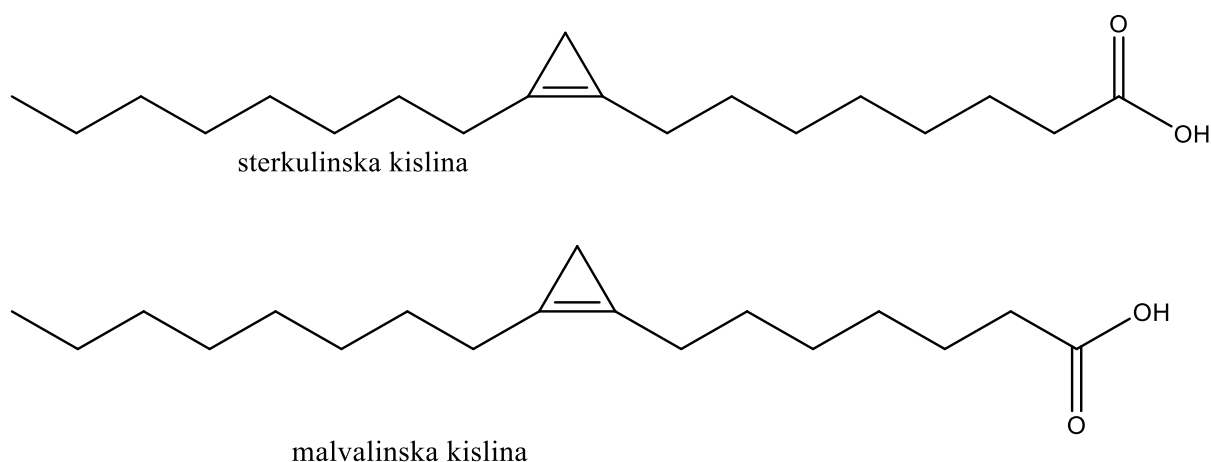
5.2 MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA OLJ

Pridobljene metilne estre maščobnih kislin, ki so se ekstrahirali v organsko fazo po ekstrakciji z vodo in heksanom, smo analizirali z GC-MS. Masne spektre smo primerjali z masnimi spektri referenčnih spojin. Kot rezultat smo podali vsebnost posameznih maščobnih kislin v odstotkih. Značilen kromatogram maščobnokislinske sestave vzorca lipovega olja je predstavljen v prilogi 2 (slika 15).

Seznam maščobnih kislin, ki smo jih zaznali v naših vzorcih, prikazuje preglednica IV, v preglednici V pa so predstavljeni posamezni deleži maščobnih kislin v vzorcih. Odločili smo se, da bomo rezultate interpretirali na podlagi povprečne vsebnosti posameznih maščobnih kislin v vseh vzorcih lipe in vseh vzorcih lipovca in ta povprečja primerjali med

seboj. Rezultate smo primerjali tudi z literaturnimi podatki iz raziskave Dowda in sodelavcev (46).

Edini literaturni vir (raziskava Dowde in sodelavcev), ki smo ga imeli na voljo, navaja, da je lipovo olje v največji meri sestavljeno iz linolne kisline (49 do 60 %), sledita ji oleinska kislina (16 do 22 %) ter palmitinska kislina (8 do 10 %). V olju so odkrili tudi dve ciklopropenoidni kislini, sterkulinsko (3 do 6 %) in malvalinsko kislino (5 do 10 %) (slika 12) (46). Ti dve kislini sta značilni za olja iz semen rastlin reda Malvales (slezenovci), predvsem družine Sterculiaceae (kakavovčevke), Malvaceae (slezenovke), Bombaceae (kapokovčevke) in Tiliaceae (lipovke) (47).



Slika 12: Sterkulinska in malvalinska kislina

Biosinteza malvalinske kisline se začne z elektrofilno adicijo metilenske skupine na oleinsko kislino, iz katere nastane dihidrosterkulinska kislina. Iz nje z desaturacijo nastane sterkulinska kislina. Z α -oksidacijo sterkulinske kisline pa nastane malvalinska kislina. Ciklopropenoidne maščobne kisline povzročajo neželene biološke učinke v živalih po zaužitju, saj inhibirajo desaturazo in tako povzročijo kopičenje nasičenih maščobnih kislin v telesu. Prišlo naj bi do ireverzibilne reakcije med obročem in tiolnimi skupinami encimov (47).

Ciklopropenoidne kisline so nestabilne v kislem, zato povzroči kislinsko katalizirano preestrenje pri pripravi metilnih estrov maščobnih kislin destrukcijo obroča, medtem ko do takega razpada ne pride pri bazično katalizirani reakciji (36). Glede na to, da smo pri

pripravi metilnih estrov najprej uporabili bazično in šele nato kislinsko katalizirano preestrenje, do razpada ciklopropenoidnih kislin ni prišlo.

V lipovem olju so zaznali še dva produkta α -oksidacije, 8-heptadecenojsko kislino in 8,11-heptadekadienojsko kislino (skupna vsebnost 1,3 do 2,3 %). Poleg naštetih kislin naj bi se v olju nahajale še miristinska, stearinska, α -linolenska, arašidna, behenska, palmitoleinska, vakcenska in lignocerinska kislina. Našli so tudi sledove heptadekanojske, 9-heptadecenojske, 9,10-epoksistearinske in vernolne kisline. V lipovem olju niso našli kratkoverižnih maščobnih kislin (46).

Preglednica IV: Maščobne kisline, ki smo jih zaznali v našem olju

Oznaka	Ime maščobne kisline (IUPAC)	Trivialno ime
C14:0	Tetradekanojska kislina	Miristinska kislina
C16:1 (Δ^9)	(9Z)-9-heksadecenojska kislina	Palmitoleinska kislina
C16:0	Heksadekanojska kislina	Palmitinska kislina
C17:1 (Δ^{10})	(10Z)-10-heptadecenojska kislina	-
C18:1 (Δ^7)	(7Z)-7-(2-oktil-1-ciklopropenil)heptanojska kislina	<i>Cis</i> -malvalinska kislina
C18:2 ($\Delta^{9,12}$)	(9Z,12Z)-9,12-oktadekadienojska kislina	Linolna kislina
C18:1 (Δ^9)	(9Z)-9-oktadecenojska kislina	Oleinska kislina
C18:1	(9E)-9-oktadecenojska kislina	Elaidinska kislina
C18:1	(11E)-11-oktadecenojska kislina	Vakcenska kislina
C18:0	Oktadekanojska kislina	Stearinska kislina
C19:1 (Δ^8)	(8E)-8-(2-oktilciklopropen-1-il)oktanojska kislina	<i>Cis</i> -sterkulinska kislina
C19:0	8-(2-oktilciklopropil)oktanoat	Dihidrosterkulinska kislina

Povprečna vsebnost **miristinske kisline** je v semenih obeh vrst 0,14 % (literaturna vrednost za obe vrsti znaša 0,21 %). Vsebnost **palmitoleinske kisline** je v semenih lipa 0,07 %, semenih lipovca pa 0,13 % (literaturna vrednost za semena lipa znaša 0,12 %, za semena lipovca pa 0,22 %). **Palmitinske kisline** je v semenih obeh vrst podoben delež, in sicer v semenih lipa 8,55 %, v semenih lipovca pa 8,59 %. Literatura navaja 8,31 % palmitinske kisline v semenih lipa in 9,17 % v semenih lipovca. V naših vzorcih smo zaznali **10-heptadecenojsko kislino**, in sicer 0,68 % v semenih lipa in 0,74 % v semenih

lipovca. Te kisline Dowda in sodelavci (46) niso zaznali, medtem ko mi v vzorcih nismo zaznali 8-heptadecenojske in 8,11-heptadienojske kisline.

Največji delež maščobnih kislin v olju predstavlja **linolna kislina**. Semena lipe so malenkost bolj bogata z njo, predstavlja 59,63 %, v semenih lipovca pa 53,31 %. Največji delež linolne kisline je v oljih iz Škofje Loke (62,32 %) in Litostroja (62,12 %). Izstopajo olja iz semen lipovcev iz Brežic (49,86 %), Črne na Koroškem (46,60 %) in Sežane (41,22 %), saj je delež linolne kisline v njih manjši od 50 %. Tudi glede na literaturni podatek je delež linolne kisline v semenih lipe (56,45 %) večji kot v semenih lipovca (48,80 %). Linolni kislini po zastopanosti sledi **oleinska kislina** z 22,17 % v semenih lipe in 18,22 % v semenih lipovca. Najmanjši delež oleinske kisline vsebuje olje iz semen iz Črne na Koroškem, in sicer 14,87 %. Do sedaj znani podatki kažejo, da je oleinske kisline v semenih lipovca 21,67 %, v semenih lipe pa 19,55 %. V naših vzorcih smo zaznali tudi *trans* izomer oleinske kisline, **elaidinsko kislino**, o čemer v prejšnjih raziskavah niso poročali, in sicer 2,18 % v semenih lipe in 2,73 % v semenih lipovca. **Vakcensko kislino** smo našli samo pri enem vzorcu semen lipe (Litostroj). Ta delež je znašal 0,22 %. V literaturi navajajo, da je vakcenske kisline v semenih lipovca 1,36 %, v semenih lipe pa 0,83 %. Delež **stearinske kisline** v semenih lipovca je 1,38 %. Enako vsebnost stearinske kisline navaja tudi literaturni vir. Semena lipe pa vsebujejo 1,55 % stearinske kisline (v literaturi navajajo 1,80 %).

Delež **dihidrosterkulinske kisline** znaša 1,46 % v semenih lipe in 1,24 % v semenih lipovca. V objavljeni raziskavi so ugotovili 0,78 % te kisline v lipi in 0,63 % v lipovcu. Dihidrosterkulinsko kislino najdemo v vseh vzorcih lipe, medtem ko se ne nahaja v vseh vzorcih lipovca. Ne najdemo je v vzorcih olja semen iz Brežic, Brezij, Vrhavča in Novega mesta. Četrta najbolj zastopana maščobna kislina v semenih lipovca je **sterkulinska kislina**, ki predstavlja 4,71 %. Najbolj izstopa vzorec olja semen lipovca iz Črne na Koroškem, saj vsebuje kar 10,98 % sterkulinske kisline. Sledita mu olji lipovca iz Sežane z 8,66 % sterkulinske kisline in iz Brežic s 6,72 %. Vrednost sovpada z literaturno vrednostjo, ki znaša 4,91 %. Delež te maščobne kisline je mnogo manjši v semenih lipe, in sicer znaša 0,89 % (literaturna vrednost 2,89 %). Vzorci olj iz semen lipe iz Litostroja in Semiča vsebujejo zelo majhen odstotek sterkulinske kisline, ki za obe olji znaša 0,36 %. Tudi olje, pridobljeno iz vzorca iz Škofje Loke, ima le 0,43 % sterkulinske kisline. Za razliko od literaturnih podatkov, kjer je odstotek malvalinske kisline (5,58 % za semena lipe in 8,27 % za semena lipovca) dvakrat večji kot pa odstotek sterkulinske kisline, pri

naših vzorcih to ne drži. Delež **malvalinske kisline** v naših vzorcih je manjši (za semena lipe znaša 1,65 %, za semena lipovca pa 3,10 %), kar nakazuje na manjšo α -oksidacijo sterkulinske kisline. Najmanjši delež malvalinske kisline je v oljih, pridobljenih iz vzorcev semen iz lipe iz Semiča (1,13 %) in Vrhnike 1 (1,25 %). Največ malvalinske kisline vsebujeta vzorca olj lipovca iz Brezij (3,87 %) in Brežic (3,64 %). Večji kot je delež sterkulinske kisline v oljih, več malvalinske kisline iz nje lahko nastane.

V vzorcih semen olja lipovca iz Brežic, Črne na Koroškem in Sežane lahko vidimo, da vsebujejo manjši odstotek linolne (manj kot 50 %) in oleinske kisline (manj kot 18 %) ter večji delež sterkulinske (več kot 6 %) in malvalinske kisline (več kot 3 %). Vse to nakazuje na večjo pretvorbo oleinske kisline v sterkulinsko in le-te v malvalinsko kislino.

Z GC-MS metodo smo v vzorcih uspeli **identificirati** nad 90 % maščobnih kislin. Izstopata vzorca olj iz Črne na Koroškem, kjer delež identificiranih kislin znaša 89,38 %, in Sežane, kjer je ta delež še manjši, 86,88 %. Neidentificiran delež predstavljajo nečistoče in ostali artefakti. Ostalih kislin, ki jih navajajo v literaturi, nismo zaznali. Omeniti velja tudi to, da nismo zaznali α -linolenske kisline, ki se po literaturnih virih v semenih lipe nahaja v 0,78 %, v lipovcu pa v 0,84 % (46).

Lipovo olje tako vsebuje, glede na vse zaznane maščobne kisline, največji delež večkrat nenasičene linolne kisline, ki ji sledi enkrat nenasičena oleinska kislina in nasičena palmitinska kislina. Po sestavi ga lahko primerjamo s sončničnim oljem, ki vsebuje približno 6 % palmitinske kisline, 22 % oleinske kisline in 66 % linolne kisline, ter bučnim oljem, ki je sestavljeno iz 13 % palmitinske kisline, 26 % oleinske kisline in 51 % linolne kisline (48). Tako sončnično kot bučno olje vsebujeta manjšo količino α -linolenske kisline, in sicer sončnično olje 0,5 %, bučno olje pa 0,2 % (48). Iz raziskave Dowda in sodelavcev izračunano razmerje med maščobnimi kislinami omega-6 in omega-3 v olju lipe znaša 72, v olju lipovca pa 58, kar je mnogo manj, kot znaša to razmerje v sončničnem (131) in bučnem (257) olju (46, 48). Na podlagi naših rezultatov tega razmerja ne moremo izračunati, saj v vzorcih nismo zaznali nobene maščobne kisline omega-3. Omeniti velja še olje iz semen bombaževca, ki po maščobnokislinski sestavi sicer ni podobno lipovemu olju, vsebuje pa sterkulinsko in malvalinsko kislino; tudi bombaževca namreč spada v družino Malvaceae (slezenovke), ki spada v isti rod kot lipa (rod Malves) (2).

V okviru analize podatkov smo izračunali tudi statistična odstopanja, relativno standardno deviacijo (RSD) za posamezno maščobno kislino med vzorci iz različnih krajev (preglednica V). Ugotoviti smo poskušali ali različni vzorci vsebujejo primerljive količine maščobnih kislin. Na sliki 13 so predstavljene povprečne vsebnosti maščobnih kislin v posameznih vzorcih z dodanim intervalom napake. Ugotovili smo, da so razlike med maščobnimi kislinami, ki se v vzorcu nahajajo v manjših količinah, velike. Za miristinsko kislino v semenih lipe znaša RSD 24,58 % (povprečna vsebnost 0,14 %), v semenih lipovca pa 23,76 % (povprečna vsebnost 0,14 %). Tudi RSD palmitoleinske kisline je velik – 25,87 % v vzorcih lipe (povprečna vsebnost te kisline znaša 0,07 %) in 14,93 % v vzorcih lipovca (povprečna vsebnost te kisline znaša 0,13 %). Največji RSD tako pri vzorcih olja iz semen lipe (53,04 %) – povprečna vsebnost znaša 0,89 %, kot iz semen lipovca (76,53 %) – povprečna vsebnost znaša 4,71 %, ima sterkulinska kislina. Glede na to, da se omenjene kisline nahajajo v manjših količinah (pod 1 %, z izjemo sterkulinske kisline v vzorcih semen lipovca, kjer je delež te kisline manjši od 5 %), so takšni RSD-ji lahko posledica napake analizne metode. Pri kislinah, ki se v vzorcu nahajajo v večjih količinah, pa so RSD-ji manjši. Za linolno kislino v olju iz semen lipe RSD tako znaša 3,65 % (povprečna vsebnost 59,63 %), v olju iz semen lipovca pa 12,85 % (povprečna vsebnost 53,31 %). Tudi oleinska kislina ima manjši RSD, in sicer 7,07 % v olju iz lipovih semen (povprečna vsebnost 22,17 %) in 8,88 % v olju iz semen lipovca (povprečna vsebnost 18,22 %). Ta variabilnost je najverjetneje posledica različnih vzorcev. Opazimo pa tudi, da so RSD-ji večji pri olju iz semen lipovca kot lipe. Izračunane RSD-je smo primerjali tudi z RSD-ji iz analize rastlinskih olj v magistrski nalogi avtorice Ive Horvat (49). Iz rezultatov prav tako vidimo, da manjša kot je vsebnost maščobne kisline v vzorcu, večji je RSD, vendar pa tudi to ne drži popolnoma pri vseh vzorcih (49). Razloga sta torej tako napaka analizne metode kot tudi sama variabilnost vzorcev, saj so bili nabrani na različnih lokacijah.

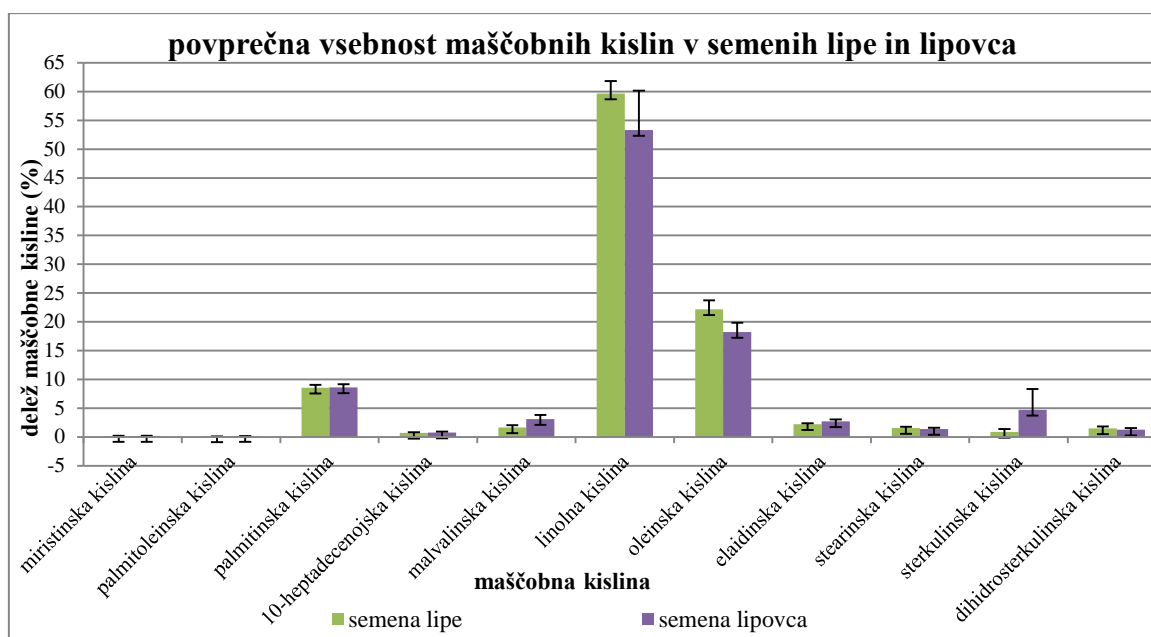
Običajno se značilne razlike vsebnosti posameznih maščobnih kislin v različnih vzorcih enakega olja gibljejo med 5 in 10 % (2). To je posledica več dejavnikov, na ravni rastline so to npr. geografska lega rastišča, vremenske razmere, čas nabiranja rastlinskega materiala, na ravni olja pa način pridelave in predelave oz. različni dobavitelji (2).

Preglednica V (I): Delež posameznih maščobnih kislin v vzorcih

Vzorec (številka vzorca)	Površina pod krivuljo (%) – vzorci lipe										Povprečna vsebnost maščobne kisline (%)	RSD (%)
	Sedovec (1)	Črni Kal (2)	Litostroj (3)	Škofja Loka (4)	Ilirska Bistrica (5)	Vrhnik 1 (7)	Semič (9)	Vrhnik 2 (10)	Lendava (13)	Nova Gorica (16)		
Maščobna kislina												
Miristinska kislina	0,17	0,18	0,15	0,16	0,13	0,13	0,12	0,17	0,15	0,06	0,14	24,58
Palmitoleinska kislina	0,10	0,05	0,05	0,05	0,08	0,08	0,07	0,07	0,10	0,08	0,07	25,87
Palmitinska kislina	9,21	8,39	8,41	8,89	8,55	7,97	7,93	9,20	8,11	8,83	8,55	5,53
10-heptadecenojska kislina	0,85	0,70	0,91	0,56	0,62	0,59	0,65	0,65	0,79	0,51	0,68	18,97
Malvalinska kislina	2,28	2,34	1,84	1,71	1,26	1,25	1,13	1,40	1,71	1,55	1,65	25,37
Linolna kislina	60,43	56,66	62,12	62,32	61,76	60,71	59,50	58,60	57,49	56,75	59,63	3,65
Oleinska kislina	21,29	22,71	20,18	19,23	21,35	23,13	23,79	23,01	23,37	23,60	22,17	7,07
Elaidinska kislina	1,87	2,04	2,32	1,97	2,13	2,55	2,23	2,07	2,35	2,28	2,18	9,33
Vakcenska kislina	-	-	0,22	-	-	-	-	-	-	-	0,22	-
Stearinska kislina	1,45	1,56	1,26	1,80	1,58	1,34	1,45	1,81	1,63	1,65	1,55	11,67
Sterkulinska kislina	0,79	1,82	0,36	0,43	0,91	0,74	0,36	0,89	1,08	1,48	0,89	53,94
Dihidrosterkulinska kislina	1,13	2,02	1,21	1,49	1,03	1,04	1,78	1,45	1,82	1,67	1,46	24,13
Identificirane kisline	99,57	98,47	99,03	98,61	99,40	99,53	99,01	99,32	98,60	98,46	99,00	0,45

Preglednica V (II): Delež posameznih maščobnih kislin v vzorcih

Vzorec (številka vzorca)	Površina pod krivuljo (%) – vzorci lipovca								Povprečna vsebnost maščobne kisline (%)	RSD (%)
	Žablje (6)	Dravograd (8)	Brežice (11)	Brezje (12)	Vrhavč (14)	Črna na Koroškem (15)	Novo mesto (17)	Sežana (18)		
Maščobna kislina										
Miristinska kislina	0,13	0,17	0,16	0,14	0,11	0,10	0,12	0,20	0,14	23,76
Palmitoleinska kislina	0,13	0,11	0,16	0,13	0,14	0,10	0,13	0,15	0,13	14,93
Palmitinska kislina	9,22	9,09	8,30	8,77	8,03	7,58	9,11	8,60	8,59	6,77
10-heptadecenojska kislina	0,7	0,76	0,69	0,56	0,82	0,49	0,90	1,02	0,74	23,31
Malvalinska kislina	2,21	1,82	3,64	3,87	2,93	3,42	3,53	3,40	3,10	23,50
Linolna kislina	59,86	59,39	49,86	54,97	59,65	46,60	54,89	41,22	53,31	12,85
Oleinska kislina	19,01	19,83	17,82	19,43	18,09	14,87	19,41	17,31	18,22	8,88
Elaidinska kislina	3,19	2,66	2,81	2,61	2,89	2,29	2,41	2,98	2,73	10,91
Vakcenska kislina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stearinska kislina	1,17	1,27	1,49	1,08	1,20	1,59	1,50	1,70	1,38	16,29
Sterkulinska kislina	1,56	1,99	6,72	3,47	1,91	10,98	2,40	8,66	4,71	76,53
Dihidrosterkulinska kislina	0,94	1,03	-	-	-	1,36	-	1,64	1,24	25,81
Identificirane kisline	98,12	98,12	91,65	95,03	95,77	89,38	94,40	86,88	93,67	4,33



Slika 13: Povprečna vsebnost maščobnih kislin v semenih lipa in lipovca

5.3 SESTAVA NEUMILJIVIH SNOVI

5.3.1 Ekstrakcija neumiljivih snovi

Zaradi premajhne količine pridobljenega olja smo neumiljive snovi, po postopku iz Evropske farmakopeje, ekstrahirali le iz osmih vzorcev (preglednica VI). Odstotek neumiljivega dela v olju se giblje med 0,49 % (Litostroj) in 5,20 % (Lendava). V literaturi smo našli podatek, da naj bi se v olju semen lipovca nahajal 1 % neumiljivih snovi (45).

Preglednica VI: Delež neumiljivih snovi v vzorcih

Številka vzorca	Vzorec	Rastlinska vrsta	Delež neumiljivih snovi (%)
1	Sedovec	Lipa	1,48
3	Litostroj	Lipa	0,49
4	Škofja Loka	Lipa	0,60
9	Semič	Lipa	2,20
10	Vrhnika 2	Lipa	2,00
13	Lendava	Lipa	5,20
14	Vrhavč	Lipovec	1,55
17	Novo mesto	Lipovec	2,60

5.3.2 Sestava neumiljivih snovi v vzorcih

Med postopkom ekstrakcije neumiljivih snovi smo v zmes KOH in olja pred segrevanjem dodali holesterol, ki nam je služil kot interni standard. Pri analizi neumiljivih snovi je

interni standard potreben, saj lahko le tako natančno določimo kvalitativno in kvantitativno sestavo vzorca.

Koncentracijo fitola, skvalena, α - tokoferola, δ -tokoferola, γ -tokoferola, stigmasterola in β -sitosterola v vzorcih smo določali iz umeritvene krivulje. Referenčne spojine za umeritveno krivuljo (β -sitosterol, stigmasterol, fitol, skvalen, α -tokoferol, δ -tokoferol, γ -tokoferol) smo pripravili v začetni koncentraciji 1000 ppm in nato z redčenjem pripravili še raztopine koncentracij 500 ppm, 250 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 10 ppm in 5 ppm. Za korekcijo rezultatov zaradi izgub vzorca med postopkoma izolacije in nadaljnje derivatizacije smo želeli izračunati učinkovitost ekstrakcije holesterola (*recovery*) pri posameznem vzorcu. Vendar pa smo določili večjo koncentracijo holesterola v vzorcu, kot smo ga dodali v reakcijsko zmes. Zato smo se odločili, da rezultate podamo brez korekcije s holesterolom. Vzrok temu je najverjetneje napaka pri tehtanju, saj smo natehtali zelo majhno količino holesterola (1 mg). Temu bi se lahko izognili s tehtanjem večje mase holesterola in nadaljnjim alikvotiranjem. Zaradi premajhne količine vzorca, postopka ekstrakcije neumiljivih snovi v katerem bi natehtali večjo količino holesterola, nismo mogli ponoviti.

Glede na to, da se fitol nahaja v obliki dveh izomerov, fitola A in B, smo rezultat podali kot seštevek obeh izomerov. V vzorcih smo določali tudi vsebnost α -tokoferola, vendar ga nismo zaznali. Domnevamo, da se je razgradil že med saponifikacijo.

Koncentracije posameznih neumiljivih snovi med vzorci so zelo različne (preglednica VII). Največjo koncentracijo **fitola** vsebuje vzorec semen lipovca iz Vrhavča (148,34 mg/100 g). Najmanjšo koncentracijo pa vsebuje vzorec iz Semiča (49,60 mg/100 g). **Skvalen** se v vzorcih pojavlja v manjših količinah, vendar njegova koncentracija bistveno manj niha (10,15 do 17,60 mg/100g); največ ga vsebuje vzorec iz Novega mesta. **Δ -Tokoferola** je največ v vzorcu iz Vrhavča (43,80 mg/100 g), ne pojavlja pa se v vseh vzorcih. Zanimivo je, da se **γ -tokoferol** v veliki koncentraciji nahaja v vzorcu iz Lendave (74,97 mg/100 g), medtem ko se v drugih vzorcih nahaja v manjših količinah (od 10,73 do 41,78 mg/100 g). **Stigmasterola** je največ v vzorcu iz Litostroja (108,70 mg/100 g), ki vsebuje tudi veliko količino **β -sitosterola**. β -Sitosterola je največ v vzorcu iz Sedovca (105,30 mg/100 g). Največjo celotno koncentracijo fitosterolov vsebuje vzorec iz Litostroja (193,39 mg/100

g), medtem ko je največ tokoferolov v vzorcu iz Lendave (74,97 mg/100 g). Značilen kromatogram sestave neumiljivih snovi v vzorcu olja lipovih semen je predstavljen v prilogi 2 (slika 16).

Če med seboj primerjamo vzorce semen lipe z vzorci semen lipovcev (Novo mesto, Vrhavč), vidimo, da semena lipovca vsebujejo več fitola, skvalena in δ -tokoferola ter manj γ -tokoferola kot pa semena lipe. Ostale neumiljive snovi pa se razlikujejo od vzorca do vzorca.

Poskušali smo tudi najti povezavo med koncentracijo neumiljivih snovi in pokrajino, kjer smo vzorec lipovih semen nabrali, vendar so bili rezultati preveč različni. Koncentracija določene neumiljive snovi se razlikuje od vzorca do vzorca, poleg tega pa nam majhno število vzorcev, ki smo jih imeli na voljo za analizo, ne omogoča statistične obdelave.

Preglednica VII: Sestava neumiljivih snovi

Vzorec (številka vzorca)	Koncentracija (mg/100 g)							
	Sedovec (1)	Litostroj (3)	Škofja Loka (4)	Semič (9)	Vrhnika 2 (10)	Lendava (13)	Vrhavč (14)	Novo mesto (17)
Neumiljive snovi								
Fitol	99,00	114,20	103,78	49,60	101,14	60,48	148,34	120,61
Skvalen	13,44	12,30	13,00	10,15	15,58	13,87	17,08	17,60
Δ-Tokoferol	19,98	18,15	11,50	-	-	-	43,80	21,09
γ-Tokoferol	14,16	14,56	15,73	10,73	41,78	74,97	13,33	13,29
Stigmasterol	10,58	108,70	11,21	39,76	-	33,20	11,82	54,53
β-Sitosterol	105,30	84,69	73,21	45,04	47,39	50,68	99,76	54,43
Celotna koncentracija tokoferolov	34,14	32,71	27,23	10,73	41,78	74,97	57,13	34,38
Celotna koncentracija fitosterolov	115,88	193,39	84,42	84,80	47,39	83,88	111,58	108,96

5.4 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST

Oljem smo ugotavljali tudi antioksidativno aktivnost z že prej optimizirano metodo (49). Izračunali smo povprečni antioksidativni potencial (AOP) vzorca iz treh meritev absorbance. V preglednici VIII so predstavljeni rezultati. Povprečni AOP vzorcev olja iz semen lipe znaša 47,3 % in je večji kot povprečni AOP vzorcev olja iz semen lipovca, ki znaša 38,3 %. Najmanjši AOP imata vzorca lipovca iz Sežane (8,9 %) in Črne na

Koroškem (15,6 %), največji AOP pa vzorec lipe iz Škofje Loke (65,5 %) in lipovca iz Dravograda (62,7 %). Iz rezultatov so vidna velika odstopanja med vzorci, zato smo izračunali tudi statistično odstopanje (RSD) iz meritev treh absorbanč za posamezen vzorec (priloga 3, preglednica X). RSD-ji znašajo od 0,64 % do 3,21 %. Takšni rezultati so tako posledica različnega rastlinskega materiala, ne pa npr. neprimernosti metode, ki bi tako dajala neponovljive rezultate.

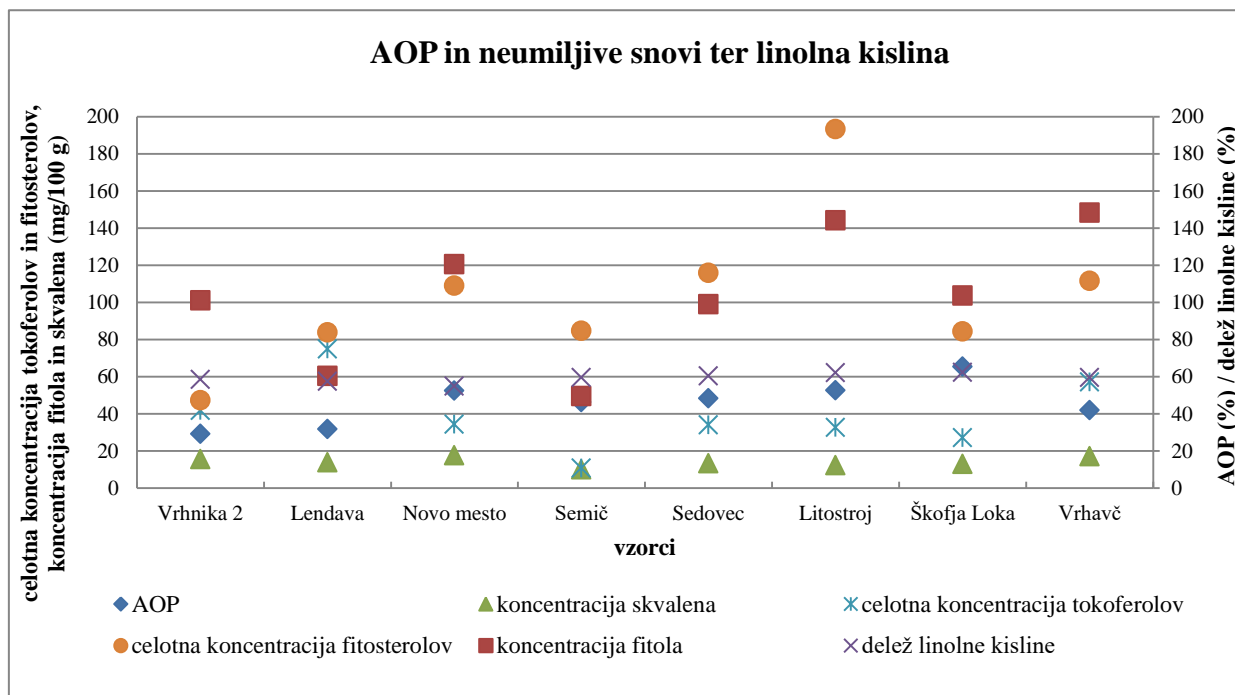
Preglednica VIII: Antioksidativna aktivnost olj, izražena kot antioksidativni potencial (AOP) v metodi DPPH

Številka vzorca	Vzorec	Rastlinska vrsta	AOP (%)
1	Sedovec	Lipa	48,3
2	Črni Kal	Lipa	58,2
3	Litostroj	Lipa	52,6
4	Škofja Loka	Lipa	65,5
5	Ilirska Bistrica	Lipa	48,8
6	Žablje	Lipovec	51,9
7	Vrhnik 1	Lipa	50,9
8	Dravograd	Lipovec	62,7
9	Semič	Lipa	46,3
10	Vrhnik 2	Lipa	29,2
11	Brežice	Lipovec	18,0
12	Brezje	Lipovec	54,8
13	Lendava	Lipa	31,7
14	Vrhavč	Lipovec	42,0
15	Črna na Koroškem	Lipovec	15,6
16	Nova Gorica	Lipa	41,5
17	Novo mesto	Lipovec	52,5
18	Sežana	Lipovec	8,9

5.5 POVEZAVA MED ANTIOKSIDATIVNIM POTENCIALOM IN SESTAVO OLJ

V okviru magistrske naloge smo poizkušali poiskati povezavo med antioksidativno aktivnostjo olj, ugotovljeno z metodo DPPH in izraženo kot antioksidativni potencial (AOP), in njihovo sestavo, natančneje deležem linolne kisline in koncentracijami tokoferolov, fitosterolov, fitola in skvalena (slika 14). Večjo antioksidativno aktivnost smo pričakovali pri vzorcih z večjimi koncentracijami tokoferolov, fitosterolov, fitola in skvalena, tj. molekul, ki ščitijo maščobne kisline pred oksidativnim kvarjenjem.

Na podlagi rezultatov ne moremo sklepati na povezavo med AOP in deležem linolne kisline. Izmed osmih analiziranih vzorcev vsebuje vzorec semen iz Novega mesta najmanj linolne kisline (54,89 %), njegov AOP pa kljub temu ni majhen (52,5 %). Po drugi strani pa vzorec iz Vrhlike 2 vsebuje kar velik delež linolne kisline (58,60 %), njegov AOP (29,3 %) pa je najmanjši izmed vseh osmih vzorcev.



Slika 14: AOP in neumiljive snovi ter linolna kislina

Zanimivo je, da je v vzorcu iz Lendave največja celotna koncentracija tokoferolov (74,97 mg/100 g), a ima kljub temu zelo majhen AOP (31,7 %). Po drugi strani pa je v vzorcu iz Škofje Loke z največjim AOP (65,5 %) majhna koncentracija tokoferolov (27,23 mg/100 g). Pričakovali smo, da bodo imeli vzorci z večjo celotno koncentracijo tokoferolov tudi večji AOP, vendar glede na dobljene rezultate te hipoteze ne moremo potrditi.

Skvalen se v vseh vzorcih nahaja v približno enakih koncentracijah in ni videti bistvene povezave med njim in AOP, ravno tako ne moremo sklepati za fitol, da zelo vpliva na AOP, saj vzorec iz Semiča vsebuje najmanjšo koncentracijo fitola (49,60 mg/100 g), a kljub temu nima tako majhnega AOP (46,3 %). Po drugi strani vzorec iz Vrhavča vsebuje največjo koncentracijo fitola (148,33 mg/100 g), njegov AOP pa znaša 42,0 %, kar je manj kot AOP vzorca iz Semiča, kljub temu, da vsebuje več fitola.

Nakazana je povezava med celotno koncentracijo fitosterolov in AOP. Manjša kot je celokupna koncentracija fitosterolov, manjši je tudi AOP. Vzorec iz Vrhnike 2 ima izmed osmih olj najmanj fitosterolov (47,39 mg/100 g) in tudi najmanjši AOP (29,2 %). Vzorec iz Litostroja z največ fitosteroli (193,40 mg/100 g) ima tudi velik AOP (52,6 %), vendar ne največjega.

5.6 UPORABA LIPOVEGA OLJA

Glede na to, da lipovo olje vsebuje največji delež linolne kisline in nič α -linolenske kisline, ni najboljši prehranski vir maščobnih kislin, saj olje ne vsebuje nobene maščobne kisline omega-3. Tako se razmerja med omega-6 in omega-3 ne da izračunati in je popolnoma porušeno v smeri maščobnih kislin omega-6. Lipovo olje poleg tega ni ravno bogato s fitosteroli, če ga primerjamo npr. s koruznim oljem, ki vsebuje 809–1557 mg fitosterolov/100 g ali sončničnim oljem s 374–725 mg fitosterolov/100 g. Po vsebnosti fitosterolov se še najbolj približa palmovemu olju s 71–117 mg fitosterolov/100 g (28).

Zlasti velika vsebnost linolne kisline ter prisotnost fitosterolov in skvalena dajejo lipovemu olju potencialno uporabnost v kozmetiki. Linolna kislina v keratinocitih aktivira specifičen receptor (PPAR- α), ki je udeležen v regulaciji proliferacije keratinocitov, vnetja in vzdrževanju homeostaze kože. Linolna kislina naj bi tako zmanjšala transepidermalno izgubo vode, kožo hidratirala in izboljšala njeno stanje (50). Skvalen in tokoferoli delujejo antioksidativno in ščitijo kožo pred lipidno peroksidacijo (2). Raziskave kažejo, da fitosteroli kožo ščitijo pred staranjem. *In vitro* testi s človeškimi keratinociti so dokazali, da fitosteroli inhibirajo z UV svetlobo povzročeno ekspresijo encima MMP-1 (*matrix metalloproteinase-1*), kar privede do proteolizne razgradnje kolagena in zmanjšanja ekspresije genov COL1A1 in COL1A2, ki sta odgovorna za sintezo kolagena. Zmanjšana količina fitosterolov v koži privede do večje dovzetnosti kože do poškodb zaradi UV žarkov. Poleg tega pa fitosteroli delujejo emolientno, saj so po svoji strukturi podobni holesterolu (2, 51).

6. SKLEP

V okviru magistrske naloge smo ekstrahirali olje iz lipovih semen, ki smo jih nabrali v različnih krajih po Sloveniji. Optimizirali smo metodo ekstrakcije in kot najprimernejšo izbrali štirikratno zaporedno ekstrakcijo s heksanom v ultrazvočni kadički, ki je dajala največje izkoristke. Vsebnost olja v semenih lipa znaša v povprečju 19,22 %, v semenih lipovca pa 14,10 %.

Ekstrahirano olje smo nato analizirali s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo. Ugotovili smo, da največji delež maščobnih kislin predstavlja linolna kislina (50 do 60 %). Druga po vsebnosti je oleinska kislina (20 %), tretja pa palmitinska (8 %). Čeprav literaturni viri navajajo tudi prisotnost α -linolenske kisline, je v naših vzorcih nismo zaznali. Po deležu posameznih maščobnih kislin je tako lipovo olje primerljivo s sončničnim oljem. V oljih smo zaznali redke ciklopropenoidne kisline. To so dihidrosterkulinska, sterkulinska in malvalinska kislina, ki jih najdemo tudi v olju iz bombaževih semen. Večji kot je odstotek sterkulinske kisline v oljih, večji je odstotek malvalinske kisline, saj se prva pretvori v drugo preko α -oksidacije.

V nadaljnji analizi olja smo ekstrahirali neumiljive snovi po postopku iz Evropske farmakopeje, jih derivatizirali in ravno tako analizirali s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo. Delež neumiljivih snovi se giblje med 0,49 in 5,20 %. Vsebnosti α -tokoferola nismo mogli ugotoviti, saj se je najverjetneje razgradil že med reakcijo saponifikacije. Njegova koncentracija nas je zanimala, saj je izmed vseh tokoferolov biološko najbolj aktiven in tako pomembno prispeva h antioksidativni aktivnosti olja.

Antioksidativno aktivnost smo določili z metodo DPPH. O pomembnejši povezavi med antioksidativno aktivnostjo in koncentracijami tokoferolov, skvalena in fitola ter deležem linolne kisline ne moremo sklepati. Nakazana je povezava med celotno koncentracijo fitosterolov in antioksidativnim potencialom, manjša koncentracija celotnih fitosterolov pomeni tudi manjšo antioksidativno aktivnost, čeprav tudi tu ni popolnoma linearne povezave. Pričakovali smo, da bodo vzorci z večjo koncentracijo celotnih tokoferolov, fitosterolov, skvalena in fitola imeli večji antioksidativni potencial, vendar naši rezultati ne potrjujejo naše hipoteze.

Ugotovili smo, da se vzorci semen med seboj glede vsebnosti olja razlikujejo naključno. Med seboj so si primerljivi le vzorci iz Ljubljane in okolice. Glede maščobnokislinske sestave so največje razlike med lipo in lipovcem v deležu sterkulinske kisline (4,71 % v lipovcu in 0,89 % v lipi) in linolne kisline (53,31 % v lipovcu in 59,63 % v lipi). Delež malvalinske kisline je manjši v vzorcih semen lipe (1,65 %) kot pa lipovca (3,10 %). Povezave med koncentracijo neumiljivih snovi in pokrajino rastišča nismo našli, smo pa ugotovili, da semena lipovca vsebujejo več fitola, skvalena in δ -tokoferola in manj γ -tokoferola. Verjetno so razlike med vzorci semen naključne, za podrobnejšo analizo bi potrebovali večje število vzorcev.

Lipovo olje ni najboljši vir prehranskih maščobnih kislin zaradi porušenega razmerja med maščobnimi kislinami omega-6 in omega-3 v prid omega-6, ima pa potencialno vrednost v uporabi za kozmetične namene.

7. VIRI IN LITERATURA

1. Martinčič A idr.: Mala flora Slovenije: ključ za določanje praprotnic in semenk, 3. izdaja, Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 1999: 402.
2. Kočevar Glavač N idr.: Sodobna kozmetika: sestavine naravnega izvora, 1. izdaja, Širimo dobro besedo, Velenje, 2015: 54-165, 503-504, 744-745.
3. Bruneton J: Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal plants, 2. izdaja, Lavoisier publishing, Paris, 1999: 113-116.
4. Galle-Toplak K: Zdravilne rastline na Slovenskem, 2. izdaja, Založba Mladinska knjiga, Ljubljana, 2002: 174-176.
5. Michas G, Micha R, Zampelas A: Dietary fats and cardiovascular disease: Putting together the pieces of a complicated puzzle. *Atherosclerosis*, 234, 2014: 320-328.
6. Ribarič S: Temelji patološke fiziologije, 2. izdaja, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo. Poglavje Ateroskleroza, Bajrović F. F, Šuput D. 2011: 169-176.
7. Micallef A M, Garg L M: Beyond blood lipids: phytosterols, statins and omega-3 polyunsaturated fatty acid therapy for hyperlipidemia. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20, 2009: 927-939.
8. Chan C A: Vitamin E and Atherosclerosis. *The Journal of Nutrition*, 128, 1998: 1593-1596.
9. Ribarič S: Seminarji iz patološke fiziologije, 2. izdaja, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo. Poglavje Hiperlipoproteinemije, Ribarič S. 2012: 137-147.
10. Astup V A idr. : Fats and fatty acids in human nutrition, Report of an expert consultation. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2010: 21-36, 55-60.
11. Duplus E, Glorian M, Forest C: Fatty Acid Regulation of Gene Transcription. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 2000: 30749-30752.
12. Lunn J, Theobald H E: The health effects of dietary unsaturated fatty acids. *British Nutrition Foundation*, 31, 2006: 178-224.
13. Lieberman M, Marks A, Peet A: Marks` basic medicinal biochemistry: a clinical approach, 4. izdaja, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 1950: 585-595.
14. Rustan A C, Drevon C A: Fatty Acids: Structures and Properties. *Encyclopedia of life sciences* , John Wiley & Sons, 2005: 1-7 .

- http://www.uio.no/studier/emner/matnat/farmasi/FRM2041/v06/undervisningsmateriale/fatty_acids.pdf datum dostopa: 24.4.2016
15. Ostlund E R, Racette B S, Stenson F W: Effects of Trace Components of Dietary Fat on Cholesterol Metabolism: Phytosterols, Oxysterols, and Squalene. *Nutrition Reviews*, 60, 2002: 349- 359.
 16. Ruiz-Núñez B, Dijck-Brouwer J D A, Muskiet A J F: The relation of saturated fatty acids with low-grade inflammation and cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 36, 2016: 1-20.
 17. Orsavova J, Misurcova L, Ambrozova V J, Vicha R, Mleck J: Fatty Acids Composition of Vegetable Oils and Its Contribution to Dietary Energy Intake and Dependence of Cardiovascular Mortality on Dietary Intake of Fatty Acids. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 2015: 12871-12890.
 18. Harris S W idr.: Omega-6 Fatty Acids and Risk for Cardiovascular Disease. *Circulation*, 119, 2009: 902-907.
 19. Simopoulos P A: The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine&Pharmacotherapy*, 56, 2002: 365-379.
 20. Collins J J: Omega-3 (Ω -3) essential fatty acids. *Nutri News*, 9 (2), 2010: 1-7.
 21. Wijendran V, Hayes C K: Dietary n-6 and n-3 Fatty Acid Balance and Cardiovascular Health. *Annual review of Nutrition*, 24, 2004: 597-615.
 22. Russo L G: Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implication in cardiovascular prevention. *Biochemical Pharmacology*, 77, 2009: 937-946.
 23. Moreau A R, Whitaker D B, Hicks B K: Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*, 41, 2002: 457-500.
 24. Lagarda J M, García-Llatas G, Farré R: Analysis of phytosterols in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 2006: 1486-1496.
 25. <http://lipidlibrary.aocs.org/Primer/content.cfm?ItemNumber=39358> datum dostopa: 17.5.2016
 26. Patel D M, Thompson D P: Phytosterols and vascular disease. *Atherosclerosis*, 186, 2006: 12-19.
 27. Gylling H idr.: Plant sterols and plant stanols in the management of dyslipidaemia and prevention of cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 232, 2014: 346-360.

28. Brufau G, Canela A M, Rafecas M: Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. *Nutrition Research*, 28, 2008: 217-225.
29. Khor T H, Chieng Y D: Effect of squalene, tocotrienols and α -tocopherol supplementations in the diet on serum and liver lipids in the hamster. *Nutrition Research*, 17, 1997: 475-483.
30. Huang Z-R, Lin Y-K, Fang J-Y: Biological and Pharmacological Activities of Squalene and Related Compounds: Potential Uses in Cosmetic Dermatology. *Molecules*, 14, 2009: 540-554.
31. Herrera E, Barbas C: Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 57 (1), 2001: 43-56.
32. Siti N H, Kamisah Y, Kamisah J: The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascular Pharmacology*, 71, 2015: 40-56.
33. Eder K: Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *Journal of Chromatography B*, 671, 1995: 113-131.
34. <http://lipidlibrary.aocs.org/content.cfm?ItemNumber=39230> datum dostopa: 28.4.2016
35. Park P W, Goins R E: *In Situ* preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. *Journal of food science*, 59, 1994: 1262-66.
36. Christie W W: Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. *Advances in Lipid Methodology*, 2, 1993: 69-111.
37. Orata F: Derivatization Reactions and reagents for Gas Chromatography Analysis. *Advanced Gas Chromatography – Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*, 2012: 83-108.
38. Skoog D A, Holler F J, Nieman T A: *Principles of Instrumental Analysis*, 27. poglavje: Gas Chromatography, 6th edition, 2007: 788-810.
39. Skoog D A, Holler F J, Nieman T A: *Principles of Instrumental Analysis*, 11. poglavje: Atomic Mass Spectrometry, 6th edition, 2007: 281-301,
40. Skoog D A, Holler F J, Nieman T A: *Principles of Instrumental Analysis*, 20. poglavje: Molecular Mass Spectrometry, 6th edition, 2007: 550-584.
41. Pyrzyńska K, Pękal A: Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical Methods*, 5, 2013: 4288-4295.

42. Kedare S B, Singh R P: Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Scientists & Technologists*, 48 (4), 2011: 412-422.
43. <http://macro.lsu.edu/howto/solvents/Polarity%20index.htm> datum dostopa: 9.10.2016
44. Sicaire A-G idr.: Ultrasound induced green solvent extraction of oil from oleaginous seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 2016: 319-329.
45. Fontanel D: Unsaponifiable matter in Plant Seed Oils, 1. izdaja, Springer, Berlin, 2013: 288.
46. Dowd M K, Farve M C: Fatty acid composition of *Tilia* spp. seed oils. *Grasas y Aceites*, 64 (3), 2013: 243-249.
47. <http://lipidlibrary.aocs.org/content.cfm?ItemNumber=39323> datum dostopa: 19.6.2016
48. Dubois V idr.: Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *European journal of lipid science technology*, 109, 2007: 710–732.
49. Horvat I: Maščobnokislinska sestava rastlinskih olj z α -linolensko kislino in njihova antioksidativna aktivnost. Magistrska naloga. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2015.
50. Danby G S idr.: Effect of Olive and Sunflower Seed Oil On the Adult Skin Barrier: Implication for Neonatal Skin Care. *Pediatric Dermatology*, 30 (1), 2013: 42-50.
51. Quirin K W: Specialty Fatty Oils for Healthy Skin. *Cosmetic Science Technology*, 2009: 16-2

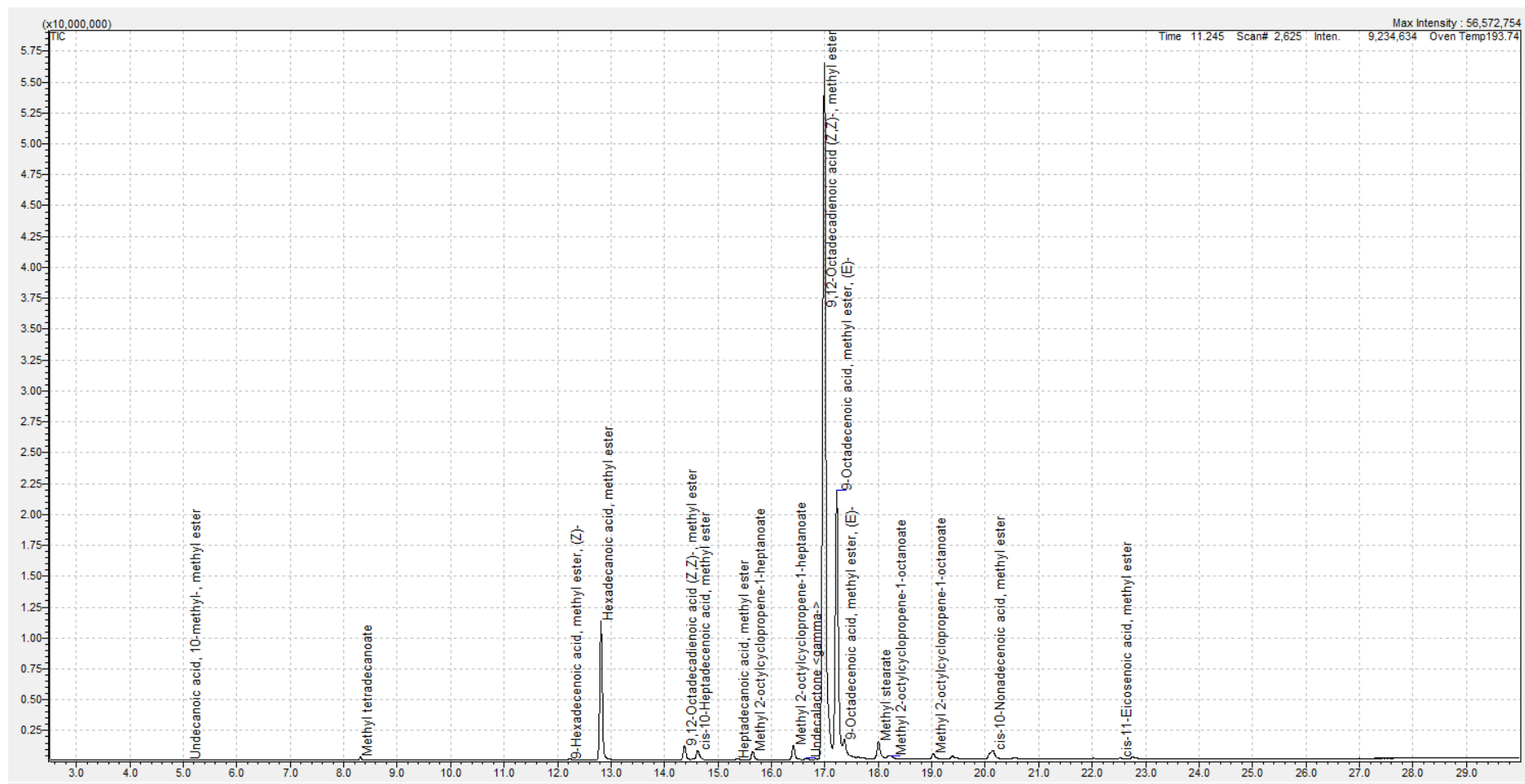
8. PRILOGE

Priloga 1

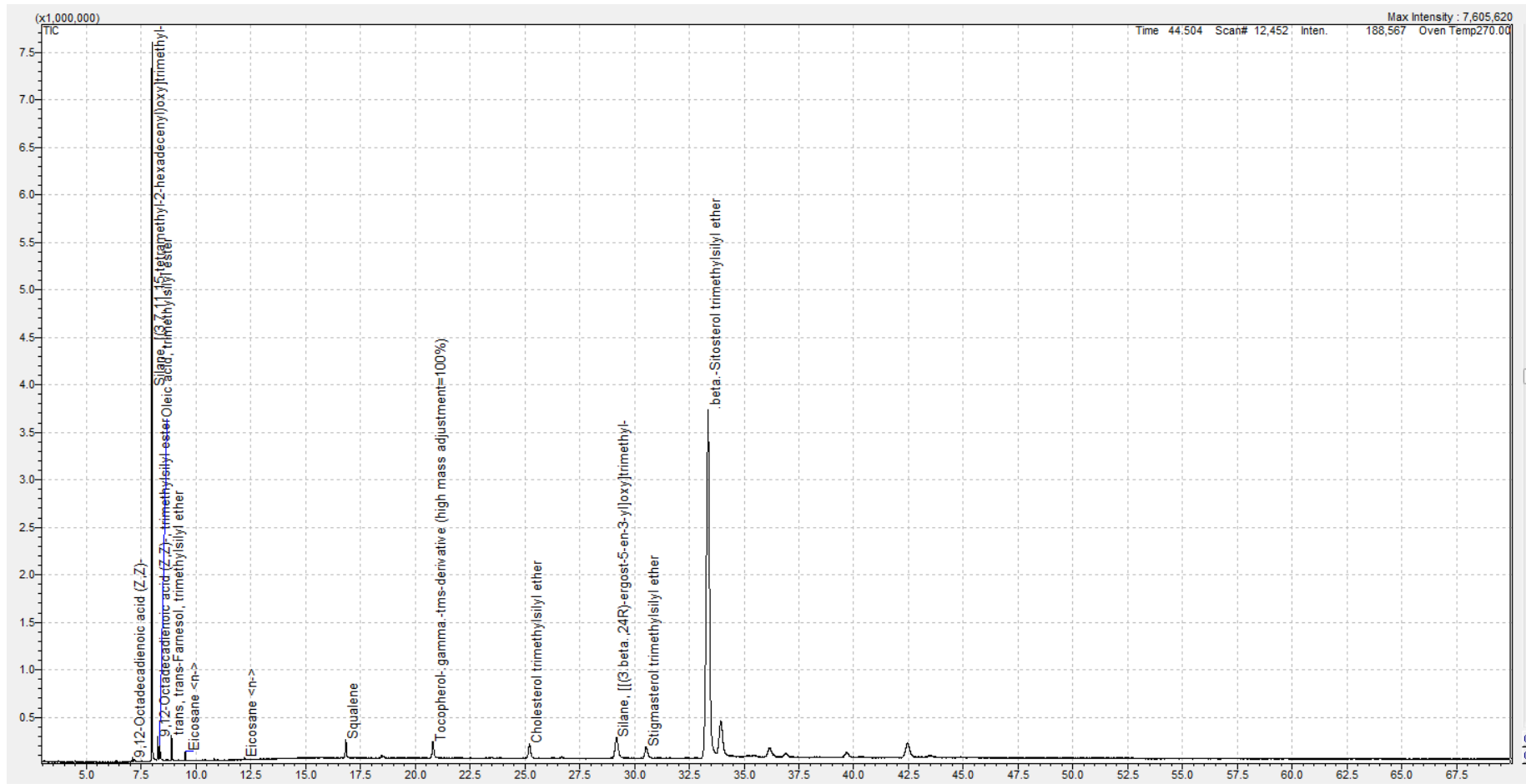
Preglednica IX: Podatki za lipovo olje

Številka vzorca	Vzorec	Masa semen, uporabljena za ekstrakcijo (g)	Masa pridobljenega olja po štirikratni ekstrakciji (g)	Masa olja, uporabljena za ekstrakcijo neumiljivih snovi (mg)	Masa neumiljivih snovi (mg)
1	Sedovec	33,15	5,93	4,73	70
2	Črni Kal	12,22	2,56	-	-
3	Litostroj	8,74	1,37	2,03	10
4	Škofja Loka	20,13	3,89	3,32	20
5	Ilirska Bistrica	18,5	3,59	-	-
6	Žablje	17,04	2,65	-	-
7	Vrhnik 1	13,61	2,85	-	-
8	Dravograd	8,4	1,82	-	-
9	Semič	32,33	6,18	5,00	110
10	Vrhnik 2	117,77	23,95	5,00	100
11	Brežice	15,12	1,41	-	-
12	Brezje	11,36	1,72	-	-
13	Lendava	38,94	8,24	5,00	260
14	Vrhavč	33,94	4,98	3,86	60
15	Črna na Koroškem	6,97	0,87	-	-
16	Nova Gorica	8,61	1,5	-	-
17	Novo mesto	62,19	9,26	5,00	130
18	Sežana	14,61	1,33	-	-

Priloga 2



Slika 15: Kromatogram maščobnokislinske sestave vzorca olja semen iz Sedovca po derivatizaciji



Slika 16: Kromatogram sestave neumiljivih snovi v vzorcu olja semen iz Sedovca po derivatizaciji

Priloga 3

Preglednica X: Odstopanja absorbanč posameznih vzorcev, izraženih kot RSD

Številka vzorca	Vzorec	Rastlinska vrsta	Povprečna absorbanca	RSD (%)
1	Sedovec	Lipa	0,232	1,63
2	Črni Kal	Lipa	0,192	1,08
3	Litostroj	Lipa	0,215	0,71
4	Škofja Loka	Lipa	0,163	1,87
5	Ilirska Bistrica	Lipa	0,230	3,21
6	Žablje	Lipovec	0,217	1,86
7	Vrhnika 1	Lipa	0,221	2,27
8	Dravograd	Lipovec	0,174	2,01
9	Semič	Lipa	0,240	0,64
10	Vrhnika 2	Lipa	0,307	3,26
11	Brežice	Lipovec	0,352	1,15
12	Brezje	Lipovec	0,206	3,18
13	Lendava	Lipa	0,298	2,57
14	Vrhavč	Lipovec	0,257	0,98
15	Črna na Koroškem	Lipovec	0,362	1,20
16	Nova Gorica	Lipa	0,259	0,89
17	Novo mesto	Lipovec	0,215	1,40
18	Sežana	Lipovec	0,389	1,57