

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARJETA ŠPILE

**ANALIZA ZA AROMO POMEMBNIH Hlapnih spojin in
maščobnokislinske sestave arganovega olja**

**ANALYSIS OF VOLATILE COMPOUNDS IMPORTANT
FOR THE AROMA OF ARGAN OIL AND ITS FATTY ACID
COMPOSITION**

Diplomsko delo

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Damjana Janeša, mag. farm.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem doc. dr. Damjanu Janešu, mag. farm., za vso pomoč, uporabne nasvete pri eksperimentalnemu delu in pisanju diplomske naloge, hvala tudi vsem prostovoljcem s Katedre za farmacevtsko biologijo za prostovoljno sodelovanje in pomoč pri organoleptični analizi.

Hvala tudi mojim staršem, ki so me tekom študija podpirali in spodbujali ter mi omogočili, da postanem, kar si želim. Za pomoč in nepozabna študentska leta hvala tudi mojim sošolkam in prijateljem.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja doc. dr. Damjana Janeša, mag. farm.

Predsednik komisije:izr. prof. dr. Marija Bogataj

Član komisije: doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar

Ljubljana, 2013

Marjeta Špile

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1 UVOD	1
1.1 ARGANIA SPINOSA	1
1.1.1 Socialna in ekonomska vloga arganovega gozda.....	2
1.2 ARGANOVO OLJE	3
1.2.1 Priprava arganovega olja	3
1.2.2 Fizikalne značilnosti arganovega olja.....	5
1.2.3 Sestava arganovega olja.....	5
1.2.4 Razlike v fizikalno-kemijskih lastnostih arganovega olja različne pridelave.	7
1.2.5 Farmakološke lastnosti arganovega olja	8
1.2.6 Arganovo olje v primerjavi z ostalimi jedilnimi olji.....	10
1.2.7 Neželeni učinki in toksičnost.....	10
1.2.8 Odmerjanje.....	10
1.2.9 Ponarejanje arganovega olja	11
1.2.10 Dosedanje raziskave hlapnih spojin v arganovih plodovih in semenih.....	11
1.3 PLINSKA KROMATOGRAFIJA Z MASNO SPEKTROSKOPIJO (GC-MS)..	12
1.3.1 Potek analize	13
2 NAMEN DELA	14
3 MATERIALI in METODE	15
3.1 VZORCI.....	15
3.2 REAGENTI	16
3.3 LABORATORIJSKA OPREMA IN APARATURE	17
3.4 METODA ANALIZE SESTAVE MAŠČOBNIH KISLIN	18
3.5 METODA ANALIZE HlapNIH SPOJIN AROME.....	19
4 EKSPERIMENTALNI DEL	20
4.1 Ekstrakcija olja iz arganovih semen	20
4.2 Analiza sestave maščobnih kislin	20
4.2.1 Tvorba estrov maščobnih kislin »in situ«	20

4.2.2	<i>Priprava referenčnih spojin</i>	21
4.3	Analiza hlapnih spojin arome	21
4.3.1	<i>Potek dela</i>	21
4.3.2	<i>Priprava vzorcev</i>	22
4.3.3	<i>Priprava referenčnih spojin</i>	23
4.4	Organoleptična analiza.....	24
4.4.1	<i>Potek dela</i>	24
4.4.2	<i>Priprava vzorcev</i>	24
4.4.3	<i>Iskanje in izbira prostovoljcev</i>	25
4.4.4	<i>Seansa vonjanja vzorcev</i>	25
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	27
5.1	Ekstrakcija olja iz arganovih semen	27
5.2	Sestava maščobnih kislin	27
5.3	Hlapne spojine arome	30
5.4	Organoleptična analiza.....	39
5.4.1	<i>Vzorec 1: Arganovo olje Baccara Rose</i>	39
5.4.2	<i>Vzorec 1: Sveže pripravljeno arganovo olje na FFa</i>	40
6	SKLEP.....	41
7	VIRI.....	42
8	PRILOGE	44

POVZETEK

Arganovo olje, izdelano iz semen arganovega drevesa ali arganije (*Argania spinosa*), velja že od nekdaj za enega najbolj cenjenih olj, bodisi zaradi omejenega področja rasti (uspeva le v Maroku), bodisi zaradi svojih številnih farmakoloških učinkov, ki jih lahko dosežemo tako z nanašanjem olja na kožo kot z uživanjem olja v prehrani.

Poznamo več vrst arganovega olja glede na namen uporabe (zunanje ali jedilno) in način izdelave (tradicionalno, hladno stiskano, industrijsko ...), ki se med sabo razlikujejo tako po fizikalnokemijskih parametrih kot tudi po kakovosti. Analizirali smo več različnih vzorcev olja, enega izmed njih smo pripravili sami iz arganovih semen. Da smo lahko preučili razlike med njimi, smo najprej izvedli analizo maščobnih kislin. Uporabili smo metodo "in situ" preesternja maščobnih kislin in plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo. Večina vzorcev je imela podobno sestavo maščobnih kislin, pri čemer so prevladovale bolj zdrave nenasičene maščobne kisline, predvsem veliko je bilo oleinske kisline, kar pojasni antiaterogeni učinek arganovega olja. Rahlo je odstopalo le tradicionalno arganovo olje, kar pomeni, da vpliv načina izdelave na kakovost ni zanemarljiv.

Glavni namen diplomskega dela je bila analiza hlapnih spojin, ki so bile do sedaj redko predmet raziskav. Vsestransko uporabnost in pomembne farmakološke učinke namreč rahlo zasenči dokaj neprijeten vonj, zato je bil naš cilj poiskati spojine, ki so za to odgovorne. Za analizo smo uporabili plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo in metodo termične desorpcije z direktnim injiciranjem vzorcev olja. Z uporabo referenčnih spojin smo nato izračunali koncentracije in vrednosti aktivnosti vonja posameznih hlapnih spojin. Glede na nizke vrednosti verjetno nobena izmed identificiranih spojin ne prispeva relevantno k aromi ali pa zanjo nismo našli podatka o pragu vonjanja in zato nismo mogli z zagotovostjo potrditi prispevka k neprijetnemu vonju arganovega olja. Rezultate smo senzorično potrdili še z organoleptično analizo rekonstrukcije arome in spojine z največjo aktivnostjo vonja. Po mnenju prostovoljcev, ki so sodelovali, nobena od preizkušenih spojin nima podobnega vonja, prav tako kot ne rekonstrukcija celotne arome, kar nam je potrdilo, da nobena izmed spojin, za katere smo lahko izračunali aktivnosti vonja, ne prispeva k neprijetni aromi arganovega olja.

ABSTRACT

Argan oil, which is made from seeds of the argan tree (*Argania spinosa*), has always been one of the most valuable oils due to its limited growth (it grows only in Morocco) or due to its numerous pharmacological effects, that can be reached with skin application or consumption of the oil.

There are different types of argan oil as for purpose of use (external or edible oil) or method of making (traditional, cold-pressed, industrial) and there is a difference in chemical composition and physical parameters and also in quality. Therefore, different samples were analysed, one was even made by extracting argan kernels in our laboratory. To examine differences between different samples of argan oil, fatty acid composition was first analysed employing “*in situ*” transesterification of fatty acids and gas chromatography coupled with mass spectrometry. For most of the samples the results were similar, nonsaturated fatty acids were predominating, especially oleic acid, which explains antiatherogenic effect of argan oil. The only sample with a little bit different composition was traditional argan oil, which means that a method for oil extraction also determines its quality.

But the main purpose of this thesis was the analysis of volatile compounds, which were rarely the subject of research so far. The universal applicability and invaluable pharmacological effects of argan oil are slightly overshadowed by its rather unpleasant odour. The goal of this research was finding compounds that are responsible for that. Again gas chromatography coupled with mass spectrometry was used together with thermal desorption with direct injection of samples. Afterwards concentration and odour activity value of an individual volatile compounds were calculated with the use of reference compounds. Due to low concentrations none of the compounds had relevant impact on aroma or the data about its odour threshold value was not available from the literature. Therefore its contribution to the aroma could not be established. The results were confirmed with an organoleptic analysis using reconstruction of argan oil aroma and a solution of a compound with highest odour activity value. Volunteers were of united opinion, that there is no similarity in odour of original oil and other two samples, which confirmed that none of the found compounds, for which we were able to calculate the odour activity value, contributes to the aroma of argan oil.

SEZNAM OKRAJŠAV

AOC – Argan Oil Company

BF₃ – borov trifluorid

BR – Baccara Rose

F.A.M.E - Mix C4-C24 – (angl.: *Fatty Acid Methyl Esters*) metilni estri maščobnih kislin C4-C24

FFa – Fakulteta za farmacijo

GC-MS – (angl.: *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) plinska kromatografija z masno spektrometrijo

HDL – (angl.: *High-Density Lipoprotein*) lipoproteini velike gostote

ISTE – (angl.: “*in situ*” *transesterification*) “in situ” preestrenje

kDa – kilodalton

kg / g / mg – kilogram / gram / milligram

KOH – kalijev hidroksid

kV – kilovolt

LDL – (angl.: *Low-Density Lipoprotein*) lipoproteini majhne gostote

mbar – milibar

meq – miliekvivalent

MK – maščobna kislina

NaOH – natrijev hidroksid

OAV – (angl.: *Odour Activity Value*) vrednost aktivnosti vonja

OTV – (angl.: *Odour Threshold Value*) vrednost praga vonja

Pa – pascal

ppb / ppm – “parts per billion / parts per million”

R² – kvadrat korelacijskega koeficienta

RI – retencijski indeks

1 UVOD

1.1 ARGANIA SPINOSA

Arganija je drevo, ki raste v južnem delu Maroka, v pokrajini, ki se razprostira od področja Safi na severu in vse do Sahare na jugu. Arganov gozd pokriva približno 800,000 ha in v njem raste več kot 2 milijona dreves. Povsem domača mu je izsušena in siromašna pokrajina, pogosto raste tudi po hribih. Arganija je v Maroku za zimzelenim hrastom - črničevjem (*Quercus ilex*) druga najbolj pogosta drevesna vrsta in ker je Maroko edina država na svetu, kjer do sedaj uspeva arganija, je le-ta označen kot endemit (1).

Drevo uvrščamo v družino saptovk (Sapotaceae) in je posebej odporno na suha in nerodovitna maroška tla, na temperature od 3 do 50°C, raste pa lahko tudi na nadmorski višini do 1500 m. Njegove korenine se razprostirajo čez velik del površja in so hkrati zelo globoke; sposobne so posrkati vodo in hranilne snovi iz globine več kot 30 m pod zemljo, kar je še posebej pomembno v sušnih obdobjih, ki lahko trajajo več mesecev (1).

Povprečna višina drevesa meri od 8 do 10 m, po obliki je podobno drevesu oljke. Njegova življenjska doba je dolga, doseže lahko od 150 do 200, nekatera drevesa tudi do 250 let. Ima majhne, temnozeleno liste, rastoče na vijugastih vejah, ki so lahko na koncih tudi bodičaste. Načeloma je argan zimzeleno drevo, vendar v dolgotrajnih sušnih obdobjih lahko kdaj tudi izgubi liste. Zanimiva pa je tudi oblika debla, saj se hrapavo lubje iz tal v krošnjo zviija kakor kača (1).

Zelenorumen sadež arganije je oblikovan kot orešček, je okrogel, jajčaste ali stožčaste oblike, odtrgan iz drevesa pa postane rjave barve. Znotraj mlečne pulpe, ki je pokrita s tankim olupkom, je seme s trdno lupino, ki predstavlja približno četrtino mase celotnega sadeža. Orešček argana vsebuje do tri z oljem bogata jedrca, iz katerih lahko ekstrahiramo olje z izkoristkom od 30-50 %, odvisno od metode ekstrakcije (2).

Navadno lokalna maroška populacija na podeželju izkoristi vse, kar lahko arganija ponudi, in uporabi na svoj način:

- ➔ jedrca semen: za pridobivanje olja,
- ➔ semenske lupine: kot gorivo za kurjavo,

- tropine pri iztiskanju olja: kot krmilo za živino,
- liste: kot hrano za koze,
- les: za gradnjo in kurjavo.

Ne glede na vse produkte, ki jih lahko dobimo iz arganije, pa je od vseh najbolj cenjeno prav arganovo olje, na trgu se ga drži sloves enega najbolj dragih olj in v kozmetiki ene izmed prvovrstnih kozmetičnih sestavin (1).

1.1.1 Socialna in ekonomska vloga arganovega gozda

Arganov gozd ima v Maroku zelo pomembno socialno in ekonomsko vlogo, država kot lastnik je lokalni populaciji prepustila velik del pravic, kot so: obiranje plodov in sečnja dreves, hkrati pa je vsaka vas zadolžena, da ohranja arganov gozd v dobrem stanju. Država šteje okoli 30 milijonov prebivalcev, arganovi gozdovi pa predstavljajo vir dohodka in obstoj za skoraj 3 milijone Maročanov. V arganovih gozdovih se je razvilo tudi poljedelstvo, kar je prineslo dodaten vir hrane in zaslužka lokalni populaciji. Izkoriščanje arganovega gozda naj bi po nekaterih ocenah priskrbelo kar 20 milijonov delovnih dni na leto, s čimer se je precej omejilo izseljevanje domačinov in jim omogočilo, da so si delo priskrbeli v domačem kraju (1).

Žal pa arganov gozd zadnje čase postaja zelo ranljiv ekosistem, za kar je krivo več dejavnikov. Med najpomembnejšimi so prekomerno obdelovanje zaradi potrebe po večjem izkoristku gozdov in potreb trga, erozija zemlje in napredovano širjenje puščav – dezertifikacija. Povečanje prebivalstva je s sabo prineslo tudi večje potrebe po lesu za gradnjo in ogrevanje, prekomerno obdelovanje in namakalni sistemi pa so izčrpali zaloge vode v zemlji, zaradi česar postaja le-ta vedno bolj slana (1).

Zaradi vsega naštetega so bile vpeljane različne dejavnosti z namenom ohraniti in regenerirati gozdove arganije, ki je pomemben tako z ekološkega vidika, saj predstavlja še zadnjo bariero, ki preprečuje širjenje puščave, kakor tudi z ekonomskega vidika, arganov gozd je namreč zelo pomemben vir dohodka domačemu prebivalstvu (1).

1.2 ARGANOVO OLJE

1.2.1 Priprava arganovega olja

Arganovo olje je v jugozahodnem Maroku poznano že iz časov Feničanov, zato ni presenetljivo, da je imelo vedno velik vpliv na življenje tamkajšnjih domačinov. Od nekdanj so arganovo olje izdelovali na tradicionalen način, nato pa je izdelavo olajšal polmehaniziran način hladnega stiskanja, s katerim danes večinoma pridelujejo dva tipa arganovega olja: negovalno arganovo olje in jedilno arganovo olje. Z uporabo v kozmetiki se je razširilo pridobivanje olja z ekstrakcijo s topili in nadalje iz tega pridobivanje obogatene arganovega olja. Ti dve metodi sta v uporabi izven meja Maroka, kjer industrijsko pridelujejo arganovo olje kot sestavino v kozmetičnih izdelkih iz uvoženih semen (3).

1.2.1.1 Tradicionalna metoda

Tradicionalno arganovo olje izdelujejo ženske maroških kooperativ (Slika 1). Zrelo sadno meso in olupek previdno odstranijo, nato pa arganov orešček zlomijo s kamni in tako dobijo jedrca za nadaljnje pridobivanje olja. Te najprej posušijo na zraku v glinastih kotlih, nato jih popražijo na rahlem ognju in pretlačijo v rjavkasto zmes, ki ji primešajo vodo. Kašo nato ročno stisnejo in dobijo rjavkasto emulzijo, iz katere se kasneje izloči bistro olje z okusom po lešnikih. Ostanek po stiskanju oz. t.i. tropine rjavočrne barve še vedno vsebujejo do 10 % olja in ga navadno uporabljajo za krmljenje živine (2).



Slika 1 – Ročno stiskanje arganovega olja v ženski kooperativi v Maroku (Foto: M. Špile)

Tehnika tradicionalne ročne ekstrakcije je dolgotrajna, saj za približno 1 liter olja potrebujemo 10 ur, izkoristek je manjši, okoli 30 %, hkrati pa je tudi slabše kakovosti in ima krajši rok uporabe zaradi dodane vode med samo ekstrakcijo. Tradicionalno olje še vedno iztiskajo sproti po potrebi, za boljšo obstojnost dodajajo sol (2).

1.2.1.2 Hladno stiskano arganovo olje

Z namenom pridelave večjih količin zelo kakovostnega arganovega olja so v jugozahodnem Maroku začeli ustanavljati ženske kooperative, kjer na mehanski način pridobivajo arganovo olje s hladnim stiskanjem arganovih semen. S to tehnologijo lahko ena oseba v 13 urah pridelala 4-6 litrov olja iz 100 kg suhih semen, večji je tudi izplen, okoli 45 % (4).

Izvor sadeža in metoda pridelave sta ključna za kakovost arganovega olja, zato so v kooperative vpeljali stroga pravila priprave, kar vključuje mehansko stiskanje in lupljenje sadežev namesto ročnega, prav tako so prepovedali uporabo oreščkov, ki so jih prebavile koze, kljub temu, da to nikoli ni bila redna praksa v tradicionalni pridelavi. Koncentracija polifenolov in tokoferolov je v obeh primerih približno enaka, razlika v roku uporabe hladno stiskanega arganovega olja in arganovega olja, izdelanega na tradicionalen način, pa je posledica izbire semen za pridelavo in uporabe vode slabe mikrobiološke kakovosti v tradicionalnem načinu. Prav tako ima arganovo olje, izdelano s hladnim stiskanjem, manjše kislinsko število (4).

Jedilno arganovo olje je pridelano iz praženih semen, medtem ko za izdelavo negovalnega olja in olja za kozmetične namene uporabljajo nepražena semena. Jedilno arganovo olje je tradicionalno del zelo hranilnega pripravka, imenovanega »Amlou«, katerega sestavine so tudi mandlji in med. Negovalno arganovo olje (»beauty grade«) je namenjeno uporabi neposredno na koži ali laseh. Nima značilnega okusa po lešnikih kakor jedilno arganovo olje, vsebnost hlapnih spojin je nižja kot v jedilnem olju, prav tako je krajši rok uporabe (do 2 leti) (4).

1.2.1.3 Ekstrakcija s topili

Industrijsko kozmetično arganovo olje (»cosmetic grade«) izdelujejo z ekstrakcijo zdobljenih arganovih koščic z lipofilnimi topili, pri čemer ni določenih zahtev za kakovost vhodnega materiala. Takšno olje je navadno destilirano in deodorirano, uporabljamo pa ga

izključno za izdelavo negovalnih krem, losjonov in šamponov, saj so njegove organoleptične lastnosti manj zadovoljive kakor pri olju, ki ga pridobivajo po tradicionalni metodi ali s hladnim stiskanjem. Pogosto dodajo tudi antioksidante (tokoferoli, polifenoli ...), ki preprečijo izgubo naravnih snovi med ekstrakcijo in/ali destilacijo (5). Izplen je od 50 do 55 % (2).

1.2.1.4 Obogateno arganovo olje

Tudi to olje je uporabno izključno za kozmetične namene in ga pripravijo z molekularno destilacijo surovega olja, pridobljenega z ekstrakcijo s topili, pod znižanim tlakom (0,14 Pa) in pri temperaturi 270°C. Vrednost nemiljivega dela in koncentracija maščobnih kislin v takem olju je trikrat večja kakor v hladno stiskanem olju, zaradi večje vsebnosti antioksidantov pa je takšno olje tudi dalj časa uporabno. Vendar pa obogatenost z maščobnimi kislinami preprečuje uporabo takšnega olja kot surovega materiala, hkrati pa je lahko tudi dražeče za kožo, če ga nanjo nanesemo neposredno. Proste maščobne kisline lahko iz obogatene arganovega olja odstranimo z destilacijo pri temperaturi med 150 in 200°C in tlaku 1,5-8,5 Pa (3).

1.2.2 Fizikalne značilnosti arganovega olja

Jedilno arganovo olje ima pri temperaturi 20°C relativno gostoto od 0,906 do 0,919. Lomni količnik, prav tako merjen pri temperaturi 20°C, je 1,463 do 1,472, kislinsko število pa od 0,8 do 2,5. Velik razpon slednjega je posledica razlike v pridobivanju olja, kislinsko število je najmanjše za ekstra deviško arganovo olje, s slabšanjem kakovosti pa se veča (6).

1.2.3 Sestava arganovega olja

99 % arganovega olja sestavljajo acilgliceroli; 95 % je triacilglicerolov, preostale 4 % pa predstavljajo monoacilgliceroli (0,27-0,65 %), diacilgliceroli (0,68-1,53 %) in proste maščobne kisline (1,1-2 %) (Tabela 1). Glavni dve maščobni kislini, ki sta prisotni v arganovem olju, sta oleinska kislina (enkrat nenasičena maščobna kislina) in linolna kislina (dvakrat nenasičena maščobna kislina). Na tretjem in četrtem mestu sta palmitinska in stearinska kislina, obe sta nasičeni maščobni kislini (7).

Tabela 1 – Vsebnost MK v arganovem olju (7)

IME KISLINE	ODSTOTEK (%)
Oleinska kislina	43-49
Linolna kislina	29-36
Palmitinska kislina	11-15
Stearinska kislina	4-7
Palmitoleinska kislina	0,3-3
Arašidna kislina	<0,5
Linolenska kislina	<0,2
Behenojska kislina	<0,2
Miristinska kislina	<0,1

Preostali 1 % arganovega olja predstavlja nemiljivi del, ki je sestavljen iz karotenov (37 %), tokoferolov (8 %), triterpenskimi alkoholov (20 %), sterolov (29 %) in ksantofilov (5 %). V ekstra deviškem arganovem olju je koncentracija tokoferola med 600 in 900 mg/kg, glavni predstavnik je gama-tokoferol (81-92 %), ki je močan antioksidant, drugi tokoferoli so še alfa-, beta- in delta-tokoferol. Z uporabo masne spektroskopije so zasledili še nekatere fenolne derivate, kot so kavna kislina, oleuropein, vanilinska kislina, tirozol, ferulna kislina, siringinska kislina, katehol, resorcinol, (-)-epikatehin in (+)-katehin. V arganovem olju so identificirali naslednje triterpenske alkohole: tirukalol, beta-amirin, butirospermol, lupeol in 24-metilencikloartanol (7). Prisotni pa so tudi sledovi anorganskih snovi (železo, baker, mangan in svinec). Od vseh komponent naj bi bila za ugodne farmakološke lastnosti najbolj zaslužna skvalen in tokoferol (4).

Kot uspešni kardioprotektivi so predstavljene omega-3 maščobne kisline, medtem ko so omega-6 maščobne kisline ključne v uravnoteženi maščobni dieti. Oleinska kislina je odgovorna za zmanjšanje krvnega tlaka (regulacija strukture membranskih lipidov in inhibicija aktivacije gelatinaze), linolna kislina, ki je glede na koncentracijo druga najbolj pomembna kislina v arganovem olju, pa je metabolni prekursor arahidonske kisline in derivatov eikozanoida. Fenolne spojine in tokoferol so znane po svojih antioksidativnih lastnostih kot znani lovilci radikalov, gama-tokoferol pa igra pomembno vlogo v preventivi bolezni srca in po možnosti raka prostate (4).

1.2.4 Razlike v fizikalno-kemijskih lastnostih arganovega olja različne pridelave

Negovalno, kozmetično in obogateno arganovo olje imajo precej podobne fizikalno-kemijske lastnosti (Tabela 2). Pričakovano je vrednost nemiljivega dela v obogatenem olju veliko večja, razlike pa se pojavijo v koncentraciji tokoferola; ta je najmanjša v kozmetičnem arganovem olju, kar je verjetno posledica manjše topnosti tokoferola v lipofilnih topilih. Negovalno arganovo olje ima trikrat večjo koncentracijo tokoferola, vendar 2,5-krat manjšo kot obogateno arganovo olje. Razlik v sestavi maščobnih kislin vseh treh tipov olj skorajda ni (8).

Tabela 2 – Razlike v fizikalno-kemijskih parametrih, sestavi MK in koncentraciji tokoferola med različnimi vrstami arganovega olja (8)

	<i>Negovalno arganovo olje</i>	<i>Kozmetično arganovo olje</i>	<i>Obogateno arganovo olje</i>
		<u>Fizikalno-kemijski parametri</u>	
Kislinsko število (mg KOH/g olja)	<1	1	<4
Jodno število (g I ₂ /100 g olja)	102	98,1	100
Peroksidno število (meq O ₂ /kg olja)	1,2	0,8	<10
Saponifikacijsko št. (mg KOH/g olja)	196	195	195
Nemiljivi del (%)	0,8	1	3,8
		<u>Koncentracija tokoferola</u>	
Skupni tokoferol (mg/kg)	771	250	1834
		<u>Maščobnokislinska sestava (%)</u>	
Palmitinska kislina	13	13,5	13,5
Stearinska kislina	5,5	5,5	5,5
Oleinska kislina	46	47	48
Linolna kislina	35	33	34
Linolenska kislina	<0,5	<0,5	<0,5

1.2.5 Farmakološke lastnosti arganovega olja

Arganovo olje se je v nekaj letih povzpelo iz turistične atrakcije v eno najbolj cenjenih olj na svetu, odgovorne za to pa so njegove številne farmakološke lastnosti (Tabela 3) (9).

Prvotno so farmakološke lastnosti arganovega olja ocenili na podlagi lastnosti njegovih komponent, ki so jih izolirali in farmakološko ovrednotili v preprostih modelih. Nedavno pa se je pričelo znanstveno vrednotenje tradicionalnih trditev o učinkih arganovega olja z uporabo živalskih modelov in kohortnih ali kliničnih študij z namenom ugotoviti, ali je arganovo olje le dober dodatek k prehrani ali dejansko ima farmakološke lastnosti (5). Jedilno arganovo olje in arganovo olje za zunanjo uporabo imata različne terapevtske lastnosti. Kozmetične lastnosti so večinoma osnovane na tradicionalnem izročilu in imajo manj znanstvene podlage kakor jedilno arganovo olje (10).

Tabela 3 – Farmakološke lastnosti (10)

<i>ZUNANJA UPORABA</i>	<i>UŽIVANJE OLJA</i>
Proti staranju	Hepatoprotektiv
Vlaženje	Antidiabetik
Celjenje ran	Antiproliferativno delovanje
Proti aknam	Proti debelosti
Zmanjšano izločanje sebuma	Holeretik

1.2.5.1 Kemoprotektivni učinki v boju protu raku

Ker imata arganovo in olivno olje podobno sestavo, kemoprotektivni učinek pripisujemo tudi arganovemu olju. Zaradi visoke vsebnosti gama-tokoferola, ki je eden najmočnejših antioksidantov, in skvalena pa naj bi bilo arganovo olje celo bolj učinkovito v preprečevanju rakavih obolenj. S poskusi so dokazali, da antioksidanti, ki so prisotni v arganovem olju, preprečijo ali zakasnjijo sproženje reaktivnih kisikovih zvrsti po lipidni peroksidaciji v celicah človeške ali podganje plazme (11).

1.2.5.2 Preventiva debelosti in kardiovaskularnih zapletov

Ker so fenolne komponente, fitosteroli in tokoferoli znani po učinkovitem preprečevanju hiperholesterolemij, ni presenetljivo, da je arganovo olje znano tudi zaradi teh učinkov. Fenolne komponente preprečujejo oksidacijo LDL proteinov v človeških celicah plazme in

hkrati povečajo HDL fluidnost. Prisotnost teh komponent je odgovorna za antiaterogen potencial arganovega olja (11).

Prav tako pa arganovo olje inhibira agregacijo trombocitov brez učinkov na podaljšanje časa krvavenja ali na koncentracijo trombocitov. S študijami na podganah, ki so uživale arganovo olje, so dokazali kar 36 % inhibicijo agregacije trombocitov, inducirane s trombinom, pri čemer je čas krvavenja ostal enak (11).

1.2.5.3 Učinek na ščitnični hormonski profil

Hormoni ščitnice in metabolizem maščobnih kislin so dokaj povezani; nenasičene maščobne kisline naj bi imele vlogo pri preprečevanju hipotiroidizma, vendar študije za zdaj tega še niso dokazale (11).

1.2.5.4 Antidiabetična aktivnost

Zaščitni kardiovaskularni in antidiabetični učinki arganovega olja so njegove najdlje znane farmakološke lastnosti, vendar so bili antidiabetični učinki do sedaj dokazani le s študijami na podganah. Intraperitonealna aplikacija arganovega olja 30 min pred uživanjem glukoze je sprožila značilno glikemično znižanje, ki je trajalo tri ure. Prav tako pa je arganovo olje pri poskusih na podganah močno znižalo absorbcijo glukoze v jejunumu (11).

1.2.5.5 Vpliv na imunski sistem

Nedavne biokemične študije na podganah so pokazale, da lahko maščobne kisline spremenijo imunski odziv; uživanje maščob namreč vpliva na proliferacijo limfocitov, produkcijo limfocitnega citokina in celično imunost (11).

1.2.5.6 Uporaba v kozmetiki

Kreme, ki vsebujejo arganovo olje, so v kozmetologiji pogosto indicirane kot kreme za vlaženje, proti staranju in za obnavljanje kože. Zmanjšanje izločanja sebuma pri zunanji uporabi arganovega olja je bila dokazana na 20 prostovoljcih z mastno kožo na obrazu, starih od 17 do 50 let, pri čemer so jim količino sebuma izmerili na čelu in obeh licih. Kremo z arganovim oljem so nanašali dvakrat na dan in po štirih tednih je prišlo do bistvenega izboljšanja mastne kože in zmanjšanja izločanja sebuma (10).

1.2.6 Arganovo olje v primerjavi z ostalimi jedilnimi olji

Kakovost jedilnega olja navadno ocenjujemo z večih vidikov, med katerimi so najpomembnejši senzorične lastnosti, hranilna vrednost in farmakološke lastnosti. Zadnje dvoje je pomembno iz vidika prehranske vrednosti, medtem ko so senzorične lastnosti pomembne za pridobitev kupcev in deleža na trgu (11).

Pomemben delež pri ocenjevanju kakovosti olja predstavlja sestava maščobnih kislin v olju, predvsem prisotnost nenasičenih maščobnih kislin, saj so le te prekursorji levkotrienov in prostaglandinov (11).

Olivno olje in arganovo olje sta si v sestavi zelo podobni, obe vsebujeta veliko oleinske kisline, na drugem mestu je linolna kislina, kot nasičeni maščobni kislini sta v obeh oljih palmitinska in stearinska kislina. Če upoštevamo povprečne vrednosti, je olivno olje bolj bogato z emkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami, vendar je razlika med njima predvsem posledica velike variabilnosti sestave olivnega olja, saj ga pridelujejo po celotnem Sredozemlju in zaradi različnega geografskega izvora variira tudi sestava maščobnih kislin. Za primer vzemimo linolno kislino, ki je lahko v olivnem olju prisotna v koncentraciji v razponu od 3,5 do 21%. Sestava maščobnih kislin arganovega olja je veliko bolj homogena, posledično je njegova prehranska vrednost manj variabilna. Isto lahko trdimo tudi za vse komponente, ki so v oljih v majhnih količinah; določena olivna olja ne vsebujejo vseh teh spojin ali pa so prisotna v različnih koncentracijah, zaradi česar nimajo vsa olivna olja enakih farmakoloških lastnosti. Zopet pa nasprotno velja za arganovo olje, kjer se profil nizkokoncentracijskih komponent zelo malo spreminja, prav tako pa farmakološki učinek (11).

1.2.7 Neželeni učinki in toksičnost

Arganovo olje v Maroku že stoletja uporabljajo v prehrani ali za nego kože, vendar zaenkrat ni znano, da bi bilo olje kakorkoli kronično ali akutno toksično. Poznan je le en primer alergije na arganovo olje, pri čemer je bil alergen 10 kDa velik protein, ki ga uvrščamo v družino oleozinov in ga najdemo tudi v arašidih in sezamu (11).

1.2.8 Odmerjanje

Terapevtski odmerek za preprečevanje metabolnih bolezni je 15-30 g (1-2 jedilni žlici) arganovega olja na dan, vzdrževalni odmerek je 3-6 g. Lahko ga dodamo solatam kot preliv ali jedem po tem, ko so že kuhane. Arganovo olje ni primerno za dolgotrajno cvrtje, lahko pa ga uporabimo za krajše oz. hitro cvrtje (12).

1.2.9 Ponarejanje arganovega olja

Zaradi visoke cene arganovega olja se porajajo vprašanja glede ponarejanja, zato so posledično nujne metode detekcije ponarejenega in manj kakovostnega arganovega olja. V tem primeru izkoristimo posebnost arganovega olja, za katerega je značilno, da ima edinstveno sestavo sterolov. To so spojine, ki so v manjših količinah pogoste v rastlinah in večini rastlinskih olj. Arganovo olje vsebuje 142-220 mg fitosterolov na 100 g olja. Dva glavna sterola, ki ju najdemo v arganovem olju, sta *šotenol* in *spinasterol*, *kampesterol* pa je prisoten le v sledovih. Slednji je v višjih koncentracijah prisoten v vseh drugih rastlinskih oljih. Na osnovi tega so razvili metodo plinske kromatografije, s katero lahko ugotovimo koncentracijo kampesterola, ki nam v primeru višjih vrednosti lahko nakaže na ponarejeno arganovo olje. V kombinaciji z metodo določanja sestave maščobnih kislin lahko s 95 % zanesljivostjo potrdimo čistost arganovega olja (7).

1.2.10 Dosedanje raziskave hlapnih spojin v arganovih plodovih in semenih

Na področju raziskav hlapnih spojin arganije so bili do sedaj objavljeni le trije znanstveni članki. Prvič so hlapne spojine s pomočjo GC-MS raziskovali leta 1998 in sicer so primerjali sestavo hlapnih spojin v listih, sadnem mesu in jedrcih semen. V prvih dveh so našli kar nekaj različnih spojin, medtem ko so v jedrcih našli le 14-metiliden-2,6,10-trimetilheksadecen (13). Kasneje so raziskovali še vsebnost esencialnih olj v sadnem mesu plodov arganije, pri čemer so odkrili vsebnost kafe in 1,8-cineola. Ti dve spojini se uporabljata med drugim tudi kot insekticida, kar je vodilo do spoznanja o novem potencialnem načinu uporabe produktov arganije (14). Tretja izmed raziskav in hkrati edina, pri kateri so vzorci bili olje samo, pa je bila primerjava različnih vzorcev arganovega olja glede na to, ali so bila jedrca pred samo izdelavo olja pražena ali ne in ali so plodove prebavile kože, pri čemer so identificirali hlapne spojine in kvalitativno ocenili njihov vonj. Skupni vsem vzorcem so bili derivati aldehydov in ketonov, za katere so tudi sklepali, da imajo največji prispevek k vonju vzorcev (15).

1.3 PLINSKA KROMATOGRAFIJA Z MASNO SPEKTROSKOPIJO (GC-MS)

Plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo (GC-MS) je danes ena izmed najpomembnejših analiznih metod za ugotavljanje identitete in koncentracije posameznih komponent v kompleksnih zmesih, pri čemer plinski kromatograf najprej loči posamezne komponente, masni spektrometer pa nato ločene komponente posamezno identificira (Slika 2) (16).

Zaradi visoke selektivnosti in občutljivosti je ta tehnika postala pomembna za širok spekter različnih analiz. Uporaba GC-MS tehnike je omejena na spojine, ki so dovolj hlapne, da jih lahko s stopnjevanjem temperature ločimo med sabo s plinsko kromatografijo, razvoj v zadnjih letih omogoča elucijske temperature tudi do 500°C. Sklopitev plinske kromatografije z masno spektroskopijo je omogočila pridobivanje zanesljivih rezultatov v okoljevarstvenih analizah, forenzični znanosti in analizi sledov in zaostankov v hrani, zdravilih itd. Poleg zanesljivih rezultatov pa je prednost GC-MS tehnike tudi tehnična realizacija samega sistema, kolone iz kremenčevega stekla so preproste za uporabo, jih lahko hitro zamenjamo in so dostopne v mnogih visokokakovostnih oblikah, optimiziran tok nosilnega plina pa je dobro kompaktilen z masnim spektrometrom, zato omogoča direktno sklopitev (16).



Slika 2 – GC-MS na Katedri za farmacevtsko biologijo FFa (Foto: M. Špile)

1.3.1 Potek analize

Pričetek analize je injiciranje zmesi v **mobilno fazo**. Le ta je pri plinski kromatografiji inerten plin, najpogosteje helij. Z nosilnim plinom potuje zmes spojin do kolone, v kateri je **stacionarna faza**, ta selektivno reagira s posameznimi spojinami zmesi in glede na stopnjo interakcije spojine ob različnih časih zapustijo kolono – to je glavni princip ločbe spojin v zmesi. Ker je kolona nameščena v prostoru, kjer lahko poljubno nastavimo temperaturo, si navadno s temperaturnim programom pomagamo pri ločbi spojin; tiste spojine z nižjim vreliščem bodo prišle skozi kolono hitreje kot tiste z višjim (16).

Ko spojina zapusti kolono, vstopi v detektor. V našem primeru gre za identifikacijo spojin z *elektronsko ionizacijo*; spojina vstopi v tok elektronov, kar povzroči razpad molekule na fragmente, ki so navadno nabiti ioni z določeno maso. Ionizirane fragmente vodimo v analizator, najpogosteje je to t.i. kvadrupolni masni analizator, ki glede na spreminjajoče se elektromagnetno polje selektivno usmerja ionizirane fragmente. Rezultat signalov, poslanih iz detektorja na računalnik, je *masni spekter*. Le ta je za dano kemično komponento pri danih pogojih vedno enak. Računalnik hrani knjižnico masnih spektrov za spojine, jih primerja z dobljenimi spektri pri analizi in tako identificira spojino. Identiteto nato potrdimo še s primerjavo referenčnih spojin (16).

2 NAMEN DELA

Zanimanje za arganovo olje in hkrati njegova uporaba se v zadnjih letih izrazito povečujeta, t.i. »maroško zlato« je postalo svetovna senzacija na področju naravne kozmetike in uživanja olj v prehrani kot preventiva proti različnim boleznim, zato ni presenetljivo, da se je v zadnjih letih tudi povečalo število raziskav na tem področju. Najdemo lahko kar nekaj študij o farmakoloških lastnostih arganovega olja, pomenu za prebivalstvo in o njegovi biokemični sestavi, zelo malo pa je do sedaj bilo raziskano na področju hlapnih spojin v samem olju; ravno neprijeten vonj arganovega olja je namreč odgovoren za njegovo omejeno uporabo na področju kozmetike.

Najprej bomo z metodo *ISTE* – »in situ« preestrenja maščobnih kislin začeli analize sestave maščobnih kislin arganovega olja, pri čemer bomo uporabili vzorce različnega izvora in načina pridelave. Pri tej metodi bomo maščobne kisline pretvorili v metilne estre, nato bomo le te ekstrahirali v organsko topilo in ekstrakt aplicirali na GC-MS. Naš glavni namen pri tej metodi je ugotoviti in preučiti razlike v sami sestavi maščobnih kislin v različnih vzorcih arganovega olja.

Glavni del celotne raziskave pa bo analiza hlapnih spojin v arganovem olju, pri čemer bomo uporabili metodo *termične desorpcije*, ki daje pravilnejše podatke o sestavi hlapnih spojin, kot enostavnejša metoda analize plinske faze nad vzorcem (headspace). Hlapne spojine bomo identificirali in izračunali njihovo koncentracijo s pomočjo umeritvene premice iz referenčnih spojin, ki jih bomo kasneje aplicirali na GC-MS.

Ko bomo identificirali vse hlapne snovi v olju, bomo izvedli še organoleptične analize in poskušali senzorično ovrednotiti rezultate, ki smo jih dobili z GC-MS analizo. Iz referenčnih spojin bomo naredili rekonstrukcijo arome, pri čemer bomo med sabo primerjali vzorce brez določenih spojin z namenom ugotovitve, katere spojine res značilno vplivajo na aromo in katera izmed njih je najbolj odgovorna za neprijeten vonj.

3 MATERIALI in METODE

3.1 VZORCI

Naši vzorci so bili naslednji:

A1 – arganovo olje *Primavera* (Oy – Mittelberg, Nemčija)

A2 – arganovo olje *Argan Oil Company* (Maroko)

A3 – praženo arganovo olje *Bio Planete* (Ölmühle Moog Sarl, Bram, Francija)

A4 – arganovo olje *Baccara Rose* (Sonsbeck, Nemčija)

A5 – tradicionalno arganovo olje iz berberske lekarne (Fez, Maroko)

A6 – sveže pripravljeno arganovo olje, ekstrahirano iz semen arganovih plodov (semena kupljena v Marakešu, Maroko)

Prvih pet vzorcev arganovega olja smo bodisi naročili preko spleta bodisi kupili v trgovini, sveže ekstrahirano olje pa smo pripravili sami (Slika 3).



*Slika 3 – Vzorci arganovega olja in semen argana za izdelavo sveže iztisnjenega olja
(Foto: M. Špile)*

3.2 REAGENTI

Reagenti za pripravo metilnih estrov maščobnih kislin:

- metanol (Panreac, Barcelona, Španija),
- diklorometan (Panreac, Španija),
- natrijev hidroksid (Merck, Darmstadt, Nemčija),
- 14 % borov trifluorid v metanolu (Merck, Darmstadt, Nemčija).

Topila:

- prečiščena voda (Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani),
- heptan, p.a. (Carlo Erba, Milano, Italija),
- pentan, p.a. (Carlo Erba, Milano, Italija),
- absolutni etanol (Carlo Erba, Milano, Italija).

Sestava maščobnih kislin (referenčne spojine):

Metoda »in situ« preestrenja:

- F.A.M.E. Mix C4-C24 (Supelco, Bellefonte, PA, ZDA)

Metoda termične desorpcije (referenčne spojine):

- cikloheksankarboksilna kislina,
- nonanojska kislina,
- anetol,
- 4-nonolakton,
- 5-dekanolid,
- 5-dodekanolid,
- 5-tetradekanolid,
- metilpalmitat,
- etilpalmitat,
- metiloleat,
- etiloleat,
- dekanal,
- 2,4-nonadienal,
- linalilacetat,

- 2,4-dekadienal,
- nerilacetat,
- 2,5-dimetilpirazin,
- 2-decenal,
- lavrinska kislina,
- miristinska kislina,
- palmitinska kislina,
- metilinolenat,
- limonen,
- kafra,
- benzilbenzoat,
- nonanal.

Referenčne spojine za metodo termične desorpcije smo naročili preko naslednjih dobaviteljev:

- Sigma Aldrich, Steinheim, Nemčija,
- Merck, Darmstadt, Nemčija,
- Fluka, Buchs, Švica.

3.3 LABORATORIJSKA OPREMA IN APARATURE

Mletje

laboratorijski mlinček (Waring, Newhartford Connecticut, ZDA)

Tehtanje

analizna tehtnica PC 2000 (Mettler, Zürich, Švica)

analizna tehtnica KERN ALS 120-4 (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Nemčija)

Odporevanje pri znižanem tlaku

Rotavapor R-215 (Büchi, Flawil, Švica)

Centrifugiranje

centrifuga Centric 400R (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

Mešanje

mešalnik Wibbromix 10 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

Raztapljanje in segrevanje

ultrazvočna kadička SONIS 2GT (Iskra PIO, d. o. o., Šentjernej, Slovenija)

Plinska kromatografija z masnim detektorjem – GC-MS

Sistem: GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonska)

Kolona:

- kapilarna kolona Rxi-5 Sil MS, 30 m x 0,25 mm, 0,1 µm 5 % difenil/95 % dimetilpolisiloksan (Restek, Bellefonte, PA, ZDA)

Računalniški program: GCMS Solution 2.3 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japonska)

Ostali pribor

avtomatske pipete Proline (10 µl, 100 µl, 1000 µl), (Biohit, Helsinki, Finska)

plastične epruvete, 50 ml, TPP (TPP, Trasadingen, Švica)

plastične epruvete Eppendorf, 1,5 ml (Brand, Nemčija)

3.4 METODA ANALIZE SESTAVE MAŠČOBNIH KISLIN

Kromatografske razmere

- kapilarna fenildimetilsiloksanska kolona (5 % difenil / 95 % dimetilpolisiloksan), 30 m × 0,25 mm, 0,1 µm debela stacionarna faza
- način injiciranja: split (1 : 100)
- nosilni plin: helij
- pretok: 1 ml/min
- temperaturni program: začetno temperatura kolone smo nastavili na 160°C, potem je temperatura naraščala 5°C / min in dosegla 300°C ter 10 min ostala konstantna pri 300°C
- volumen injiciranja: 1 µL
- temperatura injektorja: 250°C
- temperatura ionskega izvora: 200°C
- temperatura vmesnika: 300°C

- napetost na detektorju: 1 kV
- celokupen čas analize: 36 min

3.5 METODA ANALIZE HLAPNIH SPOJIN AROME

Kromatografske razmere

- kapilarna fenildimetilsiloksanska kolona (5 % difenil/95 % dimetilpolisiloksan), 30 m × 0,25 mm, 0,1 µm debela stacionarna faza
- način injiciranja: splitless (vzorci olja) / split 100 (raztopine referenčnih spojin)
- nosilni plin: helij
- pretok: 1 ml/min
- temperaturni program: začetno temperaturo kolone smo nastavili na 50°C, nato je temperatura naraščala 6°C / min in dosegla 250°C ter nato še 10 min do končne temperature 300 °C. Pri končni temperaturi smo program zadržali še 3 minute.
- volumen injiciranja: 1 µL
- temperatura injektorja: 150°C
- temperatura ionskega izvora: 200°C
- temperatura vmesnika: 330°C
- napetost na detektorju: 1 kV
- celokupen čas analize: 44,33 min

4 EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 Ekstrakcija olja iz arganovih semen

Kupljena semena arganovih plodov smo najprej s kladivom razbili, da smo iz njih dobili jedrca, iz katerih pridobivamo arganovo olje. Le ta smo zmleli v mlinčku, vsebino stehali in zapisali maso. V erlenmajerico smo stresli zmes, dodali približno 10-kratno količino topila (60 ml pentana) in dobro premešali. Vsebino smo prefiltrirali preko steklenega filtra št. 3 v označeno bučko, jo stehali in zapisali maso. Tako pripravljeni zmesi za ekstrakcijo smo pri temperaturi 40°C in začetnem tlaku 600 mbar odparili topilo pri znižanem tlaku. Tlak smo postopoma zniževali, dokler nismo odstranili vsega topila (do konstantne mase vzorca). Bučko smo ponovno stehali skupaj z vsebino in z izračunom ugotovili izplen ekstrakcije.

4.2 Analiza sestave maščobnih kislin

4.2.1 Tvorba estrov maščobnih kislin »in situ«

Začetek našega eksperimentalnega dela je bila analiza sestave maščobnih kislin arganovega olja, pri čemer smo ugotovili vsebnost in koncentracije maščobnih kislin v vseh šestih vzorcih arganovega olja, ki smo jih imeli na voljo (Argan oil company, Baccara Rose, Primavera, Bio Planete, tradicionalno in sveže pripravljeno). Za analizo smo uporabili metodo po Parku in Goinsu (17). Najprej smo v epruveto odpipetirali 50 µl olja in dodali 100 µl diklorometana z namenom izboljšanja topnosti ter 1 ml 0,5 M NaOH v metanolu (to raztopino smo predhodno pripravili tako, da smo 1 g NaOH raztopili v 50 ml metanola). Vsebino smo premešali in zaprto epruvetko za 10 min postavili na vodno kopel v ultrazvočno kadičko s temperaturo 80°C. Po desetih minutah smo jo vzeli iz vodne kopeli in ohladili na sobno temperaturo. Vsebini smo dodali 1 ml 14 % BF₃, premešali in ponovno segrevali 10 min pri 80°C. Zopet smo vsebino ohladili na sobno temperaturo in ji dodali 1 ml destilirane vode in 1 ml heptana. Vsebino smo pretresli najprej ročno, nato pa nekaj časa stresali še na mešalniku Vibromix. Po mešanju je sledilo petnajstminutno centrifugiranje pri sobni temperaturi na 1000 obratov. Po končani ločitvi vodne in organske faze smo v vialo najprej odpipetirali 900 µl heptana in nato še 100 µl zgornje

(organske) faze. Vialo smo dobro premešali in aplicirali vsebino na GC-MS. Ostanek v viali smo zavrgli (17).

4.2.2 Priprava referenčnih spojin

Sam masni spektrometer ni dovolj zanesljiv, da lahko le z njegovo identifikacijo zagotovimo pravilne rezultate, zato smo z referenčnimi spojinami preverili linearnost odziva in pravilnost identifikacije z masnim spektrometrom.

Pripravili smo štiri raztopine referenčnih spojin z različnimi koncentracijami. V vialo smo na analizni tehtnici natančno zatehtali 10,0 mg referenčne zmesi MK (F.A.M.E. Mix C4-C24). Zmes referenčnih spojin smo raztopili z dodatkom 500 µl heksana ter dobili prvo raztopino (RS1). Raztopino 2 (RS2) smo pripravili tako, da smo v vialo zatehtali 5,00 mg zmesi referenčnih spojin in dodali 500 µl heksana. V novo vialo smo zatehtali 2,50 mg zmesi referenčnih spojin in zopet dodali 500 µl topila (RS3). Zadnjo raztopino 4 (RS4) smo pripravili tako, da smo 1,25 mg zmesi referenčnih spojin zatehtali v vialo in dodali 500 µl heksana.

Dobili smo naslednje koncentracije raztopin:

- RS1: 20,0 mg/ml,
- RS2: 10,0 mg/ml,
- RS3: 5,00 mg/ml,
- RS4: 2,50 mg/ml.

Pripravljene raztopine referenčnih spojin smo aplicirali na GC-MS, pri čemer smo nastavili enake kromatografske razmere kot pri analizi vzorcev, ki smo jih pripravili z »in situ« metodo.

4.3 Analiza hlapnih spojin arome

4.3.1 Potek dela

Injiciranje je potekalo posamično za vsak vzorec, pri čemer smo desorpcijsko cevko vsakič napolnili z novo stekleno volno z namenom, da preprečimo kontaminacijo kolone z lipidi iz olja.

Metodo smo po pripravi vzorcev in prvem injiciranju optimizirali. Preizkusili smo različne načine injiciranja (»splitless« / »split 100« / »split 10«) in različne volumne.

4.3.2 Priprava vzorcev

Najprej smo v vialo odpipetirali vseh naših šest vzorcev olja in jih analizirali. Zaradi nizke koncentracije nekaterih spojin smo dva vzorca skoncentrirali za faktor 20 z metodo priprave absolutov. Izbrali smo vzorec Argan Oil Company in vzorec Baccara Rose. 20 ml olja smo zmešali z 20 ml etanola v plastični epruveti in močno pretresli. Tako pripravljeno zmes za ekstrahiranje smo centrifugirali 15 minut pri sobni temperaturi s 5000 obrati. Zgornjo (organsko) fazo smo prenesli v bučko, ki smo jo predhodno stehtali. Topilo smo odparili pri znižanem tlaku 75 mbar in temperaturi 50°C do konstantne mase vzorca.

$$m_{\text{AOC}} = 0,793 \text{ g}$$

$$m_{\text{BR}} = 0,729 \text{ g}$$

Pri računanju koncentracij v nadaljevanju smo potrebovali točen faktor koncentriranja absolutna, zato smo izračunali tudi tega. Izhajali smo iz formule:

$$C_{\text{olja}} = C_{\text{absoluta}} * F_{\text{faktor koncentriranja}}$$

pri čemer je $F = m_{\text{absoluta}} / m_{\text{olja}}$

Maso olja smo izračunali glede na odmerjen volumen (20 ml) in njegovo gostoto ($\rho_{\text{arganovega olja}} = 0,91 \text{ g/ml}$).

Izračun:

$$F = m_{\text{abs}} / V_{\text{olja}} / \rho_{\text{arganovega olja}}$$

$$F_{\text{AOC}} = 0,793 \text{ g} / 20 \text{ ml} / 0,91 \text{ g/ml}$$

$$F_{\text{AOC}} = \underline{0,0436}$$

$$F_{\text{BR}} = 0,729 \text{ g} / 20 \text{ ml} / 0,91 \text{ g/ml}$$

$$F_{\text{BR}} = \underline{0,0401}$$

Koncentracije hlapnih snovi smo v nadaljevanju tako računali s pomočjo naslednje formule:

$$C_{\text{AOC}} = C_{\text{absolut AOC}} * 0,0436$$

$$C_{\text{BR}} = C_{\text{absolut BR}} * 0,0401$$

4.3.3 Priprava referenčnih spojin

Za izračun vsebnosti hlapnih spojin v vzorcih arganovega olja smo potrebovali še površine pod krivuljo kromatografskih vrhov za referenčne spojine z znanimi koncentracijami. Pripravili smo tako zmes vseh spojin, ki smo jih identificirali v vzorcih in za katere smo predvidevali, da imajo pomemben vpliv na aromo arganovega olja. V erlenmajerico smo zatehtali 5,00 mg vsake spojine ali odpipetirali volumen raztopine referenčnih spojin, ki je ustrezal 5,00 mg (preračunano glede na gostoto). Na koncu smo dodali 1,00 ml topila heptana in dobro premešali. Tako pripravljeno zmes smo trikrat redčili, da smo dobili raztopino referenčnih spojin z naslednjimi koncentracijami:

RS 1 = 5000 ppm

RS2 = 500 ppm

RS3 = 50,0 ppm

Iz umeritvene premice smo odčitali vrednosti R^2 , ki je bil za vse spojine večji od 0,99 oz. dovolj blizu vrednosti 1, kar pomeni, da je razpršenost podatkov za umeritveno premico oziroma so eksperimentalne napake pri meritvah in pipetiranju dovolj majhne, da so rezultati in izračunane koncentracije hlapnih spojin iz referenčni spojin zanesljive.

Raztopina referenčnih spojin je vsebovala:

- | | | |
|----------------------------|----------------------|-----------------------|
| ○ 2,5-dimetilpirazin | ○ 2-decenal | ○ 5-dodekanolid |
| ○ limonen | ○ nonanojska kislina | ○ benzilbenzoat |
| ○ nonanal | ○ anetol | ○ miristinska kislina |
| ○ cikloheksankarb. kislina | ○ 2,4-dekadienal | ○ 5-tetradekanolid |
| ○ kafra | ○ 4-nonanolid | ○ metilpalmitat |
| ○ dekanal | ○ nerilacetat | ○ palmitinska kislina |
| ○ 2,4-nonadienal | ○ 5-dekanolid | ○ etilpalmitat |
| ○ linalilacetat | ○ lavrinska kislina | ○ metillinolat |
| ○ metillinolenat | ○ etiloleat | |

4.4 Organoleptična analiza

4.4.1 Potek dela

Za vsako izmed spojin, ki smo jih našli z metodo termične desorpcije z GC-MS, smo poiskali v literaturi podatke o vrednosti praga vonjanja (OTV) (25, 26). Nato smo izračunali s pomočjo koncentracij vrednost aktivnosti vonja OAV (izračun in definiciji sta razloženi pri razpravi v poglavju Analiza hlapnih spojin in arome arganovega olja). Sprva je bil načrt, da v organoleptično analizo vključimo vse spojine, katerih vrednost OAV bo več kot 10. Vendar v našem primeru nobena izmed spojin ni dosegla tako visoke vrednosti, zato smo v analizo vključili le spojino z najvišjo vrednostjo OAV, to je **2,4-nonadienal**.

4.4.2 Priprava vzorcev

Izbrali smo si dva vzorca arganovega olja, in sicer Baccara Rose in sveže pripravljeno olje na naši katedri, saj smo v teh dveh vzorcih našli največ spojin. Izmed najdenih spojin smo izločili tiste, katerih vrednost OAV je bila sorazmerno majhna; s tem smo si prihranili nepotrebno delo, saj te spojine naj ne bi relevantno prispevale k vonju in zato ni potrebe, da bi jih umestili v rekonstrukcije vzorcev arganovega olja. Predhodno smo pri analizi hlapnih spojin s plinsko kromatografijo že izračunali koncentracije (podane v tabelah pri razpravi v poglavju Analiza hlapnih spojin in arome arganovega olja), s pomočjo enačbe $V = m/\rho$ pa smo izračunali pripadajoče volumne posameznih spojin za izdelavo rekonstrukcije vonja (Tabela 4 in Tabela 5). Spojine smo odpipetirali v 50 ml bučko in dopolnili do oznake s sončničnim oljem. Tako pripravljena vzorca arganovega olja Baccara Rose in našega sveže pripravljenega olja smo označili pod imenom Vzorec 1.

Tabela 4 - Spojine v rekonstruiranem vzorcu Baccara Rose

	OAV	V[μ L]
2,4-nonadienal	6,867	12
2-decenal	0,031	7,8
nonanojska kislina	0,365	44,2
5-dekanolid	0,333-1,11	13,9
5-tetradekanolid	0,022	67,2
etilpalmitat	0,129	30
etiloleat	0,310	27,8

Tabela 5 - Spojine v rekonstruiranem vzorcu sveže pripravljenega olja na FFa

	OAV	V[μ L]
2-decenal	0,033	8,2
nonanojska kislina	0,3050	42,3
5-dekanolid	0,325-1,08	13,6
benzilbenzoat	0,622	18,9
5-tetradekanolid	0,0,036	111,4
etilpalmitat	0,129	29,9
etiloleat	0,404	36,2

Nato smo pripravili še druga dva vzorca (Vzorec 2), kjer smo v dve epruveti odpipetirali le raztopino 2,4-nonadienala v ustrezni koncentraciji in dopolnili do oznake s sončničnim oljem. Vzorce smo dobro premešali in manjšo količino prelili v majhne erlenmajerice za organoleptično analizo.

4.4.3 Iskanje in izbira prostovoljcev

Prostovoljce za organoleptično analizo smo poiskali na Katedri za farmacevtsko biologijo Fakultete za farmacijo. Iz vrst profesorjev, mladih raziskovalcev in asistentov smo izbrali 8 prostovoljcev, ki so se v preteklosti že ukvarjali z vonji, bodisi so sami delali podobne vrste raziskav bodisi so že kdaj sodelovali v organoleptičnih analizah. Naš namen je bil, da vključimo strokovnjake z izkušnjami, da bi pridobili čim bolj točne rezultate.

4.4.4 Seansa vonjanja vzorcev

Organoleptično analizo smo izvedli v študentskem laboratoriju na Katedri za farmacevtsko biologijo. Prostor smo pred tem dobro prezračili, nato smo na delovno površino razstavili vse pripravljene vzorce. Prvi v vrsti je bil vzorec originalnega olja, nato rekonstruiran vzorec (Vzorec 1) in zadnji (Vzorec 2) raztopina 2,4-nonadienala.

Prostovoljcem smo predstavili namen analize, jih seznanili z navodili in razdelili anketne vprašalnike (Slika 4). Vsak izmed prostovoljcev je povonjal vse vzorce in o njih izpolnil vprašalnik, tako da smo dobili 8 različnih rezultatov za vsak vzorec. Ocenjevali so po naslednjih kriterijih: **podobnost** z originalnim vonjem, **prijetnost** vonja in morebitne **asociacije**.

Organoleptična analiza: Arganovo olje**Baccara Rose**

1. Povonjajte originalno olje.
2. Ocenite od 1-5:

	Vzorec 1	Vzorec 2
Podobnost z originalnim oljem (od 1-5, pri čemer je 1 najmanj podobno in 5 najbolj)		
Prijetnost (od 1-5, pri čemer je 1 najmanj prijetno in 5 najbolj)		
Asociacije (z eno besedo opišite, na kaj vas spominja vonj)		

FFa

1. Povonjajte originalno olje.
2. Ocenite od 1-5:

	Vzorec 1	Vzorec 2
Podobnost z originalnim oljem (od 1-5, pri čemer je 1 najmanj podobno in 5 najbolj)		
Prijetnost (od 1-5, pri čemer je 1 najmanj prijetno in 5 najbolj)		
Asociacije (z eno besedo opišite, na kaj vas spominja vonj)		

Slika 4 – Vprašalnik za udeležence seanse vonjanja

Prvi kriterij so ocenili numerično, in sicer na lestvici od 1 do 5, pri čemer je 1 pomenilo najmanj podobno in 5 najbolj podobno vonju originalnega olja. Na enak način so ocenili tudi prijetnost vonja, z 1 so ocenili najbolj neprijeten vonj in s 5 najbolj prijeten vonj. Ker pa je na tak način težko opredeliti vonj in na tak način pridobiti rezultate, smo dodali še tretji kriterij. Prostovoljci so lahko zapisali, na kaj jih asociira vonj določenega vzorca, s čimer smo lažje opredelili prijetnost določenih vonjav glede na občutke, ki so jih doživljali ob vonjanju posameznih vzorcev.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

Namen naših analiz in raziskav je primerjava vzorcev arganovega olja, zato smo izbrali vzorce olj različnih proizvajalcev in načinov izdelave, vpliv slednjega nas je predvsem zanimal pri analizi arome; po vonju so se namreč različni vzorci močno razlikovali med sabo. To je tudi bil vzrok, da smo se nadalje odločili za organoleptično analizo, pripravo rekonstrukcije vonja in analizo hlapnih snovi z GC-MS aparaturo, paralelno pa tudi za analizo sestave maščobnih kislin.

5.1 Ekstrakcija olja iz arganovih semen

Iz 5,858 g jedrc smo dobili 2,835 g olja, kar pomeni, da je bil izplen ekstrakcije 48,4 %.

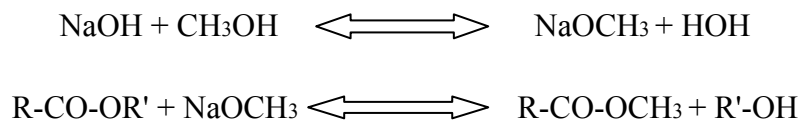
Kot je bilo že v uvodu navedeno, naj bi s takšno metodo glede na podatke iz virov dobili izplen ekstrakcije nekje med 50 in 55 %, kar pomeni, da smo se dobro približali referenčni vrednosti in je bila metoda ekstrakcije s pentanom uspešno izvedena (2)

5.2 Sestava maščobnih kislin

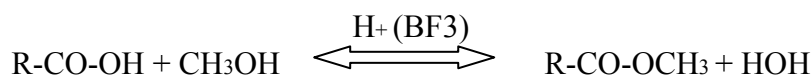
Poznamo več metod za pripravo metilnih estrov maščobnih kislin, za slednjo pa smo se odločili, saj združuje ekstrakcijo lipidov iz biološkega materiala in nadaljnje preestrenje MK v eni stopnji in tako bistveno poenostavi analizo sestave maščobnih kislin, zaradi zmanjšanja delovnih stopenj v samem poteku analize pa se tudi izognemo večjim analiznim napakam in dobimo bolj točne rezultate.

Glavni namen pretvorbe maščobnih kislin v njihove pripadajoče metilne estre je povečanje hlapnosti in zmanjšanje tvorbe »repov« ob vrhovih v plinskem kromatogramu pri kromatografski analizi. Po pregledu literature smo se odločili za metodo, ki sta jo razvila Park in Goins (17). Raziskala sta pripravo metilnih estrov maščobnih kislin na več različnih načinov in ugotovila, da metoda ISTE daje identične rezultate v primerjavi z drugimi metodami, ki pa so časovno bolj zamudne, bolj kompleksne, porabi pa se tudi več organskih topil. Direktna priprava metilnih estrov maščobnih kislin vsebuje dve fazi: alkoholizo z natrijevim hidroksidom v metanolu in nadaljnjo metilacijo z raztopino BF_3 v

metanolu. Potekajo naslednje reakcije: v *bazičnem mediju* najprej preestrimo maščobne kisline iz trigliceridov:



Nastale proste maščobne kisline pa zaestrimo z reakcijo v *kislem mediju*:



V metanolu se dobro raztopijo proste maščobne kisline in fosfolipidi, trigliceridi pa so v metanolu slabo topni, zato smo na začetku dodali v reakcijsko zmes diklorometan z namenom izboljšanja topnosti.

Ker je bila metoda ISTE že optimizirana v prejšnjih analizah na katedri, smo lahko že vnaprej izbrali ustrezne kromatografske pogoje in optimizacija metode ni bila potrebna (18). Spremenili smo le količine reagentov, in sicer smo upoštevali delovni postopek po metodi Park in Goins (17). Spremenili pa smo vrsto topila; namesto heksana smo se odločili za uporabo heptana, saj je le ta manj hlapen, zaradi česar smo imeli manj težav pri pipetiranju in posledično tudi manjše analizne napake. Heptan kot topilo navaja tudi farmakopejska metoda (19).

Ker gre za rutinsko metodo, smo se pri analizi rezultatov odločili za relativne vrednosti (odstotek mase MK glede na vsoto vseh MK). Za preverjanje variabilnosti odziva smo injicirali tudi zmes F.A.M.E. Mix C4-C24 in ker je bila razlika v površinah manj kot 5 %, kar je za potrebe naše analize sprejemljivo, smo se odločili za relativne vrednosti površin pod krivuljo kromatografskih vrhov (20). Pri pregledu literature smo ugotovili, da je relativna razmerja glede na površine v rezultatih predstavila tudi večina raziskovalcev, ki so v preteklosti že raziskovali lipidno sestavo arganovega olja.

Tabela 6 – Vsebnosti MK v različnih vzorcih arganovega olja

Maščobna kislina (rel. %)	A1	A2	A3	A4	A5	A6
Miristinska (14:0)	0,100	0,100	0,120	0,100	0,0700	0,130
Palmitinska (16:0)	13,1	13,5	13,8	12,7	11,3	13,6
Linolna (18:2)	29,0	28,6	30,1	30,0	43,1	29,7
Oleinska (18:1)	50,9	50,5	48,8	49,1	33,1	49,6
Stearinska (18:0)	6,65	7,06	6,94	7,41	5,11	6,39
Gadoleinska (20:1)		0,120	0,0800	0,180	0,120	0,180
Arašidna (20:0)		0,110	0,120	0,220	0,270	0,200
Tridekanojska (13:0)				0,0300		
Palmitoleinska (16:1)	0,0300		0,0500	0,0400	0,0600	0,0700
Margarinska (17:0)					0,0600	
Pentadekanojska (15:0)			0,0300			0,0400
Nonadekanojska (19:0)	0,100		0,0300			
Linolenska (18:3)					7,47	
Behenojska (22:0)					0,220	
Σ nasičenih MK	19,9	20,8	21,0	20,4	17,0	20,4
Σ enkrat nenasičenih MK	50,9	50,6	48,9	50,1	33,3	49,9
Σ dvakrat nenasičenih MK	29,0	28,6	30,1	30,0	43,1	29,7
Σ trikrat nenasičenih MK	/	/	/	/	7,47	/
Σ nenasičenih MK	79,9	79,2	79,0	80,1	83,8	79,5

Večji del rezultatov (Tabela 6) smo dobili v okviru pričakovanih vrednosti, že v uvodu smo navedli pričakovane vsebnosti MK, kakor je do sedaj bilo navedeno v različnih virih (21). Velika vsebnost enkrat nenasičene oleinske kisline pojasni antiaterogeni učinek arganovega olja in preventivo pred kardiovaskularnimi boleznimi. V krvi namreč spodbudi nastanek ugodnega HDL in skupnega holesterola in zmanjša LDL (18). Majhen delež predstavljajo nasičene MK, kar zopet ugodno vpliva na zdravje. Med njimi je najbolj aterogena miristinska kislina, vendar jo je v vseh šestih vzorcih zelo malo.

V vseh šestih vzorcih smo dobili približno enake vrednosti, izstopa pa le tradicionalno arganovo olje iz Maroka, kjer je vsebnost nasičenih MK še malo manjša (za približno 4 %), vsebuje tudi manj oleinske kisline (v večini ostalih vzorcev so vrednosti okoli 50 %,

medtem, ko je ta vzorec vsebuje le 33,28 %). Večji delež pa pripada linolnoli kislini (43,05 %), kar je za približno tretjino več kot drugi vzorci, v tradicionalnem olju pa smo našli tudi linolensko kislino, ki je v drugih vzorcih ni bilo. Glede na to, da spada alfa-linolenska kislina med omega-3 MK, ki veljajo za ene izmed najbolj zdravih esencialnih MK, ki jih telo potrebuje, in da tradicionalno olje vsebuje tudi manj nezdravih nasičenih MK, bi lahko rekli, da glede na kakovost, ocenjeno po sestavi maščobnih kislin, prednjači pred ostalimi olji. Vzrok za to je najbrž v ročni izdelavi, kjer je minimalna termična obdelava in ni industrijskega vpliva, ki osiromaši še tako bogata olja. Razmerje omega-3 / omega-6 je tako po deležih nekje okoli 1:7, kar še nekako ustreza zdravemu razmerju. Težko pa primerjamo z drugimi vzorci, saj smo alfa-linolensko kislino identificirali le v tradicionalnem arganovem olju.

5.3 Hlapne spojine arome

Za analiziranje hlapnih spojin v arganovem olju smo se odločili za metodo termične desorpcije. Med analizo s pomočjo uravnavanja temperature iz analita v desorpcijski cevki sprostimo koncentrirane hlapne spojine in jih vodimo dalje v GC-MS sistem. Avtomatizirana termična desorpcija zmanjša število korakov v sami analizi, z direktnim injiciranjem vzorca, v našem primeru olja, pa se izboljšajo tudi natančnost, točnost in občutljivost metode (16). Če govorimo o prednostih metode, pa prav tako ne potrebujemo topila, kar zmanjša v prvi vrsti strošek analize, bolj pomembno pa je to, da topilo ne vpliva na rezultate, kar ima pomemben vpliv na zanesljivost rezultatov. Poleg tega termična desorpcija daje pravilnejše podatke o sestavi hlapnih spojin v primerjavi z enostavnejšo metodo analize plinske faze nad vzorcem (headspace), ker pri višji temperaturi uparimo tudi težje hlapne spojine.

Po več poizkusih smo našli najbolj optimalen način, kjer so bili kromatografski vrhovi najlepši in s tem rezultati najbolj točni, to je način injiciranja »split 100« (kar pomeni, da se vzorec razdeli na 100 delov, en del vzorca gre na kolono, 99 ostalih delov pa v odpad) in volumen 1 mikroliter za raztopine referenčnih spojin in način »splitless« za vzorce olja.

Glavni parameter termične desorpcije je, kot pove že samo ime, temperatura. Po pregledu literature smo izbrali temperaturo injiciranja (150°C), ki je še dovolj visoka, da bodo na kolono prišle vse spojine iz analita, po drugi strani pa ne previsoka, saj lahko stopimo v

območje t.i. »smoke point« - *točke dimljenja*, pri kateri se olje segreje do mere, kjer se prične razgradnja komponent, s tem pa porušimo kemijsko strukturo olja za nadaljnjo analizo. To lahko pri dejanskem segrevanju vidimo kot nekakšen dim, temperatura, pri kateri se začne kaditi iz olja, pa je točka dimljenja (22).

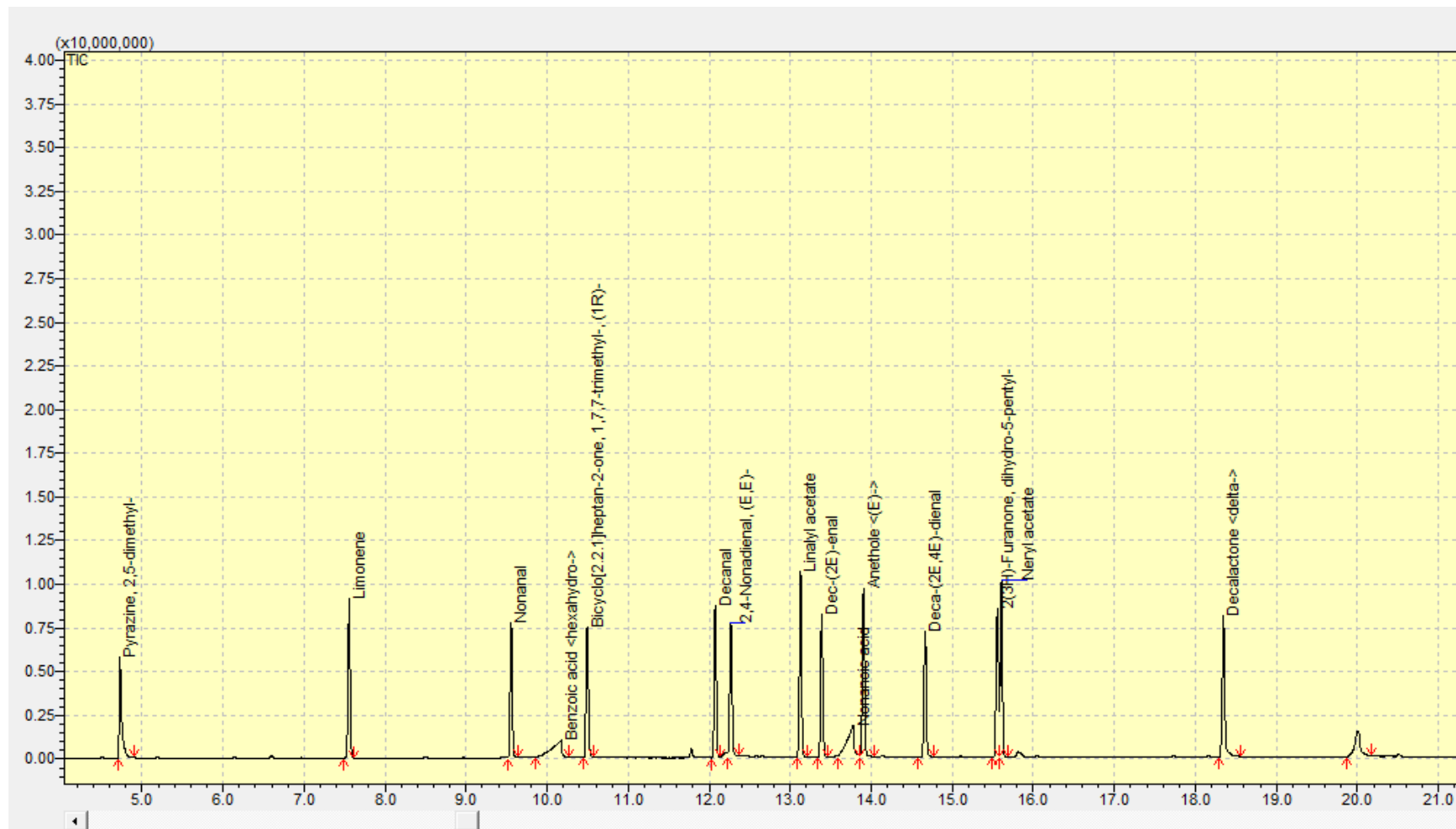
Za temperaturo 150°C smo se odločili, saj je takšna temperatura bila do sedaj določena za olivno olje, ki je po kemijski strukturi glede na maščobne kisline in ostale manjše komponente zelo podobno arganovemu. Predpostavili smo, da bodo do te temperature na kolono prišle vse spojine, hkrati pa ne bomo povzročili razpada MK na manjše fragmente, kot so krajši ogljikovodiki, aldehidi in ketoni, ki bi lahko zmotili analizo (23). Simetrični vrhovi na kromatogramu po koncu analize so potrdili pravilno izbiro temperature in s tem popolno termično desorpcijo olja, pri prenizki temperaturi termične desorpcije bi se povečala širina vrhov oz. pojavili »repi« vrhov, ker se spojine ne bi trenutno uparile v celoti in bi postopoma prehajale v kolono.

Naš glavni namen analize hlapnih spojin je bil ugotavljanje vpliva določenih spojin na vonj arganovega olja. Da smo to lahko ovrednotili, smo najprej morali izračunati koncentracije določene spojine v posameznih vzorcih. Pri tem smo iz dobljenih površin pod krivuljo v kromatogramih vzorcev in referenčnih spojin (Slika 5a in Slika 5b) ter upoštevajoč koncentracijo referenčnih spojin izračunali koncentracije naših spojin v vzorcih (Tabela 7), pomembno pa je tudi omeniti, da smo pri tem upoštevali način injiciranja (naši vzorci so dali 100-krat večji odziv, saj je bil način injiciranja olja »splitless«, raztopin referenčnih spojin pa »split« 100).

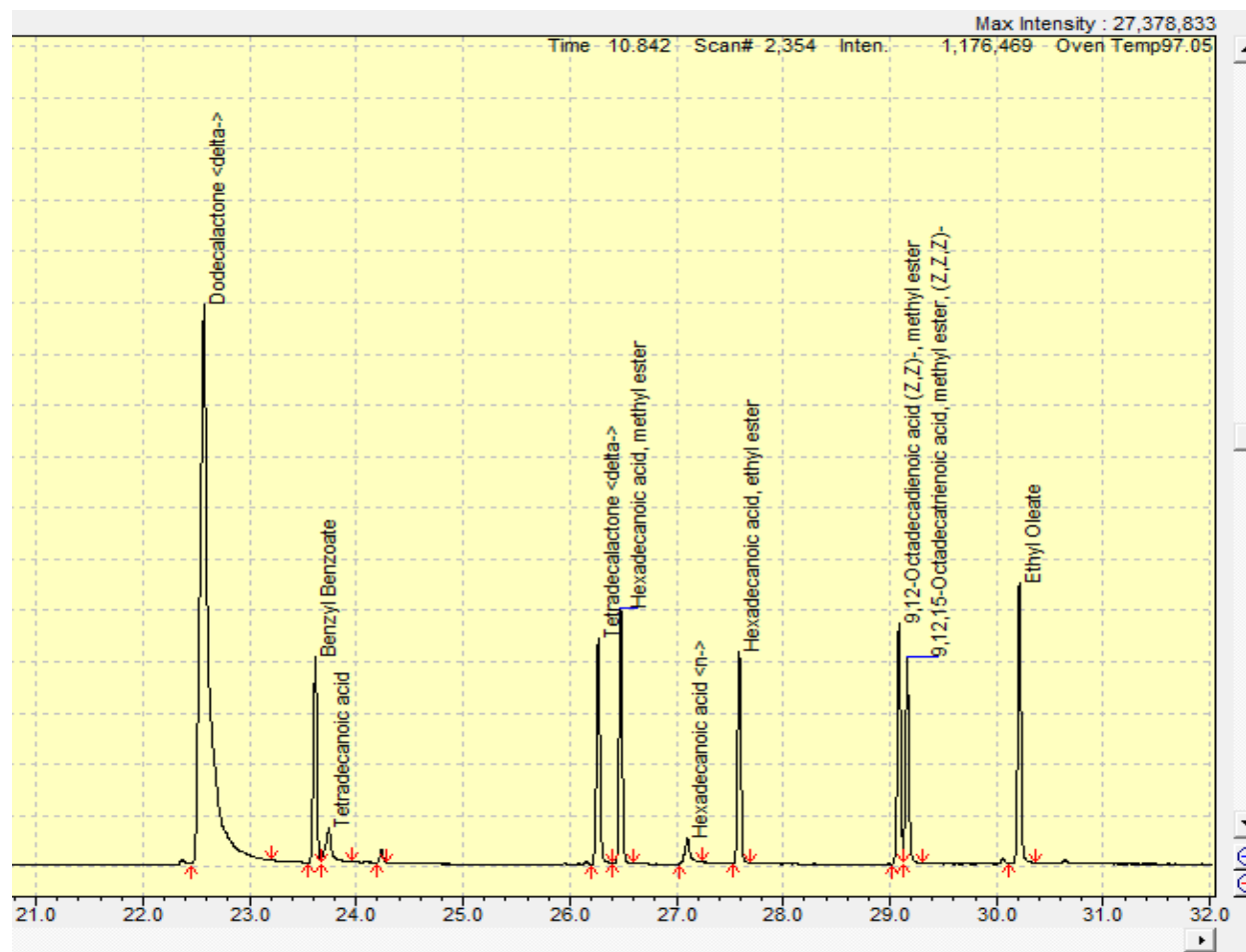
Drugi korak pri vrednotenju rezultatov je bil izračunavanje OAV – Odour Activity Value. Gre za numerično vrednost, ki nam pove, kako močan je vpliv določenega vonja – višja je ta vrednost, večji prispevek ima spojina k aromi določene zmesi, čeprav ne smemo zanemariti vpliva supresije ali sinergije (27). OAV izračunamo po naslednji formuli:

$$\text{OAV} = c / \text{OTV},$$

pri čemer je *c* koncentracija in OTV Odour Threshold Value v enoti ppb (»parts per billion«). To pa je minimalna vrednost, ki jo še lahko prosto vonjamo (25).



Slika 5a - Kromatogram za vzorec raztopine referenčnih spojin s $c = 500$ ppm, 1. del (nadaljevanje na naslednji strani)



Slika 5b - Kromatogram za vzorec raztopine referenčnih spojin s $c = 500$ ppm, 2. del

Tabela 7 – Podatki o RI – retencijskemu indeksu in OTV vrednosti ter izračunane koncentracije in OAV vrednosti za vzorce arganovega olja (1/4)

Referenčna spojina:	RI	OTV (ppb)	AOC (ppb)	OAV	Primavera (ppb)	OAV
2,5-dimetilpirazin	908	2600				
limonen	1024	14700				
nonanal	1102		502		436	
cikloheksankarboksilna kislina	1127					
kafra	1139	640000				
dekanal	1203	650	399	0,614	136	0,209
2,4-nonadienal	1211	15			102	6,80
linalilacetat	1248	10000			299	0,0300
2-decenal	1259	2100				
nonanojska kislina	1275	>1100				
anetol	1281	150-860				
2,4-dekadial	1313	180				
4-nonanolid	1354	148	105	0,709	102	0,689
nerilacetat	1356	2000-8500			41	0,00480-0,0205
5-dekanolid	1484	120-400	148	0,370-1,23	132	0,330-1,10
lavrinska kislina	1566	7200				
5-dodekanolid	1698		213		207	
benzilbenzoat	1756	341	153	0,449	192	0,563
miristinska kislina	1763	>12000			299	0,0250
5-tetradekanolid	1909	29000	590	0,0203	986	0,00300
metilpalmitat	1921		263		289	
palmitinska kislina	1960	>10000				
etilpalmitat	1990	2000	251	0,126	273	0,137
metillinolat	2086		410		483	
metillinolenat	2091					
etiloleat	2161	780	252	0,323	278	0,356

Tabela 7 – Podatki o RI – retencijskemu indeksu in OTV vrednosti ter izračunane koncentracije in OAV vrednosti za vzorce arganovega olja (2/4)

Referenčna spojina:	RI	OTV (ppb)	Praženo (ppb)	OAV	BR (ppb)	OAV
2,5-dimetilpirazin	908	2600	1423	0,547		
limonen	1024	14700				
nonanal	1102					
cikloheksankarbonska kislina	1127					
kafra	1139	640000				
dekanal	1203	650	41	0,0630	55	0,0850
2,4-nonadienal	1211	15			103	6,87
linalilacetat	1248	10000				
2-decenal	1259	2100			66	0,0310
nonanojska kislina	1275	>1100			402	0,365
anetol	1281	150-860				
2,4-dekadial	1313	180				
4-nonanolid	1354	148				
nerilacetat	1356	2000-8500				
5-dekanolid	1484	120-400	134	0,335- 1,12	133	0,333- 1,11
lavrinska kislina	1566	7200				
5-dodekanolid	1698		213		217	
benzilbenzoat	1756	341	137	0,402		
miristinska kislina	1763	>12000				
5-tetradekanolid	1909	29000	134	0,00500	628	0,0220
metilpalmitat	1921		234		220	
palmitinska kislina	1960	>10000				
etilpalmitat	1990	2000	243	0,122	258	0,129
metillinolat	2086		358		365	
metillinolenat	2091					
etiloleat	2161	780	280	0,359	242	0,310

Tabela 7 – Podatki o RI – retencijskemu indeksu in OTV vrednosti ter izračunane koncentracije in OAV vrednosti za vzorce arganovega olja (3/4)

Referenčna spojina:	RI	OTV (ppb)	Tradicionalno (ppb)	OAV	FFa (ppb)	OAV
2,5-dimetilpirazin	908	2600				
limonen	1024	14700				
nonanal	1102		90		5262	
cikloheksankarboksilna kislina	1127					
kafra	1139	640000	1357	0,00200		
dekanal	1203	650			102	0,157
2,4-nonadienal	1211	15				
linalilacetat	1248	10000	92	0,00900		
2-decenal	1259	2100			70	0,0330
nonanojska kislina	1275	>1100			385	0,350
anetol	1281	150-860				
2,4-dekadial	1313	180				
4-nonanolid	1354	148	99	0,669		
nerilacetat	1356	2000-8500				
5-dekanolid	1484	120-400			130	0,325-1,08
lavrinska kislina	1566	7200				
5-dodekanolid	1698		6		221	
benzilbenzoat	1756	341	205	0,601	212	0,622
miristinska kislina	1763	>12000				
5-tetradekanolid	1909	29000	345	0,0120	1042	0,0360
metilpalmitat	1921		302		265	
palmitinska kislina	1960	>10000				
etilpalmitat	1990	2000	220	0,110	257	0,129
metillinolat	2086		808		766	
metillinolenat	2091					
etiloleat	2161	780	255	0,327	315	0,404

Tabela 7 – Podatki o RI – retencijskemu indeksu in OTV vrednosti ter izračunane koncentracije in OAV vrednosti za vzorce arganovega olja (4/4)

Referenčna spojina:	RI	OTV (ppb)	AOC <u>Abs</u> (ppb)	OAV	BR <u>Abs</u> (ppb)	OAV
2,5-dimetilpirazin	908	2600				
limonen	1024	14700				
nonanal	1102					
cikloheksankarbonsilna kislina	1127		3359		869	
kafra	1139	640000				
dekanal	1203	650				
2,4-nonadienal	1211	15				
linalilacetat	1248	10000				
2-decenal	1259	2100				
nonanojska kislina	1275	>1100	686	0,0270	146	0,005
anetol	1281	150-860	98	0,00497 -0,0285	497	0,0232 -0,133
2,4-dekadial	1313	180	69	0,0170		
4-nonanolid	1354	148	220	0,0650	210	0,0570
nerilacetat	1356	2000-8500				
5-dekanolid	1484	120-400	636	0,0693- 0,231	642	0,0644 -0,215
lavrinska kislina	1566	7200				
5-dodekanolid	1698		371		392	
benzilbenzoat	1756	341			133	0,0160
miristinska kislina	1763	>12000	1253	0,00500	1998	0,0070 0
5-tetradekanolid	1909	29000	5887	0,009	7182	0,010
metilpalmitat	1921		246		320	
palmitinska kislina	1960	>10000	160924	0,702	141827	0,569
etilpalmitat	1990	2000	602	0,013	790	0,016
metillinolat	2086		533		607	
metillinolenat	2091					
etiloleat	2161	780	1279	0,0710	1376	0,0710

Vrednost, ki naj bi relativno pomembno prispevala k sami aromi neke zmesi, je $OAV > 10$, kar nam malo oteži analizo naših rezultatov. Nobeden od šestih vzorcev v naši analizi namreč nima te vrednosti večje od 10. Ali je določena spojina v našem vzorcu v premajhni koncentraciji ali pa za to spojino nismo našli podatkov o OTV vrednosti (25, 26). To se nam je zgodilo pri **cikloheksankarboksilni kislini**. Po primerjavi vonja arganovega olja in vseh referenčnih spojin, ki smo jih merili, smo pred samo analizo namreč pričakovali visoko vsebnost te kisline v vzorcih Argan Oil Company in Baccara Rose, ta dva vzorca sta za razliko od preostalih štirih imela zelo izrazit neprijeten vonj po cikloheksankarboksilni kislini. Slednjo smo detektirali že v samem vzorcu Baccara Rose in njegovem absolutu, medtem ko smo jo pri vzorcu Argan Oil Company detektirali šele v absolutu. Žal pa podatka o OTV vrednosti nismo nikjer našli, zato tudi ne moremo z zanesljivostjo trditi, da je ta spojina odgovorna za neprijeten vonj arganovega olja.

Spojina, ki je imela največjo vrednost OAV, je **2,4-nonadienal** v vzorcu Baccara Rose ($OAV = 6,867$) in glede na ta rezultat smo kasneje tudi izvedli organoleptično analizo (pripravili smo rekonstrukcijo arome arganovega olja brez te spojine, da bi potrdili, ali značilno vpliva na samo aromo arganovega olja). Rezultati in ugotovitve organoleptične analize so navedeni v nadaljevanju.

Če povzamemo izsledke analize, lahko napišemo, da s samo analizo nismo prišli do nekih zaključkov o tem, katera spojina je ključna za aromo arganovega olja. Bodisi je to 2-4-nonadienal, ki je imel najvišjo vrednost OAV, vendar po pravilih ne dovolj visoko, da bi lahko imel tako velik prispevek, bodisi je to res cikloheksankarboksilna kislina, za katero pa nismo mogli izračunati vrednosti OAV. Lahko pa, da gre za neko neznano hlapno spojino ali več spojin, ki je ali jih z našo analizo sploh nismo zaznali. Treba je omeniti, da vrednost OAV ni strogo napisano pravilo, zato je kljub izračunanim vrednostim še vedno možnost, da katera od drugih spojin prispeva k aromi arganovega olja. Po drugi strani pa je večina vzorcev arganovega olja zelo šibkega vonja, kar pojasni nizke koncentracije hlapnih spojin in njihove nizke izračunane vrednosti OAV.

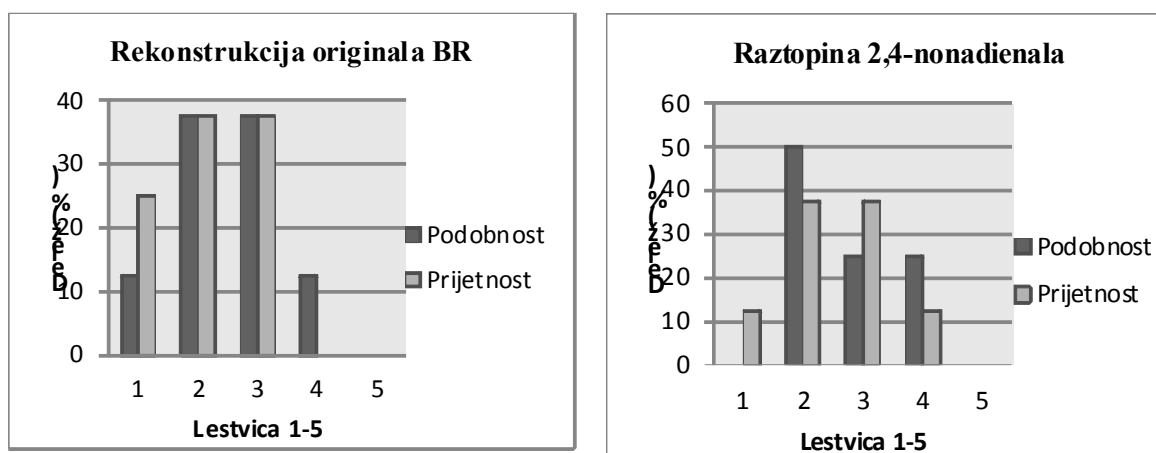
Kot je omenjeno v uvodu, smo našli le en primer raziskave hlapnih spojin v samem olju (v ostalih so raziskovali hlapne spojine v listih, sadnem mesu, ali jedrcih), kjer so navedli vse identificirane spojine in ocenili njihov vonj, vendar jih niso kvantificirali in vrednotili prispevka posameznih spojin k aromi. Avtor članka navaja, da je težko natančno določiti relativno pomembnost posamezne hlapne spojine iz kompleksne mešanice k skupni aromi

olja, kar smo tekom naše analize ugotovili tudi sami. Izmed vseh identificiranih hlapnih spojin so skupne spojine 5-dekanolid, 2,4-dekadienal in nonanal. Zanimivo povezavo smo lahko zasledili pri slednjem; v raziskavi je bilo navedeno, da je ta spojina prisotna le v olju, izdelanem iz nepraženih jedrc, enak vzorec se je pojavil tudi v naši raziskavi, kjer smo nonanal identificirali v tradicionalno izdelanem olju in sveže pripravljene, nismo pa ga zasledili v praženem olju. To lahko pomeni, da se nonanal razgradi med praženjem jedrc (15).

5.4 Organoleptična analiza

Ugotovljeno je bilo, da je sistematičen pristop pri analizi vonjav z uporabo številčnih vrednosti dejavnosti nekega vonja zelo učinkovito orodje. Skupaj z instrumentalnimi tehnikami in s pomočjo prostovoljcev pri organoleptični analizi lahko hitro najdemo spojine, ki značilno vplivajo na celotno aromo določene zmesi (24).

5.4.1 Vzorec 1: Arganovo olje Baccara Rose

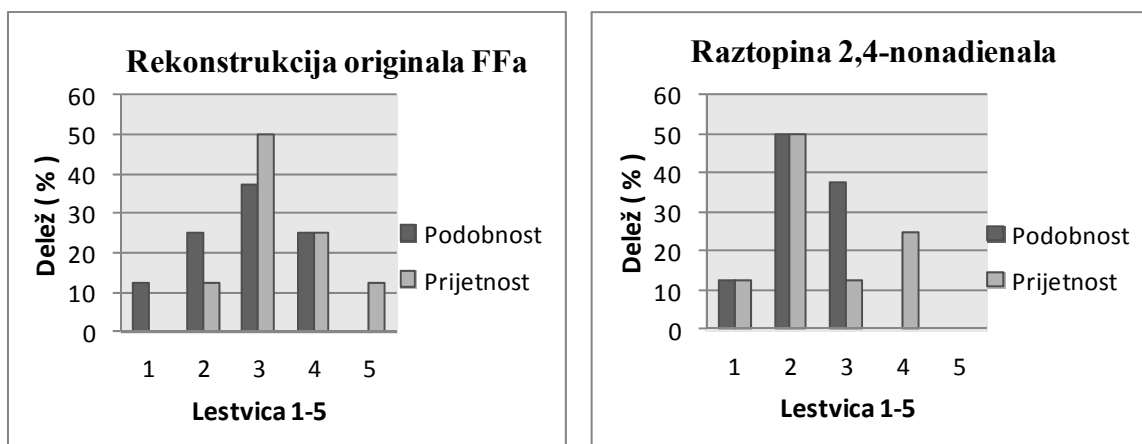


Slika 6a in 6b – Grafični prikaz rezultatov organoleptične analize, ki prikazuje deleže prostovoljcev, kako so ocenili prijetnost vonja in podobnost vonja z originalnim oljem, pri čemer 1 pomeni najmanj podobno oz. namanj prijetno in 5 najbolj podobno oz. najbolj prijetno

Večini prostovoljcev se vonj ni zdel podoben originalnemu vonju, prav tako niso vonjali podobnosti med originalnim oljem in raztopino 2,4-nonadienala (Slika 6a in Slika 6b). Iz tega lahko sklepamo, da 2,4-nonadienal ni tisti, ki bi znatno vplival na neprijeten vonj arganovega olja, kar nam je tudi potrdila plinska kromatografija in izračunan OAV, prav

tako za neprijeten vonj niso odgovorne ostale spojine, ki smo jih dodali v rekonstruiran vzorec. Organoleptična analiza se je že na začetku izkazala za upravičeno, saj nam je že pri prvem vzorcu potrdila dejstvo, da so za neprijeten vonj arganovega olja odgovorne druge spojine. Prostovoljci so ob vonjanju rekonstruiranega vzorca dobili naslednje asociacije: žarko olje, vroča guma, mandlji, vosek, mokre cunje itd., pri vonjanju raztopine 2,4-nonadienala pa tudi žarko olje, blagi agrumi, žaltava smetana in cvrto olje.

5.4.2 Vzorec 1: Sveže pripravljeno arganovo olje na FFa



Slika 7a in 7b – Grafični prikaz rezultatov organoleptične analize, ki prikazuje deleže prostovoljcev, kako so ocenili prijetnost vonja in podobnost vonja z originalnim oljem, pri čemer 1 pomeni najmanj podobno oz. namanj prijetno in 5 najbolj podobno oz. najbolj prijetno

Tudi pri tem vzorcu smo dobili podobne rezultate kot pri vzorcu Baccara Rose, rekonstruiran vzorec in raztopina 2,4-nonadienala nista podobna vonju originalnega olja, vonj obeh pa je dokaj neprijeten (Slika 7a in Slika 7b). Tudi v tem primeru gre najbrž za neke druge spojine, ki vplivajo na aromo arganovega olja. Je pa za razliko od prejšnjega vzorca rekonstrukcija tega olja manj neprijetna, o tem pričajo tudi zapisane asociacije, kot so: star les, mandljevo pecivo, kokosova sončna krema, smetana, kokos, sadni vonj, pecilni prašek itd.

6 SKLEP

V raziskovalnem diplomskem delu smo ugotavljali vsebnost maščobnih kislin in hlapnih spojin v različnih vzorcih arganovega olja. Pri tem smo uporabljali plinski kromatograf, sklopljen z masno spektroskopijo, ki se je izkazal za zelo uporabnega. Obe metodi smo razvili s pomočjo preučene literature in jih v več ponovitvah uspešno optimizirali, na kar kažejo tudi dobljeni rezultati, ti so recimo v primeru analize sestave maščobnih kislin v okviru referenčnih vrednosti, ki jih navajajo izsledki raziskav iz preteklosti o kemični sestavi arganovega olja. S tem smo potrdili istovetnost vzorcev arganovega olja, hkrati pa smo v tem prvem delu uspešno potrdili prisotnost maščobnih kislin, ki so odgovorne za pozitivne zdravilne učinke arganovega olja.

V drugem delu raziskave smo analizirali še vse hlapne spojine, metoda termične desorpcije je bila težja za optimizacijo, saj smo se srečali z več rizičnimi dejavniki v primerjavi z analizo maščobnih kislin; pomembna je bila tako temperatura, da ne bi prišli do točke dimljenja, malce težav nam je povzročala tudi prevelika viskoznost olja, kar je otežilo injiciranje, z glavnim problemom pa smo se srečali pri analizi rezultatov. Za spojino cikloheksankarboksilno kislino smo namreč predvideli največjo aktivnost vonja, saj se nam je njen vonj zdel identičen vonju dveh vzorcev arganovega olja, vendar za to spojino v literaturi nismo našli podatka o pragu vonjanja in zato tudi nismo mogli ovrednotiti prispevka k aromi. Za večino spojin so bile vrednosti prenizke, da bi lahko imele značilen prispevek k vonju, smo pa te rezultate uspešno potrdili z organoleptično analizo; tako smo analizo metodo potrdili še s senzoričnim ovrednotenjem, kar se je izkazalo za dobro kombinacijo v raziskavah o hlapnih spojinah v povezavi z aromo. Vredno je omeniti še to, da smo prvi raziskali hlapne spojine in jih hkrati tudi kvantificirali ter poskušali ovrednotiti prispevek k aromi, do sedaj so bile le identificirane in nikjer ni bilo zaslediti, katere spojine bi lahko bistveno prispevale k aromi, analiziranih pa je bilo tudi manj različnih vzorcev.

V prihodnosti bi bilo smiselno poleg odkritja hlapnih spojin, odgovornih za neprijeten vonj, raziskati še način odstranitve neprijetnega vonja arganovega olja in s tem povečati njegovo uporabnost, sploh pri neposrednem nanašanju na kožo, vendar postopek ne sme vplivati na kemično sestavo in fizikalne parametre, saj lahko tako hitro izgubimo katero od dragocenih sestavin olja, ki so odgovorne za njegove številne pozitivne učinke na zdravje.

7 VIRI

1. I. Stussi, F. Henry, Ph. Moser, L. Danoux, Chr. Jeanmarire, V. Gillon, I. Benoit, Z. Charrouf, G. Pauly: Argania spinosa – How ecological farming, fair trade and sustainability can drive the research for few cosmetic active ingredients. SÖFW-Journal, Vol. 131, 2005: 46-48.
2. Z. Charrouf, D. Guillaume: Ethnoeconomical, ethnomedical, and phytochemical study of Argania spinosa (L.) Skeels. Journal of Ethnopharmacology 67, 1999: 8.
3. D. Guillaume, Z. Charrouf: Argan oil and other argan products: Use in dermocosmetology. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 113, 2011: 404.
4. H. El Monfalouti, D. Guillaume, C. Denhez, Z. Charrouf: Therapeutic potential of argan oil: a review. Journal of Pharmacy and Pharmacology 62, 2010: 1670.
5. H. El Monfalouti, D. Guillaume, C. Denhez, Z. Charrouf: Therapeutic potential of argan oil: a review. Journal of Pharmacy and Pharmacology 62, 2010: 1671.
6. D. Guillaume, Z. Charrouf: Argan oil: Occurrence, composition and impact on human health. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 110, 2008: 633.
7. D. Guillaume, Z. Charrouf: Argan oil: Occurrence, composition and impact on human health. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 110, 2008: 634.
8. D. Guillaume, Z. Charrouf: Argan oil and other argan products: use in dermocosmetology. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 113, 2011: 405.
9. D. Guillaume, Z. Charrouf: Argan oil. Alternative Medicine Review, Vol. 16, 2011: Introduction
10. D. Guillaume, Z. Charrouf: Argan oil. Alternative Medicine Review, Vol. 16, 2011: 276.
11. H. El Monfalouti, D. Guillaume, C. Denhez, Z. Charrouf: Therapeutic potential of argan oil: a review. Journal of Pharmacy and Pharmacology 62, 2010: 1672-1673.
12. D. Guillaume, Z. Charrouf: Argan oil. Alternative Medicine Review, Vol. 16, 2011: 278.
13. S. Tahrouch, S. Rapior, J. M. Bessiere, C. Andary: Les substances volatiles de Argania spinosa (Sapotaceae). Acta bot. Gallica, 1998, 145: 259.
14. H. Harhar, S. Gharby, M. Ghanm, H. El Monfalouti, D. Guillaume, Z. Charrouf: Composition of the essential oil of argania spinosa (Sapotaceae) fruit pulp. Natural Product Communications, Vol. 5, 2010: 935.

15. Z. Charrouf, H. El Hamchi, S. Mallia, G. Licitra, D. Guillaume: Influence of roasting an seed collection on argan oil odorant composition. *Natural Product Communications*, Vol. 1, 2006: 399.
16. H. J. Hübschmann: *Handbook of GC/MS: Fundamentals and applications*, Second Edition, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim, 2009.
17. P.W. Park and R.E. Goins: *In situ* preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. *Journal of food science*, Vol. 59, No. 6, 1994: 1262-1266.
18. Jasna Tomsič: Ugotavljanje maščobnokislinske sestave svežih in staranih kokošjih jajc iz različnih virov z uporabo plinske kromatografije, diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2013.
19. European Pharmacopoeia (Ph. Eur. 7.0), elektronska verzija: 2.4.22. Composition of fatty acids by GC. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare, Strasbourg, Francija.
20. Jack Cazes: *Encyclopedia of chromatography*, Third Edition, Volume 2, Taylor and Francis Group, Suite, 2010: 840-841.
21. H. El Monfalouti, D. Guillaume, C. Denhez, Z. Charrouf: Therapeutic potential of argan oil: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 62, 2010: 1670.
22. D. A. Morgan: Smoke, fire and flash points of cottonseed, peanut and other vegetable oils, *Oil and Soap*, 1942: 193.
23. Tjaša Hertiš: Oksidativna stabilnost izbranih rastlinskih olj (raziskovalno delo projekta Mladi za napredek Maribora), Maribor, 2011.
24. P. Schieberle, T. Hofmann: Evaluation of the character impact odorants in fresh strawberry juice by quantitative measurements and sensory studies on model mixtures. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, 45: 227-232.
25. L. I. Gemert: *Odour thresholds*. Oliemans Punter & Partners. The Netherlands, 2011.
26. G. A. Burdock: *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*, 6th Ed. CRC Press, ZDA, 2010.
27. Xiaofen Du, Chad E. Finn, Michael C. Qian: Volatile composition and odour-activity of thornless 'Black Diamond' and 'Marion' blackberries. *Food Chemistry*, 2009.

8 PRILOGE

Priloga 1: Sestava standardne mešanice F.A.M.E. Mix C4-C24

Certificate of Composition

DESCRIPTION: F.A.M.E. Mix C4-C24

CATALOG NO.: 18919-1AMP
LOT NO.: LB-89551MFG. DATE: Jan 2012
EXP. DATE: Jan 2015

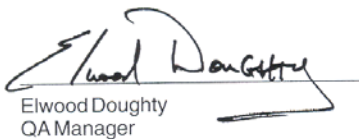
ANALYTE	CAS NO.	PURITY (1)	WRIGHT% (2)	SUPELCO LOT NO.
MYRISTOLEIC ACID METHYL ESTER	56219-06-8	99.9	2.00	LB87592
CIS-10-PENTADECENOIC ACID METH	90176-52-6	99.0 (a)	2.00	LB84963
LINOLELAIDIC ACID METHYL ESTER	2566-97-4	99.9	2.00	LB67773
GAMMA-LINOLENIC ACID METHYL ES	16326-32-2	99.9	2.00	LB85406
METHYL CIS-5,8,11,14-EICOSATE	2566-89-4	99.9	2.00	LB85903
ALL CIS-4,7,10,13,16,19-DOCOSA	2566-90-7	99.2	2.00	LB73438
METHYL CIS-5,8,11,14,17-EICOSA	2734-47-6	99.9	2.00	LB83268
METHYL BUTYRATE	623-42-7	99.9	3.99	LB63798
METHYL HEXANOATE	106-70-7	99.9	3.99	LB78270
METHYL OCTANOATE	111-11-5	99.9	3.99	LB78266
METHYL DECANOATE (CAPRATE)	110-42-9	99.9	4.00	LB80132
METHYL UNDECANOATE	1731-86-8	99.5	2.00	LB79889
METHYL LAURATE	111-82-0	99.8	4.01	LB32645
METHYL TRIDECANOATE	1731-88-0	99.9	2.00	LB79989
METHYL MYRISTATE	124-10-7	99.8	3.99	LB78271
METHYL PENTADECANOATE	7132-64-1	99.9	2.00	LB84181
METHYL PALMITATE	112-39-0	99.8	5.99	LB82986
METHYL HEPTADECANOATE	1731-92-6	99.9	2.00	LB84180
METHYL STEARATE	112-61-8	99.7	4.01	LB83390
METHYL HENEICOSANOATE	6064-90-0	99.4	2.00	LB75382
METHYL BEHENATE	929-77-1	99.6	4.00	LB80162
METHYL TRICOSANOATE	2433-97-8	99.1	2.00	LB78268
METHYL PALMITOLEATE (METHYL CI	1120-25-8	99.5	2.03	LB79596
CIS-9-OLEIC METHYL ESTER	112-62-9	99.9	3.99	LB83428
METHYL LINOLEATE	112-63-0	99.9	2.00	LB85946
METHYL ERUCATE (CIS-13-DOCOSEN	1120-34-9	99.6	2.00	LB43037
METHYL NERVONATE	2733-88-2	97.4	2.05	LB85960
METHYL ARACHIDATE	1120-28-1	99.9	3.99	LB83052
METHYL LIGNOCERATE	2442-49-1	99.9	4.00	LB85855

(1) Determined by GC-FID unless otherwise noted.

(a) Resale Item.

(2) Weight percent of analyte, calculated by using analyte weights. The total may not equal 100% due to rounding. Weight concentrations may not remain stable after opening, even if resealed.

NIST-Traceable weights are used to verify balance calibration with the preparation of each lot.



Elwood Doughty
QA Manager

Supelco warrants that its products conform to the information contained in this publication. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. Please see the latest catalog or order invoice and packing slip for additional terms and conditions of sale.



SUPELCO
Analytical
595 North Harrison Road • Bellefonte, PA
16823-0048 USA • Phone (814) 359-3441