

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA ŠTEINFELSER

**ANALIZA ZA AROMO POMEMBNIH HLAPNIH SPOJIN IN
MAŠČOBNOKISLINSKE SESTAVE OLJA IZ SEMEN GRANATNEGA JABOLKA**

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

DIPLOMSKO DELO

Ljubljana, 2013

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

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Damjanu Janešu, mag. farm. za nasvete in vsestransko pomoč pri izdelavi diplomskega dela. Zahvaljujem se tudi prof. dr. Samu Kreftu mag. farm. in vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko biologijo za sodelovanje pri izvedbi organoleptične analize.

Seveda vsega tega ne bi bilo brez vas, dragi starši, ki ste me tekom študija na vse načine podpirali in spodbujali ter mi vedno stali ob strani.

Izjava

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

Predsednik komisije: prof. dr. Albin Kristl, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Jožko Cesar, mag. farm.

Ljubljana, 2013

Maja Šteinfelser

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	I
KAZALO SLIK	III
KAZALO PREGLEDNIC	III
POVZETEK.....	IV
ABSTRACT	V
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VI
1 UVOD	1
1.1 GRANATNO JABOLKO	1
1.1.1 OPIS IN GEOGRAFSKA OPREDELITEV	1
1.1.2 SKOZI ZGODOVINO	1
1.1.3 SESTAVA.....	2
1.1.4 ZDRAVILNI UČINKI	4
1.1.4.1 <i>Inhibicija rakastih celic</i>	4
1.1.4.2 <i>Blaženje klimakterijskih težav</i>	5
1.1.4.3 <i>Lajšanje simptomov benigne hipertrofije prostate in pomoč pri erektilni disfunkciji</i>	5
1.1.4.4 <i>Metabolični sindrom</i>	6
1.1.4.5 <i>Drugi učinki</i>	7
1.1.5 UPORABA V KOZMETIKI.....	7
1.1.5.1 <i>Zmanjševanje vidnih znakov staranja</i>	7
1.1.5.2 <i>Hidratacija kože</i>	8
1.1.5.3 <i>Varovalni učinek pred ultravijoličnim sevanjem</i>	8
1.1.5.4 <i>Pomoč pri razdraženi in vneti koži</i>	9
1.1.5.5 <i>Zaviranje rasti kožnih tumorjev</i>	9
1.1.6 PRIHODNOST	9
1.2 PLINSKA KROMATOGRAFIJA Z MASNO SPEKTROMETRIJO (GC-MS)	10
1.2.1 POTEK GC-MS ANALIZE	11
2 NAMEN DELA	13
3 MATERIALI IN METODE.....	14
3.1 MATERIALI	14
3.1.1 VZORCI.....	14
3.1.2 REAGENTI.....	15
3.2 APARATURE IN LABORATORIJSKA OPREMA.....	17
3.3 METODA ANALIZE SESTAVE MAŠČOBNIH KISLIN	18
3.4 METODA ANALIZE HLAPNIH SPOJIN AROME	19

4 EKSPERIMENTALNI DEL.....	20
4.1 EKSTRAKCIJA OLJA IZ SEMEN GRANATNEGA JABOLKA	20
4.2 ANALIZA SESTAVE MAŠČOBNIH KISLIN	20
4.2.1 PRIPRAVA VZORCEV	20
4.2.2 PRIPRAVA REFERENČNIH SPOJIN.....	21
4.3 ANALIZA HLAPNIH SPOJIN IN AROME.....	21
4.3.1 PRIPRAVA VZORCEV	21
4.3.2 PRIPRAVA REFERENČNIH SPOJIN.....	22
4.4 ORGANOLEPTIČNA ANALIZA	24
4.4.1 PRIPRAVA VZORCEV	24
4.4.2 ISKANJE IN IZBIRA PROSTOVOLJCEV	26
4.4.3 SEANSA VOHANJA	26
5 REZULTATI IN RAZPRAVA	28
5.1 EKSTRAKCIJA OLJA	28
5.2 MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA	28
5.3 ANALIZA HLAPNIH SPOJIN	32
5.4 ORGANOLEPTIČNA ANALIZA	40
5.4.1 VZOREC BACCARA ROSA	41
5.4.2 VZOREC FFA	44
6 SKLEP	48
7 LITERATURA.....	49
8 PRILOGE.....	53

KAZALO SLIK

Slika 1: Sadež granatnega jabolka (Foto: M. Šteinfelser)	1
Slika 2: Punicinska (9E,11Z,13E-oktadekatrienojska) kislina.	3
Slika 3: α -Linolenska kislina.	5
Slika 4: GC-MS aparatura na Katedri za farmacevtsko biologijo (Foto: M. Šteinfelser).	10
Slika 5: Vzorci (Foto: M. Šteinfelser).	14
Slika 6: Primer umeritvene premice - benzaldehid.	23
Slika 7: Izvedba organoleptične analize (Foto: M. Šteinfelser).	27
Slika 8: Kromatogram - maščobnokislinska sestava OSGJ, vzorec Baccara Rosa.	53
Slika 9: Kromatogram - analiza hlapnih spojin, vzorec FFa.	54
Slika 10: Kromatogram - aplikacija referenčnih spojin.	55

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Spojine z OAV>10.....	24
Preglednica II: Spojine v rekonstruiranem vzorcu Baccara Rosa.	25
Preglednica III: Spojine v rekonstruiranem vzorcu FFa.	25
Preglednica IV: Ostali rekonstruirani vzorci Baccara Rosa.	25
Preglednica V: Ostali rekonstruirani vzorci FFa.	26
Preglednica VI: Maščobnokislinska sestava.	29
Preglednica VII: Hlapne spojine v OSGJ: RI, njihova koncentracija, OTV, OAV vrednosti.....	33
Preglednica VIII: Hlapne spojine v OSGJ razvršcene po kemijskih skupinah.	36

POVZETEK

Uporaba granatnega jabolka sega globoko v zgodovino. Močno izraženi antioksidativni in protivnetni učinki odpirajo možnosti za širok spekter indikacij. Ekstrakti granatnega jabolka so glavni predmet raziskav na številnih področjih, kot so inhibicija rakastih celic, metabolični sindrom, klimakterijske težave, težave s prostato in erektilno disfunkcijo in mnoge druge. Vse bolj pa je olje iz semen granatnega jabolka priljubljeno tudi v kozmetični industriji zaradi odkritih varovalnih učinkov pred škodljivimi učinki UV sevanja in posledično za zmanjševanje vidnih znakov staranja. Olje iz semen granatnega jabolka ima zelo značilen in specifičen vonj, kar je pogosto ovira v kozmetičnih izdelkih, vendar do sedaj sestave hlapnih spojin ni še nihče raziskoval. V diplomskem delu smo se osredotočili predvsem na analizo hlapnih spojin in na odkrivanje profila spojin, ki prispevajo k aromi. Uporabili smo plinsko kromatografijo sklopljeno z masno spektrometrijo. Za analizo smo optimizirali metodo termične desorpcije, ki daje realnejše podatke o koncentraciji spojin v olju. Celoten spekter hlapnih komponent olja iz semen granatnega jabolka je sestavljen iz kar 54 različnih spojin, ki jih, gledano s kemijskega vidika, delimo na organske kisline, estre, aldehyde, aromatske aldehyde, monoterpeni, monoterpenoide, fenole, ketone, etre in laktone. S pomočjo izračunanih vrednosti aktivnosti vonja smo ugotovili, katere spojine najbolj značilno prispevajo k aromi olja. Na osnovi teh podatkov smo načrtovali in izvedli organoleptično analizo naravnih in rekonstruiranih vzorcev in s tem ugotovili vpliv posameznih spojin na celoten vonj olja. Identificirali smo spojine, ki so odgovorne za neprijeten vonj, med njimi najbolj izstopajo organske kisline in 2,4-nonadienal, ki ima značilen vonj po žarkem olju. Poskusili smo razviti metodo za odstranjevanje oziroma nevtralizacijo spojin neprijetnega vonja z namenom izboljšanja organoleptičnih lastnosti olja iz semen granatnega jabolka za uporabo v kozmetične namene. Vzporedno smo analizirali sestavo in vsebnosti maščobnih kislin in primerjali vpliv različnega načina pridelave olja semen granatnega jabolka na njegovo sestavo: superkritične ekstrakcije, hladnega stiskanja in ekstrakcije s pentanom. Maščobne kisline smo analizirali v obliki metilnih estrov, ki smo jih pripravili z metodo »in situ« preestrenja. Vsebnosti maščobnih kislin pri vzorcih, pridobljenih z različnimi načini pridelave so bile zelo podobne, tako da ne moremo izpostaviti nobenega načina pridobivanja. Potrdili smo edinstven profil maščobnih kislin zaradi prisotnosti punicinske kisline, ki je glavni nosilec farmakoloških učinkov v olju iz semen granatnega jabolka.

ABSTRACT

The usage of the pomegranate has deep historical roots. Its pronounced antioxidative and anti-inflammatory effects open up possibilities for a broad spectrum of indications. Pomegranate extracts are the main object of research in numerous fields of expertise, e.g. in the study of cancer cell inhibition, the metabolic syndrome, climacteric difficulties, prostate difficulties, erectile dysfunction, and many more. Oil made from pomegranate seeds is also increasingly popular in the cosmetics industry due to the discovery of its protective properties against the damaging effects of UV radiation and consequent reduction of the visible signs of aging. Pomegranate seed oil has a very distinct, specific odour, which often acts as a hindrance in cosmetics. However, the composition of its volatile compounds has not been studied thus far. This diploma thesis focuses primarily on analyzing the volatile compounds of pomegranate seed oil and on the determination of the compounds, profile that contribute to the aroma. The techniques used were gas chromatography combined with mass spectrometry. For the purpose of analysis, the method of thermal desorption has been optimized, yielding more realistic data pertaining to the concentration of compounds in the oil. The entire spectrum of volatile compounds in pomegranate seed oil consists of no less than 54 different compounds, which can be, from a chemical point of view, categorized as organic acids, esters, aldehydes, aromatic aldehydes, monoterpenes, monoterpenoids, phenols, lactones, ketones and ethers. Aided by the calculated odour activity values, it has been determined which compounds most significantly contribute to the aroma of the oil. Based on this data, an organoleptic analysis of natural and reconstructed samples has been planned and executed, thereby determining the influence of individual compounds on the odour of the oil as a whole. Compounds that are responsible for the unpleasant smell have been identified – foremost among them are organic acids and 2,4-nonadienal, which have a distinct odour of rancid oil. An attempt has been made to develop a method to obliterate or neutralize the unpleasantly smelling compounds, with a view to improve the organoleptic properties of pomegranate seed oil used in cosmetics. In addition, an analysis of the composition and content of fatty acids has been conducted, as well as a comparison of the effects of different techniques of producing pomegranate seed oil on its composition, including supercritical extraction, cold pressing, and extraction with pentane. Fatty acids have been analyzed in the form of methyl esters, prepared by the method of “in situ” transesterification. The content of fatty acids in samples produced by different techniques was similar, so no specific production technique can be underlined. The thesis confirms the unique profile of fatty acids due to the presence of punicic acid, the main carrier of the pharmacological effects of pomegranate seed oil.

SEZNAM OKRAJŠAV

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

FFNSC – (angl.: *Flavour and Fragrance Natural and Synthetic Compounds Library*) knjižnica naravnih in sintetičnih spojin dišav in arom

GC – (angl.: *Gas Chromatography*) plinska kromatografija

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

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

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

MK – maščobna kislina

NADPH – nikotinamidadenindinukleotidfosfat

NIST08 – (angl.: *National Institute of Standards and Technology*) nacionalni inštitut za standarde in tehnologijo

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

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

OSGJ – olje iz semen granatnega jabolka

PPAR – (angl.: *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*) receptor aktivacije proliferacije peroksisomov

PPM – (angl.: *parts per million*) delec na milijon

PPB – (angl.: *parts per billion*) delec na bilijon

PSA – (angl.: *Prostate-Specific Antigen*) prostatični specifični antigen

TAG – triacilgliceroli

UV – ultravijolična svetloba

VNMK – večkrat nenasicena maščobna kislina

1 UVOD

1.1 GRANATNO JABOLKO

1.1.1 OPIS IN GEOGRAFSKA OPREDELITEV

Granatno jabolko ali granatovec (lat. *Punica granatum* L.) je dolgo živeče (preko 200 let) košato drevo, visoko navadno od 3,5 do 5 metrov. Cveti z oranžnordečimi cvetovi v obliki velikih kelihov, ki spominjajo na nageljne. Cvetoji so enojni ali polnjeni, vendar samo rastline z enojnimi cvetovi naredijo plodove. Sadež (plod) granatnega jabolka je okrogla oblike, podobno jabolku. Ima trdo rdečo ali zeleno lupino. Znotraj sadeža je meso s sočnimi užitnimi semeni (1).



Slika 1: Sadež granatnega jabolka (Foto: M. Šteinfelser).

Granatno jabolko uvrščamo v družino granatovk (Punicaceae), v edini rod *Punica* in v prevladujočo vrsto *P. granatum*. Druga vrsta *P. protopunica* Balf. f. obstaja kot manjša in bolj primitivna različica drevesa. Ta redka vrsta se pojavlja le na otoku Sokotra, ob obali Jemna. Izvorna dežela granatnega jabolka je Iran, habitat pa sega vse do Himalaje in severne Indije. Uspeva v polsuhem subtropskem klimatskem pasu s suhimi vročimi poletji in blagimi zimami, s temperaturami do najmanj -11 °C (1). Danes ga kultivirajo na širokem pasu suhega predela južne Azije, tropске Afrike, po celotnem sredozemskem pasu Evrope in v suhem delu Kalifornije ter Arizone v Združenih državah Amerike (2).

1.1.2 SKOZI ZGODOVINO

V Palestini je bilo granatno jabolko poznano že pred 5.000 leti, gojili pa so ga že v starem Egiptu. V zgodovini je bilo granatno jabolko zelo cenjeno zaradi svoje lepote in privlačnosti. Sadež granatnega jabolka predstavlja simbol plodnosti. Legenda pravi, da je bilo granatno jabolko prvo drevo ljubezni v biblijskem raju. Že tisoče let predstavniki

različnih kultur verjamejo v različne koristi uživanja granatnega jabolka – v zdravstvene namene, dolgoživost in preporod. V ajurvedski medicini že od nekdaj granatno jabolko velja kot »lekarna zase«. Sok granatnega jabolka so uporabljali kot pomoč za zniževanje povišane telesne temperature, zaradi rdeče barve pa kot krvni tonik. Po priporočilu ljudskih zdravilcev pa so olupke kuhalili v napitek, bogati s tanini, uporaben pri krvavitvah, griži in razjedah. Skorja je bila znana po protivirusnem kot tudi protiglivičnem delovanju, liste pa so uporabljali za protibakterijske kožne prelive za rane. V lubju in korenini granatnega jabolka pa najdemo še alkaloide, ki so jih v zgodovini pogosto uporabljali proti notranjim zajedavcem gastrointestinalnega trakta (1).

Danes so zaradi številnih dokazanih zdravilnih učinkov granatno jabolko in izdelki iz njega eno izmed najbolj prodajanih t.i. »vročih izdelkov« v Ameriki. Vrednost prodaje soka granatnega jabolka naj bi s \$84,507 leta 2001 poskočila na \$66,240,767 leta 2005 (1). Po poročanju časnika Forbes naj bi samo podjetju POM Wonderful prodaja izdelkov iz granatnega jabolka narasla na \$165,000,000 (3).

1.1.3 SESTAVA

Prehranska vrednost surovega sadeža granatnega jabolka – 200g:

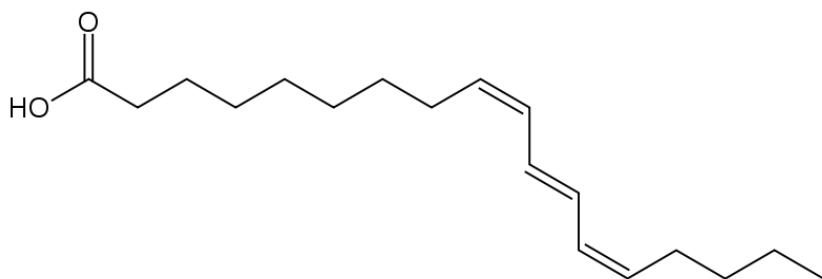
- 170 g vode (85,0 %)
- 26,4 g ogljikohidratov (13,2 %)
- 5 g vlaknin (2,50 %)
- 1,46 g proteinov (0,730 %)
- 0,46 g maščob (0,23 %) (1).

Granatno jabolko je bogat vir zlasti dveh skupin polifenolnih spojin, flavonoidov in taninov. Ti so zaradi visoke koncentracije pomembni kot močni antioksidati, delujejo pa tudi kot naravni konzervansi (4). Sok granatnega jabolka ima večjo antioksidativno učinkovitost v primerjavi z rdečim vinom, aksorbinsko kislino, sokom grozdja, borovnic, brusnic in agrumov (5). Med tanini, ki dajo sadežu grenak okus, so najpomembnejši punikalini, pedukalagini, punikalagini, estri galne in elagne kisline in elagotanini. Prevladujoča komponenta so elagotanini, ki se skozi proces prebave metabolizirajo v elagno kislino in urolitine, kot kaže bioaktivne komponente, ki zagotavljajo antioksidativno aktivnost *in vivo* (6). Najdemo lahko veliko različnih oblik flavonoidov, kot so antocianini, flavan-3-oli in flavoni (1). Značilno rdečo barvo sadeža daje visoka vsebnost antocianinov, to je od 50 do 100 µg/g svežih semen. Glavni predstavniki v soku

granatnega jabolka so 3-*O*-glukozidne in 3,5-*O*-diglikozidne oblike delphinidina, cianidina in pelargonidina. Sadež vsebuje tudi precej hlapnih sestavin, kot so monoterpenoidi, aldehydi, estri in alkoholi. Skupna koncentracija vseh hlapnih komponent v soku je 1,7-10,9 g/kg. Številne organske kisline prispevajo k okusu in kislosti soka. Od teh so najbolj pomembne citronska kislina, jabolčna, jantarna, oksalna, askorbinska, galna, klorogenska, kavna in ferulna kislina (7). Nedavna raziskava je potrdila tudi visoko vsebnost vitamina C od 312 do 1050 mg/100g soka (8).

Sok granatnega jabolka vsebuje tudi manjše deleže esencialnih aminokislin, med katerimi je največ proлина (prekursor hrustanca), metionina (bogat z žveplom in ima antioksidativne učinke) in valina (1). Esencialnih aminokislin človeško telo ni sposobno proizvesti samo, ampak jih moramo pridobiti s hrano (9).

Maščobne kisline, od tega je kar 90 % nenasičenih, so prevladujoče v semenih granatnega jabolka. Olje predstavlja okrog 18 % suhe mase očiščenih semen (1). Olje iz semen granatnega jabolka (OSGJ) vsebuje 65-80 % konjugiranih nenasičenih maščobnih kislin. Najpomembnejša je 9*E*,11*Z*,13*E*-oktadekatrienojska kislina, t.i. punicinska kislina (Slika 2) (10).



Slika 2: Punicinska (9*E*,11*Z*,13*E*-oktadekatrienojska) kislina.

V OSGJ so v precej visoki koncentraciji našli tudi fitosterole (4,089-6,205 mg/kg), kar je za približno tri do štirikrat več od koncentracije fitosterolov v sojinem olju. Glavni fitosteroli so β -sitosterol, kampesterol in stigmasterol. Seme granatnega jabolka ima visoko vsebnost α in γ -tokoferola (11). V olju so kvantificirali tudi vsebnost triterpenskih in alifatskih alkoholov. Prav prisotnost triterpenskih alkoholov zmanjšuje tveganje, povezano z razvojem ateroskleroze (12). V semenih granatnega jabolka najdemo tudi različne minerale, ki so pomembni v naši prehrani, največ je magnezija (86-136 mg/100g) in kalija (64,6-104 mg/ 100g), sledijo pa še natrij, železo, cink, baker in mangan (13).

Prav antocianini in organske kisline najbolj prispevajo k antioksidativni aktivnosti v soku in lupini granatnega jabolka. Po drugi strani pa imajo v semenu granatnega jabolka najpomembnejšo vlogo flavonoidi, punicinska kislina in tokoferoli (14).

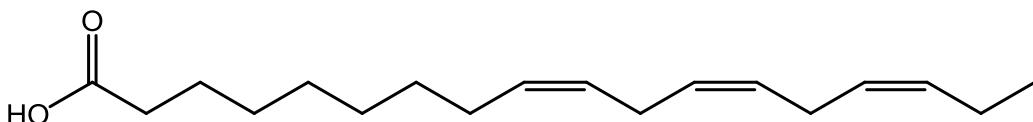
1.1.4 ZDRAVILNI UČINKI

Danes imamo veliko znanja o spojinah v samem granatnem jabolku, zato je tudi jasno, zakaj ima ta sadež toliko koristnih zdravilnih učinkov na človeški organizem. Le-te lahko pripišemo kemični sestavi, ki spodbuja obnavljanje našega telesa na celični ravni. Učinke lahko v grobem razdelimo na antioksidativne in protivnetne (1). Zlasti pomembna je tudi raziskava, ki se je osredotočila na ugotavljanje morebitne toksičnosti pri uporabi olja iz semen granatnega jabolka (OSGJ). Opravili so test mutagenosti *in vitro*, raziskavo akutne peroralne toksičnosti *in vivo* in 28-dnevno splošno raziskavo toksičnosti. Testi niso pokazali potencialne toksičnosti (2).

1.1.4.1 Inhibicija rakastih celic

Leta 2002 so znanstveniki ocenili učinke različnih izdelkov iz granatnega jabolka: OSGJ, fermentiranega soka in ekstrakta iz lupine. Ugotovili so, da polifenoli iz svežega soka in lupine zavrejo sintezo estrogena na celičnih kulturah rakavih celic, z zaviranjem encima aromataze. V naslednji raziskavi so *in vivo* na miših dokazali, da OSGJ zmanjša število rakastih celic dojke za kar 87 %. Čeprav se morajo ženske z diagnozo raka dojke ali z večjim tveganjem izogibati uživanju estrogena, saj lahko le-ta stimulira razrast rakastega tkiva, so pomisleki tukaj odveč. Po objavi raziskav, za razliko od 17-β-estradiola, 17-α-estradiol ne spodbuja raka. Torej vsi rezultati raziskav predlagajo, da bi granatno jabolko lahko imelo svoj prostor v terapiji raka dojke. Strinjajo se, da prehrana bogata s kemično zaščitnimi snovmi – hranili, kot je elagna kislina pri granatnem jabolku, lahko prepreči, zmanjša ali celo uniči rakave celice. Elagna kislina ima sposobnost spodbujanja celičnih razstrupljevalnih encimov, vključno encimom NADPH kinon reduktazo. Ta encim poveča razstrupljanje rakotvornih celic in zmanjša število rakotvornih mutacij in tumorjev. Prehrana je torej najpomembnejši prispevek posameznika k preventivi rakavih obolenj (1). Tudi edinstvena maščobna kislina, ki so jo našli v OSGJ – punicinska kislina, zavira oblikovanje vnetnih prostaglandinov (1). Punicinska kislina je strukturno zelo podobna konjugirani linolni kislini in α-linolenski kislini (Slika 3), katerima so že v preteklosti dokazali številne pozitivne učinke na zdravje, med drugim tudi preprečevanje nastanka rakastih celic. Zato so se leta 2010 prvič odločili raziskati tudi protitumorne učinke čiste

punicinske kisline na človeških rakastih celicah dojke. Rezultati so spodbudni, saj so dokazali, da ima punicinska kislina protitumorne lastnosti *in vitro* in da je sposobna zavreti proliferacijo v območju 92-96 %. Poleg učinkov na proliferacijo, sproža tudi apoptozo, program celične smrti v kar 86-91 %, vendar moramo biti do tega podatka kritični zaradi motenj, ki so jih zasledili v celičnem mitohondrijskem membranskem potencialu (15).



Slika 3: α -Linolenska kislina.

1.1.4.2 Blaženje klimakterijskih težav

Že v letu 1960 so razlagali, da OSGJ vsebuje več estrogena kot drugi rastlinski viri. Prva raziskava, ki so jo opravili leta 1963 v Egiptu, je prispevala k zanimivim dognanjem. Estrogenko aktivnost so testirali na spolno nezrelih zajcih z metodo tehtanja maternice in na miših z odstranjenimi jajčniki. Rezultate so vrednotili po Robsonovi metodi iz leta 1938. Ugotovili so, da ima 0,5 ml olja skoraj enako aktivnost kot 10 μg estradiola (16). Flavoni, npr. kamferol in kvercetin, ki so prisotni v granatnem jabolku, spadajo med blage fitosterole in prav tako regulirajo veliko fizioloških celičnih reakcij. V granatnem jabolku najden flavon luteolin, ima pet- do šestkratno estrogenko aktivnost od prej navedenih in kar 58 % aktivnosti genisteina, ki je najbolj znan izoflavon najden v soji. V granatnem jabolku najdemo tudi apigenin, ki se veže na benzodiazepinski receptor v možganih in zmanjša anksioznost. Ta učinek je prisoten verjetno tudi zaradi progesteronu podobnih spojin in prav granatno jabolko je eno redkih rastlin s temi spojinami. Ti učinki so bili dokazani na živalskih modelih z znaki menopavze. Granatno jabolko je poleg fitosterolov tudi zaradi estrogenkih spojin, kot so estradiol, estriol in estrone ter tudi fitoestrogenksimi flavonoidi potencialen sadež za preprečevanje ali zdravljenje znakov klimakterija (1).

1.1.4.3 Lajšanje simptomov benigne hipertrofije prostate in pomoč pri erektilni disfunkciji

Ekstrakt granatnega jabolka zaradi močno izraženih protivnetnih in antioksidativnih učinkov prispeva tudi k preprečevanju ali lajšanju simptomov benigne hipertrofije prostate. Opazili so tudi izboljšanje pretoka krvi v penisu in s tem boljši erektilni odziv, sprošča pa

tudi gladko mišično tkivo in preprečuje fibrozo erektilnega tkiva, ki vodi do stalne erektilne disfunkcije (1). Zadnje študije so pokazale, da lahko sok granatnega jabolka upočasni napredovanje raka prostate. Opravili so raziskavo z uživanjem soka granatnega jabolka na 46 moških s povišanim prostatno specifičnim antigenom (PSA) in ugotovili značilno zakasnjeno povišanje PSA iz 15 na 54 mesecev. Druga študija *in vitro* je pokazala, da elagotanini in njihovi metaboliti urolitini kažejo na zaviranje CYP1B1, ki je povezan z iniciacijo in progresijo raka prostate (6).

1.1.4.4 Metabolični sindrom

Metabolični sindrom je skupek sladkorne bolezni tipa 2, visceralne debelosti, hiperlipidemije, endoteljske disfunkcije in hipertenzije (9). Raziskave OSGJ so usmerjene v iskanje zdravilnih učinkov v boju s sladkorno boleznijo tipa 2, vključno z učinki na kontrolo telesne mase in vpliv na spremembo krvno lipidnega profila pri hiperlipidemičnih posameznikih (6). Sok granatnega jabolka kaže velik potencial tudi pri zdravljenju hiperholesterolemije, saj zmanjšuje oksidacijo lipoproteina nizke gostote LDL, ima zaviralni učinek na oksidativni stres v makrofagih, ki vodi do razvoja ateroskleroznih leh v koronarnih arterijah, kar je osrednji dogodek, ki vodi do pojava ateroskleroze (1). V več *in vitro* ter *in vivo* raziskavah so dokazali, da ima prav punicinska kislina, ki je glavna sestavina olja, antiaterogene učinke. V dvojno slepi klinični študiji so po 4 mesecih peroralne aplikacije OSGJ sklenili, da je pri hiperlipidemičnih ljudeh zaznati ugodne učinke na lipidni profil, predvsem na triglyceride TAG in na razmerje TAG: HDL, niso pa dokazali vpliva na zmanjšanje koncentracije holesterola in LDL frakcije (17). Na znižanje holesterola vplivajo tudi fitosteroli. Fitosteroli in holesterol se absorbirajo skozi steno tankega črevesa v kri preko istega transporterja. Fitosteroli se učinkoviteje vežejo na ta transporter in tako zaprejo pot holesterolu, ki se iz telesa izloči neabsorbiran (1).

Sok granatnega jabolka inhibira tudi encim angiotenzin konvertazo (ACE) za 36 %, kar pripomore k zmanjšanju povišanega krvnega tlaka. Predpostavljajo tudi, da stimulira sintezo dušikovega oksida, ki deluje vazodilatorno in skrbi za prožnost žil, kar prav tako zniža visok krvni tlak in s tem veliko pripomore k pravilnemu delovanju kardiovaskularnega sistema (1).

Uživanje granatnega jabolka sproži tudi hipoglikemijski učinek, vključno s povečanjem inzulinske občutljivosti, inhibicijo α -glukozidaze in vpliva na glukozni transporter tipa 4 (7). Nedavna raziskava je dokazala, da uporaba OSGJ zmanjša telesno maso, zavre vnetni odziv povezan z debelostjo in zmanjša tveganje za razvoj sladkorne bolezni tipa 2.

Katalpinska kislina zmanjša nalaganje abdominalne maščobe. V tej raziskavi so prvi dokazali, da prehranska dopolnila z OSGJ izboljšajo periferno inzulinsko senzitivnost pri miših. Nadaljnje raziskave bodo potrebne, da dokažejo, ali je stimulacija PPAR receptorjev res najverjetnejši predpostavljeni mehanizem (18).

1.1.4.5 Drugi učinki

Ekstrakt granatnega jabolka inhibira encim ciklooksigenazo-2 (COX-2) za 31-44 %, kar kaže na značilno protivnetni učinek. Farmakološko zaviranje encima COX-2 je pomembno tudi zaradi protibolečinskega delovanja (1).

Dokazali so tudi, da ekstrakt granatnega jabolka zmanjšuje aktivnost vnetnih proteinov, interlevkina-1b, ki igra pomembno vlogo pri degradaciji hrustanca pri osteoartritisu (1).

Sestavine granatnega jabolka imajo protibakterijsko in protivirusno aktivnost (1). Ekstrakti granatnega jabolka kažejo tudi protimikrobnou aktivnost na *Staphylococcus aureus* in *Pseudomonas aeruginosa*. V študiji so ugotavljal protiglivično delovanje fitoterapevtskega gela iz granatnega jabolka in dokazali, da ima le-ta večjo učinkovitost v primerjavi z gelom, ki vsebuje učinkovino mikonazol (8).

Predpostavljam, da lahko uživanje ekstrakta granatnega jabolka zniža produkcijo levkotrienov iz arahidonske kisline, ki igrajo glavno vlogo pri pojavu astme, kožnemu vnetju in agregaciji trombocitov pri kardiovaskularnih boleznih (10).

Sok granatnega jabolka ima močno adstringentno delovanje. Učinkovit je za zmanjševanje oteklin in ga topikalno lahko uporabimo za zdravljenje hemoroidov. Zaradi adstringentnih lastnosti pomaga pri diareji in uničenju gastrointestinalnih parazitov. Uporablja se lahko tudi za groranje pri vnetem žrelu in ranicah v ustih (10).

1.1.5 UPORABA V KOZMETIKI

Število produktov za nego kože, ki vsebujejo OSGJ neverjetno narašča in ti so na tržišču vedno bolj dostopni široki paleti uporabnikov. Obljubljajo pomlajevanje, mladost in lepoto, vendar še vedno poteka veliko raziskav, ki bi potrdile učinkovitost in širile spekter uporabe v kozmetične namene. Kljub temu je število opravljenih raziskav na to temo zavidljivo, prav tako tudi spekter dokazanih pozitivnih učinkov na koži (1).

1.1.5.1 Zmanjševanje vidnih znakov staranja

V procesu kožnega staranja keratinociti ne morajo tvoriti funkcionalne poroženele plasti, upočasni se hitrost nastajanja nevtralnih lipidov, ki prispevajo k barierni funkciji. Rezultat tega je suha, bleda koža z vidnimi gubami (19). OSGJ ima stimulativne učinke tudi na

proliferacijo keratinocitov, ki proizvajajo protein keratin in so glavni tip celic v povrhnjici. Ekstrakt iz lupine granatnega jabolka pa zvišuje število fibroblastov, celic, ki se lahko po poškodbi hitro razmnožujejo in izločajo kolagenska vlakna (6). Zaradi različnih oblik sevanja je v koži povečano izražanje matriksne metaloproteinaze I (MMP-I), ki je glavni kolagenolizni encim v koži. To vodi do degradacije kolagena v koži, ki sicer vzdržuje prožnost in polnost kože. Polifenoli, zlasti katehin povečajo izražanje prokolagena I in zmanjša izločanje MMP-I (20).

1.1.5.2 Hidratacija kože

Vrhnjica kože oz. epidermis postane suha in izgubi svojo elastičnost, ko se vsebnost vode v poroženeli plasti (stratum corneum) zmanjša pod kritično mejo 10 %. Dehidracija kože je najbolj pogosta v letih, ko se začne staranje. Leta 1991 so prvič opisali t.i. vodne kanale oz. akvaporine, specializirane molekule, ki regulirajo tok vode v organizmih. Ugotovili so, da je s staranjem pogosto povezana tudi disfunkcija specifičnega akvaporina AQP3. Za kozmetično industrijo je zato postalo zanimivo iskanje učinkovine, ki bi stimulirala izražanje akvaporinov v epidermalnih celicah. Akvaporini so visoko ohranjene molekule v filogenezi, zato je bilo posebnega pomena najti takšne molekule znotraj rastlinskega sveta. Nekatere rastline so namreč visoko prilagojene za varčevanje z vodo, eno takih dreves je tudi granatno jabolko. Skozi evolucijo so zaradi klimatskih razmer in zahtevnega rastišča te rastline razvile poseben sistem zadrževanja vode z akvaporini in prav zato postale raziskovalno zanimive. Skozi raziskave so ugotovili, da ekstrakt granatnega jabolka stimulira izražanje akvaporinov AQP3. Rezultati so zelo obetajoči in vse kaže, da bodo naravni ekstrakti prevzeli vodilno vlogo v kozmetiki, saj je vlažilni učinek teh specifičnih molekul drugačen od standarnih emolientov in vodi na novo pot hidracije kože (21).

1.1.5.3 Varovalni učinek pred ultravijoličnim sevanjem

Ekstrakti granatnega jabolka so postali v zadnjih letih zanimivi tudi zaradi zaznanih varovalnih učinkov pred sevanjem in posledično prehitrim staranjem kože. Potencial je viden na področju obnavljanja zunanjih plasti kože. Izpostavljenost ultravijoličnim žarkom, predvsem UVB (290 – 320 nm), ima različne učinke na človeško kožo. Le-ti lahko povzročijo eritem, edeme, sončne opeklne, hiperpigmentacijo, staranje kože, imunsko supresijo in tudi kožnega raka (20). Dokazali so, da uporaba ekstrakta granatnega jabolka peroralno in topikalno zviša zaščitni faktor kremam za 20 % (1). Višja je vsebnost fenolnih spojin, boljši je varovalni učinek. Naredili so tudi primerjavo varovalnih lastnosti

ekstraktov in ugotovili, da ima ekstrakt granatnega jabolka neprimerljivo boljše lastnosti od ekstrakta kurkume, kateremu prav tako pripisujejo te lastnosti (4).

Pomembni so predvsem antioksidanti, ki nevtralizirajo proste radikale. Poškodbe na koži povzročijo radikali, ki nastajajo z normalnim metabolizmom ali oksidacijo pospešeno z onesnaženostjo zraka, z UV žarki in stresom. Na koži se pojavijo vidni znaki staranja, vključno s poškodbami kolagena in elastina v kožnih plasteh. Elagna kislina naj bi celo krepila celične membrane in jih naredila manj ranljive za radikale zaradi preprečevanja izgube vode iz celic, zato je uporaben dodatek v kozmetičnih produktih (1).

1.1.5.4 Pomoč pri razdraženi in vneti koži

OSGJ je naravna protivnetra in protimikrobna sestavina. Uveljavlja se tudi v zdravilnih kozmetičnih produktih, osnovanih za lajšanje razdražene in vnete mladostniške kože. Svetujejo celo nanos čistega olja neposredno na vneto kožo za pospešitev celjenja (1).

1.1.5.5 Zaviranje rasti kožnih tumorjev

Spodbudni so rezultati na področju zaviranja rasti kožnih tumorjev. Zdi se, da granatno jabolko zmanjšuje razrast kožnega raka, kar je bilo pomembno odkritje ameriškega združenja za raziskave raka. Topikalna uporaba na mišjih modelih je pokazala uspešno zakasnitev ali celo zaviranje pojavnosti in raznolikosti tumorjev, saj so zabeležili za 70 % manjšo pojavnost tumorjev na koži (1).

1.1.6 PRIHODNOST

Vse te raziskave so sprožile množično vključitev OSGJ v kozmetične pripravke, prehranska dopolnila in razširila uporabo drugih ekstraktov granatnega jabolka (1). Kažejo na velik potencial granatnega jabolka in v prihodnosti obetajo še več raziskovanj in dognanj na to temo, vsekakor pa vedno več kliničnih raziskav na ljudeh. Trenutno lahko v bazi kliničnih raziskav najdemo kar 43 raziskav, ki potekajo na temo granatnega jabolka (22).

1.2 PLINSKA KROMATOGRAFIJA Z MASNO SPEKTROMETRIJO (GC-MS)

Kapilarno plinsko kromatografijo (GC) uvrščamo med najpomembnejše analizne metode na področju organske kemije za ugotavljanje posameznih spojin v kompleksnih zmeseh (23). Za metodo identificiranja spojin pogosto uporabljam masno spektrometrijo, ki jo sklopimo s plinsko kromatografijo. Z masno spektrometrijo (MS) analiziramo ione, na katere razпадajo osnovne molekule (24). Masni spektrometer zazna fragmente na podlagi razmerja mase z nabojem (m/z). Iz specifičnih fragmentov torej ugotavljamo strukturo molekul in njihovo molekulsko maso (25).

Konec 70. in na začetku 80. let 20. stoletja se je uporaba GC-MS zelo razširila in metoda je zaradi tehnike univerzalnega odkrivanja, velike selektivnosti in zelo visoke občutljivosti postala pomembna za velik nabor analiz organskih spojin (23). Sklopitev teh dveh metod vsekakor ima veliko sinergijo, saj s kombinacijo dveh tehnik tvorimo eno metodo za analizo zmesi hlapnih spojin. Ob uporabi kombinacije teh dveh tehnik lahko hkrati vrednotimo rezultate kvalitativno kot tudi kvantitativno z uporabo referenčnih spojin (26).



Slika 4: GC-MS aparatura na Katedri za farmacevtsko biologijo (Foto: M. Šteinfelser).

Prednosti kapilarne plinske kromatografije so vsekakor visoka učinkovitost, ločljivost in občutljivost. Ne nazadnje pa je pomemben tudi kratek čas analize in uporaba majhnih količin vzorca (23).

Uporabljamo indirektno injiciranje vzorca, saj je kapaciteta kapilarne kolone zelo majhna. Pazljivost je potrebna zlasti pri izbiri delovne temperature, ki ne sme preseči maksimalne dopustne temperature stacionarne faze, saj le-ta lahko začne izhajati iz kolone (27).

1.2.1 POTEK GC-MS ANALIZE

Začetek analize predstavlja injiciranje vzorca. Ta postopek pomembno vpliva na kromatografsko ločbo. Pomembno je, da je injiciranje hitro, volumni injiciranja pa čim manjši. V tem primeru se vzorec v trenutku upari in se s pomočjo mobilne faze prenese na kolono. Poznamo dva načina injiciranja: injiciranje brez razdelitve vzorca »splitless« in injiciranje z linearno delitvijo vzorca »split« način. Mobilna faza pri GC - MS je inerten plin, ki je najpogosteje helij, saj v nasprotju z vodikom ni vnetljiv. Zmes potuje z mobilno fazo do kolone, v kateri je trdna ali tekoča stacionarna faza. Najpomembnejši del v sistemu sta kolona in stacionarna faza, saj v koloni poteka ločevanje zmesi spojin na osnovne komponente, ki je odvisno od stacionarne faze (28). Pri izbiri stacionarne faze se osredotočamo na pravilo – podobno se topi v podobnem, torej za nepolarne vzorce uporabljamo nepolarno stacionarno fazo in za polarne vzorce polarno stacionarno fazo (27). Selektivnost stacionarne faze omogoča, da spojine glede na stopnjo interakcije zapustijo kolono ob različnih časih. Poleg selektivnosti je pomembna tudi inertnost. Pri ločbi spojin si pogosto pomagamo tudi s poljubno nastavljivo temperatujo, kar nam omogoča temperaturni program in praktično nameščena kolona v prostoru. Spojine z nižjim vreliščem torej prej preidejo in zapustijo kolono kot spojine z višjim vreliščem, ki se na koloni zadržijo dlje časa (25).

V koloni se torej spojine ločijo in se z mobilno fazo prenesejo do detektorja, ki zazna spojino. Najpogostejši način identifikacije je uporaba elektronske ionizacije. Z vstopom spojine v tok elektronov v vakuumu molekula razpada na fragmente. Energija ionizacije je konstanta - 70 eV. Ta energija je ravno pravšnja, saj bi se pri nižji energiji lahko soočali z neučinkovito ionizacijo, pri višji energiji pa bi lahko pričakovali slabšo kakovost informacij v spektru, zaradi prevelike fragmentacije (25).

Ionizirani fragmenti potujejo v analizator, med najpogosteje uporabljenimi pri GC-MS analizi je t.i. kvadropolni masni analizator. Fragmenti se selektivno usmerijo glede na elektromagnetno polje, ki se spreminja. Iz detektorja poslani rezultati se beležijo na računalniku. Signal je večji, čim večja je koncentracija določene spojine v vzorcu (25).

Kromatogram celokupnega ionskega toka (angl. Total ion current, TIC) predstavlja rezultat. Retencijski čas lahko odčitamo na abscisi, medtem ko ordinata kaže vsoto

intenzitete ionskih tokov pri vseh m/z. Pri poljubnem retencijskem času (RT) nam računalniški program konstruira masni spekter (25). Masni spekter je torej rezultat signalov in je vedno enak za določeno kemijsko komponento. V računalniku je shranjena knjižnica masnih spektrov, na osnovi katerih identificiramo spojino (26).

2 NAMEN DELA

Številne raziskave zdravilnih učinkov granatnega jabolka so trg močno razširile ter uporabo ekstraktov iz granatnega jabolka približale populaciji. Vsebnost širokega spektra učinkovin omogoča uporabo za raznovrstne indikacije in zato ti ekstrakti zasedajo pomembno mesto v fitoterapiji. Zaradi vedno večjih zahtev potrošnikov in teženj k uporabi naravnih virov, so zadnja leta izvlečki granatnega jabolka vedno bolj uporabljeni tudi v kozmetiki. Glavni problem pri uporabi v kozmetične namene je predvsem v neprijetnosti vonja OSGJ. Moteč vonj je lahko v kozmetični panogi precejšen problem, saj potrošniki izdelek, ki je sicer kakovosten, hitro označijo za nesprejemljivega. Prav s tega vidika se nam zdi pomembno, da v prvi vrsti odkrijemo profil hlapnih spojin, ki bi lahko bile odgovorne za aroma.

Posvetili se bomo zlasti aromi in analizirali hlapne spojine z uporabo plinske kromatografije. Dejstvo je, da profil arome OSGJ še ni bil raziskan, zato smo si za svojo prvenstveno nalogu zadali, da identificiramo in kvantificiramo hlapne spojine v olju. Za analizo hlapnih spojin bomo uporabili metodo termične desorpcije, ki daje realnejše podatke o sestavi v primerjavi s pogosteje uporabljeno enostavnejšo metodo analize plinske faze nad vzorcem. Na osnovi literarnih podatkov o pragu zaznave vonja posameznih spojin bomo izračunali aktivnost vonja, ki jo bomo potrebovali za načrtovanje organoleptične analize. Izvedli bomo rekonstrukcijo originalnega olja in s pomočjo prostovoljcev ovrednotili vpliv posameznih spojin na aroma olja. Poskušali bomo najti spojino/-e, ki najbolj značilno vpliva/-jo na neprijetnost vonja olja. V primeru uspešnosti bomo navedli tudi predlog izboljšave vonja olja in predstavili preprost tehnološki postopek, ki bo tudi ekonomsko sprejemljiv. Verjamemo, da lahko naša analiza v prihodnje pripomore k večji uporabnosti olja v kozmetične namene in k večji sprejemljivosti izdelka s strani potrošnika.

Vzporedno bomo analizirali tudi sestavo maščobnih kislin. Zanimala nas bo predvsem sestava nenasičenih maščobnih kislin, ki so pomemben dejavnik fizioloških in patofizioloških procesov v telesu. Primerjali bomo različne vzorce in s tem morebiten vpliv različnega načina pridobivanja olja na profil maščobnih kislin. Uporabili bomo metodo »*in situ*« derivatizacije maščobnih kislin in tako izvedli preestrenje maščobnih kislin v metilne estre, ki jih bomo analizirali z GC-MS.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 VZORCI

Za analizo smo izbrali vzorca OSGJ različnih proizvajalcev ter vzorec, ki smo ga pripravili sami z ekstrakcijo semen pred samo analizo. Vzorci se med seboj razlikujejo glede na način pridelave. Zanimal nas je vpliv pridelave na sestavo maščobnih kislin in posledično na samo kakovost olja. Vsi vzorci so se med seboj razlikovali tudi po vonju, kar smo nadalje analizirali z analizo hlapnih snovi z GC-MS aparaturo in izvedeno organoleptično analizo.

Vzorci so bili naslednji:

- G1 – olje iz semen granatnega jabolka Primavera, hladno stisnjeno olje (Oy Mittelberg, Nemčija),
- G2 – olje iz semen granatnega jabolka Baccara Rosa, pripravljeno s superkritično ekstrakcijo (Sonsbeck, Nemčija),
- G3 – olje iz semen granatnega jabolka, ekstrahirano iz semen granatnega jabolka Dragonsrice (Reutlinger, Nemčija), sveže pripravljeno na katedri za Farmacevtsko biologijo, Fakultete za farmacijo.



Slika 5: Vzorci (Foto: M. Šteinfelser).

Priprava vzorcev

Prva dva vzorca OSGJ smo naročili preko interneta, ekstrahirano olje pa smo pripravili sami na Katedri za farmacevtsko biologijo. Semena granatnega jabolka za izdelavo olja smo prav tako naročili preko interneta, odločali smo se glede na poreklo in izbrali semena

iz Irana, saj je ta država izvorna dežela granatnega jabolka in ena izmed največjih izvoznic semen granatnega jabolka (1).

3.1.2 REAGENTI

Reagenti za pripravo metilnih estrov maščobnih kislin:

- metanol, p.a. (Panreac, Barcelona, Španija)
- diklorometan, p.a. (Panreac, Španija)
- natrijev hidroksid, p.a. (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)

Referenčne spojine:

- Metoda »in situ« preestrenje:
 - F.A.M.E. Mix C4-C24 (Supelco, Bellefonte, PA, ZDA)
- Metoda termične desorpcije:

Pri metodi termične desorpcije smo za izračun vsebnosti hlapnih spojin potrebovali površine pod krivuljo kromatografskih vrhov za referenčne spojine z znanimi koncentracijami. Pripravili smo zmes referenčnih spojin in pri tem uporabili spojine, ki so navedene na naslednji strani.

Referenčne spojine smo kupili od naslednjih proizvajalcev:

- Sigma Aldrich (Steinheim, Nemčija)
- Merck (Darmstadt, Nemčija)
- Fluka (Buchs, Švica)

- nonanal
- limonen
- 2,4-nonadienal
- dietilsukcinat
- nonanojska kislina
- 2-feniletilacetat
- 4-heptanal
- 2,4-dodekadienal
- metildekanoat
- vanilin
- etildekanoat
- etilmiristat
- 5-tetradekanolid
- palmitinska kislina
- etilpalmitat
- metillinolat
- metiloleat
- etiloleat
- metillinolenat
- 3-metilbutanal
- 3-metilbutanojska kislina
- 2-metilbutanojska kislina
- izoamilacetat
- benzaldehid
- evkaliptol (1,8-cineol)
- 2-ethylheksilacetat
- kafra
- 4-ethylfenol
- dekanojska kislina
- 4-etylvgajakol
- anetol
- evgenol
- pentanojska kislina
- β -pinen
- fenhon
- linalol
- α -terpinilacetat
- benzilbenzoat
- dekanal
- 4-nananolid
- 5-dekanolid
- 5-dodekanolid
- miristinska kislina
- izomaslena kislina
- tiglinska kislina
- 3-heksenojska kislina
- heksanojska kislina
- 2-feniletanol
- etiloktanoat
- 2-ethylfenol
- heksanojska kislina
- 2-feniletanol
- etiloktanoat
- 4-undekanolid
- etilcinamat
- lavrinska kislina
- etillavrati
- oleinska kislina
- linolna kislina
- 5-metil-2-heksanon
- butanojska kislina
- 5-metil-2-fenil-2-heksena

3.2 APARATURE IN LABORATORIJSKA OPREMA

Mletje

Laboratorijski mlinček (Waring, Newhartford Connecticut, ZDA)

Tehtanje

Analizna tehnica PC 2000 (Mettler, Zürich, Švica)

Analizna tehnica KERN ALS 120-4 (Kern & Sohn GmbH, Balinger, Nemčija)

Odparevanje pri znižanem tlaku

Rotavapor R-215 (Büchi, Flawil, Švica)

Centrifugiranje

Centrifuga Centric 400R (Tehnica, Železniki, Slovenija)

Mešanje

Mešalnik Wibromix 10 (Tehnica, Železniki, Slovenija)

Raztpljanje in segreganje

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 Rx-5 Sil MS, 30 m × 0,25 mm, 0,1 µm 5 % difenil/95 % dimetilpolisilosan (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 (Brand, Nemčija)

3.3 METODA ANALIZE SESTAVE MAŠČOBNIH KISLIN

Kromatografske razmere

- kapilarna fenildimetilsilosanska kolona (5 % difenil / 95 % dimetilpolisilosan),
30 m × 0,25 mm, 0,1 µm= debelina nanosa stacionarne faze
- način injiciranja: split 1 : 100
- nosilni plin: helij
- pretok: 1 ml/min
- temperaturni program: začetna 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

3.4 METODA ANALIZE HLAPNIH SPOJIN AROME

Kromatografske razmere

- kapilarna fenildimetsilosanska kolona (5 % difenil/95 % dimetilpolisilosan), 30 m × 0,25 mm, 0,1 µm= debelina nanosa stacionarne faze
- način injiciranja: splitless (vzorci olja) / split 1:100 (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 SEMEN GRANATNEGA JABOLKA

Semena smo zmleli v mlinčku, vsebino stehtali in zapisali maso. Zmes smo stresli v erlenmajerico in dodali približno 10-kratno količino topila (60 ml pentana) in dobro premešali. Vsebino smo prefiltrirali preko steklenega filtra št. 3 v označeno bučko, jo stehtali in zapisali maso. Tako pripravljeni zmesi za ekstrakcijo smo pri temperaturi 40°C in začetnem tlaku 600 milibar odparili topilo. Tlak smo postopoma zniževali do konstantne mase bučke. Bučko smo ponovno stehtali skupaj z vsebino in z izračunom določili izplen ekstrakcije.

4.2 ANALIZA SESTAVE MAŠČOBNIH KISLIN

4.2.1 PRIPRAVA VZORCEV

Začetek eksperimentalnega dela je bila analiza sestave maščobnih kislin OSGJ. Identificirali smo MK in ugotovili relativni delež posameznih MK v vseh treh vzorcih (Primavera, Baccara Rosa in ekstrahiranega). Uporabili smo metodo, ki sta jo optimizirala Park in Goins (29). Na začetku smo v epruveto dali 50 µl olja, 100 µl diklorometana ter 1 ml 0,5 M NaOH v metanolu (raztopino smo predhodno pripravili iz 1 g NaOH in raztopili v 50 ml metanola). Premešali smo vsebino in zaprto epruveto za 10 minut postavili na vodno kopel v ultrazvočno kadičko s temperaturo 80°C. Nato smo epruveto ohladili na sobno temperaturo. Vsebini smo dodali 1 ml 14 % BF₃, premešali in ponovno segrevali 10 minut pri 80°C. Po ponovni ohladitvi na sobno temperaturo smo dodali 1 ml heptana in 1 ml destilirane vode. Vsebino smo pretresli v mešalniku Vibromix. Nadalje smo centrifugirali 15 minut pri 1000 obratov/min ter ločili vodno in organsko fazo. V vialo smo odpipetirali 100 µl organske (zgornje) faze in dodali 900 µl heptana. Vialo smo dobro premešali in aplicirali vsebino na GC-MS (29).

4.2.2 PRIPRAVA REFERENČNIH SPOJIN

Pripravili smo štiri raztopine referenčnih spojin z različnimi koncentracijami (29). V vialo smo natehtali 10,0 mg standardne zmesi MK (F.A.M.E. Mix C4-C24). Z dodatkom 500 µl heksana smo raztopili zmes referenčnih spojin ter dobili raztopino standarda 1 (RS1). Podobno smo pripravili tudi vse druge raztopine standardov. Za raztopino standarda 2 (RS2) smo v vialo zatehtali 5,00 mg standardne zmesi in dodali 500 µl heksana. Za raztopino standarda 3 (RS3) smo zatehtali 2,50 mg standardne zmesi in dodali 500 µl topila. Za raztopino standarda 4 (RS4) smo natehtali 1,25 mg standardne zmesi prav tako 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.

4.3 ANALIZA HLAPNIH SPOJIN IN AROME

4.3.1 PRIPRAVA VZORCEV

V viale smo najprej odpipetirali vse tri vzorce olja. Zaradi visoke gostote OSGJ smo jih pogreli s sušilnikom, dokler ni bil vzorec vidno bolj tekoč. Ta del segrevanja vzorca je pomemben, saj je OSGJ izredno viskozno in je zato injiciranje vzorca v kolono oteženo. Nadalje smo se odločili, da pripravimo še koncentrirane vzorce z namenom, da zajamemo čim širši spekter hlapnih spojin in da ne spregledamo katere izmed spojin, ki bi lahko kljub izredno nizki koncentraciji, morebiti odločilno vplivala na aroma olja. Izbrali smo vzorec Primavera in Baccara Rosa, ki smo ju skoncentrirali za faktor koncentriranja 20 ter tako pripravili absolute. Absolut je z etanolno ekstrakcijo pripravljen ekstrakt, iz katerega z vakuumsko destilacijo odstranimo topilo (etanol). Absolute smo pripravili po naslednjem postopku: v plastični epruveti smo zmešali 20 ml olja z 20 ml etanola in močno pretresli. Tako pripravljeno zmes za ekstrahiranje smo centrifugirali 15 minut pri sobni temperaturi pri 5000 obrati/min. Etanolno raztopino (zgornja faza) smo prenesli v bučko, ki smo jo

predhodno stehtali. Topilo smo odparili pri znižanem tlaku 75 mbar in temperaturi 50°C. Po končanem odparevanju smo stehtali bučko in preračunali maso absoluta.

$$m_{\text{Prim}} = 0,744 \text{ g}$$

$$m_{\text{BR}} = 0,891 \text{ g}$$

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

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

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

Maso olja smo izračunali glede na odmerjen volumen (20 ml) in njegovo gostoto ($\rho_{\text{OSGJ}} = 0,94 \text{ g/ml}$)

Izračun:

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

$$F_{\text{Prim}} = 0,744 \text{ g} / 20 \text{ ml} / 0,94 \text{ g/ml}$$

$$F_{\text{Prim}} = \underline{\underline{0,0396}}$$

$$F_{\text{BR}} = 0,891 \text{ g} / 20 \text{ ml} / 0,94 \text{ g/ml}$$

$$F_{\text{BR}} = \underline{\underline{0,0474}}$$

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

$$C_{\text{Prim}} = C_{\text{absolut Prim}} * 0,0396$$

$$C_{\text{BR}} = C_{\text{absolut BR}} * 0,0474$$

4.3.2 PRIPRAVA REFERENČNIH SPOJIN

Za izračun vsebnosti hlapnih spojin v vzorcih OSGJ smo potrebovali še površine pod krivuljo kromatografskih vrhov za referenčne spojine z znanimi koncentracijami. Pripravili smo zmes vseh spojin, ki smo jih identificirali v vzorcih. V erlenmajerico smo natehtali 5,00 mg vsake spojine ali odpipetirali volumen referenčne spojine, ki je ustrezal 5,00 mg (preračunano glede na gostoto). Potem smo dodali 1,00 ml topila (heptan) in dobro premešali (RS1). Tako pripravljeno zmes smo redčili, da smo dobili raztopino referenčnih spojin (RS2, RS3) z naslednjimi koncentracijami:

1 ppm= 1 mg/kg

Prvotna koncentracija: 5 mg/ml = 5000 ppm (RS1)

Prvo redčenje za faktor 10: v 100 ml bučko smo odpipetirali 10 ml RS1 in s topilom (heptan) dopolnili do oznake. Nova koncentracija je tako 0,5 mg/ml = 500 ppm (RS2).

Drugo redčenje za faktor 10: v 100 ml bučko smo odpipetirali 10 ml RS2 in s heptanom dopolnili do oznake. Nova koncentracija je 0,05 mg/ml = 50,0 ppm (RS3).

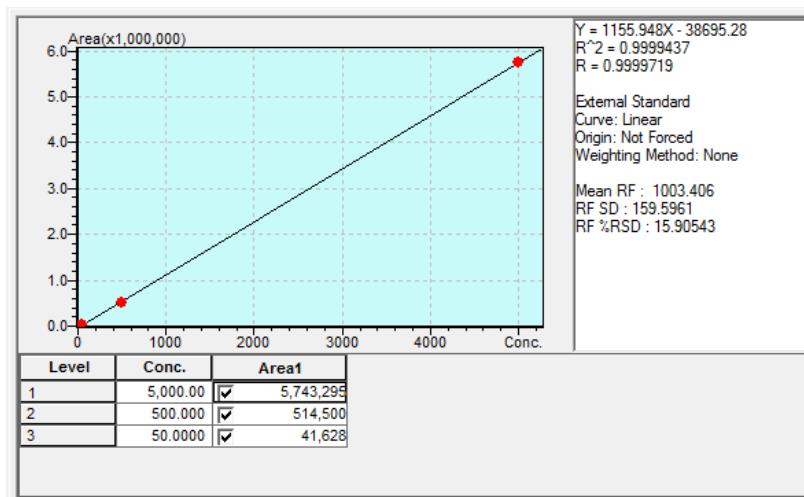
RS1 = 5000 ppm

RS2 = 500 ppm

RS3 = 50,0 ppm

Tako pripravljene raztopine smo aplicirali na GC-MS.

Iz umeritvene premice smo odčitali vrednosti R^2 , ki so za vse spojine večje od 0,999 oz. dovolj blizu vrednosti 1. To pomeni, da je razpršenost podatkov za umeritveno premico oziroma eksperimentalne napake pri meritvah in pipetiranju dovolj majhna, da so rezultati in izračunane koncentracije hlapnih spojin iz raztopin referenčnih spojin dovolj zanesljive.



Slika 6: Primer umeritvene premice - benzaldehid.

4.4 ORGANOLEPTIČNA ANALIZA

4.4.1 PRIPRAVA VZORCEV

S pomočjo izračunanih vrednosti aktivnosti vonja - OAV za vsako spojino, smo izbrali spojine, ki smo jih uporabili pri organoleptični analizi. Za spojino, ki ima $OAV > 10$ lahko zagotovo trdimo, da značilno vpliva na celotno izraznost vonja (30).

Spojine z izračunano višjo vrednostjo dejavnosti vonja pri obravnavanih vzorcih, t.j. $OAV > 10$ so naslednje:

Preglednica I: Spojine z $OAV > 10$.

3-metilbutanojska kislina	2-metilbutanojska kislina	evkaliptol
etiloktanoat	2,4-nonadienal	2-etilfenilacetat
metildekanoat	vanilin	4-undekanolid

Izmed vseh spojin, ki smo jih identificirali s plinsko kromatografijo, smo z izračuni torej izbrali le tiste, ki v teoriji značilno vplivajo in imajo največji prispevek na celosten vonj. Predhodno smo iz odziva pri GC-MS spojinam izračunali koncentracije, v katerih so prisotne v posameznem analiziranem vzorcu (vrednosti so podane v preglednici VII). Volumne izbranih spojin smo odpipetirali v 50 ml bučko in nato s sončničnim oljem dopolnili do oznake. Za sončnično olje smo se odločili predvsem zaradi nevtralnega vonja. Izdelali smo dva rekonstruirana vzorca. Glede na pridobljene rezultate smo se zaradi večje značilnosti in razlikovanja med posameznimi vzorci odločili, da rekonstruiramo vzorec Baccara Rosa, ki je bil pridelan s superkritično ekstrakcijo in vzorec, ki smo ga izdelali sami z ekstrakcijo semen.

V preglednici II in III so zapisane spojine, ki smo jih uporabili za izdelavo rekonstrukta, s pripadajočimi OAV vrednostmi.

Podrobnejša razlaga izbire spojin sledi v poglavju 5.3..

Preglednica V: Ostali rekonstruirani vzorci FFa.

Oznaka	Brez naslednje spojine:
GF1	2,4-nonadienal
GF2	metildekanoat
GF3	4-undekanolid

4.4.2 ISKANJE IN IZBIRA PROSTOVOLJCEV

Prostovoljce smo poiskali na Katedri za farmacevtsko biologijo, Fakultete za farmacijo. Izbrali smo 8 prostovoljcev iz vrst profesorjev, asistentov in mladih raziskovalcev na tej katedri. Vsi so se že v preteklosti kakorkoli ukvarjali z vonji, naj bo to profesionalno, raziskovalno ali pa so že sodelovali v podobnih raziskavah. Namen je bil, da izberemo skupino z izkušnjami in razvitimi vohalnimi čutnicami in so sposobni lažje razlikovati ter opredeliti določene vonje.

4.4.3 SEANSA VONJANJA

Organoleptična analiza je potekala v študentskem laboratoriju na Katedri za farmacevtsko biologijo. Na delovno površino smo razstavili označene vzorce po sistemu: vzorec originalnega olja za primerjavo, rekonstruiran vzorec olja, pripadajoči rekonstruirani vzorci brez 1 komponente in slepi vzorec (sončnično olje). Med te vzorce smo pomešali tudi vzorec originalnega olja, da bi preizkusili vonjalne sposobnosti prostovoljcev. Prostovoljce smo seznanili z namenom raziskave, s potekom dela in jim razdelili anketne vprašalnice (v prilogi). Kroženje je potekalo, dokler ni vsak prostovoljec povohal in opredelil vseh vzorcev.



Slika 7: Izvedba organoleptične analize (Foto: M. Šteinfelser).

Ob vonjanju so ocenili vonj posameznih vzorcev, podatke so vpisovali v tabelo. Kriteriji po katerih so ocenjevali vonj so bili:

- podobnost z originalnim vonjem,
- prijetnost vonja,
- asociacije.

Podobnost z originalnim vonjem so ocenili z oceno od 1 do 5; pri čemer je ocena 1 najmanj podobno in ocena 5 najbolj. Podobno so ocenili prijetnost vonja, ocena 1, kadar vonj prostovoljcu ni bil všeč in ocena 5, kadar mu je bil vonj zelo všeč. Včasih je vonj lažje opisati in preko asociacije ovrednotiti ali so spomini ob vonju prijetni ali ne. Prav zaradi tega smo se osredotočili tudi na iskanje asociacij, ki so jih prostovoljci doživljali ob vohanju posameznega vzorca. Iz asociacij smo po koncu tudi lažje sklepali na prijetnost vonja glede na občutke, ki so jih obdajali.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

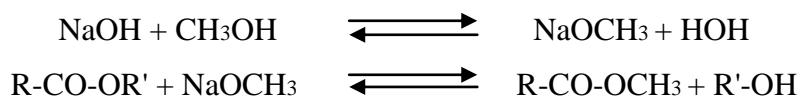
5.1 EKSTRAKCIJA OLJA

Iz 6,087 g semen smo dobili 3,255 g olja. Izplen ekstrakcije je torej 53,5 %.

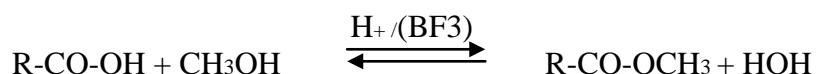
5.2 MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA

Metod za pripravo metilnih estrov maščobnih kislin je več. Odločili smo se za »in situ« derivatizacijo, saj v eni stopnji združuje ekstrakcijo lipidov iz biološkega materiala in nadaljnje preestrenje MK. Na tak način se bistveno poenostavi analiza sestave zaradi zmanjšanja delovnih stopenj, v samem poteku analize pa se tako izognemo večjim analiznim napakam in dobimo bolj točne rezultate.

Glavni namen pretvorbe maščobnih kislin v njihove pripadajoče metilne estre je povečanje hlapnosti in preprečitev nesimetričnega širjenja kromatografskih vrhov (»tailing«) pri GC analizi. Po pregledu literature smo se odločili za metodo, ki sta jo razvila Park in Goins (29). Raziskala sta pripravo metilnih estrov maščobnih kislin na več različnih načinov in ugotovila, da metoda preestrenja maščobnih kislin 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 faz: 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:



Proste maščobne kisline zaestrimo z reakcijo v *kislem mediju*, ki ga ustvarimo z dodatkom raztopine BF_3 :



Na začetku smo v reakcijsko zmes dodali diklorometan z namenom izboljšanja topnosti, saj so trigliceridi v metanolu slabo topni. Za razliko od le-teh so v metanolu dobro topne maščobne kisline in fosfolipidi.

Opisana metoda preestrenja maščobnih kislin je že bila optimizirana na katedri, zato smo izbrali ustrezne kromatografske pogoje in optimizacija metode ni bila potrebna (31).

Delovni postopek smo upoštevali po metodi Park in Goins (29). Odločili smo se za spremembo topila, in sicer smo namesto heksana uporabili heptan. Heptan je manj hlapen, zato smo imeli manj težav pri pipetiranju in posledično tudi manjše analizne napake. Heptan kot topilo navaja tudi farmakopejska metoda (32).

Preglednica VI: Maščobnokislinska sestava OSGJ: Relativni deleži posameznih maščobnih kislin v OSGJ.

<i>Maščobna kislina</i>	G1_{Primavera} [rel. %]	G2_{sup.eks} [rel. %]	G3_{FFa} [rel. %]
Punicinska kislina (18:3)	65.68	60.76	63.18
Izomeri punicinske kisline (18:3)	14.81	15.84	14.47
Palmitinska kislina (16:0)	3.10	3.82	3.60
Linolna kislina (18:2)	4.32	6.62	5.63
Oleinska kislina (18:1)	6.48	8.17	7.27
Stearinska kislina (18:0)	2.28	2.46	2.46
6,9,12,15-Dokozatetraenojska kislina (22:4)	1.76	1.40	1.62
7,10,13-Eikozatrienojska kislina (20:3)	0.51	-	-
12,12-Dimetoksidodecanojska kislina	-	-	0.21
Skupaj vseh MK	98.94	99.07	98.44
Skupaj nasičenih MK	5.38	6.28	6.06
Skupaj enkrat nenasicičenik MK	6.48	8.17	7.27
Skupaj dvakrat nenasicičenik MK	4.32	6.62	5.84
Skupaj večkrat nenasicičenik MK	82.76	78.00	79.27
Skupaj nenasicičenih MK	93.56	92.79	92.38

V tabeli so navedene identificirane maščobne kisline in relativni deleži, s katerimi so le-te prisotne v OSGJ. V oklepaju je zapisano razmerje med številom ogljikovih atomov in številom dvojnih vezi. Tako lahko razberemo, da ima npr. punicinska kislina 18 C-atomov in 3 dvojne vezi.

Na podlagi kemijske strukture razdelimo maščobne kisline na nasičene in nenasičene. Nenasičene maščobne kisline lahko nadalje razdelimo še na število dvojnih vezi (33).

Maščobne kisline so v celicah vedno vezane na glicerol v obliki estrov in niso nikoli v prosti obliki (34). V prehrani so najmanj zaželene nasičene maščobne kisline, saj delujejo aterogeno, torej zvišujejo raven holesterola v krvi. Enkrat nenasičene maščobne kisline znižujejo skupni in LDL holesterol ter zvišujejo HDL holesterol v krvi (35).

Večkrat nenasičene maščobne kisline (VNMK) so esencialne, zato je zadostna oskrba z njimi nujna, saj jih telo ne more proizvesti samo. Te kisline v telesu opravljajo dve pomembni nalogi, so prekurzorji eikozanoidov, vplivajo pa tudi na strukturo celične membrane z vključevanjem v fosfolipidni dvosloj. Eikozanoidi so skupina fiziološko aktivnih derivatov arahidonske kisline in drugih VNMK z 20 C-atomi, mednje sodijo pomembne fiziološke molekule prostaglandini, tromboksani, prostaciklini in levkotrieni (36).

Za označevanje VNMK uporabljamo oznake, kot so omega-3 in omega-6, pri čemer številka pove, kje se nahaja prva dvojna vez od končnega ogljika. Iz te oznake ne moremo sklepati na položaj ostalih prisotnih dvojnih vezi. Priporočeno razmerje med ω -3 in ω -6 VNMK je od 1:5 do 1:10 (37).

Rezultati analize sestave MK so pokazali, da je OSGJ izredno kakovostno, saj vsebuje zelo majhen delež nasičenih maščobnih kislin in ima hkrati večinski delež večkrat nenasičenih maščobnih kislin. Identiteto maščobnih kislin smo potrdili z uporabo podatkovnih knjižnic NIST08 in FFNSC. Z uporabo teh knjižnic lahko potrdimo zanesljivost identifikacije z najmanj 90% verjetnostjo za vse spojine.

Po rezultatih sodeč lahko potrdimo, da je najpomembnejša kislina v OSGJ nedvomno punicinska kislina oz. 9Z,11E,13Z-oktadekatrienojska kislina. Punicinska kislina je v preučevanih vzorcih zastopana v območju od 60,78 do 65,68 %. Po natančnem pregledu kromatogramov in masnih spektrov smo opazili, da je zanesljivost identitete največja pri najvišjem vrhu punicinske kisline (92 %). Drugi vrhovi imajo manjši procent zanesljivosti (88 %), zato zagotovo ne gre za pravi izomer puncinske kisline. Podatki o identiteti so zajeti iz NIST08 podatkovne baze, saj spojin v FFNSC podatkovni bazi ni. Zaradi

ujemanja molekulskega vrha smo te izomere označili kot izomere punicinske kisline z neznano konfiguracijo. Verjetno so tudi v člankih upoštevali samo glavni izomer, saj so vrednosti primerljive z našimi. V člankih sicer ne omenjajo drugih izomerov punicinski kisline, saj je glavni izomer nosilec farmakoloških učinkov.

Iz rezultatov lahko sklepamo, da med različnimi vzorci ne prihaja do bistvenih razlik v sestavi MK. Odstotek punicinske kisline je največji pri vzorcu G1, ki je pridobljen s hladno metodo stiskanja. Maščobnokislinski profil je zanimiv pri vzorcu G2, ki je pridobljen s superkritično ekstrakcijo. Za skoraj 5 % je manjši odstotek punicinske kisline v primerjavi z vzorcem G1, medtem ko so vse ostale kisline zastopane v nekoliko višjih odstotkih od preostalih dveh vzorcev. Manjša vsebnost punicinske kisline je verjetno posledica variabilnosti rastlinskega materiala in ne drugačne metode za pridobivanje olja. Prednosti metode s superkritično ekstrakcijo s CO₂ so namreč temperaturna neobremenitev in zaščita pred kisikom, zato je sama metoda s tega vidika primerna za pridobivanje kakovostnega OSGJ. Ekstrahirano olje, pripravljeno na katedri, daje prav tako primerljive rezultate, s čimer smo dokazali ustreznost naše metode za pripravo olja. Le v tem vzorcu je prisotna 12,12-dimetoksidodecanojska kislina, ki pa gledano s farmakološkega vidika ni pomembna, prisotna pa je tudi v zelo majhnem odstotku in zato bistveno ne prispeva k profilu MK.

Z analizo MK smo ugotovili, da so vsi obravnavani vzorci primerljivi in da ne prihaja do bistvenih razlik med vzorci, pridobljenimi z različnimi načini pridelave OSGJ. Dobljene vrednosti so primerljive z literturnimi podatki, pridobljenimi v podobnih raziskavah. Literatura navaja vsebnost punicinske kisline 65.3 %, linolenske kisline 6.6 %, oleinske 6.3 %, palmitinske 4.8 % in stearinske kisline 2.3 % (38). Zanimivo, da nekatere raziskave o sestavi MK v OSGJ, v svojih dosjehih praktično sploh ne omenjajo prisotnosti punicinske kisline, medtem ko omenjajo visoko vsebnost linolenske kisline (18:3) v območju 31.8-86.6% (11, 39, 40). Vzrok za to je verjetno posledica velike strukturne podobnosti med α-linolensko in punicinsko kislino o kateri smo že govorili v uvodu. α-Linolenski kislini pripisujejo antikancerogene učinke in prav zaradi podobnosti v strukturi so znanstveniki začeli raziskovati čisto punicinsko kislino tudi na antikancerogenem področju, in sicer za zdravljenje raka dojke (15).

Zaključimo lahko, da je maščobnokislinski profil pri OSGJ nedvomno edinstven, predvsem zaradi vsebnosti punicinske kisline, ki jo najdemo le pri granatnem jabolku. Ne nazadnje je

le-ta je zaradi konjugirane strukture odgovorna za številne pozitivne in zdravilne učinke OSGJ (1).

5.3 ANALIZA HLAPNIH SPOJIN

Za analiziranje hlapnih spojin v OSGJ smo uporabili metodo termične desorpcije. Avtomatizirana termodesorpcija zmanjša število korakov v sami analizi. Natančnost, točnost in občutljivost metode se izboljšajo z direktnim injiciranjem vzorca, v našem primeru olja. Prednosti analize so med drugim tudi neuporaba topil, saj topilo tako ne vpliva na rezultate, tako se zveča zanesljivost rezultatov, zmanjša pa tudi stroške analize (23).

Metodo smo po pripravi vzorcev in prvem injiciraju optimizirali. Preizkusili smo različne načine injiciranja (»splitless« / »split 1:100« / »split 1:10«) in različne volumne. Po večkratnem injiciraju in spremjanju pogojev smo našli najbolj optimalen način, kjer so bili kromatografski vrhovi najlepše ločeni in s tem rezultati najbolj točni. Pri vzorcih olja smo se odločili za način injiciranja »splitless«. Za raztopino referenčnih spojin pa smo uporabili način injiciranja »split 1:100« (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.

Glavni parameter termične desorpcije je vsekakor temperatura. Po pregledu literature smo izbrali temperaturo injiciranja (150°C). Za takšno temperaturo smo se odločili, ker je bila ugotovljena za olivno olje, ki pa je po kemijski sestavi zelo podobno OSGJ. Ta temperatura je ravno dovolj visoka, da bodo na kolono prišle vse spojine iz analita, pa vendar ne previsoka, da bi prišli v območje t.i. »smoke point« - *točka dimljenja*, pri kateri se olje segreje do mere, da se prične razgradnja komponent. S tem porušimo kemijsko strukturo olja. Z izbiro primerne temperature ne bomo povzročili razpada MK na manjše fragmente, kot so krašji ogljikovodiki, aldehidi in ketoni, ki bi lahko zmotili analizo (41). Pri dejanskem segrevanju je ta razpad viden kot nekakšen dim, temperatura, pri kateri se začne kaditi iz olja, pa točka dimljenja (42). Simetrični vrhovi na kromatogramu po koncu analize so potrdili pravilno izbiro temperature in s tem popolno termično desorpcijo olja.

Masni spekter ni dovolj zanesljiv in zato samo z njegovo identifikacijo ne moremo zagotoviti pravilnih rezultatov. Z referenčnimi spojinami smo preverili linearnost odziva in pravilnost identifikacije z masnim spektrometrom.

Preglednica VIII: Hlapne spojine v OSGJ razvrščene po kemijskih skupinah.

Organske kislina	Ketoni	Estri	Aldehydi	Aromatski aldehydi	Monoterpeni	Monoterpenoidi	Laktoni	Fenoli	Etri
3-metilbutanojska kislina	5-metil-2-heksanon	izoamilacetat	4-heptanal	benzaldehid	beta-pinен	evkaliptol (eter)	4-nonanolid	2-etylfenol	anetol
2-metilbutanojska kislina		2-etylheksilacetat	nonanal	vanilin	limonen	fehnol (keton)	5-dekanolid	4-etylfenol	
pentanojska kislina		dietilsukcinat	dekanal			linanol (alkohol)	4-undekanolid	4-ethylgajakol	
heksanojska kislina		etyluktanoat	2,4-nonadienal			kafra (keton)	5-dodekanolid	evgenol	
nonanojska kislina		2-feniletilacetat	5-metil-2-fenil-2-heksanal			alfa-terpinilacetat (ester)	5-tetradekanolid		
dekanojska kislina		metildekanoat	2,4-dodekadienal						
lavrinska kislina		etyldekanoat							
miristinska kislina		etylcinamat							
palmitinska kislina		etillavrat							
linolna kislina		benzilbenzoat							
oleinska kislina		etilmiristat							
		metilpalmitat							
		etylpalmitat							
		metillinolat							
		metillinolenat							
		metiloleat							
		etyloleat							

Z metodo termične desorpcije smo identificirali spojine v OSGJ in tako prvi odkrili spekter spojin, ki je odgovoren za aroma olja.

Zanesljivost identifikacije spojin smo preverili z uporabo računalniških podatkovnih knjižnic in na osnovi smiselnosti in ujemanja molekulskih vrhov izločili alternativne identitete, ki jih ponuja program. Za vsako spojino smo nato tudi primerjali retencijske indekse z referenčnimi spojinami. Retencijski indeks je numerična vrednost navadno pridobljena z logaritemsko interpolacijo in je koncept, ki je pri GC analizi uporabljen za pretvorbo retencijskih časov v sistem neodvisnih konstant. Metoda uporablja linearno razmerje med logaritmom retencijskega časa in številom ogljikovih atomov v molekuli. Medtem, ko so retencijski časi posamezne spojine variabilni glede na kromatografski sistem (dolžina kolone, debelina nanosa stacionarne faze, ...), so retencijski indeksi konstantni in tako služijo kot pomoč pri identifikaciji posameznih spojin v zmesi (23).

Vse spojine smo v nadaljevanju kvantificirali, tako da smo izračunali koncentracije, v katerih so prisotne v posameznem vzorcu. Pri tem smo upoštevali površine pod krivuljo v kromatogramih vzorcev in referenčnih spojin. Pri aplikaciji vzorcev olja in standardov smo uporabili različna načina injiciranja. Preiskovane vzorce olja smo injicirali v načinu »splitless«, saj smo pri tem načinu dosegli ustrezno višino vrhov, najboljšo ločbo vrhov in posledično najlažjo identifikacijo spojin v vzorcih. Raztopine referenčnih spojin pa smo injicirali v načinu »split 1:100«, saj smo se s tem izognili težavam visokega signala topila, zasičenosti detektorja in prekrivanja vrhov spojin s širokim vrhom topila na začetku kromatograma. Preverili smo dejansko razmerje z uporabo eksternega standarda in to vrednost nadalje upoštevali pri izračunu koncentracije. Izbrali smo spojino (limonen) in dvakrat pomerili koncentracijo v različnih načinih, prvič pri »splitu 1:100« in drugič pri načinu »splitless«. Izračunali smo razmerje površin pod krivuljo in ugotovili, da je dejansko razmerje 1:98.

Pripravili smo tudi dva absoluta vzorca z namenom, da poiščemo in identificiramo še spojine, ki bi bile morebiti prisotne v sledovih in v veliko nižjih koncentracijah ter bi morebiti prav tako vplivale na samo aroma olja. Tukaj smo koncentracijo ugotovili po že zapisanem računu z upoštevanjem faktorja (poglavje 4.3.1). S tem postopkom smo zaznali nekatere dodatne spojine, ki jih predhodno z direktno aplikacijo olja nismo. Takšne spojine so: linalool, kafra, dekanal, 4-nananolid, 5-dekanolid, 4-undekanolid, 5-dodekanolid pri vzorcu Primavera in 3-metilbutanojska kislina, 5-metil-2-heksanon, 2-etylheksilacetat,

dietilsukcinat, lavrinska kislina, miristinska kislina, palmitinska kislina pri vzorcu Baccara Rosa.

Vrednotenje rezultatov je nadalje potekalo z izračunavanjem vrednosti 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 (30). OAV se izračuna po naslednji formuli:

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

pri čemer je c koncentracija in OTV - Odour Treshold Value. OTV je vrednost praga vonjave v različnem mediju oz. minimalna vrednost, ki jo lahko prosto zavohamo (43). Vrednosti OTV smo za vsako spojino poiskali v literaturi (43, 44). Ta vrednost je eksperimentalno določena in se razlikuje glede na uporabljen medij. Za vsako spojino smo izbrali vrednost OTV v mediju, ki je najbolj podoben našemu. Vrednosti OTV so v literaturi podane v enoti ppm (»parts per million«), pretvorili pa smo jih v enoto ppb (»parts per billion«). Vrednost, ki naj bi relativno pomembno prispevala k sami aromi neke zmesi, je $\text{OAV} > 10$. Za spojino z $\text{OAV} > 10$ lahko torej zagotovo trdimo, da značilno vpliva na celotno izraznost vonja (30).

Za majhen delež identificiranih spojin v literaturi nismo našli podatka o OTV vrednosti. Spojine brez te vrednosti so na srečo vse z višjim retencijskim indeksom in so se iz kolone izločile pri visoki temperaturi. To pomeni, da so te spojine težko hlapne in lahko tudi po preizkušanju referenčnih spojin trdimo, da so skoraj popolnoma brez vonja. Iz tega razloga lahko sklepamo, da te spojine značilno ne vplivajo na aroma olja in pomanjkanje teh podatkov ne vpliva na našo analizo.

V vzorcih smo z metodo termične desorpcije tako zaznali kar 54 hlapnih spojin, ki so prisotne v aromi OSGJ. Z izračunom vrednosti OAV smo torej ovrednotili vse spojine in določili tiste, ki teoretično najmočneje vplivajo na aroma olja. Najbolj bogat vzorec s spojinami in z največjim deležem spojin z $\text{OAV} > 10$ je Baccara Rosa, pridobljen s superkritično ekstrakcijo. Vzrok za to bi lahko iskali v bolj kakovostnem rastlinskem materialu ali tehnično bolj dovršeni metodi za ekstrakcijo, vendar ne enega ne drugega ne moremo zagotovo potrdili ali ovreči. V tem vzorcu najdemo skupno kar 45 različnih spojin in od tega kar 8 spojin, ki bi lahko značilno vplivale na celotno aroma. Ena izmed teh spojin je 3-metilbutanojska kislina, ki smo jo zanimivo našli samo v absolutu in dosega

glede na koncentracijo v zmesi OAV = 75,8, kar je visoka vrednost. Te spojine nismo zaznali z direktno aplikacijo olja in bi jo spregledali, če se ne bi odločili za izdelavo koncentriranega vzorca. Vzorec Primavera pa za razliko od prejšnjega vsebuje le dve spojini, katera vrednost OAV presega mejo 10, in sicer 2,4-nonadienal in metildekanoat. Zelo izstopa 2,4-nonadienal zaradi značilenega vonja po cvrtem, žarkem olju. Ostale spojine so prisotne v manjših koncentracijah. Vonj olja Primavera je tudi veliko šibkejši, kar pojasni nizke koncentracije hlapnih spojin in njihove nizke izračunane vrednosti OAV. Vzorec olja, ki smo ga sveže pripravili, je prav tako kot vzorec Primavera manj raznolik s spojinami. Našli smo samo 29 spojin in od tega samo tri, ki bi lahko značilno vplivale na aroma olja, od prej naštetih dveh še dodatno 4-undekanolid.

Po rezultatih sodeč lahko trdimo, da se vzorci, pridobljeni z različnimi načini ekstrakcije, gledano z vidika arome med seboj zelo razlikujejo. Zelo veliko je tudi nihanje med številom identificiranih spojin. To lahko potrdimo že z enostavnih preizkusom vonjanja teh vzorcev, saj so med vonji bistvene razlike. Izstopa vsekakor vzorec Baccara Rosa, kar smo potrdili tudi z analizo. Na splošno lahko trdimo, da je v olju prisotno izjemno število različnih spojin. V preglednici VIII smo hlapne spojine razvrstili glede na pripadajočo kemijsko skupino. Gledano s kemijskega vidika lahko govorimo o organskih kislinah, estrih, aldehydih, aromatski aldehydih, monoterpenoidih, monoterpenih, fenolih, laktonih, etru in ketonu.

Pred tem so se nekatere raziskovalne skupine že ukvarjale s samo aromo, vendar so se vse osredotočale zgolj na sok granatnega jabolka. Novi trendi v kozmetični industriji pa narekujejo nove raziskave tudi na področju arome OSGJ. Pri soku granatnega jabolka so odkrili precej manj kompleksno sestavo, saj navajajo le 18-21 različnih hlapnih spojin. Le redke spojine so tako v olju kot v soku granatnega jabolka. Največ podobnosti najdemo v skupini monoterpenov (β -pinen, limonen) in monoterpenoidov (fehnon, kafra). V soku granatnega jabolka najdemo prav tako aldehyde, estre, ketone in alkohole, vendar so predstavniki spojin različni. Prisotni so tudi seskviterpeni in linearni ogljikovodiki, ki jih v OSGJ ne najdemo (45, 46). Zanimivo je tudi to, da v soku niso našli organskih kislin, ki so v OSGJ zastopane v visokem deležu. Morda je ravno tukaj ključ do tako neprijetnega in motečega vonja samega olja, saj za razliko sok ne poseduje tako neprijetne arome.

Na koncu naj povzamem, da so rezultati analize hlapnih spojin z metodo termične desorpcije izredno obetajoči. Našli smo ključ spojin, ki vodijo do arome OSGJ. Sama aroma olja je izredno kompleksna, kar smo dokazali s širokim spektrom hlapnih spojin.

Poleg identifikaciji spojin smo pozornost posvetili tudi kvantifikaciji in izbrali določene spojine, ki imajo najverjetneje glavni prispevek k edinstveni aromi OSGJ.

5.4 ORGANOLEPTIČNA ANALIZA

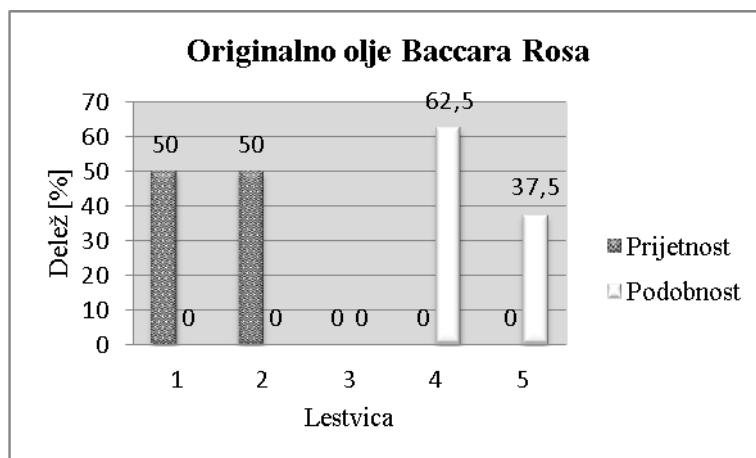
V preteklosti je bila opravljena podobna raziskava, kjer so prav tako vrednotili vonj in vpliv posameznih spojin z uporabo senzorne analize. Rezultati jasno kažejo, da je sistematičen pristop do iskanja ključne vonjave z uporabo numerične vrednosti dejavnosti vonja za posnemanje vzorcev, zmogljivo in primerno orodje. S temi podatki in kot potrditev še s pomočjo prostovoljcev pri vohalni analizi lahko najdemo tiste spojine, ki najbolj značilno vplivajo na celoten vonj (47).

Organoleptične analize smo se lotili z namenom, da razširimo raziskavo, ki smo jo začeli s plinsko kromatografijo. Po tem, ko smo s plinsko kromatografijo prvi raziskali ključ in analizirali sestavo hlapnih olj, ki vodi do specifičnega vonja OSGJ, smo hoteli narediti še korak dlje. S kromatografskega profila in preračunanih koncentracij posameznih spojin smo s teoretičnega prestopili na praktičen vidik.

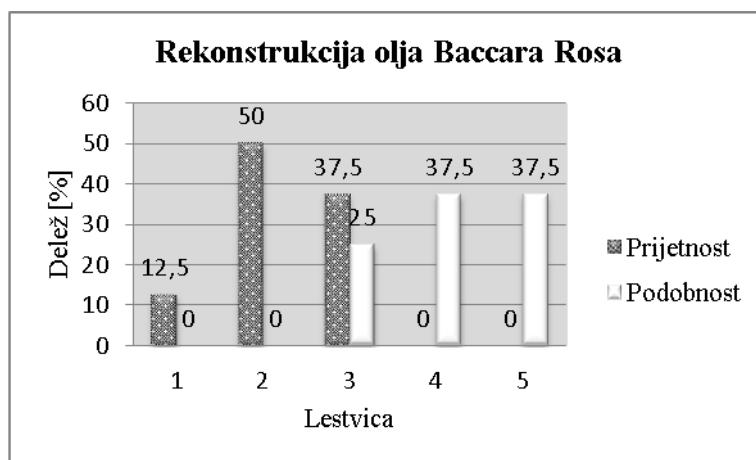
Namen organoleptične analize je potrditi, da spojine ovrednotene z $OAV > 10$, ki smo jih predhodno pridobili s plinsko kromatografijo, res značilno vplivajo na vonj OSGJ. Želeli smo tudi najti spojino, ki je po mnenju posameznikov najbolj odgovorna za moteč vonj in izzove najbolj neprijetne občutke. Iz ključnih spojin smo rekonstruirali vzorec olja, nadalje pa smo v vsakem vzorcu izpuščali po eno spojino in na tak način ugotovili najbolj izstopajočo spojino.

Treba je namreč omeniti, da so vrednosti OAV samo orientacijske, zato kljub izračunanim vrednostim še vedno obstaja možnost, da katera od spojin nima bistvenega vpliva na aroma. Prav iz tega razloga je smiselnopraviti organoleptično analizo, s katero lahko potrdimo ali zavrzemo teoretične ugotovitve.

5.4.1 VZOREC BACCARA ROSA



Graf 1: Vrednotenje originalnega olja BR.



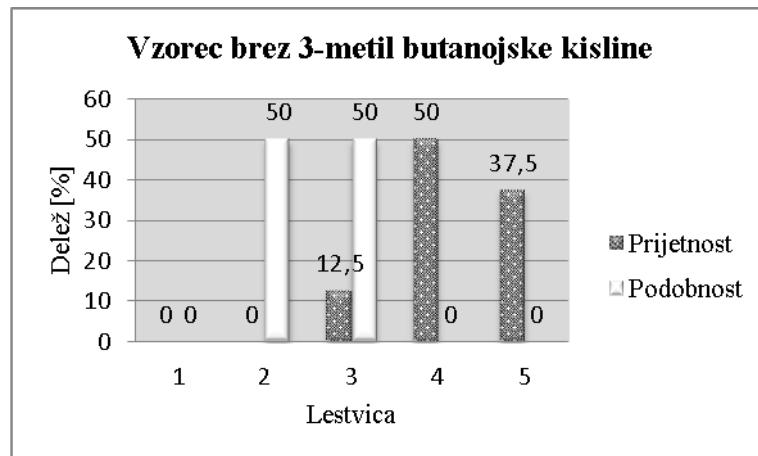
Graf 2: Vrednotenje rekonstruiranega olja BR.

Vrednotili smo vonj originalnega olja in rekonstrukcijo le-tega. Vzorec originalnega olja smo slepo pomešali med ostale postavljene vzorce, ne da bi prostovoljci za to vedeli in sicer z namenom, da preizkusimo sposobnosti vonjalcev, da izmed vseh vzorcev najdejo oz. ocenijo vsaj visoko podobnost z originalnim oljem. Originalno olje je bilo ves čas na voljo za primerjavo. Prostovoljci so se odlično izkazali, saj so vsi ocenili, da je vzorec podoben oz. enak z originalnim (ocena 4 ali 5). Zanimala nas je tudi neodvisna opredelitev prijetnosti vonja.

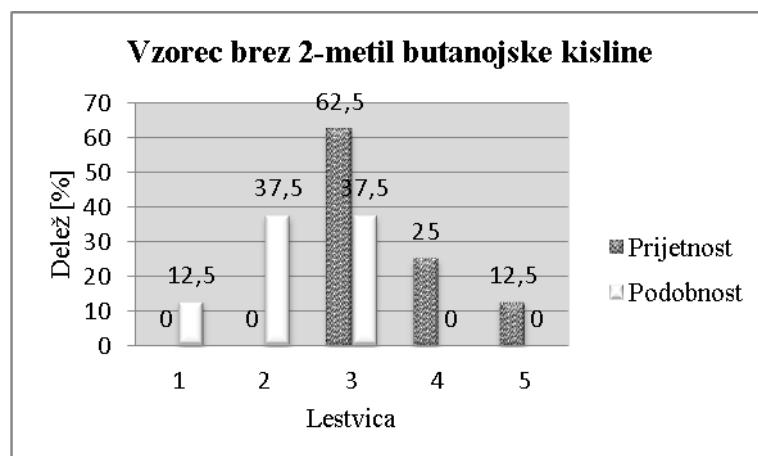
Iz grafa 1 je razvidno, da ima originalno olje po mnenju prostovoljcev neprijeten vonj, saj so vsi ovrednotili vonj z 1 ali 2, kar opisno pomeni zelo neprijeten in neprijeten vonj po uporabljeni lestvici. Večina jih je tudi rekonstruiran vzorec ocenila za neprijetnega, saj

med njimi ni bilo posameznika, ki bi ocenil vonj z več od 3. Asociacije ob vohanju so bile naslednje: »žaltava krema, ušesno maslo, kis, žarkost, sadje, limone«.

Graf 2 nam kaže dokaj visoko podobnost med originalnim oljem in rekonstruiranim vzorcem. Kar 75 % jih je s 4 oz. 5 ocenila, da je vzorec podoben originalnemu olju.

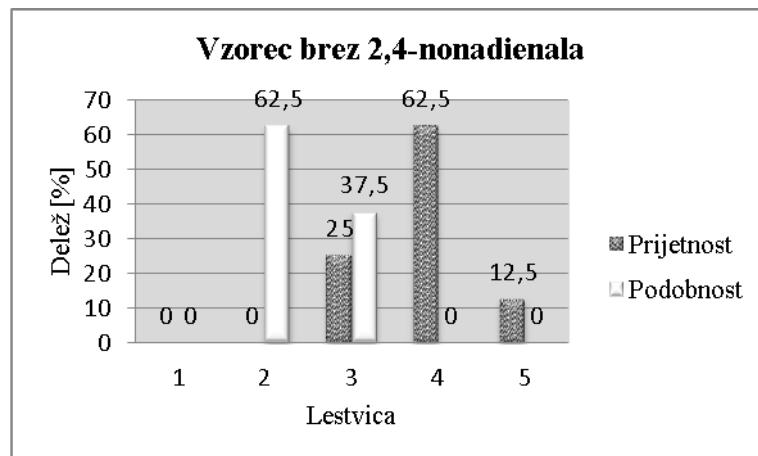


Graf 3: Rekonstrukcija olja brez 3-Me-butan. kisl.

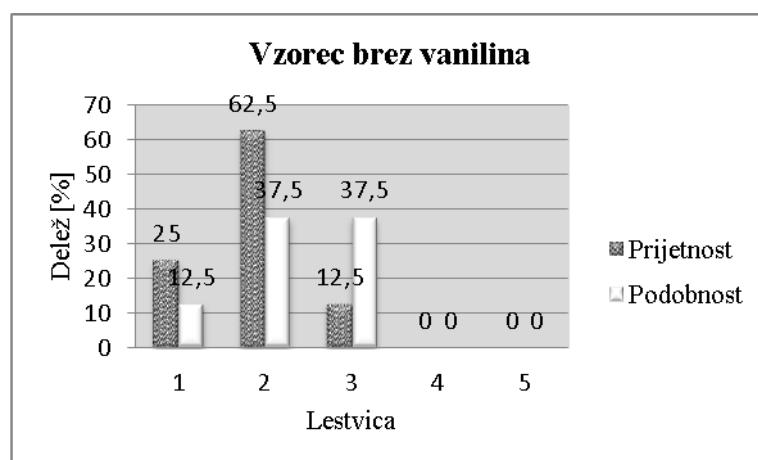


Graf 4:rekonstrukcija olja brez 2-Me-butan. kisl.

Iz grafov 3 in 4 lahko ugotovimo, da se prijetnost vonja OSGJ močno izboljša, če iz zmesi odstranimo organske kisline, predvsem 3-metil butanojsko kislino. Kot vidimo, se tudi podobnost z originalnim oljem močno zmanjša, iz česar lahko sklepamo, da je vpliv izomerov butanojske kisline očitno zelo močan.



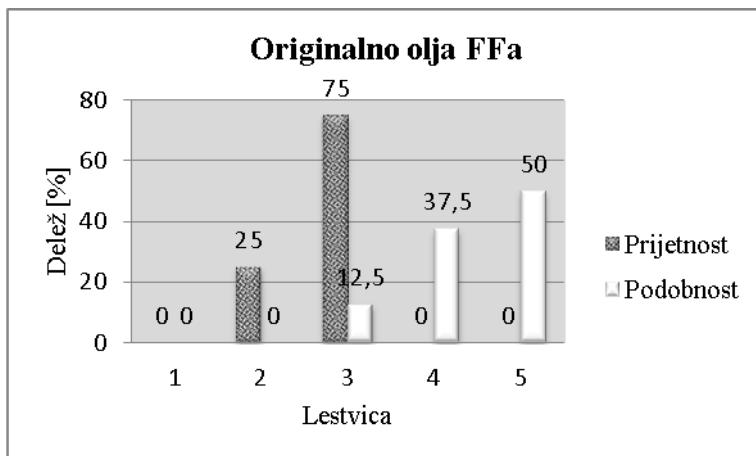
Graf 5: Rekonstrukcija olja brez 2,4-nonadienala.



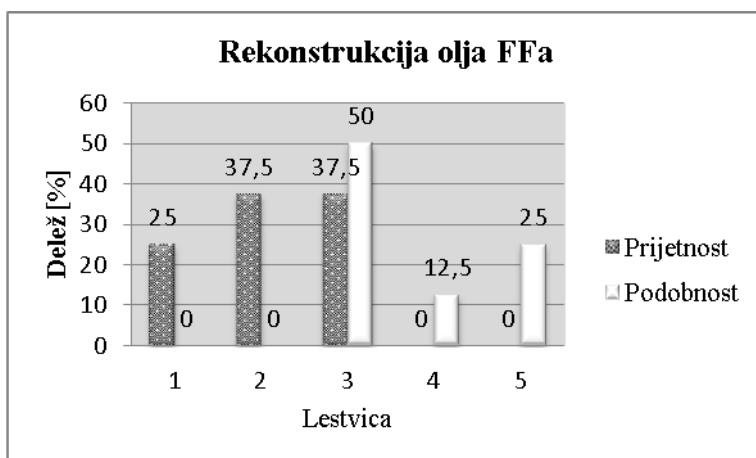
Graf 6: Rekonstrukcija olja brez vanilina.

Tudi iz grafa 5 je razvidno, da se po mnenju prostovoljcev vonj močno izboljša, če iz zmesi odstranimo 2,4-nonadienal. Ta spojina ima močan oljnat vonj, kar večino spominja na cvrtje in žarkast vonj staranega olja, če pa to spojino odstranimo, je večina dobila nasprotne asociacije. Navedene asociacije: »ribez, različno jagodičevje, breskev, agrumi«, v ospredje torej pride vonj po sadju. Ravno obratno pa se zgodi, če odstranimo vanilin. Večina prostovoljcev je vonj spet ocenila kot neprijeten oz. 25 % celo kot zelo neprijeten. Tudi podobnost z originalnim oljem se zmanjša. Navedene so asociacije: »razredčeni kis, pikantno žarko olje, pekoče, kisla koka-kola«. Iz vseh teh asociacij lahko razberemo, da je v ospredju spet vonj kislin in 2,4-nonadienala. Vanilin je prostovoljcem v zmesi všeč in prispeva k prijetnejšemu vonju olja.

5.4.2 VZOREC FFA

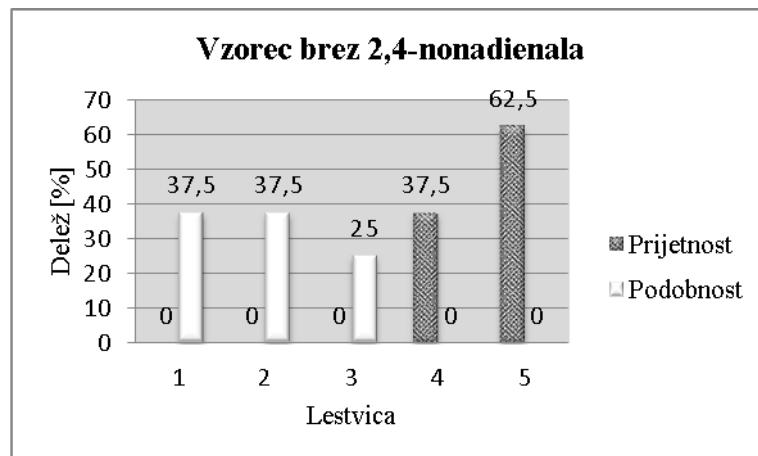


Graf 7: Vrednotenje originalnega olja FFa.

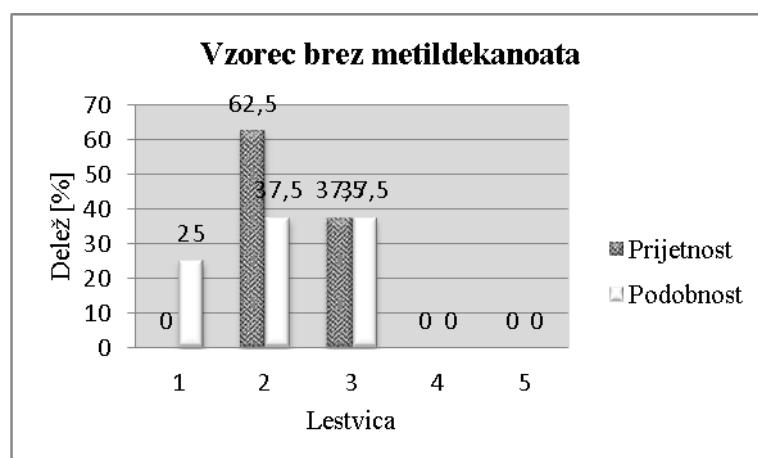


Graf 8: Vrednotenje rekonstruiranega olja FFa.

Podobno kot pri vzorcu Baccara Rosa, lahko tudi tukaj vidimo, da je rekonstrukcija olja FFa uspela, saj so vsi ocenili podobnost z več kot 3. Podobnost je nekoliko manjša kot pri prejšnji rekonstrukciji, vendar zadovoljujoča. Do manjše podobnosti z originalom pride verjetno zaradi manjšega števila uporabljenih spojin. Tudi pri tem vzorcu je iz rezultatov moč sklepati, da je olje dokaj neprijetnega vonja.



Graf 9: Rekonstrukcija olja brez 2,4-nonadienala.



Graf 10: Rekonstrukcija olja brez metildekanata.

Graf 9 nam potrjuje rezultate predstavljene že pri vzorcu Baccara Rosa. Pri samem olju je nedvomno moteč dejavnik 2,4-nonadienal, saj se po odstranitvi le-tega prijetnost vonja po mnenju vseh prostovoljcev močno izboljša. Pri tem vzorcu jih kar 62,5 % meni, da je vonj olja brez 2,4-nonadienala celo zelo prijeten. Obraten pojav spet zabeležimo pri odstranitvi metildekanata iz zmesi, prijetnost vonja spet pade, vonj posameznike spominja na »kislo, kremasto žarko olje, ocvrto olje, celo na hrošča smrdljivca«. Po tem lahko sklepamo, da do izraza spet pride 2,4 nonadienal in da je metildekanat pomembna protutež v celotnem vonju.

V predstavljenih grafih smo povzeli najpomembnejše ugotovitve, do katerih smo prišli po izvedeni organoleptični analizi. Pri ostalih rekonstruiranih vzorcih z odvzemanjem ene spojine ni prišlo do značilnih odstopanj in za katere ne moremo trditi, da izboljšajo ali poslabšajo prijetnost vonja. Kot smo ugotovili že pri analizi s plinsko kromatografijo se

vonja obeh vzorcev Baccara Rosa in FFa dokaj razlikujeta. Tudi prostovoljci so to potrdili in označili, da ima olje Baccara Rosa bolj neprijeten vonj, kar polovica ga je označila za zelo neprijetnega. Olje, ki smo ga sveže pripravili sami, ima prav tako neprijeten vonj, vendar je v njem zaznati več sadnih not. Taki rezultati niso presenetljivi, saj je FFa vzorec svež in do izraza pridejo še druge prisotne spojine in ne toliko oljnat vonj, ki ga olje vse bolj pridobiva s staranjem. Dokazali smo, da imajo na samo aroma olja največji vpliv zlasti organske kisline in sicer izomera butanojske kisline. Prostovoljce je zelo motila tudi prisotnost 2,4-nonadienala, ki ima vonj po cvrtem olju. Spojini, ki najbolj pripomoreta k vonju po sadju, zlasti breskvah, sta metildekanoat in vanilin.

Po izvedbi in pregledu rezultatov organoleptične analize smo se odločili, da bomo poskušali vonj 2,4-nonadienala in izomera butanojske kisline nevtralizirati. Pri tem poskušanju smo zajeli samo spojine, ki po mnenju prostovoljcev najbolj značilno vplivajo na aroma OSGJ. Nevtralizacije neprijetnega vonja smo poskusili izvesti glede na kemizem spojin. Ker prevladujejo hlapne organske kisline, smo jih nevtralizirali z natrijevim karbonatom in pri tem nastanejo nehlapne soli organskih kislin. Na ta način pa ne moremo odstraniti aldehidov. Te bi lahko npr. z reakcijo s hidrogensulfitem, vendar je vprašanje, če bi to pozitivno vplivalo na druge komponente olja. Nazadnje smo poskusili še z uporabo aktivnega oglja kot nespecifično adsorpcijsko metodo. Rezultati so bili zadovoljivi, saj smo že s samim poskušanjem, z dodajanjem opisanih regentov, uspešno izničili vonj tako organskih kislin kot tudi 2,4-nonadienala. Če bi hoteli samo aroma še izboljšati, bi lahko dodali še nekaj vanilina in metildekanoata ter tako poudarili sadno noto. Naš poskus je bil samo informativne narave in temelji zgolj na naših opažanjih. Nedvomno pa predstavlja možnost in idejo za nadaljnja raziskovanja, saj je ne nazadnje tudi ekonomsko sprejemljiv. S pridobljenimi rezultati smo zadovoljni, saj smo sploh prvi prikazali profil spojin, ki najbolj značilno vplivajo na celosten vonj OSGJ. Nedvomno smo te spojine potrdili tudi z organoleptično analizo, s katero smo dokazali, da se lahko z ustreznimi koncentracijami teh spojin pripravi odlična rekonstrukcija arome olja. Z izvedbo organoleptične analize smo dokazali spojine, ki so najbolj moteče v vonju olja in tudi tiste, ki so odgovorne za bolj prijetno, sadno noto olja. Celotna analiza je pomembna pridobitev za področje kozmetične industrije, saj imamo zajet širok spekter spojin, ki lahko uporabnike pri sami uporabi tega olja motijo. Z dobrim načrtovanjem bi lahko spojine z neprijetnim vonjem prikrili ali nevtralizirali. S tem bi lahko veliko pridobili, saj bi zadovoljili uporabnike in s

tem še povečali uporabo OSGJ v kozmetičnih izdelkih. Veliko indikacij za uporabo OSGJ v kozmetične namene je bilo že zapisanih v uvodu te diplomske naloge. Naj tukaj dodam le, da je bila uporaba s strani uporabnikov velikokrat vprašljiva le zaradi neprijetnega vonja, kar smo dokazali tudi s to analizo. Z znanjem, ki smo ga pridobili s to analizo, bi bilo mogoče rešiti tudi to problematiko.

6 SKLEP

V raziskovalnem diplomskem delu smo ugotovili, da različni načini pridobivanja OSGJ bistveno ne vplivajo na sestavo maščobnih kislin. Opazili smo rahle variacije, ki pa so verjetno posledica nihanja v kakovosti rastlinskega materiala. Pri analizi vsebnosti lahko govorimo o zelo visokem deležu večkrat nenasičenih maščobnih kislin, delež je v povprečju kar 80 %. Nasičenih maščobnih kislin je izredno malo, okrog 6 % iz česar lahko sklepamo, da je olje izredno kakovostno. V OSGJ se nahaja tudi edinstvena maščobna kislina, in sicer punicinska kislina, ki dokazano ugodno vpliva na zdravje.

Aroma OSGJ še ni bila raziskana, zato smo sami optimizirali metodo za termično desorpcijo hlapnih spojin iz olja. Po sami intenzivnosti vonja je najbolj izstopal vzorec, pridobljen s superkritično ekstrakcijo. To se je kasneje izkazalo tudi v kromatogramu, saj je ta vzorec vseboval neprimerljivo več spojin od drugih dveh. Skupno smo v vseh vzorcih našli kar 54 hlapnih spojin. S kemijskega stališča govorimo o estrih (17 spojin), organskih kislinah (11), aldehidih (6), monoterpenoidih (5), laktonih (5), fenolih (4), monoterpenih (2), aromatskih aldehidih (2), ketonu (1) in etru (1). S pomočjo OAV vrednosti smo določili spojine, ki v zmesi najbolj izstopajo. Te spojine smo v primernih koncentracijah uporabili za izdelavo rekonstrukcije arome. Z izvedbo organoleptične analize smo odkrili, da so te spojine res ključne za samo aroma, kar so pritrdili tudi prostovoljci in rekonstrukt pripisali visok delež podobnosti z originalnim oljem. Ugotovili smo tudi, da sta pri vseh prostovoljcih najbolj moteči spojini izomera butanojske kisline (2-metil- in 3-metil-). Zanimivo je, da so vsi prostovoljci prijetnost vzorca Baccara Rosa ocenili kot zelo neprijeten oz. neprijeten (1 in 2 po uporabljeni lestvici), po odstranitvi 3-metil butanojske kislini pa je kar 87,5% vzorec ocenila kot prijeten oz. zelo prijeten (ocena 4 in 5). Podobno pri vzorcu FFa izstopa 2,4-nonadienal, saj z odstranitvojo le-tega dosežemo, da je vonj zelo všeč kar 62,5% vonjalcem. Pomembno protitež v vonju predstavljata vanilin in metildekanoat, ki prispevata k sadnemu vonju. S preprostim načrtovanjem smo poskusili aroma OSGJ izboljšati tako, da smo nevtralizirali spojine z neprijetnim vonjem.

7 LITERATURA

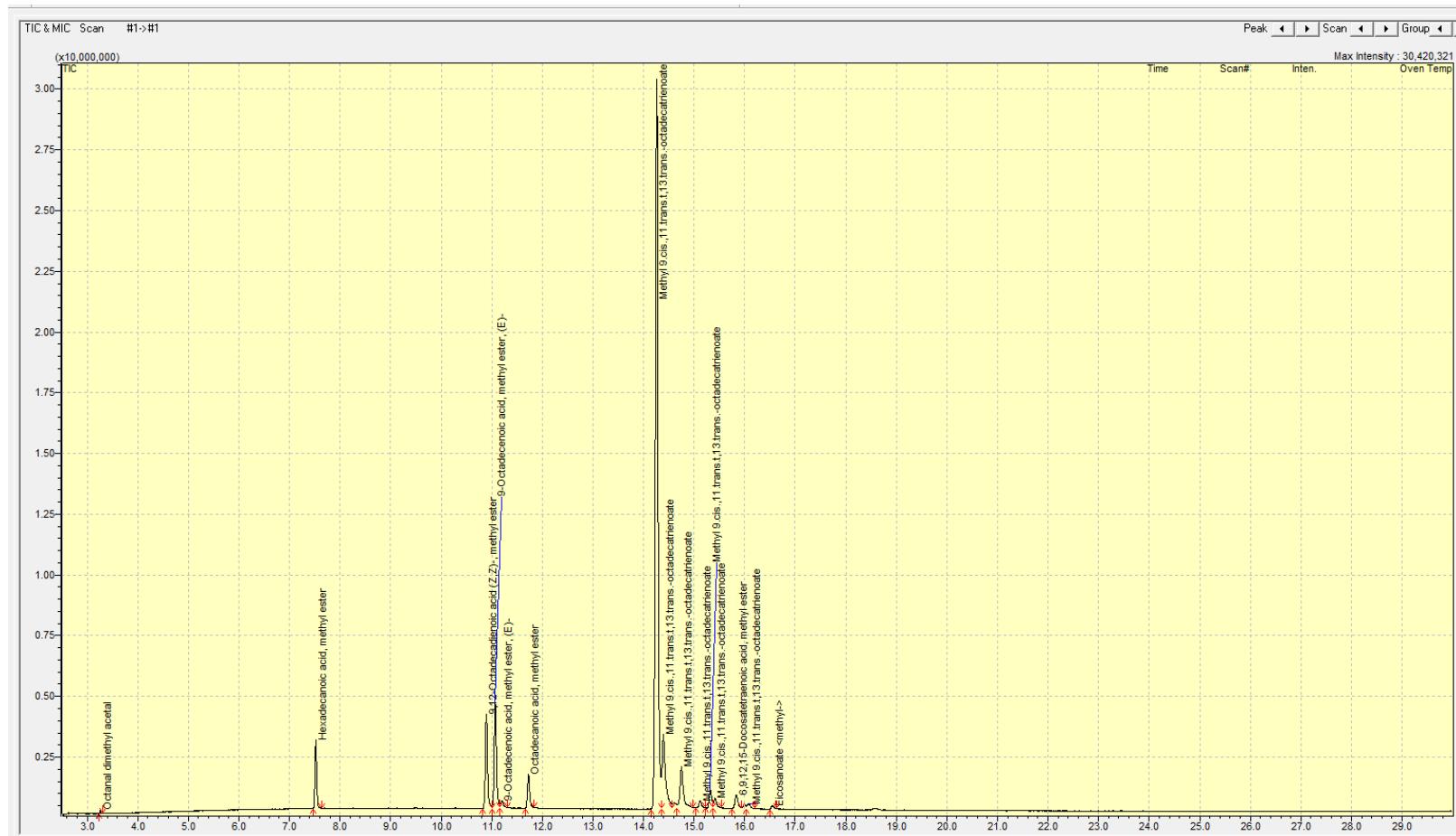
1. Newman A.Robert, Ephraim P. Lansky, Lynn Block M.: Pomegranate: the most medicinal fruit. 1st ed. Basic Healt Publications, USA, 2007.
2. Meerts I.A.T.M., Verspeek-Rip C.M., Buskens C.A.F., Keizer H.G., Bassaganya-Riera J., Jouni Z.E., Huygevoort van A.H.B.M., Otterdijk van F.M., Waart van de E.J.: Toxicological evaluation of pomegranate seed oil. Elsevier, 2009: 1085 – 1092.
3. Vinjamuri D.: POM Wonderful's Deception Is The Tip Of The Iceberg (<http://www.forbes.com/sites/davidvinjamuri/2012/05/23/judge-finds-pom-wonderful-advertising-deceptive-but-thats-just-the-tip-of-the-iceberg/>, Odprto: 12. 5. 2013).
4. Chanchal Deep Kaur, Swarnlata Saraf: Develop of photoprotective creams with antioxidant polyphenolic herbal extracts. Journal of medicinal plant, 2012, 6 (1): 83-91.
5. Lisnić T.: Granatno jabolko (<http://www.nutris.org/prehrana/zivila-meseca/101-granatno-jabolko.html>, odprto: 10. 5. 2013).
6. Johanningsmeier D. Suzanne, Harris G. Keith: Pomegranate as a functional food and nutraceutical source. Annual rewiev of food science and technology, november 2011: 181 - 201.
7. Medjakovic S., Jungbauer A.: Pomegranate: a fruit that ameliorates metabolic syndrome. The royal society of Chemistry, junij 2012: 19 - 39.
8. Opara Linus U., Al-Ani Majeed R., Al-Shuaibi Yusra S.: Physico-chemical properties, vitamin C content, and antimicrobial properties of pomegranate fruit (*Punica granatum* L.). Food Bioprocess Technol, 2009, 2: 315 – 321.
9. Ribarič S.: Temelji patološke fiziologije. Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2009.
10. Abbasi H., Rezaei K., Rashidi L.: Extraction of essential oils from the seeds of pomegranate using organic solvents and supercritical CO₂. J Am Oil Chem Soc, 2008, 85: 83-89.
11. Elfalleh W., Maying, Nasri N., Sheng-hua H., Guasmi F., Ferchichi A.: Fatty acids from Tunisian and Chinese pomegranate (*Punica granatum* L.) seeds. International Journal of Food Science and Nutrition, maj 2011; 62(3): 200 – 206.

12. Caligiani A., Bonzanini F., Palla G., Cirlini M., Bruni R.: Characterization of a potential nutraceutical ingredient: Pomegranate (*Punica granatum L.*) seed oil unsaponifiable fraction. *Plant Foods Hum Nutr*, 2010, 65: 277- 283.
13. Samadloiy H.R., Azizi M.H., Berzegar M.: Physico-chemical quality of seeds of pomegranate cultivars (*Punica granatum L.*) grown in Iran and antioxidative activity of their phenolic component. *Food science and technology*, 2008, 45 (2), 190 – 192.
14. H.H. Orak, H. Yagar, S.S. Isbilir: Comparison of antioxidant activities of juice, peel and seed of pomegranate (*Punica granatum L.*) and inter-relationship with total phenolic, tannin, anthocyanin and flavonoid contents. *Food science Biotechnology*, 2012, 21 (2): 373 – 387.
15. Grossmann M., Mizuno N.K., Schuster T., Cleary M.P.: Punicic acid is an ω -5 fatty acid capable of inhibiting breast cancer proliferation. *International journal of oncology*, 2010, 36: 421-426.
16. Sharaf A., Nigm S.A.R.: The oestrogenic activity of pomegranate seed oil. *J. Endocrin*, 1964, 29: 91-92.
17. Mirmiran P., Fazeli M. R., Asghari G., Shafiee A., Azizi F.: Effect of pomegranate seed oil on hyperlipidaemic subjects: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *British journal of nutrition*, 2010, 104, 402 – 406.
18. Vroegrijk I., Diepen J., Berg S., Westbroek I., Keizer H., Gmabelli L., Hontecillas R., Bassaganya-Riera J., Zondag G., Romijn J., Havakes L., Voshol P.: Pomegranate seed oil, a rich source of punicic acid, prevents diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 2011, 49: 1426-1430.
19. Ahshawat M.S., Saraf S., Saraf S.: Preparation and characterization of herbal creams for improvement of skin viscoelastic properties. *International Journal of Cosmetic Science*, 2008, 30, 183-193.
20. Hye Min Park, Eunjung Moon, Ae-Jung Kim, Mi Hyun Kim, Sanghee Lee, Jung Bok Lee, Young Kon Park, Hyuk-Sang Jung, Yoon-Bum Kim, Sun Yeou Kim: Ekstract of *Punica granatum* inhibits skin fotoaging induced by UVB irradiation. *International journal of dermatology*, 2010, 49: 276 – 282.
21. Defrance A.: Aquaporins: a new soure of youth for cosmetics. *Household and Personal Care Today*, 2007.

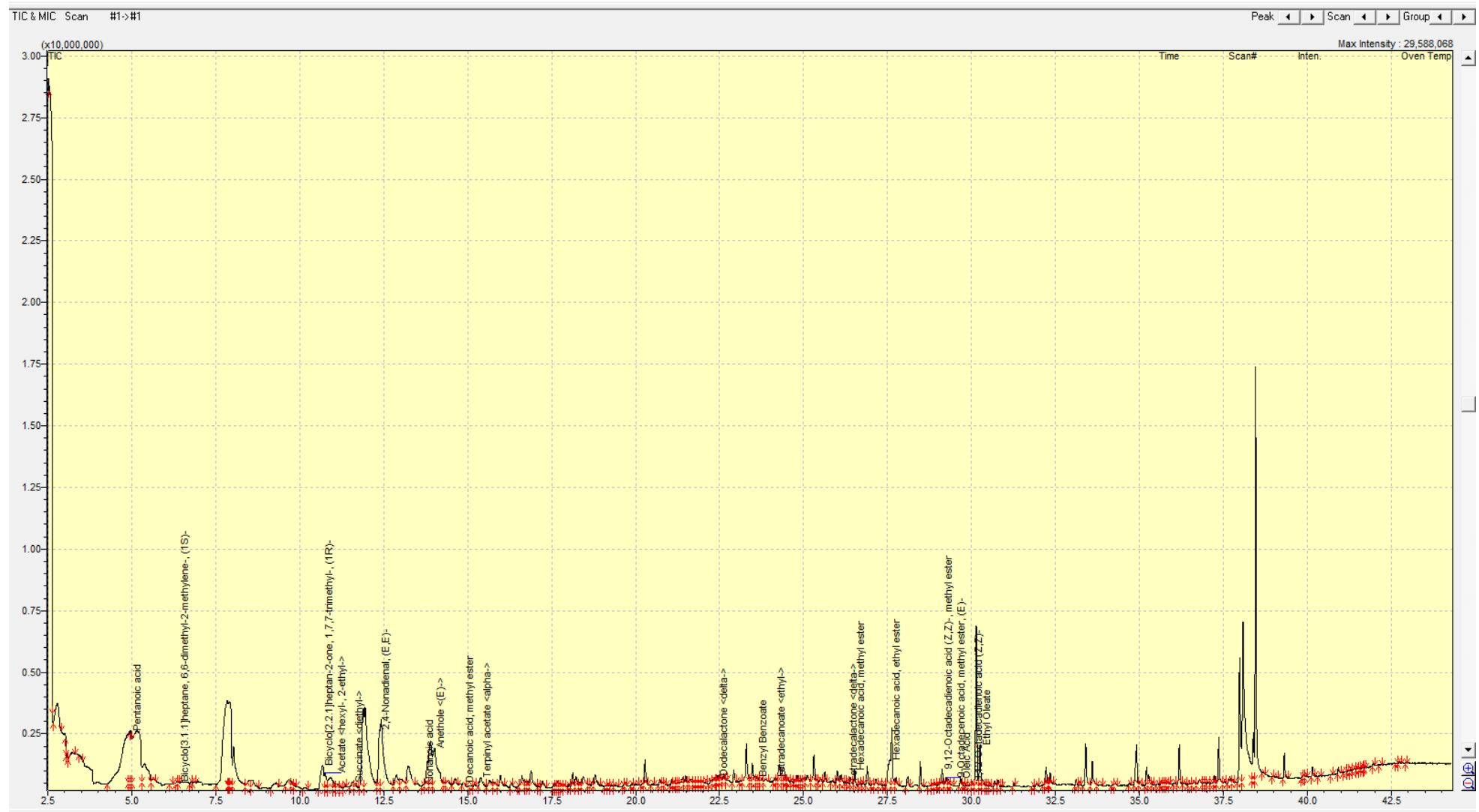
22. Clinical Trials: <http://clinicaltrial.gov> (odpro 10. 8. 2013).
23. H. J. Hübschmann: Handbook of GC/MS: Fundamentals and Applications, Second Edition, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim, 2009: 61
24. Sethi P: Mass spectrometry. New Delhi: Campus Books, 2009.
25. Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch: Principles of Instrumental Analysis, Atomic Mass Spectrometry, 6th Edition, 2007: 281-302.
26. Gas Chromatography-Mass Spectroscopy Background:
<http://www.gmu.edu/depts/SRIF/tutorial/gcd/gc-ms2.htm> (odprto 16.8.2013).
27. Harris D.D.: Quantitative Chemical Analysis, W.H. Freeman and Company, New York, 2002.
28. Brodnjak Vončina D.: Analizna kemija II, zbrano gradivo za predmet Analizna kemija II. Maribor: Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2011.
29. 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, Vol. 59, No. 6, 1994: 1262-1266.
30. Xiaofen Du, Chad E.Finn, Michael C. Qian: Volatile composition and odour-activity of thornless 'Black Diamond' and 'Marion' blackberries. Food Chemistry, 2009.
31. Tomšič J.: Ugotavljanje maščobnokislinske sestave svežih in staranih kokošjih jajc iz različnih virov z uporabo plinske kromatografije, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2013.
32. European Pharmacopeia (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
33. Sean Francis O'Keefe: Nomenclature and Classification of Lipids. V: Food Lipids, ed. Casimir C. Akoh, David B. Min, Third edition, 2008: 3-35.
34. Klofutar C.: Fizikalno-kemijske lastnosti triacilglicerolov. V: Lipidi. 14. Bitenčevi živilski dnevi, 4.-5. junij, Ljubljana, 1992: 11-16.
35. Salobir K.: Prehransko fiziološka funkcionalnost maščob. V: Funkcionalna hrana.
21. Bitenčevi živilski dnevi, nov 8.-9.; Portorož, 2001: 121-135.

36. Robert S. Chapkin: Reappraisal of the Essential Fatty Acids. V: Fatty Acids in Foods and their Health Implications, Ching Kuang Chow, 3th edition 2008: 675-692.
37. Zvonar A.: Funkcionalni lipidi kot nutricevtiki in prehranska dopolnila. V: Prehranska dopolnila II, urednika Aleš Obreza, Tomaž Vovk: strokovno izobraževanje, Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, 2010: 32-41.
38. Schubert S.Y., Lansky E.P., Neeman I.: Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology*, 1999, 66: 11-17.
39. Melgarejo P., Salazar D.M., Amoros A.: Total lipids content and fatty acid composition of seed oil from six pomegranate cultivars. *J Sci Food Agric*, 1995, 253 – 256.
40. Fadavi A., Berzegar M., Azizi M.H.: Determination of fatty acids and total lipid content in oilseed of 25 pomegranates varieties grown in Iran. *Journal of food composition and analysis*, 2006, 19:676-680.
41. Hertiš T.: Oksidativna stabilnost izbranih rastlinskih olj (raziskovalno delo projekta Mladi za napredok Maribora), Maribor, 2011.
42. Morgan D. A.: Smoke, fire and flash points of cottonseed, peanut and other vegetable oils, *Oil and Soap*, 1942: 193.
43. Gemert L. I.: Odour thresholds. Oliemans Punter & Partners. The Netherlands, 2011.
44. Burdock G. A.: Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients, 6th Ed. CRC Press, ZDA, 2010.
45. Calin-Sanchez A., Martinez J.J., Vazquez-Araujo L., Burlo F., Melgarejo P., Carbonell-Barrachina A.A.: Volatile composition and sensory quality of Spanish pomegranates (*punica granatum L.*). *J Sci Food Agric*, 2011; 91: 586-592.
46. Melgarejo P., Calin-Sanchez A., Vazquez-Araujo L., Hernandez F., Martinez J.J., Legua P., Carbonell-Barrachina A.A.: Volatile composition of pomegranates from 9 Spanish cultivars using headspace solid phase microextraction. *Journal of Food Science*, 2011; 76: 114-120.
47. Schieberle P., Hofmann T.: 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.

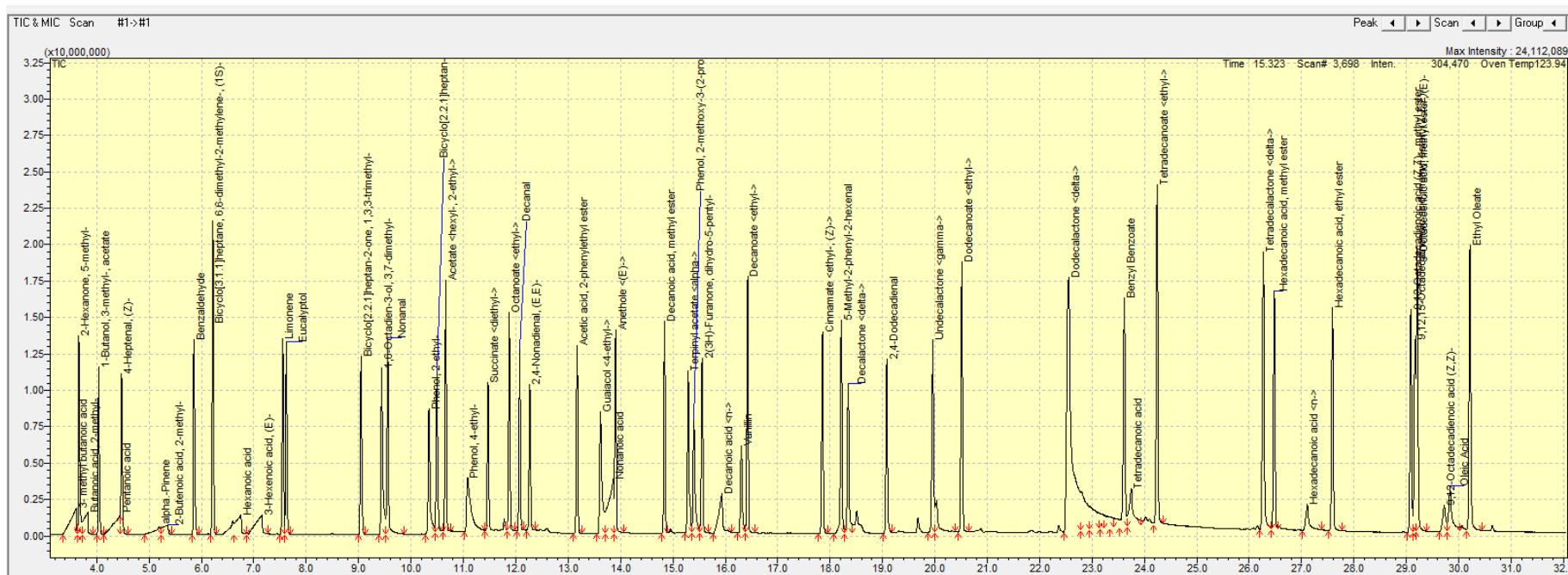
8 PRILOGE



Slika 8: Kromatogram - maščobnokislinska sestava OSGJ, vzorec Baccara Rosa.



Slika 9: Kromatogram - analiza hlapnih spojin, vzorec FFa.



Slika 10: Kromatogram - aplikacija referenčnih spojin.

Organoleptična analiza: **Olje iz semen granatnega jabolka**

CO₂ ekstrakt:

1. Povonjajte originalno olje.
1. Ocenite:

	Vzorec 0	Vzorec 1	Vzorec 2	Vzorec 3	Vzorec 4	Vzorec 5	Vzorec 6	Vzorec 7	Vzorec 8	Vzorec 9
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 podobno in 5 najbolj)										
Asociacije (z eno besedo opišite, na kaj vas spominja vonj)										

FFa:

1. Povonjajte originalno olje.
2. Ocenite:

	Vzorec 0	Vzorec 1	Vzorec 2	Vzorec 3	Vzorec 4
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 podobno in 5 najbolj)					
Asociacije (z eno besedo opišite, na kaj vas spominja vonj)					