

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA PERČIČ

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA PERČIČ

**MAŠČOBNOKISLINSKA SESTAVA IN ANTIOKSIDATIVNO
DELOVANJE IZBRANIH RASTLINSKIH OLJ**

**DETERMINATION OF FATTY ACID COMPOSITION AND
ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF SELECTED VEGETABLE OILS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2015

Magistrsko 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., in doc. dr. Nini Kočevar Glavač, mag. farm., za vso pomoč in nasvete pri izdelavi magistrske naloge. Prav tako se zahvaljujem vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko biologijo za pomoč pri delu v laboratoriju.

Zahvaljujem se svojim staršem, sestri Urši in fantu Anžetu.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Damjana Janeša, mag. farm.

Špela Perčič

Predsednica komisije: prof. dr. Janja Marc, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Žiga Jakopin, mag. farm.

Ljubljana, 2015

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	I
KAZALO SLIK.....	II
KAZALO PREGLEDNIC.....	III
POVZETEK	IV
ABSTRACT	V
KLJUČNE BESEDE	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
1. UVOD	1
1.1 Rastlinska olja.....	1
1.2 Maščobne kisline	1
1.2.1 Metabolizem s prehrano vnesenih maščobnih kislin.....	4
1.2.2 Vpliv zaužitih maščobnih kislin na zdravje	4
1.2.2.1 Vpliv prehranskih maščobnih kislin na srčnožilna obolenja in krvne lipide..	4
1.2.2.2 Vpliv prehranskih maščobnih kislin na vnetje	6
1.2.3 Stabilnost rastlinskih olj in lipidna peroksidacija	7
1.3 Derivatizacija maščobnih kislin za nadaljnjo analizo.....	9
1.4 Plinska kromatografija z masno spektrometrijo (GC-MS).....	9
1.4.1 Plinska kromatografija	10
1.4.2 Masna spektrometrija	10
1.5 DPPH metoda za ugotavljanje antioksidativnega delovanja	11
2. NAMEN DELA.....	13
3. MATERIALI IN METODE.....	14
3.1 Materiali.....	14
3.1.1 Vzorci rastlinskih olj	14
3.1.2 Reagenti.....	15
3.1.2.1 Priprava metilnih estrov maščobnih kislin za GC-MS analizo.....	15
3.1.2.2 Ugotavljanje antioksidativne aktivnosti z modificirano DPPH metodo.....	16
3.1.3 Aparature in laboratorijska oprema.....	16
3.2 Metode	16
3.2.1 Priprava metilnih estrov maščobnih kislin z metodo "in situ" preestrenja in ugotavljanje maščobnokislinske sestave z GC-MS analizo	16

3.2.2 Plinska kromatografija z masno spektrometrijo (GC-MS)	16
3.2.3 DPPH metoda za ugotavljanje antioksidativnega delovanja.....	17
4. EKSPERIMENTALNI DEL	18
4.1 Priprava metilnih estrov maščobnih kislin z metodo »in situ« preestrenja in ugotavljanje maščobnokislinske sestave z GC-MS analizo.....	18
4.2 Staranje olj	19
4.3 Ugotavljanje antioksidativnega potenciala vzorcev olj po modificirani DPPH metodi	19
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	22
5.1. Ugotovitev maščobnokislinske sestave vzorcev rastlinskih olj.....	22
5.2 Rezultati ugotavljanja antioksidativnega potenciala z DPPH metodo.....	31
5.2.1 Uporabnost DPPH metode	31
5.2.2 Optimizacija izbire topila za metodo DPPH	33
5.2.3 Rezultati meritev antioksidativnega potenciala.....	36
5.2.4 Vpliv rafiniranja in stabilizacije olj z dodatkom tokoferola	37
5.2.5 Primerjava med različnimi proizvajalci istovrstnih olj	37
5.3 Vpliv staranja olj na njihovo barvo in vonj	39
5.3.1 Spremljanje barve in vonja svežih in staranih vzorcev	39
5.4 Uporaba preiskovanih rastlinskih olj kot dopolnilo k prehrani	41
6. SKLEP	42
7. LITERATURA	44
8. PRILOGA	47

KAZALO SLIK

<i>Slika 1: Večkrat nenasičene maščobne kisline: linolna kislina, γ-linolenska kislina, α-linolenska kislina.</i>	<i>2</i>
<i>Slika 2: Reakcijska shema reagenta DPPH z donorjem vodikovega iona oziroma antioksidanta.</i>	<i>12</i>
<i>Slika 3: Fotografija prikazuje uporabljene vzorce rastlinskih olj in njihove številčne oznake.</i>	<i>15</i>
<i>Slika 4: GC-MS aparatura, ki smo jo uporabili pri analizi.....</i>	<i>17</i>

<i>Slika 5: Spektrofotometer, uporabljen za merjenje absorbanc vzorčnih, kontrolnih in slepih raztopin.</i>	20
<i>Slika 6: Kromatogram, ki prikazuje maščobnokislinsko sestavo svežega vzorca olja črni ribez Behawe Naturprodukten</i>	28
<i>Slika 7: Kromatogram, ki prikazuje maščobnokislinsko sestavo staranega vzorca olja črnega ribeza Behawe Naturprodukten</i>	28
<i>Slika 8: Graf, ki prikazuje krivuljo standarda tokoferola: % AOP v odvisnosti od koncentracije tokoferola (mg/kg)</i>	35
<i>Slika 9: Standardne raztopine tokoferola po inkubaciji z DPPH reagentom</i>	35
<i>Slika 10: Vzorci svežih olj z dopisanimi številčnimi oznakami.</i>	40
<i>Slika 11: Vzorci staranih olj z dopisanimi številčnimi oznakami.</i>	40

KAZALO PREGLEDNIC

<i>Preglednica I: Priprava standardnih raztopin tokoferola.</i>	21
<i>Preglednica II: Maščobne kisline, detektirane v vzorcih rastlinskih olj</i>	22
<i>Preglednica III: Sestava MK v svežih in staranih vzorcih olj boreča in črnega ribeza</i>	23
<i>Preglednica IV: Sestava MK v svežih in staranih vzorcih olj svetlina, črne koprive in črne kumine</i>	24
<i>Preglednica V: Sestava MK v svežih in staranih vzorcih olj lana in španske kadulje</i>	25
<i>Preglednica VI: Sestava MK v svežih in staranih vzorcih olj inkovske plukenecije in kivija</i>	26
<i>Preglednica VII: Izmerjene absorbance in antioksidativni potencial različnih zateht olja rakitovca</i>	34
<i>Preglednica VIII: AOP in relativni delež ALK in GLK za sveže in starane vzorce</i>	37

POVZETEK

Rastlinska olja, bogata z α - in γ -linolensko kislino, postajajo zadnje čase čedalje pogosteje uporabljana tako v obliki prehranskih dopolnil kot v kozmetiki. Namen magistrskega dela je bil proučiti naslednja rastlinska olja: borečovo olje, olje črnega ribeza, svetlinovo olje, olje španske kadulje, olje črne koprive, olje inkovske plukenecije, kivijevo olje, laneno olje ter olje črne kumine. Vzporedno smo proučevali in primerjali več vzorcev različnih proizvajalcev istovrstnega olja. Maščobnokislinsko sestavo rastlinskih olj smo ugotovili s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektroskopijo po metodi »*in situ*« preestrenja trigliceridov iz olja v metilne estre maščobnih kislin. Vsa preiskovana olja, razen olja črne kumine, so vsebovala α -linolensko kislino v koncentraciji nad 50% ali γ -linolensko kislino ali celo oboje, kot na primer olje črnega ribeza.

Vzorcem olj smo izmerili antioksidativno delovanje z uporabo modificirane metode določevanja antioksidativnega potenciala z reagentom 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, ki reagira z donorjem vodikovega iona v vzorcu. Metoda merjenja antioksidativnega delovanja z reagentom DPPH temelji na spektrofotometričnem merjenju padca absorbance vzorca po 30 minutni inkubaciji z omenjenim reagentom. Metodo DPPH smo optimizirali in kot topilo uporabili zmes 50 % 2-butanona v metanolu (v/v).

Ker imajo vsa preiskovana olja veliko vsebnost večkrat nenasičenih maščobnih kislin in so zaradi tega bolj podvržena reakcijam kvarjenja in lipidni peroksidaciji, smo proučevali tudi vpliv simulacije pospešenega staranja na maščobnokislinsko sestavo in antioksidativno delovanje rastlinskih olj. Vzorce olj smo en teden v poletnih mesecih izpostavili zunanjim dejavnikom okolja: zračni vlagi, zračnemu kisiku, povišani temperaturi in svetlobi. Vzorce smo pred in po staranju tudi organoleptično ovrednotili, in sicer smo opisali njihov vonj in barvo. Ugotovili smo, da se barva vzorcev tekom staranja ni bistveno spremenila. Starani vzorci so imeli v primerjavi s svežimi vzorci olj veliko bolj neprijeten vonj - po žarkem, kar nakazuje na kvarjenje lipidov. Ugotovili smo, da se antioksidativni potencial rastlinskih olj s staranjem zmanjša, medtem ko ostajajo relativni deleži posameznih maščobnih kislin v trigliceridih med enotedenskim staranjem olj pretežno konstantni. Antioksidanti, ki so naravno prisotni v rastlinskih oljih, reagirajo z radikali, ki nastanejo med lipidno peroksidacijo ter tako do neke mere zaščitijo olje pred nadaljnjim razpadom. Izmerjeni antioksidativni potencial rastlinskih olj po staranju je zato manjši, medtem ko se vsebnost večkrat nenasičenih α -linolenske in γ -linolenske kisline po staranju bistveno ne spremeni.

ABSTRACT

Vegetable oils, rich in α - and γ -linolenic acid are being increasingly used both as dietary supplements and cosmetic ingredients. Following vegetable oils were studied: borago, blackcurrant, evening primrose, chia, perilla, sacha inchi, kiwi, flaxseed and black cumin oil. Several different samples from different manufacturers were tested and compared. Fatty acid composition was determined employing gas-cromatography coupled with mass-spectrometry after »*in situ*« methyl transesterification. All examined vegetable oils with the exception of black cumin oil were either rich in α -linolenic acid (over 50%) or contained γ -linolenic acid. Blackcurrant oil even contained both, α -linolenic and γ -linolenic acid .

Antioxidant potential of vegetable oils was assessed and determined using modified DPPH free radical scavenging method employing 2,2-diphenyl-1-hydrazyl and spectrophotometric measuring of the decreased absorption of the sample after 30 min incubation time. DPPH method was optimized using 50 % 2-butanone in methanol (v/v) as solvent.

All selected vegetable oils have high contents of polyunsaturated fatty acids, which make them more susceptible to deterioration and lipid peroxidation. A simulated forced degradation study was performed to determine the impact of increased temperature, solar UV radiation, atmospheric oxygen and humidity on stability of vegetable oils. An organoleptic analysis of the oil samples was carried out before and after the simulated acceleration study: odour and colour were evaluated and documented. While the colour of the samples mainly remained unchanged, the odour of aged oil samples became rancid and unpleasant. The results showed a substantial decrease of antioxidant potential of vegetable oils after exposure to light, oxygen and humidity. Surprisingly, fatty acid composition of aged oils samples did not change much. Antioxidants, which occur naturally in vegetable oils, such as tocopherols, reacted with free radicals, produced during lipid peroxidation, and to a certain extent preserved oil from further deterioration. Determined antioxidant potential of vegetable oils after aging was therefore lower, while overall content of α - and γ -linolenic acid remained unchanged.

KLJUČNE BESEDE

Maščobne kisline, rastlinska olja, antioksidant, α -linolenska kislina, γ -linolenska kislina

Fatty acids, vegetable oils, antioxidants, α -linolenic acid, γ -linolenic acid

SEZNAM OKRAJŠAV

A – absorbanca

AK – arahidonska kislina

ALK – α -linolenska kislina

AOP – antioksidativni potencial

ATP – adenzin trifosfat

CI – (ang. *chemical ionisation*) kemijska ionizacija

CoA – koencim A

DHK – dokozaheksaenojska kislina

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

EI – (ang. *electronic ionisation*) elektronska ionizacija

ENMK – enkrat nenasičene maščobne kisline

EPK – eikozapentaenojska kislina

ESI – (ang. *electrospray ionisation*) elektrosprej ionizacija

F. A. M. E. Mix C₄-C₂₄ – (angl.: *Fatty Acid Methyl Esters*) zmes referenčnih spojin metilnih estrov maščobnih kislin C₄-C₂₄

FAB – (ang. *fast atom bombardment*) hitro obstreljevanje z atomi

FD – (ang. *field desorption*) desorpcija v električnem polju

FI – (ang. *field ionisation*) ionizacija v električnem polju

GC – plinska kromatografija

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

GLK – γ -linolenska kislina

HDL – (ang. *high-density lipoproteins*) lipoproteini visoke gostote

IUPAC – (ang. *International Union of Pure and Applied Chemistry*) Mednarodna zveza za čisto in uporabno kemijo

LDL – (ang. *low-density lipoproteins*) lipoproteini nizke gostote

LK – linolna kislina

MALDI – (ang. *Matrix-assisted laser desorption/ionisation*) metoda ionizacije vzorca z laserjem s pomočjo matriksa

MK – maščobna kislina

m/z – (ang. *mass-to-charge value*) razmerje mase z nabojem

PPAR – (ang. *peroxisome proliferator-activated teceptor*) s peroksisomskim proliferatorjem aktivirani receptorji; tip jedrnih receptorjev, ki sodelujejo kot transkripcijski dejavniki in uravnavajo izražanje genov

TIC – (ang. *Total Ion Current*) celotni ionski tok

TS – (ang. *thermospray ionisation*) termosprej ionizacija

TMK – *trans* maščobne kisline

TOF – (ang. *time of flight*) masni analizator na čas preleta elektronov

VNMK – večkrat nenasičene maščobne kisline

1. UVOD

1.1 Rastlinska olja

Rastlinska olja, kamor uvrščamo olja, pridobljena z mehanskim stiskanjem rastlinskega materiala ter izvlečke, pridobljene s topili ali superkritičnim ogljikovim dioksidom, sestavljajo večinoma trigliceridi - estri glicerola in treh nasičenih oziroma nenasičenih maščobnih kislin. Poleg trigliceridov v rastlinskih oljih najdemo še tokoferole, tokotrienole, rastlinske sterole, alifatske alkohole, flavonoide, fenole, glikolipide, fosfolipide, karotenoide in proste maščobne kisline. Sestava olj je odvisna od vrste, kultivarja ali kemotipa rastline, porekla rastlinskega materiala in načina ekstrakcije olja (1, 2).

Rastlinska olja, pridobljena iz nenavadnih rastlin, ki so bogata z večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami, kot sta α -linolenska in γ -linolenska kislina, v zadnjem času precej uporabljamo tako v kozmetiki kot v obliki prehranskih dopolnil, ki pripomorejo k zdravi in uravnoteženi prehrani (1, 2).

1.2 Maščobne kisline

Maščobne kisline so sestavine človekove prehrane in imajo obsežne metabolne, strukturne in funkcionalne vloge v človeškem telesu. So pomemben vir energije, ena izmed glavnih sestavin vseh celičnih membran in so prekurzorji številnih signalnih molekul (3).

Maščobne kisline rastlinskega ali živalskega izvora so navadno sestavljene iz sodega števila do 30 ogljikovih atomov v nerazvejani verigi s karboksilno skupino na skrajnem koncu verige. Karboksilna skupina lahko tvori estre z alkoholi, kot sta glicerol in holesterol. Maščobne kisline imajo lahko v svoji strukturi lahko eno ali več dvojnih vezi v *cis*- oziroma (*Z*)-konfiguraciji (3, 4).

Maščobne kisline delimo na **nasičene MK**, ki v alkilnem delu nimajo nobene dvojne vezi in na **nenasičene** (enkrat ali večkrat nenasičene MK), ki v alifatskem delu vsebujejo eno ali več dvojnih vezi. Nasičene MK so najpogostejše sestavine trigliceridov v živalskih tkivih, nenasičene pa v rastlinskih tkivih, so nerazvejane in najpogosteje dolge 14, 16 in 18 ogljikovih atomov (4).

Enkrat nenasičene maščobne kisline (ENMK) vsebujejo v alifatskem delu MK eno dvojno vez, zaradi katere so manj stabilne ter bolj podvržene oksidaciji kot nasičene MK. Navadno

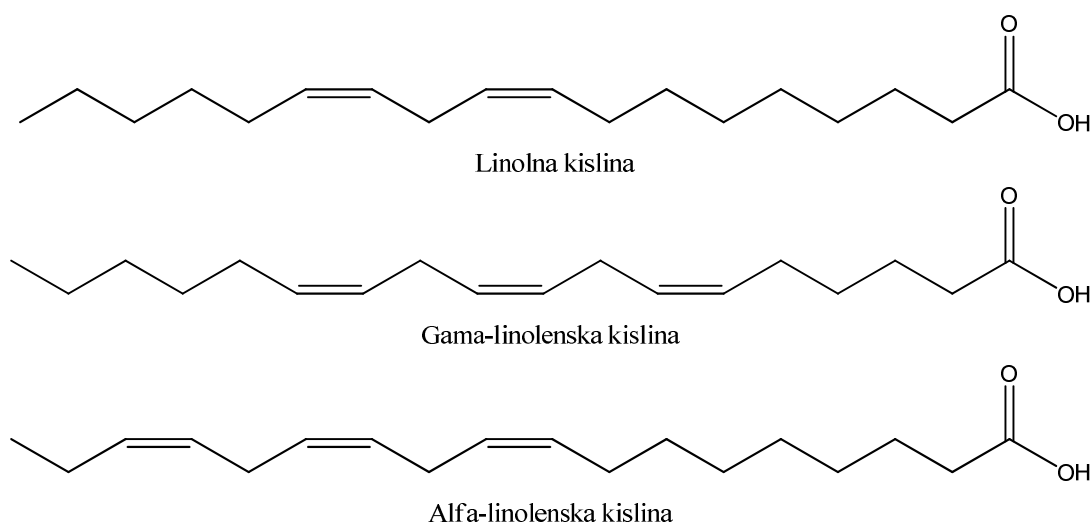
je konfiguracija dvojne vezi *cis*-, oziroma (*Z*)-, izjemoma tudi *trans*- oziroma (*E*)-. Najpogostejša enkrat nenasičena maščobna kislina, ki jo najdemo v rastlinskih oljih, je oleinska kislina (4).

Večkrat nenasičene maščobne kisline (VNMK) vsebujejo v alifatskem delu dve ali več *cis*-dvojnih vezi, imajo nizko temperaturo tališča ter so bolj podvržene oksidativnemu kvarjenju in avtooksidaciji. Med večkrat nenasičene maščobne kisline uvrščamo linolno (LK), α -linolensko (ALK), γ -linolensko (GLK), arahidonsko (AK), eikozapentaenojsko (EPK) in dokozaheksaenojsko kislino (DHK). Zadnji dve najdemo v morski hrani, mastnih ribah in školjkah (4).

Večkrat nenasičene maščobne kisline delimo v dve glavni skupini:

- *n-3 ali omega 3 maščobne kisline*, kjer je prva dvojna vez locirana na tretjem ogljikovem atomu gledano z metilnega konca; v to sodi linolna kislina in
- *n-6 ali omega 6*, kjer 6 označuje položaj prve dvojne vezi gledano z metilnega konca; sem sodi α -linolenska kislina (4).

Omenjeni maščobni kislini, LK in ALK, uvrščamo tudi med esencialne maščobne kisline. Esencialne MK so tiste večkrat nenasičene MK, ki jih sesalci sami ne zmorejo sintetizirati in jih je zato v organizem treba vnesti s prehrano: z rastlinskimi olji, oreščki, žitaricami, ribami. ALK in LK skupaj sestavljata kar 95-98 % prehranskega vnosa večkrat nenasičenih maščob v prehrani (3).



Slika 1: Večkrat nenasičene maščobne kisline: linolna kislina, γ -linolenska kislina, α -linolenska kislina.

α -linolenska kislina

ALK je esencialna omega 3 MK, ki jo najdemo zlasti v semenih (španska kadulja, lan, črna kopriva, kivi, rakitovec, konoplja), oreščkih (orehi) in mnogih pogosto uporabljenih rastlinskih oljih kot sta sojino olje in olje oljne ogrščice. Najdemo jo v ričkovem olju, v manjših količinah tudi v zelenjavi, žitih, stročnicah in sadju. Njeno IUPAC ime je (9Z,12Z,15Z)-9,12,15-oktadekatrienojska kislina, kar pomeni, da ima na mestih 9, 12 in 19 tri dvojne vezi v (Z)-konfiguraciji. ALK moramo nujno zaužiti s prehrano, saj odsotnost encimov 12- in 15-desaturaze pri ljudeh onemogoča sintezo α -linolenske kisline iz stearinske kisline. ALK je prekursor dveh pomembnih dolgoverižnih VNMK – EPK in DHK, ki imata zelo pomembno vlogo pri razvoju možganov, zdravju srca in ožilja in odzivu organizma na vnetje. Neposredno lahko EPK in DHK v organizem vnesemo z uživanjem mastnih morskih rib, vendar so pomemben vir EPK in DHK tudi rastlinska olja, bogata z ALK. Učinkovitost metabolne pretvorbe je pri ljudeh sicer omejena (<8 % ALK v EPK in <4% ALK v DHK), vendar nadvse pomembna, saj predstavlja edini kopenski vir EPK in DHK (5, 6).

γ -linolenska kislina

GLK je maščobna kislina, ki jo najdemo zlasti v rastlinskih oljih svetlina, črnega ribeza, boreča in konoplje, prisotna pa je tudi v žitaricah in spirulini. Njeno IUPAC ime je (9Z,6Z,12Z)-9,6,12-oktadekatrienojska kislina. Kot dodatek prehrani jo priporočajo pri številnih zdravstvenih težavah, čeprav je malo kliničnih študij, ki bi dokazovale in podpirale njene koristne učinke. GLK uvrščamo v skupino n-6 ali omega 6 maščobnih kislin, kar pomeni, da je prva dvojna vez na ogljikovodikovi verigi na šestem ogljikovem atomu. GLK je maščobna kislina z 18 ogljikovimi atomi in tremi *cis* dvojnimi vezmi in je izomer ALK, ki sodi v skupino nenasičenih n-3 MK. V človeškem telesu GLK nastane iz α -linolenske kisline pod vplivom encima delta-6-desaturaze. γ -linolenske kisline navadno zaužijemo dovolj s prehrano, saj je v izobilju v jedilnih oljih in mesu, vendar se pomanjkanje GLK lahko pojavi pri ljudeh, ki imajo manj aktiven encim delta-6-desaturaza, na primer pri starostnikih. V tem primeru je priporočljivo peroralno nadomeščanje GLK (7).

1.2.1 Metabolizem s prehrano vnesenih maščobnih kislin

Maščobne kisline navadno zaužijemo s prehrano v obliki trigliceridov, ki jih s pomočjo pankreasne lipaze v črevesju razgradimo na proste maščobne kisline in monogliceride. Proste maščobne kisline se hitro in učinkovito absorbirajo ter vstopijo v celice preko maščobnokislinskih transporterjev. V celicah se najprej pretvorijo v maščobnokislinske acil-CoA tioestre, nato pa le-ti lahko reagirajo po treh glavnih metabolnih poteh:

1. β -oksidacija – produkcija energije in ATP,
2. sinteza nevtralnih (trigliceridi, holesterolni estri) in polarnih lipidov (fosfolipidi, sfingolipidi),
3. sinteza dolgoverižnih VNMK: MK so podvržene seriji zaporednih encimskih reakcij desaturacije in podaljševanja (elongacije) (8).

Večji delež zaužitih MK se presnavlja po prvi poti in gre neposredno v reakcije β -oksidacije. Na primer, pri ALK gre kar 65-85 % zaužite ALK v reakcije β -oksidacije. Manjši delež ALK pa se v večih serijah zaporednih reakcij desaturacije in podaljševanja pretvori v EPA in kasneje v DHK. Linolenska kislina se analogno kot α -linolenska kislina v EPA in DHA pretvori v arahidonsko kislino (AK). Omega 3 in omega 6 MK si namreč delijo iste encime desaturaze in podaljševanja ter med seboj tekmujejo zanje (5, 6).

1.2.2 Vpliv zaužitih maščobnih kislin na zdravje

1.2.2.1 Vpliv prehranskih maščobnih kislin na srčnožilna obolenja in krvne lipide

Prehranske maščobne kisline igrajo pomembno vlogo tako pri vzrokih za nastanek bolezni srca in ožilja kot tudi pri sekundarnem preprečevanju le-teh. Tveganje za nastanek srčnožilnih obolenj lahko zmerno zmanjšamo z zmanjšanjem vnosa nasičenih MK, ki jih v prehrani nadomestimo s kombinacijo ENMK in VNMK. Vendar se moramo zavedati, da so v splošnem veliko bolj kot sama vsebnost posameznih MK v hrani, pomembni celotni vzorci prehranjevanja in matriks zaužite hrane. Zdrava in uravnotežena prehrana bi zato morala biti osnovni temelj za preprečevanje bolezni srca in ožilja (9).

- **Nasičene maščobne kisline**

Primaren vir nasičenih maščobnih kislin so živalske maščobe (meso, mleko, mlečni izdelki), nekatera rastlinska olja (palmino, kokosovo olje, kakavovo maslo) in komercialno procesirana hrana, ki vsebuje hidrogenirane maščobe – margarino (piškoti, peciva). Nasičene

maščobne kisline so v prehrani najmanj zaželene, saj povečujejo tveganje za razvoj bolezni srca in ožilja in zvišujejo raven holesterola v krvi. Priporoča se omejitev vnosa nasičenih maščobnih kislin na <10 % (po nekaterih virih pa celo <7 % ali <5 %) vseh zaužitih kalorij (8, 9).

- **trans-maščobne kisline**

Dvojne vezi so v naravno prisotnih maščobnih kislinah z izjemo MK v mesu in mlečnih izdelkih (na primer vakcenska kislina) večinoma v *cis*- oziroma (*Z*)-konfiguraciji. Večina TMK v prehrani pa žal izhaja iz industrijsko predelanih delno hidrogeniranih rastlinskih olj ali industrijsko predelane, toplotno obdelane hrane. TMK zvišujejo raven LDL holesterola in zmanjšujejo velikost LDL delcev, znižujejo raven HDL holesterola, zvišujejo raven lipoproteina A v krvi in povečujejo produkcijo vnetnih dejavnikov. Dokazana je močna povezava med uživanjem TMK in povečanjem smrtnosti zaradi srčnožilnih bolezni. Dnevno naj bi vnos TMK omejili na manj kot 1 % vseh zaužitih kalorij s hrano, tiste TMK, ki jih zaužijemo, pa naj bi prišle iz naravnih virov (meso, mleko in mlečni izdelki) in ne iz virov procesirane in predelane hrane (9).

- **Enkrat nenasičene maščobne kisline**

Viri enkrat nenasičenih maščobnih kislin so oreščki, olivno olje, olje oljne ogrščice, sončnično olje, avokado. Glavni predstavnik ENMK je oleinska kislina. ENMK zvišajo HDL ter znižajo LDL in celotni holesterol. ENMK naj bi imele vpliv tudi na znižanje telesne mase in znižanje sistoličnega in diastoličnega krvnega tlaka. Zaradi pomanjkanja ustreznih študij z jasnimi rezultati priporočljivega dnevnega vnosa ENMK v literaturi nismo zasledili, priporočilo je zgolj, da prehranske nasičene in TMK v čim večji meri nadomeščamo z VNMK in ENMK (9).

- **Večkrat nenasičene maščobne kisline**

VNMK dokazano zmanjšujejo koncentracijo celotnega plazemskega holesterola in koncentracijo LDL holesterola.

- **n-6 maščobne kisline**

Priporočljivo je zaužiti vsaj 5-10 % dnevnega vnosa kalorij iz n-6 nenasičenih MK.

- n-3 maščobne kisline

So največkrat proučevane in delujejo preventivno pri boleznih srca in ožilja. Predlagani mehanizmi delovanja so naslednji: znižanje koncentracije plazemskih trigliceridov, znižanje arterijskega tlaka, znižanje srčne frekvence, izboljšanje vaskularne funkcije, zmanjšanje sproščanja dejavnikov vnetja. Zlasti pri posameznikih, ki ne uživajo rib in morske hrane, priporočajo dopolnjevanje prehrane s kakovostnimi prehranskimi dopolnili v obliki primarnega preprečevanja srčnožilnih obolenj. Pri drugi populaciji je priporočljivo jesti ribe vsaj dvakrat tedensko. Nujne so dodatne raziskave, ki bi ugotovile optimalne odmerke n-3 in n-6 MK v prehrani ter določile skupino prejemnikov – pacientov ali zdrave populacije, ki bi imela korist od dopolnjevanja prehrane z n-3 in n-6 MK prehranskimi dopolnili.

- razmerje (n-3)/(n-6) in omega 3 indeks

V človeški prehrani je pomembno ohranjanje razmerje med n-3 in n-6 MK, saj obe vrsti MK tekmujeta za iste encimske sisteme desaturacije in elongacije. Ker pa so n-6 maščobne kisline (zlasti linolna kislina) veliko bolj zastopane v sodobni prehrani kot n-3 MK, je razmerje pogosto porušeno v korist n-6 MK. To vodi v zmanjšanje možnosti za endogeno produkcijo dolgoveržnih n-3 MK. Danes razmerje zaužitih MK v večini zahodnih držav pogosto presega 15:1 ali celo 20:1. Poenostavljeno gledano, predstavlja visoko razmerje (n-3):(n-6) povečano tveganje za razvoj in napredovanje srčnožilnih obolenj, vrednost čim bližje 1, pa deluje zaščitno pred degenerativnimi patologijami. Kritika razmerja je, da gre tu za preveliko poenostavitev brez prave napovedne vrednosti, zato se zadnje čase namesto razmerja (n-3):(n-6) vpeljuje nov kazalec omega 3 indeks. Omega 3 indeks predstavlja delež EPK in DHK v rdečih krvnih celicah, izraženo v obliki deleža vseh identificiranih MK. Kardioprotektivna vrednost omega 3 indeksa, ki naj bi izražala zmanjšanje tveganja za primarni srčni zastoj, nenadno smrt ali akutni koronarni sindrom, naj bi bila <8 % (3, 5, 6, 8-10).

1.2.2.2 Vpliv prehranskih maščobnih kislin na vnetje

Vnetje je lokalna reakcija tkiva na poškodbo, ki ima lahko številne sistemske učinke. Gre za zaščitni odziv organizma, ki spremlja številna pogosta stanja in bolezni. Ob razvoju vnetnega procesa se sintetizirajo in sproščajo številni endogeni mediatorji vnetne reakcije, med katere uvrščamo histamin, polipeptide, eikozanoide, dušikov oksid, citokine, kemokine in neuropeptide. Nabor maščobnih kislin, ki jih zaužijemo s prehrano, lahko vpliva na vnetne

reakcije preko številnih mehanizmov, izmed katerih je morda najpomembnejši ta, da so maščobne kisline v organizmu prekursorji za sintezo eikozanoidov. Eikozanoidi so modulatorji in regulatorji vnetja, ki nadzorujejo intenziteto in trajanje vnetnih procesov. Mednje štejemo prostaglandine, levkotriene, tromboksane, prostacikline in lipoksine (11).

Maščobne kisline, zaužite s prehrano, lahko vplivajo na vnetne procese v človeškem telesu in delujejo po različnih poteh. Mehanizmi, preko katerih zaužite maščobne kisline lahko vplivajo na vnetne procese v človeškem telesu, so naslednji:

- neposreden vpliv na plazemske koncentracije kompleksnih lipidov, lipoproteinov in njihovih metabolitov,
- delovanje preko maščobnokislinskih receptorjev na celični površini in delovanja preko znotrajceličnih receptorjev – vpliv na celično signaliziranje in izražanje genov (preko PPAR receptorjev), kar vodi do spremenjene produkcije lipidnih in peptidnih mediatorjev,
- spremembe sestave MK v celičnih membranah: vgraditev MK v membranske fosfolipide celičnih membran vnetnih celic: uravnavanje fluidnosti in urejenosti membrane, vpliv na tvorbo lipidnih raftov in na celično signaliziranje (3, 5).

Celice, ki so vpletene v vnetni odziv, so navadno bogate z n-6 arahidonsko kislino, vendar lahko na količino in razmerje med AK, EPK in DHK v celici vplivamo tudi s spremenjenim peroralnim vnosom prekursorjev za našete MK. Eikozanoidi, ki izhajajo iz AK, imajo mnogo močnejše vnetne učinke kot eikozanoidi, ki nastanejo iz EPA. To pomeni, da lahko s spremenjenim razmerjem in količino zaužitih MK bistveno vplivamo na produkcijo posameznih endogenih mediatorjev vnetja in njihovo biološko aktivnost. V bistvu lahko s prehranskim vnosom in posledično maščobnokislinsko sestavo celične membrane neposredno vplivamo na celično funkcijo (3, 5).

1.2.3 Stabilnost rastlinskih olj in lipidna peroksidacija

Rastlinska olja, bogata z VNMK, kot sta α - in γ -linolenska kislina, so zaradi svoje sestave zlasti podvržena oksidativnemu kvarjenju in lipidni peroksidaciji. Lipidna peroksidacija je nekontrolirana oksidacija lipidov, ki se začne kot radikalska verižna reakcija in se nadaljuje v kompleksen in prepleten sistem oksidacij, ki potekajo po radikalskih in neradikalskih

potih. Reakcijo peroksidacije lahko sproži hidroksilni radikal oziroma vsaka radikalska molekula, ki je sposobna odvzeti vodikov atom lipidni molekuli. Tarčne spojine so večkrat nenasičene maščobne kisline, kjer na mestih dvojne vezi radikalska molekula odtegne vodik. To vodi v nastanek lipidnega karbokationa in dvojne vezi se premestijo. Nastane konjugiran dien, ki z zračnim kisikom tvori lipidni peroksilni radikal. Peroksilni radikal v nadaljevanju odvzame vodikov atom naslednji molekuli lipida. Ciklični krog opisanih reakcij se ponavlja in lipidne molekule se po radikalskih poteh tako postopoma oksidirajo do hidroperoksidov, ti pa razpadejo v alkane, alkene aldehide, ketone in epokside (12, 13).

Verižna radikalska reakcija peroksidacije se lahko ustavi tako, da med seboj reagirata dve radikalski molekuli, pogosteje pa radikal zreagira z antioksidantom. Antioksidant je vsaka snov, ki upočasni, prepreči ali odstrani oksidativno poškodbo tarčne molekule. Antioksidativno delovanje v rastlinskih oljih imajo številne molekule, izmed katerih so najpomembnejši lipidni antioksidanti, kot so tokoferoli, v lanenem olju tudi plastokromanol-8. Antioksidativno delovanje izkazujejo tudi flavonoidi in polifenoli, vendar je le-teh zaradi njihove hidrofilne narave v rastlinskih oljih manj (12, 13).

Proces kvarjenja maščob, ki vodi v žarkost in razpad lipidnih komponent, se lahko začne že med pridelavo olja, pospeši pa se med neustreznim transportom in shranjevanjem. Prisotnost vode v olju ali izpostavljenost olja zračni vlagi pospeši hidrolizo trigliceridov in nastanek prostih maščobnih kislin in glicerola. Nepravilno shranjevanje olj in izpostavljenost svetlobi ter kisiku močno pospeši oksidacijo olja, saj povzroči fotooksidacijo nenasičenih maščobnih kislin in nastanek hidroperoksidov. Fotooksidacijo lahko pospešijo tudi v olju prisotni klorofilni pigmenti, ki delujejo kot fotosenzibilizatorji (12, 13).

Vse te spremembe povzročijo zmanjšanje prehranske vrednosti olj in spremembe organoleptičnih lastnosti olj, kot so barva, vonj in okus. Zaradi tega je pomembno ustrezno shranjevanje rastlinskih olj, bogatih z večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami. Shranjevati jih moramo v dobro zaprti, kakovostni ovojnini (temno steklo), na hladnem, temnem prostoru (hladilnik), dosledno pa je potrebno upoštevati navedene roke uporabe. Ti so zaradi narave izdelka navadno precej kratki (12, 13).

1.3 Derivatizacija maščobnih kislin za nadaljnjo analizo

Pri analizi lipidnih vzorcev moramo lipidne komponente sprva ločiti in nato posamezne komponente identificirati in kvantificirati. Metoda izbora pri analizi lipidnih vzorcev je plinska kromatografija, pri kateri vzorce uparimo. Maščobne kisline in nekatere lipide z manjšo molekulsko maso lahko analiziramo neposredno, lipide z večjo molekulsko maso pa moramo pred analizo hidrolizirati na enostavnejše komponente ali derivatizirati v bolj hlapne spojine. Tudi maščobne kisline pred analizo s plinsko kromatografijo navadno derivatiziramo v metilne ali etilne estre, da povečamo hlapnost ter zmanjšamo pojav kromatografski repov (ang. *tailing*) zaradi polarne karboksilne skupine. Za lažjo identifikacijo maščobnih kislin v trigliceridih uporabljamo plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektroskopijo (4, 14).

Klasična metoda priprave metilnih (ali etilnih) estrov maščobnih kislin za GC analizo vključuje:

1. hidrolizo – umiljenje (kislinsko ali bazično hidrolizo) trigliceridov, nato ločbo prostih MK in neumiljive frakcije,
2. pripravo estrov s kislinsko ali bazično katalizirano reakcijo (kislinsko katalizirana je reakcija estrenja, medtem ko je reakcija preestrenja lahko bazično ali kislinsko katalizirana) (4).

Zaradi preprostejše in hitrejšje izvedbe lahko uporabimo tudi »*in situ*« metodo priprave metilnih estrov MK po Park in Goinsu, s čimer se izognemo zamudnemu koraku ločevanja prostih MK in neumiljive frakcije in preestrenje izvedemo v enem samem koraku (14).

1.4 Plinska kromatografija z masno spektrometrijo (GC-MS)

Razvoj plinske kromatografije je prinesel revolucijo v analitiko lipidnih vzorcev in določanje maščobnokislinske sestave. Plinska kromatografija, sklopljena z masno spektroskopijo, je kombinacija dveh analiznih tehnik za kvalitativno in kvantitativno ugotavljanje posameznih komponent v hlapnih vzorcih. GC-MS je zaradi hitrega časa analize in precej velike zanesljivosti danes metoda izbora za analizo lipidnih vzorcev (4, 15).

1.4.1 Plinska kromatografija

Pri plinski kromatografiji se komponente uparjenega vzorca porazdeljujejo med plinsko mobilno fazo, ki je navadno inerten plin (na primer helij ali vodik) in trdno ali tekočo stacionarno fazo, nanešena na steno kromatografske kolone, ki je navadno kapilara iz kremenčevega stekla. Ločbo komponent vzorca uravnavamo s temperaturnim programom. Komponente vzorca z mobilno fazo kemijsko ne reagirajo, mobilna faza zgolj prenese vzorec skozi kolono. Na podlagi različnega porazdeljevanja med fazama izkazujejo posamezne komponente različne retencijske čase, ki so osnova za kromatografsko ločbo.

Plinska kromatografija je uporabna metoda za identifikacijo in kvantifikacijo MK. Komponente vzorca identificiramo na osnovi primerjanja retencijskih časov z retencijskimi časi referenčnih spojin. Vendar se problem pojavi pri kompleksnejših vzorcih, saj so retencijski časi večkrat nenasičenih maščobnih kislin, kot so ALK in GLK, lahko zelo blizu skupaj, zato je zaradi delnega prekrivanja vrhov za kvantitativno vrednotenje nujna optimizacija kromatografske ločbe (15, 16).

1.4.2 Masna spektrometrija

Molekularna masna spektrometrija nam omogoča določitev elementne sestave vzorcev, ugotovitev struktur anorganskih, organskih in bioloških molekul, kvalitativno in kvantitativno ugotavljanje sestave kompleksnih vzorcev in ugotavljanje izotopskega razmerja atomov v vzorcu. Vzorec moramo ionizirati, nato pa posamezne ionske komponente detektiramo na podlagi razmerja mase iona z nabojem (ang. *m/z ratio*). Poznamo več vrst ionizacijskih tehnik, v splošnem pa ionske izvore delimo glede na to, ali uporabimo vzorec v plinasti ali v trdni/tekoči obliki. Pri plinastem vzorcu uporabljamo elektronsko ionizacijo (EI – ang. *electronic ionisation*), kemijsko ionizacijo (CI – ang. *chemical ionisation*) in ionizacijo v električnem polju (FI – ang. *field ionisation*). Pri trdnih in tekočih vzorcih uporabljamo desorpcijske ionizacijske tehnike in sicer desorpcijo v polju (FD – ang. *field desorption*), elektrosprej ionizacija (ESI – ang. *electrospray ionisation*), MALDI (ang. *Matrix-assisted laser desorption/ionisation*), plazemska desorpcija, hitro obstreljevanje z atomi (FAB – ang. *fast atom bombardment*), termosprej ionizacija (TS – ang. *thermospray ionisation*) (17, 18).

Glede na to, kakšen ionski izvor uporabimo, molekule med ionizacijo razpadejo na specifične fragmente. Te specifične fragmente zaznamo in ločimo z masnimi filtri in detektorji. Najpogosteje uporabljen masni filter je kvadrupolni masni analizator uporabljamo

pa tudi TOF (ang. *Time of Flight*) analizator in ionsko past. Kvadrupolni masni analizator je sestavljen iz štirih vzporednih cilindričnih palic, ki služijo kot elektrode. Nasprotni elektrodi sta med sabo povezani, pri čemer je en par priključen na pozitiven priključek enosmerne napetosti, drugi par palic pa na negativnega. Na oba para elektrod je priključen tudi izvor izmenične napetosti. Ioni iz ionskega izvora potujejo med temi štirimi elektrodami z veliko hitrostjo. Enosmerno napetost na elektrodah linearno spreminjamo, pri čemer ohranjamo razmerje med izmenično in enosmerno napetostjo konstantno. S tem dosežemo, da detektor v posameznih trenutku doseže le ion z določenim m/z razmerjem. Prednost kvadrupolnega masnega analizatorja je, da celoten spekter posnamemo v zelo kratkem času. Kot detektor uporabljamo elektronsko pomnoževalko, ki pozitivne ione pretvori v električni signal. Ojačan signal aparat pošlje na računalnik, kjer kot rezultat dobimo kromatogram celotnega ionskega toka (TIC – ang. *Total ion Current*), ki prikazuje skupek intenzitet vseh vrhov med eno analizo (17-19).

1.5 DPPH metoda za ugotavljanje antioksidativnega delovanja

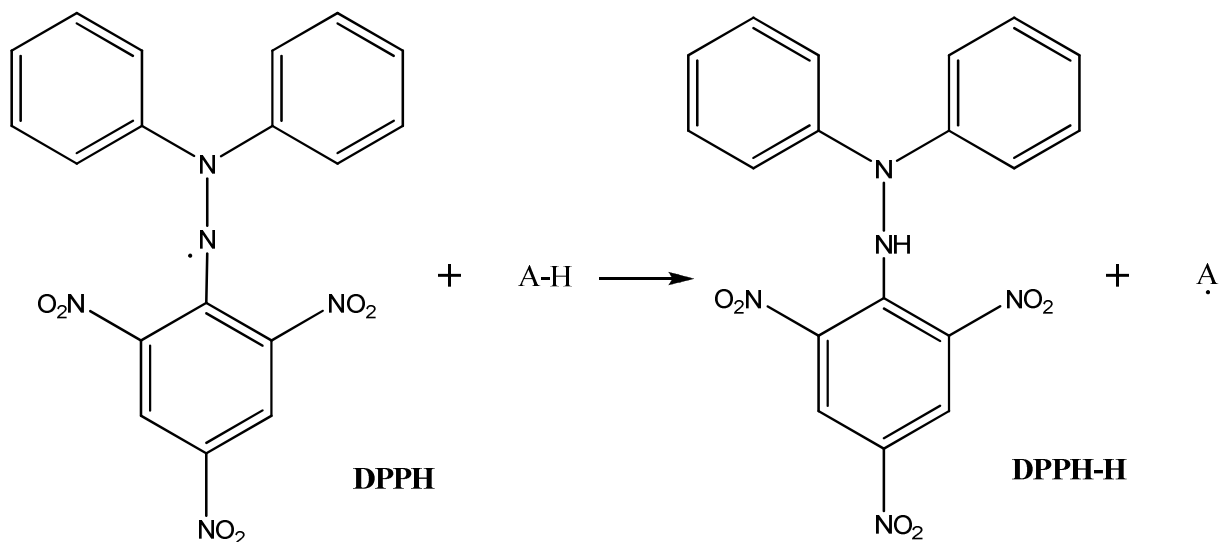
Za ugotavljanje antioksidativnega delovanja rastlinskih in jedilnih olj uporabljamo dve vrsti testov:

- 1) metode za ugotavljanje zmožnosti lovljenja radikalov,
- 2) metode, ki dokazujejo zmožnost inhibicije lipidne peroksidacije pri razmerah pospešene oksidacije (20).

DPPH metoda sodi v prvo skupino in je zaradi svoje preprostosti, hitre izvedbe in cenovne dostopnosti mnogokrat metoda izbora za ugotavljanje antioksidativnega potenciala čiste spojine, izvlečka ali biološkega vzorca. Poda hitro in zanesljivo informacijo o *in vitro* antioksidativnem delovanju preiskovanega vzorca (13, 21).

Molekula 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila ali DPPH je stabilen radikal, v katerem je prosti dušikov elektron delokaliziran po celotni molekuli. To daje molekuli stabilnost in intenzivno vijolično obarvanje. Ob reakciji z donorjem vodikovega iona oziroma antioksidantom, se DPPH reducira v neradikalno obliko hidrazina. Ob tem je vidno razbarvanje z intenzivno vijolične barve do rumene. Padec absorbance spremljamo spektrofotometrično, kar je najbolj vidno pri valovni dolžini 515-520 nm (13).

Raztopina reagenta DPPH je precej nestabilna in občutljiva na svetlobo, zato jo moramo pripravljati dnevno svežo in hraniti zaščiteno pred svetlobo.



Slika 2: Reakcijska shema reagenta DPPH z donorjem vodikovega iona oziroma antioksidanta. Radikalska oblika molekule, ki je na sliki prikazana na levi strani, je intenzivno vijolično obarvana, medtem ko je neradikalska oblika (na desni) obarvana le blago rumeno.

2. NAMEN DELA

V magistrskem delu bomo ugotovili sestavo maščobnih kislin v rastlinskih oljih, ki navadno vsebujejo velik delež α - in γ -linolenske kisline. To so hladno stiskana olja ali olja, ekstrahirana s superkritičnim ogljikovim dioksidom naslednjih rastlin: boreča, črnega ribeza, svetlina, španske kadulje, črne koprive, črne kumine, inkovske plukenecije, kivija in lana.

Sestavo maščobnih kislin v trigliceridih bomo ugotavljali s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektroskopijo po uveljavljeni metodi »*in situ*« *derivatizacije maščobnih kislin v metilne estre.*

V nadaljevanju bomo z optimizirano DPPH metodo ugotavljali antioksidativno aktivnost izbranih rastlinskih olj. Ker so navedena olja slabo obstojna in podvržena kvarjenju maščobnih komponent in lipidni peroksidaciji, bomo vzorce en teden izpostavili povišani temperaturi, svetlobi, zračnemu kisiku in zračni vlagi. Sestavo in morebiten padec antioksidativnega potenciala starih vzorcev bomo nato primerjali s svežimi vzorci.

Poskušali bomo najti povezavo med vsebnostjo α - in γ -linolenske kisline v rastlinskih oljih z njihovo oksidativno stabilnostjo in podvrženostjo kvarjenju po izpostavitvi zunanjim razmeram. Ugotoviti želimo, kako se sestava maščobnih kislin v trigliceridih olj spreminja s staranjem olja in kako to vpliva na antioksidativno delovanje izbranih olj.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Vzorci rastlinskih olj

Uporabili smo vzorce komercialno dostopnih rastlinskih olj, ki jih prodajajo za uporabo v kozmetiki ali kot prehranska dopolnila. Uporabili smo rastlinska olja različnih proizvajalcev, saj smo želeli ugotoviti variabilnost sestave maščobnih kislin. Interne številčne oznake vzorcev, ki smo jih uporabljali med analizo za lažje označevanje in razvrščanje podatkov, so navedene ob proizvajalcu, prav tako je navedeno ali gre za hladno stiskano olje ali za izvleček, pridobljen s superkritičnim ogljikovim dioksidom (kjer je bilo podatek mogoče pridobiti). Uporabljeni vzorci rastlinskih olj so naslednji:

- boreč (*Borago officinalis*) Dragonspice Naturwaren 6,
- boreč (*Borago officinalis*) Tovarna Organika 7,
- boreč (*Borago officinalis*) Caelo, rafiniran, 8,
- boreč (*Borago officinalis*) Farmalabor 9,
- črni ribez (*Ribes nigrum*) Dragonspice Naturwaren 10,
- črni ribez (*Ribes nigrum*) Behawe Naturprodukte 11,
- svetlin (*Oenothera biennis*) Dragonspice Naturwaren 24 hladno stiskano,
- svetlin (*Oenothera biennis*) Farmalabor 25,
- svetlin (*Oenothera biennis*) Alexmo cosmetics 26,
- svetlin (*Oenothera biennis*) Caelo, rafiniran 27 hladno stiskano,
- španska kadulja (*Salvia hispanica*) BaccaraRose, lot.3291 31, CO2 ekstrakt,
- španska kadulja (*Salvia hispanica*) Dragonspice Naturwaren 32, CO2 ekstrakt,
- španska kadulja (*Salvia hispanica*) BaccaraRose, lot 4505 33,
- črna kopriiva (*Perilla frutescens*) BaccaraRose 34, hladno stiskano,
- črna kumine (*Nigella sativa*) Caelo 35,
- inkovska plukenecija (*Plukenetia volubilis*) Magnolija 36,
- kivi (*Actinidia chinensis*) Dragonspice Naturwaren 37,
- lan (*Linum usitatissimum*) BaccaraRose 38, hladno stiskano,
- lan (*Linum usitatissimum*) Farmalabor 39,
- lan (*Linum usitatissimum*) Caelo 40.



Slika 3: Fotografija prikazuje uporabljene vzorce rastlinskih olj in njihove številčne oznake.

Pri optimizaciji DPPH metode in izbiranju ustrezne zmesi topil smo zaradi intenzivnega obarvanja in lažjega spremljanja topnosti uporabili tudi rastlinsko olje:

- rakitovec (*Hippophae rhamnoides*), BioKing Sanddorn Frucht Öl.

Alexmo Cosmetics (Weyhe, Nemčija)

Behawe Naturprodukte (Rietberg, Nemčija)

Bio King, Philipp Loicht (Kundl, Avstrija)

Caelo - Caesar & Loretz GmbH (Hilden, Nemčija)

Dragonspice Naturwaren, Christian Recke (Reutlingen, Nemčija)

Farmalabor Srl (Canosa di Puglia, Italija)

Magnolija (Gabrovka, Slovenija)

Tovarna Organika (Trzin, Slovenija)

3.1.2 Reagenti

3.1.2.1 Priprava metilnih estrov maščobnih kislin za GC-MS analizo

- diklorometan, p. a., Panreac (Castellar del Vallès, Španija),
- natrijev hidroksid, p. a., Merck (Darmstadt, Nemčija),
- metanol, p. a., Merck (Darmstadt, Nemčija),
- 14 % borov trifluorid v metanolu, Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija),
- heksan, p. a., Panreac (Castellar del Vallès, Španija),
- prečiščena voda, Fakulteta za farmacijo (Ljubljana, Slovenija),
- metilni estri maščobnih kislin F.A.M.E. Mix (C4-C24), Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija).

3.1.2.2 Ugotavljanje antioksidativne aktivnosti z modificirano DPPH metodo

- metanol, p. a., Panreac (Castellar del Vallès, Španija),
- 2-butanon, p. a., Merck (Darmstadt, Nemčija),
- DPPH, Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija)
- galna kislina, p. a., Fluka (Buchs, Švica),
- (+)- α -tokoferol, tip U - 1000 IU/g, Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija).

3.1.3 Aparature in laboratorijska oprema

- analizna tehtnica XS205, Mettler Toledo (Greifensee, Švica),
- UV-VIS spektrofotometer Nanocolor UV/VIS, Machery-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Nemčija),
- grelna plošča, Končar – Elektroindustrija d.d (Zagreb, Hrvaška),
- 2 ml Safe-Lock Tubes, Eppendorf AG (Hamburg, Nemčija),
- 2 ml steklene vialo za GC-MS analizo, Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija),
- 15 ml plastične epruvete, TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Švica),
- avtomatske pipete Proline, Biohit (Helsinki, Finska),
- nastavki za avtomatske pipete, Eppendorf AG (Hamburg, Nemčija),
- računalniški program ChemDraw Ultra 11.0, CambridgeSoft, Perkin Elmer (Waltham, MA, ZDA).

3.2 Metode

3.2.1 Priprava metilnih estrov maščobnih kislin z metodo "in situ" preestrenja in ugotavljanje maščobnokislinske sestave z GC-MS analizo

Za pripravo metilnih estrov maščobnih kislin smo uporabili modificiran postopek po Parku in Goinsu (14). Trigliceride smo razgradili na posamezne maščobne kisline z reakcijo umiljenja z natrijevim hidroksidom v metanolu in jih nato »in situ« preestri v metilne estre z borovim trifluoridom v metanolu.

3.2.2 Plinska kromatografija z masno spektrometrijo (GC-MS)

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

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

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

Kromatografske razmere:

- nosilni plin: helij,
- pretok plina: 1 ml/min,
- pretok plina: 1 ml/min,
- način injiciranja: »split« (1:100),
- temperaturni program: začetna temperatura 160°C, nato dvig temperature 5 °C/min do 300 °C in 10 min pri 300 °C,
- temperatura injektorja: 250 °C,
- temperatura ionskega izvora: 200 °C,
- temperatura vmesnika: 300 °C,
- volumen injiciranja: 1 µl,
- napetost na detektorju: 1 kV,
- frekvenca zajemanja podatkov: 5 Hz,
- območje odčitavanja relativne molekulske mase: 35-500
- celoten čas analize: 38 min.



Slika 4: GC-MS aparatura, ki smo jo uporabili pri analizi.

3.2.3 DPPH metoda za ugotavljanje antioksidativnega delovanja

Za ugotavljanje antioksidativnega delovanja rastlinskih olj smo uporabili DPPH metodo. Metoda je osnovana na spektroskopskem merjenju padca absorbanca pri valovni dolžini 515 – 520 nm. Padec absorbanca je posledica zmanjšanja radikalske oblike 2,2-difenilpikrilhidrazila, ki se v reakciji z antioksidantom pretvori v ustrezen hidrazin.

4. EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 Priprava metilnih estrov maščobnih kislin z metodo »in situ« preestrenja in ugotavljanje maščobnokislinske sestave z GC-MS analizo

Trigliceride smo razgradili na posamezne maščobne kisline z reakcijo umiljenja z 0,5 M natrijevim hidroksidom v metanolu in jih nato »in situ« preestri v metilne estre z borovim trifluoridom v metanolu. Vzorcev nismo prepihovali z dušikom. Uporabili smo dvakrat večji volumen reagenta, pri čemer smo s presežkom reagenta zagotovili kvantitativen potek reakcije.

Pred začetkom dela smo dali vsa olja iz hladilnika in pustili, da se segrejejo na sobno temperaturo. Namesto volumskega odmerjanja 10 µl smo zaradi večje natančnosti in enakomernosti mase olja raje tehtali 10 mg olja. Vodno kopel smo nastavili tako, da smo na grelno ploščo postavili večji lonec z vročo vodo, katere temperaturo smo nadzirali s termometrom, z dodajanjem hladnejše vode in večanjem jakosti grelnika. Uporabili smo tudi plastične plovčke, v katere smo postavili plastične epruvete.

Postopek izvedbe:

10 mg rastlinskega olja (zatehta od 9,50 mg - 10,50 mg) smo z avtomatsko pipeto dodali 10 µl diklorometana in nato še 200 µl 0,5 M natrijevega hidroksida v metanolu. Reakcijsko mešanico smo 10 min segrevali na vodni kopeli pri temperaturi 90 °C. Zmes smo ohladili na sobno temperaturo, pri čemer smo opazili pojav bele usedline. Dodali smo 200 µl 14% borovega trifluorida v metanolu in nastala oborina se je raztopila. Segrevali smo 10 min na vodni kopeli pri 90 °C. Ko se je reakcijska zmes ponovno ohladila na sobno temperaturo, smo dodali 200 µl prečiščene vode in 1 ml heksana. Ekstrakcijo smo izvedli z močnim ročnim stresanjem plastične epruvete z reakcijsko zmesjo 1 min. Pri tem se je raztopina kar precej ohladila. Pustili smo, da sta se organska in vodna faza ločili, nato pa smo zgornjo plast z avtomatsko pipeto previdno prenesli v stekleno vialo za GC-MS analizo.

Priprava reagentov:

- NaOH v metanolu: 1,0 g pelet natrijevega hidroksida smo raztopili v 50 ml metanola

Optimizacija metode: Vzorce smo sprva na vodni kopeli segrevali v epruветah, vendar so se le-te prevračale, se zaradi izparevanja metanola in heksana odpirale in tako razlile. Nato smo

poskusili segrevati v steklenih vialah za HPLC analizo na ultrazvočni kadički - tu je vzorec skoraj popolnoma izparel, pokrovčki vial pa so se odvili. Prav tako ultrazvočna kadička ni dosegla želene temperature, prišli smo le do 75 °C. Zato smo se na koncu odločili za segrevanje vzorcev v 15 ml plastičnih epruvetah v vodni kopeli, temperaturo pa smo nadzorovali s termometrom v območju 90-100 °C.

Priprava raztopin referenčnih spojin metilnih estrov maščobnih kislin

Za potrjevanje identitete spojin smo pripravili raztopino referenčnih spojin metilnih estrov maščobnih kislin s koncentracijo 1,0 mg/ml v heksanu. V vialo na analizni tehtnici smo natehtali 1,0 mg zmesi metilnih estrov maščobnih kislin (F. A. M. E. Mix C4-C24) in dodali 1 ml heksana. Raztopino smo injicirali v GC-MS sistem pri enakih kromatografskih razmerah, kot smo posneli raztopine vzorcev, pripravljenih z »*in situ*« metodo esterifikacije maščobnih kislin.

4.2 Staranje olj

V 2 ml epruvete smo z avtomatsko pipeto odmerili po 1 ml vsakega vzorca olja in jih označili. Odprte epruvete smo postavili v držalo in jih z držalom vred postavili ven na okensko polico. Tam so bile en teden (23. 6. 2014 – 29. 6. 2014) izpostavljene sončni svetlobi, povišani temperaturi, zračnemu kisiku in zračni vlagi.

4.3 Ugotavljanje antioksidativnega potenciala vzorcev olj po modificirani DPPH metodi

Izbor optimalnega topila

Preizkusili smo topnost rastlinskih olj v naslednjih topilih in zmesih topil: aceton, metanol, etilacetat, tetrahidrofuran, butanol, 2-butanon, 5, 10, 20 in 50-odstotni aceton v metanolu, 5, 10, 20 in 50-odstotni izopropanol v metanolu, 5, 10, 20 in 50-odstotni 2-butanon v metanolu. Zatehtali smo 60 mg olja in ga poskušali raztopiti v 1 ml topila ali zmesi topil in paralelno 0,4 mg DPPH v 10 ml topila ali zmesi topil. Pri ugotavljanju topnosti olj smo zaradi intenzivne rumene barve uporabili vzorec olja rakitovca.

Rastlinska olja

V 10 ml plastične epruvete smo na analizni tehtnici natehtali 15 mg vzorca rastlinskega olja (oziroma naknadno 7,5 mg ali 3 mg). Z avtomatsko pipeto smo olju dodali 1 ml DPPH, raztopljenega v zmesi 2-butanona in metanola (1:1). Raztopino DPPH reagenta smo vsak dan pripravili svežo tako, da smo zatehtali 4 mg trdnega DPPH reagenta in ga raztopili v 100 ml zmesi 2-butanona in metanola. Tako raztopino smo shranjevali zaščiteno pred svetlobo ovito v aluminijasto folijo.

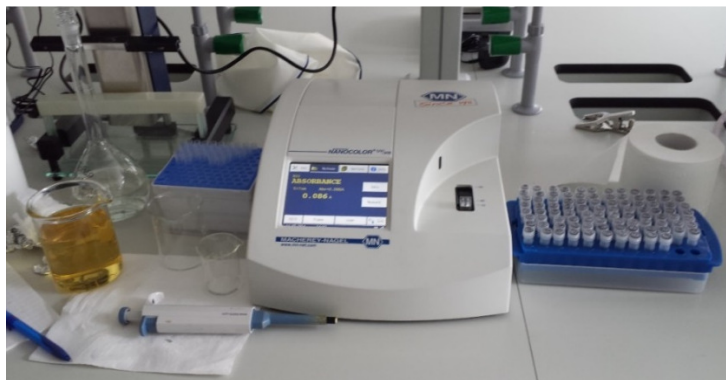
Reakcijsko zmes z oljem in raztopino DPPH reagenta smo dobro premešali in zaščiteno pred svetlobo pustili reagirati 30 min. Vsako plastično epruveto smo zavili v aluminijasto folijo, nato pa še celotno stojalo z epruvetami ter ga postavili v zatemnjeno laboratorijsko omarico. Po pretečenem inkubacijskem času 30 min smo vzorcem pomerili absorbanco pri valovni dolžini 517 nm. Ob vsakem merjenju smo izmerili še absorbanco slepe raztopine in absorbanco kontrolne raztopine.

Slepa raztopina: 40 μ l raztopine topila (2-butanon:metanol = 1:1, v/v), ki smo ji dodali 1 ml DPPH reagenta v enaki zmesi topil

Kontrolna raztopina: 40 μ l raztopine galne kisline (pripravljene tako, da smo 10 mg galne kisline raztopili v 10 ml zmesi 2-butanona in metanola (1:1, v/v)), ki smo ji dodali 1 ml DPPH reagenta v enaki zmesi topil.

Antioksidativno delovanje rastlinskih olj proti radikalom molekule DPPH smo izračunali po naslednji enačbi:

$$AOP = (A_{\text{slepa}} - A_{\text{vzorec}}) / (A_{\text{slepa}} - A_{\text{kontrola}}) \times 100$$



Slika 5: Spektrofotometer, uporabljen za merjenje absorbanco vzorčnih, kontrolnih in slepih raztopin.

Priprava raztopin standarda tokoferola: Pred meritvami absorbanc vzorcev smo na enak način pomerili antioksidativni potencial standarda (+)- α -tokoferola.

Raztopine tokoferola smo pripravili z raztapljanjem v zmesi 2-butanona in metanola (1:1, v/v).

Preglednica I: Priprava standardnih raztopin tokoferola.

Oznaka raztopine	Koncentracija tokoferola (mg/kg topila)	Priprava raztopine
A	2500	25 mg tokoferola v 10 ml topila
B	1250	5 ml raztopine A smo dodali 5 ml topila
C	625	5 ml raztopine B smo dodali 5 ml topila
D	300	3 mg tokoferola v 10 ml topila
E	50	5 ml raztopine D smo dodali 5 ml topila
F	75	5 ml raztopine E smo dodali 5 ml topila
G	37,5	5 ml raztopine F smo dodali 5 ml topila

Vsaki raztopini tokoferola smo absorbanco izmerili v treh neodvisnih ponovitvah, celotno analizo pa smo izvedli v celoti trikrat v treh različnih dnevih. Z izračunom umeritvene krivulje tokoferola vseh treh ponovitev smo določili koncentracijsko območje, kjer metoda še daje linearen odziv v korelaciji z naraščajočo koncentracijo tokoferola. Tokoferol smo uporabili kot modelni antioksidant, saj smo predpostavili, da v lipidnih vzorcih predstavlja glavno antioksidativno spojino. Mejna vrednost linearne odziva je 80 % AOP. Pri višjih vrednostih DPPH reagenta zmanjka in meritve niso več zanesljive, saj DPPH reagent ne more več zreagirati z antioksidanti v vzorcu.

Pri svežih vzorcih s številčnimi oznakami 8, 11, 27, 35 in 36 in staranih vzorcih 27, 35 in 36, kjer je bil izračunan AOP večji od 80 %, smo meritve ponovili z manjšimi zatehtami (7,5 mg, 3 mg, 1 mg), dokler nismo dobili vrednosti AOP nižje kot 80 %. To dobljeno vrednost smo nato množili z ustreznim faktorjem (2, 5, 15), da smo dobili vrednosti, preračunane na maso olja 15 mg.

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. Ugotovitev maščobnokislinske sestave vzorcev rastlinskih olj

Metilne estre maščobnih kislin smo identificirali s primerjavo masnih spektrov vzorcev z masnimi spektri čistih komponent, ki so shranjene v knjižnici masnih spektrov. Ustrezno sestavo komponente vzorca smo potrdili s primerjanjem rezultatov, ki smo jih dobili z analizo raztopin standardov F. A. M. E. Mix C4-C24. Vrednosti površine pod krivuljo posamezne komponente v vzorcu v odstotkih, ki smo jih dobili z GC-MS analizo, direktno korelirajo s sestavo posameznih MK v trigliceridih, saj je odziv za metilne estre MK pri GC-MS analizi pri posameznih meritvah zelo enakomeren in primerljiv. Tako lahko predpostavimo, da je odstotek površine pod krivuljo posameznega metilnega estera maščobne kisline premo sorazmeren s količino posamezne MK v vzorcu. Vse vzorce smo na GC-MS analizo injicirali v enkratni ponovitvi.

V naslednji preglednici so zbrane vse maščobne kisline, ki smo jih zaznali v vzorcih rastlinskih olj. Zbrane so oznake, imena maščobnih kislin po IUPAC-u, trivialna imena in kemijske formule.

Preglednica II: Maščobne kisline, detektirane v vzorcih rastlinskih olj

Oznaka	Ime maščobne kisline (IUPAC)	Trivialno ime	Kemijska formula
C14:0	tetradekanojska kislina	miristinska kislina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
C16:1 (Δ^9)	(9Z)-9-heksadecenojska kislina	palmitoleinska kislina	$\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}_2$
C16:0	heksadekanojska kislina	palmitinska kislina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
C16	14-metilpentadekanojska kislina	izopalmitinska kislina	$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$
C18:3 ($\Delta^{9,6,12}$)	(9Z,6Z,12Z)-9,6,12-oktadekatrienojska kislina	γ -linolenska kislina	$\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2$
C18:2 ($\Delta^{9,12}$)	(9Z,12Z)-9,12-oktadekadienojska kislina	linolna kislina	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$
C18:3 ($\Delta^{9,12,15}$)	(9Z,12Z,15Z)-9,12,15-oktadekatrienojska kislina	α -linolenska kislina	$\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2$
C18:1 (Δ^9)	(9Z)-9-oktadecenojska kislina	oleinska kislina	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$
C18:1	(11E)-11-oktadecenojska kislina	vakcenska kislina	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$
C18:1	(9E)-9-oktadecenojska kislina	elaidinska kislina	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$
C18:0	oktadekanojska kislina	stearinska kislina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
C20:2 ($\Delta^{11,14}$)	(11Z,14Z)-11,14-eikozadienojska kislina	eikozadienojska kislina	$\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_2$
C20:1 (Δ^{11})	(11Z)-11-eikozenojska kislina	gondojska kislina	$\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{O}_2$
C20:0	eikozanojska kislina	arašidna kislina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
C22:1 (Δ^{13})	(13Z)-13-dokozenojska kislina	erucinska kislina	$\text{C}_{22}\text{H}_{42}\text{O}_2$
C22:0	dokozenojska kislina	behenska kislina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$

V naslednjih preglednicah so prikazani deleži posameznih maščobnih kislin v vseh proučevanih rastlinskih oljih.

Preglednica III: Sestava MK v svežih in staranih vzorcih olj boreča in črnega ribeza

Vsebnost maščobnih kislin - površina pod krivuljo (%)												
Rastlinsko olje	BOREČ: Vsebnost maščobnih kislin - površina pod krivulja (%)								ČRNI RIBEZ			
Proizvajalec	<i>Dragonspice Naturwaren</i>		<i>Tovarna Organika</i>		<i>Caelo</i>		<i>Farmalabor</i>		<i>Dragonspice Naturwaren</i>		<i>Behawe Naturprodukten</i>	
Maščobna kislina	svež vzorec	staran vzorec	svež vzorec	staran vzorec	svež vzorec	staran vzorec	svež vzorec	staran vzorec	svež vzorec	staran vzorec	svež vzorec	staran vzorec
miristinska kislina							0,06					0,05
palmitoleinska kislina												0,05
palmitinska kislina	7,38	6,77	8,05	7,53	8,03	7,81	9,90	8,92	5,83	5,21	4,45	6,98
izopalmitinska kislina												
γ -linolenska kislina - GLA	8,44	7,14	15,2	13,6	15,4	13,9	17,4	14,9	9,28	6,40	7,08	11,2
linolna kislina	46,5	46,5	45,8	46,0	42,9	43,9	40,5	42,9	45,4	47,5	51,2	49,9
α -linolenska kislina - ALA									12,9	12,1	16,6	14,0
oleinska kislina	30,6	32,3	22,2	23,6	24,7	25,7	23,2	24,0	20,8	24,4	17,2	14,3
vakcenska kislina					0,11	0,14		1,38	1,62	0,33	1,46	1,32
elaidinska kislina	0,17	0,18	1,08	0,98			0,27					
stearinska kislina	5,34	5,40	5,15	5,52	5,98	5,87	5,16	5,01	3,34	3,29	1,88	1,66
eikozadienojska kislina (20:2)												
gondojska kislina	1,31	1,34	2,03	2,21	2,28	2,14	2,48	2,20	0,80	0,61	0,25	0,49
arašidna kislina							0,10					
erucinska kislina	0,30	0,44	0,50	0,66	0,65	0,63	1,02	0,68		0,11		
behenska kislina												

Preglednica IV: Sestava MK v svežih in staranih vzorcih olj svetlina, črne koprive in črne kumine

Vsebnost maščobnih kislin - površina pod krivuljo (%)												
Rastlinsko olje	SVETLIN: Vsebnost maščobnih kislin - površina pod krivulja (%)								ČRNA KOPRIVA		ČRNA KUMINA	
Proizvajalec	<i>Dragonspice Naturwaren</i>		<i>Farmalabor</i>		<i>Alexmo</i>		<i>Caelo</i>		<i>BaccaraRose</i>		<i>Caelo</i>	
Maščobna kislina	svež vzorec	staran vzorec	svež vzorec	staran vzorec	svež vzorec	staran vzorec	svež vzorec	staran vzorec	svež vzorec	staran vzorec	svež vzorec	staran vzorec
miristinska kislina											0,06	0,11
palmitoleinska kislina												0,10
palmitinska kislina	4,70	4,11	5,23	4,67	4,69	3,96	4,24	3,60	3,75	5,15	9,29	11,9
izopalmitinska kislina												
γ-linolenska kislina - GLA	2,73	2,04	2,00	1,43	4,88	3,43	4,39	3,03				
linolna kislina	71,0	72,7	53,2	53,6	79,9	82,9	80,0	82,6	6,63	8,77	55,1	55,8
α-linolenska kislina - ALA									67,5	67,5		
oleinska kislina	17,3	17,5	34,5	34,6	7,28	6,89	8,08	7,97	18,0	15,2	29,3	25,1
vakcenska kislina	1,43	1,12			1,16	1,01		0,99	2,04	1,71	2,03	2,69
elaidinska kislina			0,18	1,37			1,19					
stearinska kislina	2,93	2,51	4,34	4,01	2,10	1,77	2,09	1,82	2,04	1,69	3,49	3,01
eikozadienojska kislina (20:2)											0,69	1,08
gondojska kislina			0,33	0,26							0,08	0,19
arašidna kislina												
erucinska kislina			0,08									
behenska kislina			0,08	0,07								

Preglednica V: Sestava MK v svežih in staranih vzorcih olj lana in španske kadulje

Rastlinsko olje	Vsebnost maščobnih kislin - površina pod krivuljo (%)											
	LAN						ŠPANSKA KADULJA					
	Farmalabor		Caelo		BaccaraRose		BaccaraRose 3291		Dragonspice Naturwaren		BaccaraRose 4505	
Proizvajalec	svež vzorec	staran vzorec	svež vzorec	staran vzorec	svež vzorec	staran vzorec	svež vzorec	staran vzorec	svež vzorec	staran vzorec	svež vzorec	staran vzorec
Maščobna kislina												
miristinska kislina				0,03								
palmitoleinska kislina												
palmitinska kislina	3,78	5,09	3,67	5,06	3,4	4,66	4,86	4,13	4,54	5,83	4,56	5,87
izopalmitinska kislina												0,07
γ -linolenska kislina - GLA												
linolna kislina	8,10	11,9	8,46	11,7	9,55	13,2	12,1	10,0	11,6	13,1	10,7	13,2
α -linolenska kislina - ALA	58,1	57,7	53,3	54,1	58,0	57,4	66,6	69,0	66,7	66,1	67,5	66,3
oleinska kislina	23,5	19,7	27,0	22,8	24,9	20,3	11,2	11,9	11,4	10,0	11,5	9,74
vakcenska kislina	1,64	1,53	2,07	1,75			1,40	1,38	1,54	1,38	1,44	1,20
elaidinska kislina				0,04	0,2	1,13						
stearinska kislina	4,86	4,04	5,44	4,54	3,99	3,3	3,80	3,59	4,32	3,58	4,39	3,62
eikozadienojska kislina (20:2)												
gondojska kislina												
arašidna kislina												0,03
erucinska kislina												
behenska kislina												

Preglednica VI: Sestava MK v svežih in staranih vzorcih olj inkovske plukenecije in kivija

Rastlinsko olje	Vsebnost maščobnih kislin - površina pod krivuljo (%)			
	INKOVSKA PLUKENECIJA		KIVI	
Proizvajalec	<i>Magnolija</i>		<i>Dragonspice Naturwaren</i>	
Maščobna kislina	svež vzorec	staran vzorec	svež vzorec	staran vzorec
miristinska kislina				
palmitoleinska kislina				
palmitinska kislina	2,55	3,77	3,41	4,81
izopalmitinska kislina				
γ -linolenska kislina - GLA				
linolna kislina	29,7	33,8	7,45	10,4
α -linolenska kislina - ALA	49,0	48,2	68,5	67,4
oleinska kislina	13,8	11,4	17,5	14,7
vakcenska kislina	1,44			0,10
elaidinska kislina			0,12	
stearinska kislina	3,50	2,91	2,89	2,44
eikozadienojska kislina (20:2)				
gondojska kislina			0,07	0,09
arašidna kislina				
erucinska kislina				
behenska kislina				

Maščobnokislinska sestava rastlinskih olj v povezavi z antioksidativnim delovanjem

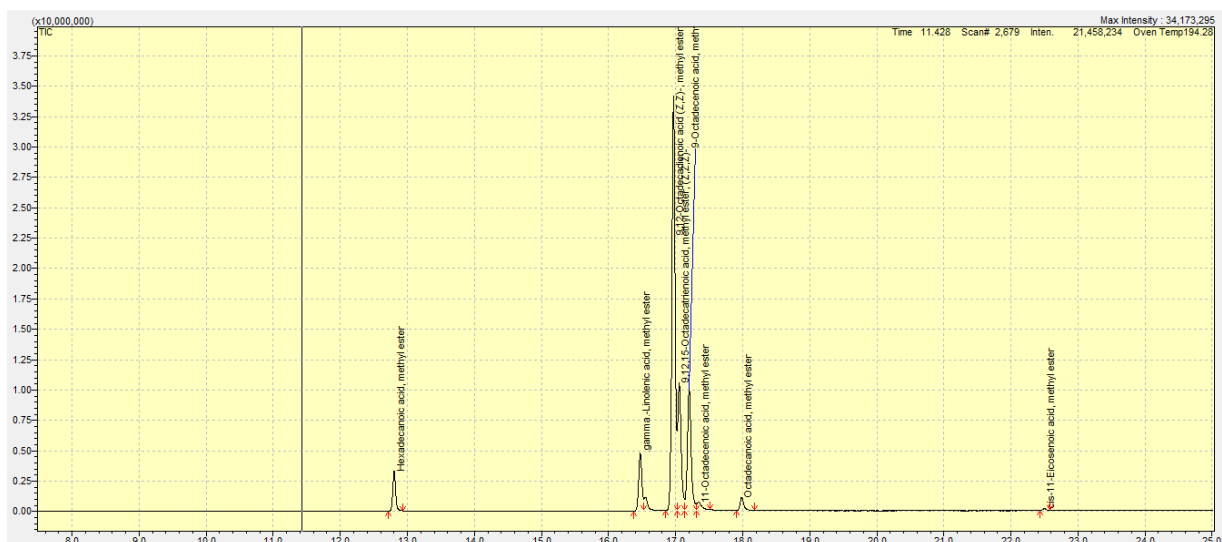
Boreč

Preizkušali smo štiri borečeva olja različnih proizvajalcev: Dragonspice Naturwaren, Tovarna Organika, Caelo in Farmalabor. V borečevem olju najdemo največji delež linolne kisline (svež: 40,5-46,5 %) in oleinske kisline (svež: 22,2-30,6 %, staran: 23,6-32,3 %). Deleži GLK v svežih vzorcih olja so bili v območju 8,4-17,4%, v staranih vzorcih olja pa 7,1-14,9 %. Najmanjšo vsebnost GLK je imel vzorec olja proizvajalca Dragonspice Naturwaren, največjo vsebnost pa vzorec olja proizvajalca Naturwaren. V literaturi navajajo vsebnost GLK v borečevem olju od 17-25 % (7). Meritev vsebnosti je bila torej na spodnji meji, vendar vseeno v pričakovanem območju. Poleg naštetih MK najdemo v borečevih oljih še naslednje: palmitinska kislina (6,8-9,9 %), stearinska, gondojska, erucinska in elaidinska.

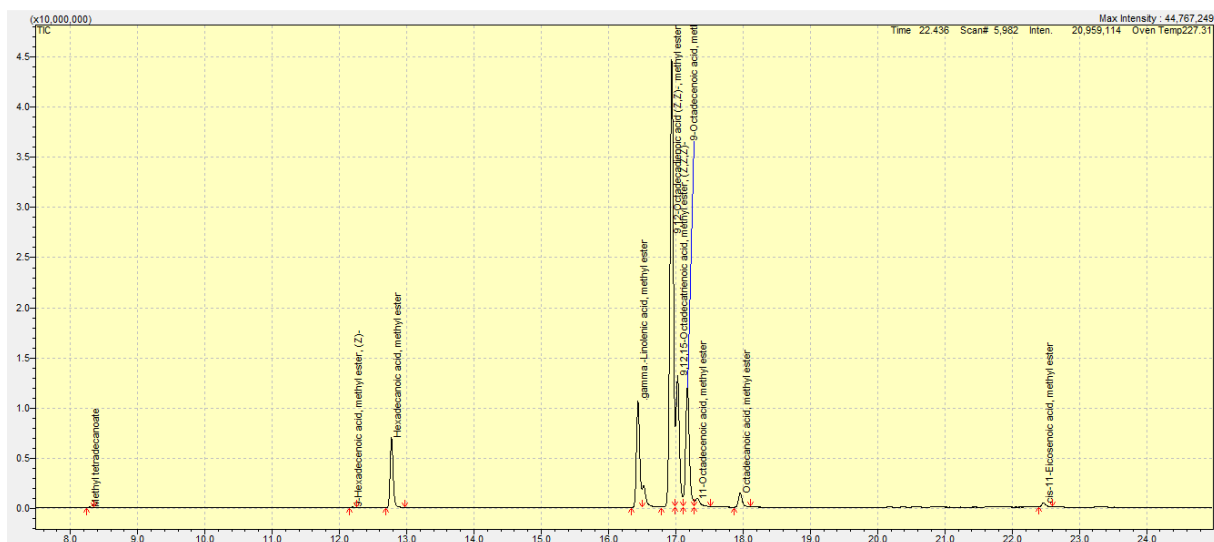
Črni ribez

Črni ribez je edini preiskovani vzorec, ki je hkrati vseboval tako α -linolensko kislino kot tudi γ -linolensko kislino. Vsebnost ALK pri svežih vzorcih je bila 16,6-12,9 %, medtem ko je bila pri staranih vzorcih še vedno v območju 12,1-14,0 %. Vsebnost GLK v vzorcih je variirala med 7,1-9,3 % pri svežih vzorcih in med 6,4-11,7 % pri staranih vzorcih. Izmerjena vsebnost GLK 15,8 %, je sicer malo nižja, vendar vseeno primerljiva z literaturnimi podatki (7). Poleg omenjenih maščobnih kislin, vsebuje olje črnega ribeza še linolno (45-50 %), oleinsko, palmitinsko, stearinsko, vakcensko in gondojsko kislino. Po literaturnih podatkih je olje črnega ribeza zelo bogato tudi s tokoferoli (1716 mg/kg olja), od tega naj bi bilo največ, kar 34,8 % α -tokoferola, ki je najbolj biološko aktivna oblika. Glavna funkcija tokoferolov v olju je zaščita VNMK pred peroksidacijo. To je v skladu z našimi ugotovitvami, saj se deleži ALK in GLK po staranju skoraj ne razlikujejo od deležev istih MK v svežih vzorcih. Zaznali pa smo kar precejšen padec antioksidativnega potenciala, kar nakazuje na zmanjšanje vsebnosti tokoferolov in drugih komponent, ki izkazujejo antioksidativno delovanje.

Ker je olje črnega ribeza edino preiskovano olje, ki hkrati vsebuje tako ALK kot GLK, smo priložili reprezentativen kromatogram GC-MS analize svežega in staranega vzorca olja Dragonspice Naturwaren.



Slika 6: Kromatogram, ki prikazuje maščobnokislinsko sestavo svežega vzorca olja črni ribez Behawe Naturprodukten



Slika 7: Kromatogram, ki prikazuje maščobnokislinsko sestavo staranega vzorca olja črnega ribeza Behawe Naturprodukten

Svetlin

Deleži posameznih maščobnih kislin so se pri štirih različnih vzorcih svetlinovega olja kar precej razlikovali. Najbolj se je od drugih vzorcev razlikoval vzorec Farmalabor, ki je imel manjši delež LK (53 %, svež in staran) in bistveno večji delež oleinske kisline (34 %, svež in staran). Prav tako je vzorec v manjših količinah vseboval še nekatere dodatne maščobne kisline, ki jih v drugih vzorcih nismo zaznali, to so elaidinska, gondojska, erucinska in behenska kislina.

Drugi vzorci, Dragonspice Naturwaren, Alexmo in Caelo, so vsebovali največ linolne kisline (80,0-71,0 % sveži in 72,7-83,0 % starani), sledila je oleinska kislina (8,1-17,3 % sveži in 6,9-17,5 % starani), palmitinska (3,6-4,7 %), stearinska, GLK in vakcenska kislina. Vsebnost GLK v naših oljih so bile bistveno manjše od poročanih 7-10 % (7) in so bile v območju od 4,9 % (za svež vzorec Alexmo) do 1,4 % (za staran vzorec Farmalabor).

Pri vseh vzorcih smo izmerili skoraj za polovico manjšo vsebnost GLK kot smo zasledili v literaturi (7). Predpostavimo lahko, da olja različnega geografskega porekla vsebujejo različne koncentracije GLK, prav tako je vsebnost GLK odvisna od načina ekstrakcije olja, kakovosti vhodnega materiala in shranjevanja olja tekom predpisanega roka uporabe.

Španska kadulja

Olje španske kadulje, ki ga pogosto prodajajo pod imenom olje iz semen čije oziroma oljne kadulje, je znano predvsem po visoki vsebnosti ALK. Naše analize so to potrdile pri vseh treh testiranih vzorcih olj, BaccaraRose lot. 3291 in lot. 4505, Dragonspice Naturwaren, pri katerih so bili deleži ALK tako pri svežih kot pri staranih oljih nad 66 %. Druge maščobne kisline, prisotne v oljih španske kadulje, so bile: linolna kislina (10,0-13,2 %), oleinska kislina (9,7-11,9 %), palmitinska kislina (4,1-5,9 %), stearinska kislina (3,6-4,4 %) in vakcenska kislina (1,2-1,5 %). Rezultati so v skladu z literaturnimi navedbami o sestavi olja španske kadulje (22).

Pri španski kadulji smo za razliko od drugih vzorcev med seboj lahko primerjali ne samo olja različnih proizvajalcev, temveč tudi olja istega proizvajalca različne serijske številke. Ugotovili smo, da imata obe olji proizvajalca BaccaraRose zelo primerljive vsebnosti vseh vrednotenih maščobnih kislin. Zelo konsistentne so bile vsebnosti MK v svežih oljih. Manjša razlika se je pojavila pri merjenju maščobnokislinske sestave staranih olj, kjer smo pri vzorcu BaccaraRose lot. 4505 zaznali večji padec koncentracije oleinske kisline (9,7 %, svež vzorec: 11,5 %) kot pri vzorcu BaccaraRose lot. 3291 (staran vzorec: 11,9 %, svež vzorec: 11,2 %).

Črna kopriva

Olje črne koprive vsebuje visok delež ALK 67,5 %, ki ostaja konstanten tako pri svežem kot staranem vzorcu. Pričakovali smo, da se bo delež ALK tekom staranja zmanjšal, saj je le-ta zaradi dvojnih vezi v svoji strukturi bolj podvržena oksidacijam, polimerizacijam in

izomerizacijam dvojnih vezi. Vendar je verjetno olje črne koprive vsebovalo dovolj naravno prisotnih antioksidantov, ki so ALK zaščitili pred razpadom in padcem koncentracije MK. Določena vrednost ALK je nekoliko višja, kakor navajajo literaturni podatki: 49,3–51,6% (23). Poleg ALK so v olju črne koprive prisotne še naslednje MK: oleinska (svež 18,1 %, staran 15,2 %), linolna, palmitinska, vakcenska in stearinska kislina.

Črna kumina

Olje črne kumine ne vsebuje ne ALK in ne GLK, v nasprotju z večino drugih analiziranih rastlinskih olj pa vsebuje majhen delež miristinske kisline. Vsebuje velik delež linolne kisline (55,1 % svež vzorec, 55,8 % staran vzorec), sledijo ji oleinska kislina (svež 29,3 %, staran 25,1 %), palmitinska, stearinska, vakcenska, eikozadienojska, gondojska in miristinska kislina. Olje črne kumine je zelo bogato z večkrat nenasičenimi MK in ga zaradi njegovega pozitivnega učinka na zdravje pogosto uporabljajo kot prehransko dopolnilo. Dobljeni rezultati so primerljivi z že objavljenimi rezultati o maščobnokislinski sestavi hladno stiskanega olja črne kumine (24).

Inkovska plukenecija

Olje inkovske plukenecije vsebuje največ ALK (49,0 %) in linolne kisline (29,7 %), sledijo oleinska (13,8 %), stearinska (3,50%), palmitinska (2,55 %) in vakcenska kislina (1,44 %). Preračunano razmerje med n-6 in n-3 maščobnimi kislinami je 0,61 %, kar je primerljivo ter še bolj ugodno kot poročana vrednost 0,73 %. Tudi vsebnosti posameznih maščobnih kislin so zelo primerljive z literaturnimi podatki, ki navajajo, da kar 93 % vseh maščobnih kislin predstavljajo nenasičene MK (25, 26). Zelo podoben rezultat (92,5 %) smo dobili tudi pri analizi maščobnokislinske sestave z GC-MS. Zanimivo je, da se s staranjem olja deleži maščobnih kislin večinoma ohranjajo in ostajajo konstantni, na račun vakcenske kisline se le rahlo poveča delež palmitinske in linolne kisline.

Kivi

Izmerjena vsebnost ALK v svežem vzorcu olje je bila 68,5 % in v staranem 67,4 %, kar je celo več kot navaja literatura – 58 % (27). Prisotne MK v olju so še oleinska kislina (17,5 % svež, 14,7 % staran vzorec), linolna (7,45 % svež, 10,4 % staran vzorec), palmitinska (3,41 % svež, 4,81 % staran), stearinska (2,89 % svež, 2,44 % staran) in v zelo majhnih količinah

še gondojska kislina (0,07 % svež, 0,09 % staran). V svežem vzorcu kivijevega olja smo izmerili tudi 0,1 % elaidinske kisline.

Olje kivijevih semen je bogato z esencialnimi maščobnimi kislinami, vendar je zaradi visoke vsebnosti VNMK tudi zelo občutljivo na oksidacijo in ima posledično krajši rok uporabe. Vsebnost tokoferola v olju kivijevih semen je zelo nizka, zgolj 138 mg/kg olja. Visoka vsebnost fenolnih antioksidantov v olju bi lahko zaščitila VNMK pred reakcijami oksidacije in lipidne peroksidacije in podaljšala rok uporabe olj. Hoed in Barbouche sta preučevala vpliv filtriranja hladno stiskanega olja kivijevih semen na antioksidativno delovanje olj (27). Ugotovili so, da čeprav večina hidrofilnih antioksidantov ostane po stiskanju v zaostanku, v olje vseeno preidejo nekatere fenolne komponente, karotenoidi in tokoferoli. Slednje so povezane ne zgolj z oksidativno stabilnostjo olj, temveč tudi z njihovo antioksidativno kapaciteto. Celotno antioksidativno delovanje olja je večje kot seštevek antioksidativnega delovanja posameznih skupin antioksidantov (tokoferoli, fenoli), kar lahko razjasnimo s sinergističnim delovanjem različnih skupin in antioksidativnih komponent v olju (27).

Lan

Testirali smo tri vzorce lanenega olja različnih proizvajalcev, pri katerih je bila vsebnost ALK pri svežih vzorcih med 53,3-58,1 %. Starani vzorci so imeli zelo primerljiv delež ALK, in sicer 54,1-57,7 %. Tudi tu je zanimivo, da se delež ALK po staranju ni bistveno spremenil, temveč je ostal konstanten in je v skladu z literaturnimi navedbami 39-62 % (28). Druge maščobne kisline, ki jih najdemo v lanenem olju, so naslednje: oleinska (19,7-27,0 %), linolna (8,10-13,2 %), stearinska (3,30-5,44 %), palmitinska (3,4-5,10 %) in vakkenska kislina. Po literaturnih podatkih laneno olje vsebuje poleg velikega deleža esencialnih n-3 MK tudi fitoestrogen lignan in prehranske vlaknine (2, 28).

5.2 Rezultati ugotavljanja antioksidativnega potenciala z DPPH metodo

5.2.1 Uporabnost DPPH metode

DPPH metodo uporabljamo za oceno antioksidativnega delovanja posameznih komponent ali zmesi komponent v vzorcu (29). V tej raziskavi smo jo uporabili za napovedovanje oksidativne stabilnosti rastlinskih olj. Rastlinska olja, bogata z večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami, so namreč bolj podvržena radikalskim reakcijam, kot so reakcije

lipidne peroksidacije na mestih dvojnih vezi in reakcije avtooksidacije. To vodi v izgubo kakovosti, spremembo barve, okusa, vonja in spremembo prehranske vrednosti olja (12, 20).

Antioksidativno delovanje rastlinskih olj je posledica kombiniranega delovanja številnih komponent. Največji delež prispevajo tokoferoli, sledijo tokotrienoli, karotenoidi, polarne fenolne komponente in polarni lipidi. Prispevek posamezne komponente k celokupnemu antioksidativnemu potencialu olja je odvisen od razlik v vsebnosti in sestavi lipidnih antioksidantov, polarnih bioaktivnih komponent in neumiljivih komponent, sinergističnega delovanja biaktivnih komponent in razlik v reakcijski kinetiki posameznih komponent z reagentom DPPH (20, 30).

DPPH metoda je osnovna metoda za rešetanje in iskanje novih antioksidantov iz naravnih virov, kot so začimbe, zelišča, sadje, zelenjava, nekonvencionalna rastlinska olja (12). Zaradi široke uporabnosti metode in dejstva, da metodo lahko uporabljamo tako v vodnih kot nepolarnih topilih za določitev hidrofilnih in lipofilnih antioksidantov, so v preteklosti raziskovalci uporabili zelo veliko različic metode. V protokolih so uporabili različna topila, kar onemogoča primerjavo rezultatov med različnimi študijami, saj so reakcije potekale pri različnih razmerah. Dokazano je namreč, da vrsta in količina topila, uporabljenega za raztapljanje antioksidanta, količina vode v sistemu, pH raztopine in prisotnost kovinskih ionov v sistemu bistveno vplivajo na količino nezreagirane DPPH reagenta. Že samo antioksidativno delovanje α -tokoferola je manjše v protičnih kot v aprotičnih topilih. Vodikova vez med protičnim topilom in fenolno skupino tokoferola namreč zmanjša sposobnost tokoferola, da odda proton radikalski obliki DPPH. Hitrost reakcije fenolnih antioksidantov se v odvisnosti od sestave topila lahko razlikuje tudi za dva reda velikosti. Nabor topil, uporabljenih pri izvedbi DPPH metode, je širok: etilacetat, dioksan, metanol, heksan, izopropanol, kloroform, aceton, eter, toluen, benzen, mešanice topil heksan/etil acetat/metanol (12, 13, 20, 21, 29, 30-33).

Poleg vpliva topila je DPPH reagent občutljiv tudi na svetlobo in zračni kisik, zato ga moramo vsak dan pripraviti svežega in ga shranjevati v temi. Na hitrost reakcije vpliva pH, zato so v nekaterih študijah predlagali vključitev pufrne raztopine v sistem, ki bi ohranjal ustrezen pH in sistem zaščitil pred kislinskimi nečistotami kot so ogljikov dioksid iz zraka in proste maščobne kisline iz vzorca (30).

Eden izmed razlogov, zakaj DPPH test tako široko uporabljamo, je njegova preprostost in hitra izvedba. Vzorec pomešamo z reagentom, pustimo reagirati določen čas in izmerimo padec absorbance. Vendar se že tu pojavi problem, kakšen naj bi bil inkubacijski čas. Čas, ki je potreben, da celoten DPPH reagent zreagira z antioksidanti v vzorcu, je seveda odvisen od kinetike reakcije, ta pa, kot smo že prej omenili, je odvisna od številnih dejavnikov, od katerih je najpomembnejši izbira topila. Najbolj pravilno bi bilo, da v vsakem sistemu, kjer bomo ugotavljali antioksidativno delovanje, posebej izmerimo in ugotovimo kinetiko reakcije in na podlagi rezultatov določimo čas, ki je potreben, da reakcija doseže ravnotežno stanje. Ker pa je to nadvse zamudno, rutinsko uporabljamo že vnaprej določen inkubacijski čas, ki je ponavadi 30 min, redkeje pa krajši (10 min) ali daljši (do 60 min). Praktična posledica tega je, da DPPH testi, ki jih izvajamo v različnih topilih, lahko vodijo do ogromnih variacij v poročanih vrednostih AOP za isti vzorec. Pogosto je podcenjevanje antioksidativnega potenciala, saj izmerimo absorbanco reakcijske zmesi v času, ko reakcija še ni popolnoma potekla oziroma še ni dosegla platoja – ravnotežnega stanja (29, 30).

Zaradi zgoraj naštetih razlogov bi bilo treba DPPH metodo določanja antioksidativnega delovanja različnih rastlinskih vzorcev standardizirati. S tem bi bila zagotovljena primerljivost med rezultati različnih raziskovalcev, kar bi omogočilo poglobljen vpogled v antioksidativno delovanje različnih rastlinskih olj. Razlog, zakaj je v uporabi toliko različnih topil in njihovih kombinacij, pa je preprost: največja težava pri izvedbi DPPH testa je najti ustrezno topilo, ki bo hkrati popolnoma raztapljalo DPPH reagent in željen vzorec v pravilni koncentraciji, da še zaznamo njegovo antioksidativno delovanje.

5.2.2 Optimizacija izbire topila za metodo DPPH

Zmes topil, ki smo jo izbrali za ugotavljanje antioksidativnega potenciala rastlinskih olj, je bila 2-butanon: metanol = 1: 1 (v/v). Pri izboru topila smo se sprva opirali na že objavljene študije, nato pa smo preizkusili, ali so rastlinska olja v topilih sploh lahko topna. Glavne težave, na katere smo naleteli pri izbiranju ustreznega topila, so naslednje:

1. težka topnost rastlinskega olja v topilu,
2. uporaba premajhne količine rastlinskega olja, da bi zaznali antioksidativno delovanje,
3. slaba topnost reagenta DPPH v topilu,

4. ustreza topnost tako olja kot DPPH, vendar premajhen odziv pri DPPH metodi (kinetika reakcije v topilu je premajhna za čas inkubacije 30 min).

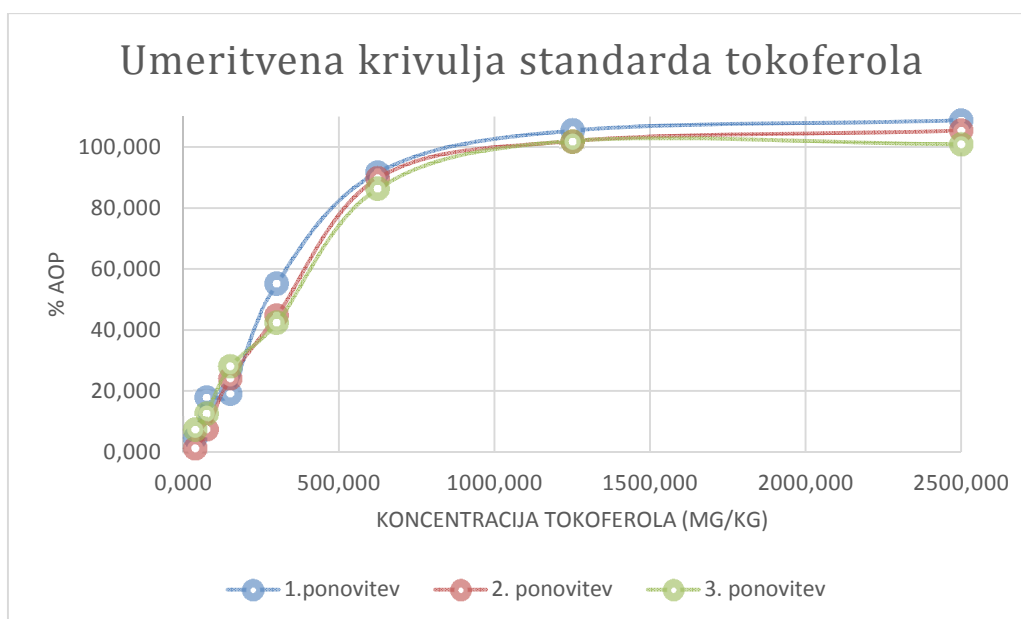
Izbrali smo 50-odstotni 2-butanon v metanolu, ki je izkazoval dobro topnost tako DPPH reagenta kot rastlinskih olj, prav tako je bil odziv metode pri uporabi galne kisline ustrežno velik.

Spodnja preglednica prikazuje rezultate antioksidativnega potenciala olja rakitovca v različnih koncentracijah: 60 mg, 40 mg in 10 mg zatehte olja. Olje rakitovca smo pri določevanju topnosti uporabili zaradi intenzivnega rumenega obarvanja, pri določevanju ustreznosti zatehte olja pa zato, ker po literaturnih navedbah vsebuje največ vitamina E. Na podlagi dobljenih rezultatov smo se odločili za končno zatehto rastlinskih olj 15 mg. S tem smo želeli zajeti tudi antioksidativno delovanje olj z manjšo vsebnostjo antioksidativno delujočih komponent.

Preglednica VII: Izmerjene absorbanse in antioksidativni potencial različnih zateht olja rakitovca

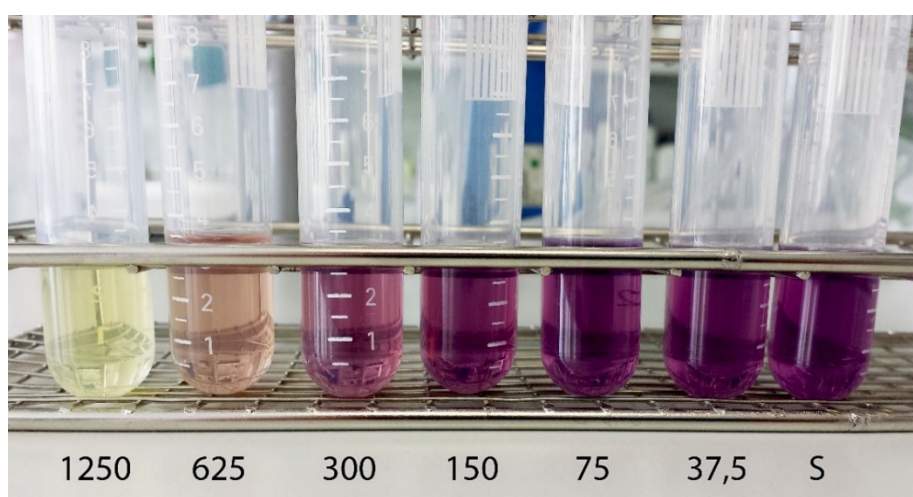
m zatehte olja rakitovca (mg)	A	AOP (%)
60,01	0,009	99,0
40,07	0,013	98,0
10,04	0,046	89,6
Slepa raztopina	0,398	/
Kontrolna raztopina galne kisline	0,005	/

V izbrani zmesi topil smo v treh ponovitvah pomerili raztopino tokoferola in narisali krivuljo, ki prikazuje odstotek antioksidativnega delovanja v odvisnosti od koncentracije tokoferola v raztopini. Zanimalo nas je, do katere koncentracije tokoferola daje naša metoda še zanesljive podatke, do kdaj je koncentracije antioksidanta še premo sorazmerna z odzivom antioksidativnega potenciala. Pri višjih vrednosti AOP DPPH reagenta zmanjka in tako vrednosti ne izražajo več realne povezave med vsebnostjo komponent, ki delujejo antioksidativno, in dobljenim številčnim rezultatom AOP. Reakcija ne poteče kvantitativno in dobljeni podatki niso relevantni.



Slika 8: Graf, ki prikazuje krivuljo standarda tokoferola: % AOP v odvisnosti od koncentracije tokoferola (mg/kg).

Ugotovili smo, da je največja koncentracija tokoferola, ki še daje zanesljive rezultate za našo metodo, 500 mg/kg. Ker pa točnih podatkov o vsebnosti tokoferolov v rastlinskih oljih nismo imeli na razpolago, antioksidativno delovanje olja pa je tudi kombinirano delovanje več posameznih sestavin olja, ne zgolj tokoferola, smo za mejo zanesljivosti postavili vrednosti AOP <80 %. Pri večjih vrednostih AOP smo uporabili manjšo količino olja in nato preračunali na zatehto olja 15 mg.



Slika 9: Standardne raztopine tokoferola po inkubaciji z DPPH reagentom

Na sliki 9 vidimo raztopine tokoferola po reakciji z DPPH reagentom in različne stopnje razbarvanja le-tega. Od leve proti desni so koncentracije: 1250 mg/kg, 625 mg/kg, 300 mg/kg, 150 mg/kg, 75 mg/kg, 37,5 mg/kg, zadnja epruveta prikazuje slepo raztopino.

Retrospektivno gledano, bi se optimizacije topil lahko lotili bolj sistematično: najprej bi testirali topnost rastlinskih olj v vseh topilih in zmesih le-teh, nato pa še topnost reagenta DPPH. Nato bi v topilih in zmesih topil, ki bi ustrezali kriterijem, pomerili standarde tokoferola v različnih koncentracijah. Problem pri začetnih meritvah je bil tudi v tem, da smo uporabili premajhno količino olja oziroma prevečkrat redčili olja, tako da se končna absorbanca vzorčne raztopine ni bistveno razlikovala od absorbance slepe raztopine. Koncentracije preizkušanih olj bi lahko po literaturnih podatkih prilagodili na 10 ali 15 mg, namesto da smo določili največjo topnost rastlinskega olja v topilu in nato uporabili to koncentracijo. Nikjer v literaturi nismo zasledili, da bi z DPPH metodo ugotavljali antioksidativni potencial v zmesi 2-butanona in metanola, ki smo jo uporabili v tej raziskavi, zato nimamo ustrezne primerjave in podatkov o kinetiki reakcije lipidnih antioksidantov z reagentom DPPH.

5.2.3 Rezultati meritev antioksidativnega potenciala

Meritve smo za vsak vzorec rastlinskega olja, svež in staran, izvedli v treh neodvisnih ponovitvah. Za končni izračuna AOP vrednosti smo uporabili povprečje treh vrednosti.

V preglednici so zbrane številčne vrednosti izračunanega antioksidativnega potenciala vzorcev svežih in staranih olj. Pri vseh vzorcih, razen pri vzorcu številka 33: španska kadulja, BaccaraRose 4505, je pri staranih oljih viden padec antioksidativnega potenciala. Pri vzorcu št. 33 je viden porast AOP za približno 10 %, kar lahko pripišemo napaki analizne metode. S staranjem olj njihov antioksidativni potencial pade. Takšna je bila tudi naša hipoteza, saj smo pričakovali, da antioksidanti, ki so naravno prisotni v rastlinskih oljih, ob izpostavitvi razmeram, ki simulirajo pospešeno staranje, reagirajo z radikalskimi molekulami in na ta način zaščitijo olje pred nadaljnjo lipidno peroksidacijo. Posledično pa se zmanjša koncentracija delujočih antioksidantov, ki bi bili na voljo za reakcijo z DPPH reagentom in vrednost AOP pri staranih oljih pade.

Naslednja preglednica prikazuje strnjene podatke in preračunan antioksidativni potencial povprečja treh meritev in relativni delež ALK in GLK za sveže in starane vzorce.

Preglednica VIII: AOP in relativni delež ALK in GLK za sveže in starane vzorce

Rastlinsko olje	Proizvajalec	Oznaka	AOP (sveži)	% GLA	% ALA	AOP (starani)	% GLA	% ALA
Boreč	Dragonspice Naturwaren	6	47,0	8,44	/	31,1	7,14	/
	Tovarna Organika	7	52,7	15,2	/	39,4	13,6	/
	Caelo	8	106	15,4	/	63,5	13,9	/
	Farmalabor	9	64,7	17,4	/	55,4	14,9	/
Črni ribez	Dragonspice Naturwaren	10	68,3	9,28	12,9	33,8	6,40	12,1
	Behawe naturprodukten	11	182	7,08	16,6	58,8	11,2	14,0
Svetlin	Dragonspice Naturwaren	24	36,4	2,73	/	5,87	2,04	/
	Farmalabor	25	33,3	2,00	/	19,7	1,43	/
	Alexmo cosmetics	26	38,1	4,88	/	11,2	3,43	/
	Caelo	27	127	4,39	/	90,7	3,03	/
Španska kadulja	BaccaraRose 3291	31	57,2	/	66,6	23,9	/	69,0
	Dragonspice Naturwaren	32	76,5	/	66,7	60,8	/	66,1
	BaccaraRose 4505	33	46,1	/	67,5	55,9	/	66,3
Črna kopriva	BaccaraRose	34	55,2	/	67,5	27,3	/	67,5
Črna kumina	Caelo	35	105	/	/	71,5	/	/
Inkovska plukenecija	Magnolija	36	136	/	49,0	92,6	/	48,2
Kivi	Dragonspice Naturwaren	37	76,8	/	68,5	54,5	/	67,4
Lan	BaccaraRose	38	55,3	/	58,0	40,9	/	57,4
	Farmalabor	39	44,1	/	58,1	25,0	/	57,7
	Caelo	40	42,5	/	53,3	30,0	/	54,1

5.2.4 Vpliv rafiniranja in stabilizacije olj z dodatkom tokoferola

Rafinirana vzorca sta bila boreč Caelo – 8 in svetlin Caelo – 27. Vzorec številka 8 je bil po navedbah na primarni ovojnini poleg rafiniranja še dodatno stabiliziran z 0,1 % tokoferola, vzorec številka 27 pa je bil dodatno stabiliziran z 0,2 % tokoferola. Pri obeh vzorcih, 8 in 27, se to odraža v zelo visokem antioksidativnem potencialu svežih vzorcev in manjšem padcu AOP po staranju olja. Tudi zmanjšanje relativnega deleža GLK je bilo minimalno, vendar je bil ta trend viden tudi pri drugih, nerafiniranih vzorcih brez dodatka tokoferola, zato ne moremo predpostaviti, da imata rafiniranje in dodatek stabilizatorja bistven vpliv na konstantnost deležev posameznih maščobnih kislin tekom staranja.

5.2.5 Primerjava med različnimi proizvajalci istovrstnih olj

Boreč: Testirali smo štiri različne vzorce borečevih olj proizvajalcev Dragonspice Naturwaren, Tovarna Organika, Caelo in Farmalabor. Največjo vsebnost GLK je tako v svežih kot staranih vzorcih izkazovalo olje Farmalabor (17,4 % svež, 14,5 % staran).

Največji antioksidativni potencial je po pričakovanjih imel vzorec borečevega olja Caelo, ki je, kot smo že prej omenili, rafiniran in stabiliziran z dodatkom 0,1 % tokoferola. Zanimivo je tudi, da se vsebnost določene GLK v svežem vzorcu Dragonspice Naturwaren (8,44 %) in svežem vzorcu Farmalabor (17,4 %) razlikuje za skoraj 10 %. To lahko predpišemo tako različnemu načinu ekstrakcije olja, različnim razmeram med rastjo boreča, iz katerega so pridobili olje, kot različno dolgem času shranjevanja olja in različnemu datumu pridelave olja. Na originalni ovojnini olj so bili namreč navedeni le roki uporabnosti olj, ne pa tudi dejanski datumi oziroma meseci pridelave olja.

Črni ribez: Preizkušali smo vzorca olja črnega ribeza dveh nemških proizvajalcev, Dragonspice Naturwaren in Behawe Naturprodukten. Slednjemu smo z DPPH metodo določili bistveno večji antioksidativni potencial (182 %, svež vzorec) kot vzorcu Dragonspice Naturwaren (68,3 %, svež vzorec). Pri obeh vzorcih pa s staranjem antioksidativni potencial olja močno pade, pri vzorcu Behawe na 58,8 %, pri vzorcu Dragonspice pa na zgolj 33,8 %.

Svetlin: Za testiranje smo imeli na voljo 4 različna svetlinova olja. Eden izmed njih, vzorec Caelo, je bil, kot smo že omenili, rafiniran in stabiliziran z dodatkom 0,2 % tokoferola. Njegova vrednost AOP svežega olja je zato kot pričakovano najvišja, 127 %, ki tudi po staranju olj bistveno ne pade – 90,7 %. Olja ostalih treh proizvajalcev, Dragonspice Naturwaren, Farmalabor in Alexmo cosmetics, imajo zelo primerljive vrednosti AOP za sveža olja, med 33,3 % in 38,1 %. Padec AOP po staranju je najbolj viden pri vzorcu Dragonspice, ki pade kar na 5,9 %, sledi mu vzorec Alexmo, kateremu vrednost pade na 11,2 %. Vzorcju Farmalabor se AOP s staranjem še najmanj spremeni, in sicer s 33,3 na 19,7 %.

Španska kadulja: Pri vzorcih olj španske kadulje smo imeli na voljo dva vzorca istega proizvajalca BaccaraRose, vendar z različnima serijskima številka. Odločili smo se, da med seboj primerjamo tudi ta dva vzorca, da vidimo, kakšna je ponovljivost med serijami. Za kontrolo smo imeli še vzorec drugega proizvajalca Dragonspice Naturwaren. Antioksidativni potencial vzorcev BaccaraRose se je kar precej razlikoval. Sveži vzorec 3291 je imel AOP vrednost 57,2 %, vzorec 4505 pa 46,1 %. Vendar je zanimivo, da je vzorec 3291 s staranjem precej bolj izgubil na antioksidativnem delovanju (23,9 %) kot vzorec 4505, pri katerem se je vrednost AOP celo povečala (55,9 %). Povečanje lahko pripišemo

tudi napaki analizne metode, ki je v okviru 10 %. Vzorec Dragonspice Naturwaren je imel najvišjo vrednost AOP, tako pri svežem (76,5 %) kot pri staranem vzorcu olja (60,8 %).

Lan: Testirali smo tri različna lanena olja proizvajalcev BaccaraRose, Farmalabor in Caelo. Vrednosti AOP svežih olj so med vsemi tremi proizvajalci precej primerljive, in sicer BaccaraRose 55,3 %, Farmalabor 44,1 % in Caelo 42,5 %. Starani vzorci imajo naslednje vrednosti AOP: BaccaraRose 40,9 %, Farmalabor 25,0 %, Caelo 30,0 %.

Vzorci rastlinskih olj črne koprive, črne kumine, inkovske plukenecije in kivija smo testirali samo v eni parareli, zato primerjave med posameznimi proizvajalci olj ne moremo izvesti.

5.3 Vpliv staranja olj na njihovo barvo in vonj

Olja smo en teden izpostavili zračnemu kisiku, zračni vlagi, sončni svetlobi in povišani temperaturi. S testom pospešenega staranja olj smo želeli preučiti vpliv shranjevanja olj na njihovo kakovost, sestavo in hranilno vrednost. Pri oljih, ki se uporabljajo kot prehranska dopolnila ali sestavine kozmetičnih preparatov, namreč ni strogih zahtev glede shranjevanja in transporta. Vzorce smo sicer shranjevali na temnem, v hladilniku, vendar ne vemo, kaj se je predhodno dogajalo z njimi - ne moremo zagotoviti poteka hladne verige. Prav tako na olja tekom shranjevanja vpliva primarna, stična ovojnina. Večina vzorcev je bila pakiranih v temnih stekleničkah, vzorec 7, boreč Tovarna Organika je bil zapakiran v plastenki.

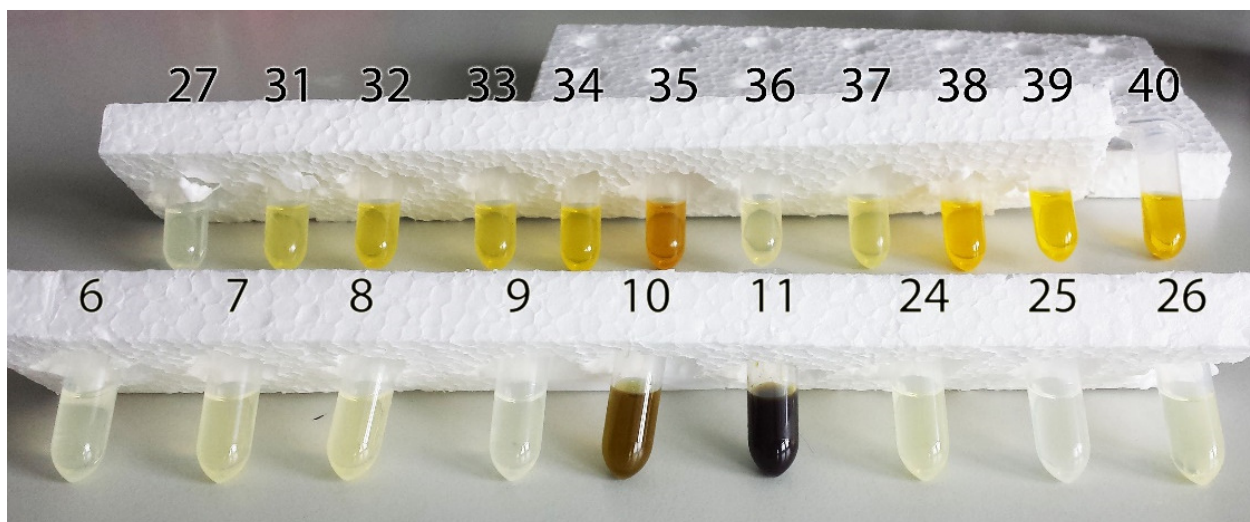
5.3.1 Spremljanje barve in vonja svežih in staranih vzorcev

Ker se med shranjevanjem do roka uporabnosti rastlinskih olj ne spreminja samo njihova kemična sestava, temveč tudi njihove organoleptične lastnosti, smo spremljali vonj vzorcev olj pred in po staranjem. Sveža olja so imela po večini prijeten, svež vonj. Vonj nas je spominjal na seno, sveže pokošeno travo, zemljo. Izjema sta vzorca olja črnega ribeza, 10 in 11, ki sta imela izrazit sadni vonj po ribezovem soku. Vzorca olj španske kadulje so imeli značilen morski vonj po ribah, pristanišču.

Vsa starana olja so imela neprijeten, oljnat vonj po žarkem. Izrazito neprijeten, smrdeč vonj so imeli vsi vzorci razen vzorcev številka 6, 7 in 27. Vzorec 27 je verjetno ohranil prijeten vonj, saj je bil rafiniran in dodatno stabiliziran z dodatkom 0,2 % tokoferola, ki je vzorec zaščitil pred kvarjenjem maščob in lipidno peroksidacijo.

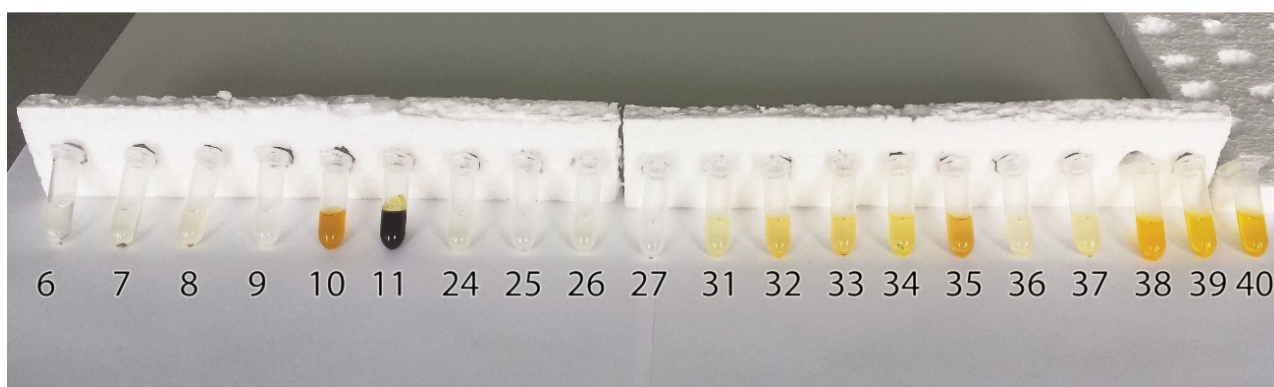
Na naslednji sliki so prikazani vzorci svežih olj. Barve posameznih vzorcev se močno razlikujejo, borečova olja (6-9) so rahlo rumenkasto obarvana, medtem ko sta vzorca črnega

ribeza obarvana intenzivno rjavo in črno (10, 11). Svetlinova olja (24-27) so skoraj popolnoma brezbarvna, olja španske kadulje (31-33) pa je podobno kot olje črne koprive (34) rumene barve. Olje črne kumine (35) je intenzivne oranžne barve. Olje inkovske plukenečije (36) je rahlo rumenkasto, prav tako olje kivija (37), ki je malo močnejše rumene barve. Lanena olja (38-40) so intenzivno rumene barve.



Slika 10: Vzorci svežih olj z dopisanimi številčnimi oznakami.

Na naslednji sliki vidimo prikazane vzorce olj po enotedenski izpostavitvi zunanjim razmeram okolja. Kot vidimo, se barve posameznih vzorcev niso bistveno spremenile, izjema je vzorec številka 10 (črni ribez Dragonspice Naturwaren), ki je obledel, kar je verjetno posledica razpada pigmentov, prisotnih v olju.



Slika 11: Vzorci staranih olj z dopisanimi številčnimi oznakami.

5.4 Uporaba preiskovanih rastlinskih olj kot dopolnilo k prehrani

Hladno stiskana olja ali superkritični izvlečki (z ogljikovim dioksidom) eksotičnih, nenavadnih rastlin, kot so inkovska plukenecija, španska kadulja, črna kumina in kivi, zadnje čase pridobivajo na popularnosti kot dodatek v prehrani, pogosto pa so tudi uporabljeni v kozmetičnih izdelkih za nego kože ali las.

Ob upoštevanju posameznikovega dnevnega vnosa nasičenih in nenasičenih maščob ter njihovem pravilnem odmerjanju so rastlinska olja lahko kakovostno prehransko dopolnilo zlasti pri ljudeh, ki ne uživajo morske hrane ali ribjega olja. Z rednim zauživanjem predvsem ALK, ki se kasneje metabolizira v EPK in DHK, zadostimo dnevnim potrebam po višjih večkrat nenasičenih MK in tako zmanjšamo tveganje za nastanek in poslabšanje vnetnih in srčnožilnih bolezni. Pri odmerjanju olja moramo upoštevati posameznikov dnevni vnos lipidov, trigliceridov in nasičenih in nenasičenih maščobnih kislin (8).

Poudarek pri uživanju rastlinskih olj v obliki prehranskih dopolnil mora biti na kakovostnem izdelku in sicer moramo biti pozorni na: ustrezno kakovost vstopnih surovin – rastlinskega materiala, pravilno pridobivanje, ustrezno kakovost primarne stične ovojnine ter ustrezno hranjenje izdelka tekom transporta do končnega uporabnika.

Ob pravilnem pridobivanju in hranjenju olja, pri katerem izpostavljenost olja svetlobi, vlagi, zračnemu kisiku in drugim dejavnikom okolja poskušamo zmanjšati na minimalno, so olja relativno stabilna in uporabna v predpisanem roku uporabe. Ta rok uporabe je navadno precej kratek, saj so večkrat nenasičene MK nestabilne in podvržene reakcijam oksidacije.

6. SKLEP

V raziskovalnem delu smo ugotavljali maščobnokislinsko sestavo izbranih rastlinskih olj, ki so bogata z ALK in/ali GLK. Ta rastlinska olja so borečevo, laneno, svetlinovo, olje črnega ribeza, črne koprive, črne kumine, kivija, inkovske plukenecije in španske kadulje. Izbrane vzorce rastlinskih olj različnih proizvajalcev smo z metodo »*in situ*« preestrenja pretvorili v metilne estre maščobnih kislin in jih ločili in analizirali s tehniko plinske kromatografije sklopljene z masno spektrometrijo. Vsa testirana olja razen olja črne kumine vsebujejo ALK v koncentraciji nad 50 %, GLK ali celo oboje, kot na primer olje črnega ribeza. Olje črne kumine ALK in GLK ne vsebuje, za razliko od ostalih vzorcev pa vsebuje miristinjsko kislino.

Olja z visoko vsebnostjo večkrat nenasičenih maščobnih kislin, kakršni so analizirani vzorci, so zaradi prisotnosti dvojnih vezi v strukturi bolj podvržena oksidativnem kvarjenju in reakcijam lipidne peroksidacije. Kljub temu prisotnost naravnih antioksidantov, kot so tokoferoli, flavonoidi in fenoli, v vzorcih rastlinskih olj do neke mere ščitijo olja pred kvarjenjem in ohranjajo deleže posameznih maščobnih kislin pretežno konstantne.

Vzorci olj smo en teden izpostavili simuliranim razmeram pospešenega staranja, zračni vlagi, zračnemu kisiku, svetlobi in povišani temperaturi. Nato smo svežim in staranim vzorcem rastlinskih olj z DPPH metodo ugotovili antioksidativno delovanje. DPPH metodo smo optimizirali z uporabo do sedaj v literaturi še ne omenjene 1:1 (v/v) zmesi 2-butanona in metanola. Za izbrano zmes topil smo se odločili na podlagi najboljše topnosti olja in najboljšega odziva metode z meritvami raztopin tokoferola in računanja umeritvene krivulje. Ugotovili smo, da se pojavlja potreba po standardizaciji metode ugotavljanja antioksidativnega delovanja z reagentom DPPH. Ker je kinetika reakcije spojnin, ki izkazujejo antioksidativno delovanje, z reagentom DPPH v veliki meri odvisna od izbire topila, v katerem poteka reakcija, raznovrstnost uporabljenih topil v številnih preteklih študijah onemogoča kvantitativno primerjavo rezultatov posameznih raziskovalcev med seboj.

Po pričakovanjih je antioksidativni potencial staranih vzorcev v primerjavi z antioksidativnim potencialom svežih vzorcev bistveno padel. Naša hipoteza je bila, da naravno prisotni antioksidanti v rastlinskih oljih, kot so tokoferoli, reagirajo z radikalskimi molekulami in na ta način zaščitijo lipidne molekule. Pričakovali smo tudi, da se bo delež

večkrat nenasičenih MK, kot sta ALK in GLK, s staranjem zmanjšal, vendar se je pri večini vzorcev relativni delež posameznih MK ohranil in ostal primerljiv tako pred kot tudi po staranju vzorcev.

V nadaljnjih raziskavah bi bilo zanimivo kvantitativno ugotoviti vsebnost tokoferolov in rastlinskih sterolov v rastlinskih oljih ter dobljene podatke navezati na celokupno antioksidativno delovanje olj. Prav tako bi bilo zanimivo raziskati celoten profil neumiljivih frakcij preučevanih rastlinskih olj, kvantificirati vsebnost hidrofilnih fenolnih antioksidantov in proučiti njihov prispevek k antioksidativnem delovanju olja.

7. LITERATURA

1. Montserrat-de la Paz S, Fernandez-Arche M A, Angel-Martin M, Garcia-Gimenez M D: Phytochemical characterization of potential nutraceutical ingredients from Evening Primrose oil (*Oenothera biennis* L.). *Phytochemistry Letters*, Vol. 8, 2014: 158-162.
2. W.S. Choo, J. Birch, J.P. Dufour: Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed flaxseed oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol. 20, 2007: 202-211.
3. Calder P C: Fatty acids and inflammation: The cutting edge between food and pharma. *European Journal of Pharmacology*, Vol. 668, 2011: S50-S58.
4. Christie W W: *Gas Chromatography and Lipids*, Oily Press Ltd., 1989.
5. Kim K-B, Nam YA, Kim HS, Hayes AW, Lee B-M: α -Linolenic acid: Nutraceutical, pharmacological and toxicological evaluation. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 70, 2014: 163-178.
6. Barcelo-Coblijn G, Murphy EJ: Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: Benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Progress in Lipid Research*, Vol. 48, 2009: 355-374.
7. Goffman F D, Galleti S: Gamma-Linolenic acid and tocopherol contents in the seed oil of 47 accessions from several ribes species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol 49, 2001: 349-354.
8. Russo G L: Dietary n - 6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochemical Pharmacology*, Vol. 77, 2009: 937-946.
9. Michas G, Micha R, Zampelas A: Dietary fats and cardiovascular disease: Putting together the pieces of a complicated puzzle. *Atherosclerosis*, Vol 234, 2014: 320-328.
10. Pan A, Chen M, Chowdhury R, Wu JHY, Sun Q, Campos H, Mozaffarian D, Hu FB: α -Linolenic acid and risk of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr*, Vol. 96, 2012: 1262-1273.
11. Ribarič S. *Temelji patološke fiziologije*, 2. izdaja. Poglavje Vnetje, U. Kovačič. 2011: 45-52.

12. Lee JM, Chung H, Chang P S, Lee J: Development of a method predicting the oxidative stability of edible oils using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH). *Food Chemistry*, Vol. 103, 2007: 662-669.
13. Kedare S B, Singh R P: Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*, Vol. 48 (4), 2001:412-422.
14. Park P W and Goins R E: *In situ* Preparation of Fatty Acid Methyl Esters for Analysis of Fatty Acid Composition in Foods. *Journal of Food Sciences*, Vol. 59, No. 6, 1994: 1262-1266.
15. Skoog D A, Holler F J, Crouch S R: Principles of Instrumental Analysis, 27. poglavje: Gas Chromatography, 6th Edition, 2007: 788-810.
16. Guil-Guerrero J: Common mistakes about fatty acids identification by gas-liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol 33, 2014: 153-154.
17. Skoog D A, Holler F J, Crouch S R: Principles of Instrumental Analysis, 20. poglavje: Molecular Mass Spectrometry, 6th Edition, 2007: 550-584.
18. Skoog D A, Holler F J, Crouch S R: Principles of Instrumental Analysis, 11. poglavje: Atomic Mass Spectrometry, 6th Edition, 2007: 281-301.
19. Fundamentals of GC/MS
<http://www.shimadzu.com/an/gcms/support/fundamentals/index.html>, datum dostopa: 8.4.2015
20. Ramadan M F, Mörsel J T: Screening of the antiradical action of vegetable oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol. 19, 2006: 838-842.
21. Ramadan M F, Kinni S G, Rajanna L N, Seetharam Y N, Seshagiri M, Mörsel J T: Fatty acids, bioactive lipids and radical scavenging activity of *Celastrus paniculatus* Wild. seed oil. *Scientia Horticulturae*, Vol. 123, 2009: 104-109.
22. Peiretti P, Gai F: Fatty acid and nutritive quality of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds and plant during growth. *Animal Feed Science and Technology*, Vol. 148, 2009: 267-275.
23. Gu H B, Ma X-Y, Wu J-B, Zhang Q, Yuan W-B, Chen Y-P: Concentration of α -Linoleic Acid of Perilla Oil by Gradient Cooling Urea Inclusion. *Agricultural Sciences in China*, Vol. 8 (6), 2009: 685-690.
24. Lutterodt H, Luther M, Slavin M, Yin J, Parry J, Gao J, Yu L: Fatty acid profile, thymoquinone content, oxidative stability, and antioxidant properties of cold-pressed

- black cumin seed oils. *LWT- Food Science and Technology*, Vol. 43, 2010:1409-1413.
25. Gonzales G F, Gonzales C: A randomized, double-blind placebo-controlled study on acceptability, safety and efficacy of oral administration of sacha inchi oil (*Plukenetia volubilis* L.) in adult human subjects. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 65, 2014:168-176.
26. Fanali C, Dugo L, Cacciola F, Beccaria M, Grasso S, Dacha M, Dugo P, Mondello L: Chemical Characterization on Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 59, 2012: 13043-13049.
27. Van Hoed V, Barbouche I, De Clercq N, Dewettinck K, Slah M, Leber E, Verhe R: Influence of filtering cold pressed berry seed oils on their antioxidant profile and quality characteristics. *Food Chemistry*, Vol. 127/4, 2001: 1848-1855.
28. Sun X, Zhang L, Li P, Xu B, Ma F, Zhang Q, Zhang W: Fatty acid profiles based adulteration detection for flaxseed oil by gas chromatography mass spectrometry. *Food Science and Technology*, Vol. 63/1, 2015: 430-436.
29. Dawidowicz A L, Wianowska D, Olszowny M: On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). *Food Chemistry*, Vol. 131, 2012: 1037-1043.
30. Prevc T, Šegatin N, Poklar Ulrich N, Cigić B: DPPH assay of vegetable oils and model antioxidants in protic and aprotic solvents. *Talanta*, Vol. 109, 2013: 13-19.
31. Espin J C, Soler-Rivas C, Wichers H J: Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fraction using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radikal. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 48, 2000: 648-656.
32. Arranz S, Cert R, Perez-Jimenez J, A. Cert A, Saura-Calixto F: Comparison between free radical scavenging capacity and oxidative stability of nut oils. *Food Chemistry*, Vol. 110, 2008: 985-990.
33. Iwatsuki M, Tsuchiya J, Komuro E, Yamamoto Y, Niki E: Effects of solvents and media on the antioxidant activity of α -tocopherol. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol 1200, Issue 1, 1994: 19-26.

8. PRILOGA

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

Certificate of Composition

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

CATALOG NO.: 18919-1AMP

MFG. DATE: Jan 2012

LOT NO.: LB-89551

EXP. DATE: Jan 2015

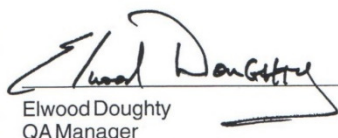
ANALYTE	CAS NO.	PURITY (1)	WEIGHT% (2)	SUPELCO LOT NO.
MYRISTOLEIC ACID METHYL ESTER	56219-06-8	99.9	2.00	LB87592
CIS-10-PENTADECENOIC ACID METH	90176-52-6	99.0 (a)	2.00	LB84963
LINOLELAIDIC ACID METHYL ESTER	2566-97-4	99.9	2.00	LB67773
GAMMA-LINOLENIC ACID METHYL ES	16326-32-2	99.9	2.00	LB85406
METHYL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

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

(a) Resale Item.

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

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



Elwood Doughty
QA Manager

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



595 North Harrison
16823-0048 USA • PI

Certificate of Composition

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

CATALOG NO.: 18919-1AMP

MFG. DATE: Jan 2012

LOT NO.: LB-89551

EXP. DATE: Jan 2015

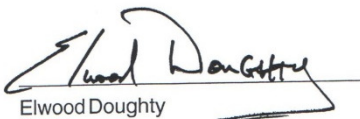
ANALYTE	CAS NO.	PURITY (1)	WEIGHT% (2)	SUPELCO LOT NO.
TRANS-9-ELAIDIC METHYL ESTER	1937-62-8	99.9	2.00	LB73439
METHYL LINOLENATE	301-00-8	99.9	2.00	LB84165
METHYL EICOSENOATE	2390-09-2	97.8	2.04	LB84595
CIS-10-HEPTADECENOIC ACID METH	75190-82-8	99.9	2.00	LB86712
CIS-11,14-EICOSADIENOIC ACID M	2463-02-7	99.9	2.00	LB81408
CIS-11,14,17-EICOSATRIENOIC AC	55682-88-7	99.9	2.00	LB86027
CIS-8,11,14-EICOSATRIENOIC ACI	21061-10-9	99.9	2.00	LB86226
CIS-13,16-DOCOSADIENOIC ACID M	61012-47-3	99.9	2.00	LB87399

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

(a) Resale Item.

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

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


Elwood Doughty
QA Manager

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

595 North Harris
16823-0048 USA